

原 著

動脈硬化抑制に関わるAT₁受容体拮抗薬 とエストロゲンの作用機序： 酸化ストレスに対する相互作用を中心に

津田 昌宏

Mechanism of Inhibitory Action of AT₁ Receptor Blocker and Estrogen on Atherosclerosis

Masahiro Tsuda (Department of Nephrology, Saitama Medical School, Moroyama, Iruma-gun, Saitama, 350-0495, Japan)

In the present study, we investigated a gender difference of atherosclerotic changes induced in apoE-deficient (ApoEKO)mice, focusing on oxidative stress, and the possible interaction between olmesartan, an AT₁ (angiotensin type 1 receptor) blocker (ARB), and estrogen. After treatment with high cholesterol diet (HCD) for 6 weeks, apparent atherosclerotic lesion formation including lipid deposition and increase in superoxide production and p47^{phox} expression were observed in ApoEKO mice. These changes were significantly greater in male than in female mice, although plasma cholesterol level was not different. Preceding ovariectomy enhanced atherosclerotic lesion and oxidative stress 6 weeks after HCD. The changes in ovariectomized mice were reversed by 17 β -estradiol (80 μ g/kg/day) replacement. On the other hand, olmesartan (3 mg/kg/day) inhibited both atherosclerosis and oxidative stress observed in ApoEKO mice treated with HCD. The inhibitory effect of olmesartan on atherosclerosis was significantly stronger in female than in male and ovariectomized ApoEKO mice. Neither the smaller dose of estrogen (20 μ g/kg/day) nor olmesartan (0.5 mg/kg/day) influenced atherosclerosis and oxidative stress. However, co-administration of olmesartan and estrogen at these smaller doses attenuated atherosclerosis as well as oxidative stress. We further investigated interaction between AT₁ receptor stimulation and estrogen on NADPH oxidase activity using cultured VSMC, which mainly was expressed AT₁ receptor. The NADPH oxidase activity in cultured VSMC was increased by Angiotensin II. 17 β -estradiol attenuated NADPH oxidase activity induced by angiotensin II without affecting the expression of AT₁ receptor. These results indicate that estrogen enhances the inhibitory effect of AT₁ receptor blocker on atherosclerosis. Our results also suggest that estrogen and ARB act synergistically to inhibit oxidative stress, by attenuating NADPH oxidase activity.

Keywords: atherosclerosis, estrogen, AT₁ receptor blocker, NADPH oxidase

J Saitama Med School 2005;32:1-11

(Received November 23, 2004)

緒 言

高脂血症、糖尿病および喫煙は心血管危険因子としてよく知られている^{1,2)}。それらは血管壁での細胞レドックス状態を変化させ内皮細胞機能不全や動脈硬化を促進する。これら心血管危険因子による共通の機序として初期に酸化ストレスが関与し、血管の炎症を引き起こすと考えられている。活性酸素種の過剰産生を含む酸化ストレスは、血管平滑筋細胞の肥大や増殖、細胞間物質の遊走及び調節にかかわっており³⁻⁵⁾、動脈硬化症、血管再狭窄、糖尿病や高血

圧に伴う血管障害を引き起こす原因の一つである⁶⁾。NADPH oxidaseは、NADHあるいはNADPHを電子供与体として用い、酸素に一電子還元する化学反応を触媒することでsuperoxideを産生させる⁷⁾。また、血管平滑筋細胞において、NADPH oxidaseは細胞膜サブユニットであるnox1, nox4, p22^{phox}と細胞質内サブユニットであるp47^{phox}及びrac-1からなっておりそれらの複合体がNADPH oxidaseとして働く⁸⁾。

アンジオテンシンII (Ang II) は局所的血管障害にも重要な役割を担っており⁹⁾、またAng IIは酸化ストレスの主要な伝達因子としてAT₁受容体を介してNADPH oxidaseを活性化させることでsuperoxideの産生をきたす^{10, 11)}。一方、疫学や臨床試験での成績は

エストロゲンが心血管保護作用を有することを示している¹²⁻¹⁴。エストロゲン補充療法は更年期女性での心血管疾患の発生を抑制し¹⁴，血中LDLコレステロール値を低下させHDLコレステロール値を増加させる¹⁵。しかし，その作用機序については充分には明らかにされておらず，脂質代謝以外作用を有する可能性も考えられる。

本研究においてはこれまでの報告をもとに，動脈硬化性病変形成におけるエストロゲンの役割について，特にAT₁受容体拮抗薬（ARB）との相互作用に注目しながら，動脈硬化症のモデルであるapolipoprotein E遺伝子欠損（ApoEKO）マウスを用いて酸化ストレスへの影響を中心に検討すると共に，NADPH oxidase活性に対するエストロゲンの作用機序と，AT₁受容体刺激との関連について，培養血管平滑筋細胞を用いて検討した。

方 法

動物及び薬物投与

本実験では動脈硬化症モデルである6週齢成熟ApoEKOマウス（The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME）を用いた。全ての動物実験は埼玉医科大学動物実験委員会の承諾を得，愛媛大学動物実験指針に準拠して行った。動物は，6週齢から標準食（MF, Oriental Yeast Co. Ltd.）あるいは高コレステロール食（1.25 % cholesterol, 10 % coconut oil in MF）で6週間飼育した。両側卵巣摘出は高コレステロール食開始48時間前に施行した。17 β -estradiol（Sigma Chemical Co., St. Louis, MO）（20あるいは80 μ g/kg/day）はpropylene glycolで溶解し皮下投与した。ARBであるOlmesartan（RNH-6270, 三共株式会社より供与）はosmotic minipump（Alzet model 1002, DURECT Corporation, Cupertino, CA）を用いて0.5あるいは3.0 mg/kg/dayの用量で腹腔内投与した¹⁶。血中コレステロール値はcholesterol oxidase法（Cholesterol E-test, WAKO Chemical Industries, Ltd., Tokyo）を用いて，組織Ang IIはPeninsula Laboratories Kit（Peninsula Laboratories, Inc）を用いてそれぞれ測定した¹⁷。

動脈硬化性病変の測定

近位大動脈の凍結切片を作成し，Elastica van Gieson染色を用い，病変サイズは画像解析ソフトDensitograph Imaging Software（ATTO Corporation, Tokyo, Japan）を用いて算出し，脂肪沈着は，oil red-O染色後同じく画像解析ソフトを用いて算出した¹⁸⁻²⁰。

Superoxide産生

Superoxide産生は，近位大動脈の新鮮凍結切片を作成し，これをdihydroethidium（DHE; 10 μ mol/L）と共に遮光した加湿チェンバー内で37 $^{\circ}$ C，30分間インキュベートし，superoxideをethidiumの赤色蛍光として検出した^{21, 22}。

NADPH oxidase 活性

大動脈サンプルは内皮を傷つけないように迅速に摘出し，氷冷したTris-sucrose buffer（10 mM Tris pH 7.1, 340 mM sucrose, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10 μ g/mL aprotinin）500 mLでホモジナイズし，30分間抽出した。さらにサンプルを遠心（15,000 g, 10 min, 4 $^{\circ}$ C）し，上清（20 μ g protein）に78 μ M cytochrome C（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO），100 μ M NADPH（Sigma-Aldrich）を加え，1000 U/mL superoxide dismutase（SOD）（Sigma-Aldrich）存在下及び，非存在下で37 $^{\circ}$ C，60分間インキュベート後，吸光度を測定した。NADPH oxidase活性はSODの存在，非存在下での吸光度より算出した²³。

Real Time RT-PCR

大動脈サンプルよりRNAを抽出し，reverse transcriptionを行ったのち，定量的polymerase chain reactionをSYBR green Iキット（MJ Research, Inc., Waltham, MA）を用いて行った。

PCRプライマーは，

p47^{phox}: 5'-GTCCCTGCATCCTATCTGGA-3' (forward)
5'-GGGACATCTCGTCCTCTTCA-3' (reverse),
AT₁受容体: 5'-GTTCTGCTCACGTGCTCA-3' (forward)
5'-CATCAGCCAGATGATGATGC-3' (reverse),
 β -actin: 5'-CCTGTATGCCTCTGGTCGTA-3' (forward)
5'-CCATCTCCTGCTCGAAGTCT-3' (reverse) を用いた。

血管平滑筋細胞培養と受容体結合能測定

成熟Sprague-Dawleyラット大動脈血管平滑筋細胞（VSMC）は以前の報告のように準備し培養を行った²⁴⁻²⁶。今回の実験では5から7継代したsubconfluent VSMCを用いた。AT₁やAT₂のreceptor bindingはHayashidaらの報告に従い測定した²¹。すなわち，1 μ mol/L valsartanあるいは1 μ mol/L PD12319（Research Biochemical International）存在，非存在下で¹²⁵I-[Sar¹, Ile⁸] Ang II（Du Pont NEN Research Product）と伴に37 $^{\circ}$ C，1時間培養した後で，結合した放射活性を測定した。AT₁ receptor bindingは総カウント量とvalsartanと一緒に培養したサンプルのカウント量間の差を用いて，AT₂ receptor bindingは総カウント量からPD12319存在下でのカウント量を差引きして算出した。

培養VSMCにおけるNADPH oxidase活性測定

VSMCは24時間無血清で培養して静止状態とした後，培養液とAng II（Sigma Chemical Co., St. Louis, MO），17 β -estradiol（Sigma Chemical Co.）を添加した。NADPH oxidase活性は5 μ mol/Lのlucigeninを用いて測定した⁵。化学発光はluminometer（AB-2200, ATTO Corporation, Tokyo, Japan）で5分間測定した。

統計処理

本文と図表では平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。データの検定は2元分散分析（ANOVA）を用いた。有意差が

ある時は、グループ間の差を検出するため Newman-Keuls 検定を施行した。危険率は 5% 未満を統計学的に有意とみなした。

結 果

ApoEKO マウスにおける動脈硬化性病変の性差

高コレステロール食投与 6 週間後で、対照群に比べ著しい血中コレステロール値の上昇が認められた (雄性マウス 対照群: 46 ± 3.6 mg/dL, 比較群: 1684 ± 96.0 mg/dL, 雌性マウス 対照群: 46.6 ± 3.6 mg/dL, 比較群: 1592 ± 79.0 mg/dL). 近位大動脈においては、高コレステロール食投与 6 週間で脂肪沈着を伴う動脈硬化性病変形成が認められた。この動脈硬化性病変は雄性マウスに比べ雌性マウスにおいて有意に減弱していた (Fig. 1). さらに、雌性マウスでは卵巣摘出により近位大動脈での脂肪沈着を伴う動脈硬化性病変形成は対照群に比べ増加を認めた (Fig. 2). 卵巣摘出による変化は 17β -estradiol 投与により、用量依存性に抑制された (Fig. 2). 血中エストロゲン濃度は対照群で 224.6 ± 16.8 pg/mL であり、卵巣摘出により著明な血中エストロゲン濃度の低下を認めた (卵巣摘出群: 54.6 ± 2.6 pg/mL). この血中エストロゲン濃度は、雄性マウス (55.0 ± 5.1 pg/mL) とほぼ同レベルまで低下していた。さらに、エストロゲン投与は、血中エストロゲン濃度を 85.5 ± 2.8 pg/mL ($20\text{ }\mu\text{g/kg/day}$ 投与), 193.3 ± 3.7 pg/mL ($80\text{ }\mu\text{g/kg/day}$ 投与) と増加させ、 $80\text{ }\mu\text{g/kg/day}$ 投与で正常雌性マウスとほぼ同レベルまでの回復を認めた。血中コレステロール値は両側卵巣摘出とエストロゲン投与による影響は認めなかった (卵巣摘出群: 1536 ± 65 mg/dL, エストロゲン投与群: 1557 ± 57 mg/dL). また、卵巣摘出及びエストロゲン投与は血圧には影響を与えず (対照群: 118.6 ± 6.1 mmHg, 卵巣摘出群: 111.2 ± 3.9 mmHg, エストロゲン投与群: 112.1 ± 6.8 mmHg), 組織 Ang II についても、卵巣摘出とエストロゲン投与共に正常雌性マウスと同レベルであった (雌性マウス: 59 ± 5.0 pg/mg protein, 卵巣摘出群: 57 ± 7.0 pg/mg protein, エストロゲン投与群 ($80\text{ }\mu\text{g/kg/day}$): 58 ± 1.0 pg/mg protein).

動脈硬化に対する 17β -estradiol と olmesartan の相互作用

3 mg/kg/day の olmesartan 投与により、雌雄ともに明らかな脂肪沈着を伴う動脈硬化性病変形成の抑制を認めた (Fig. 1). 比較的低用量である Olmesartan (0.5 mg/kg/day) の投与では雌性マウスにおいてのみ明らかな減少を認めたが、雄性マウス、卵巣摘出雌性マウスではこれらの変化はほとんど認めなかった。 (Fig. 1). さらに単独投与では脂肪沈着と動脈硬化性病変に影響を与えない比較的低用量の olmesartan (0.5 mg/kg/day) とエストロゲン ($20\text{ }\mu\text{g/kg/day}$) の併用により有意な抑制を認めた (Fig. 2). なお今回用いた

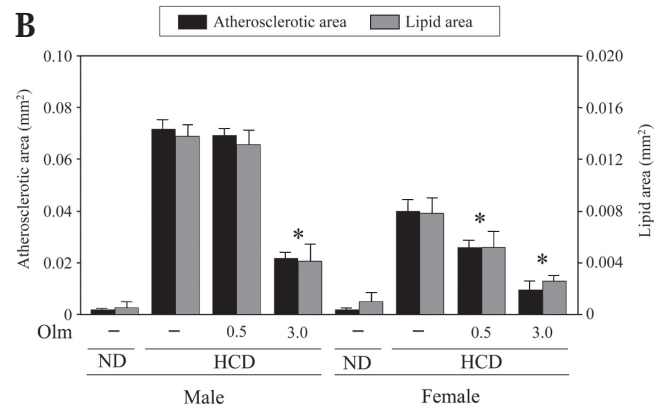
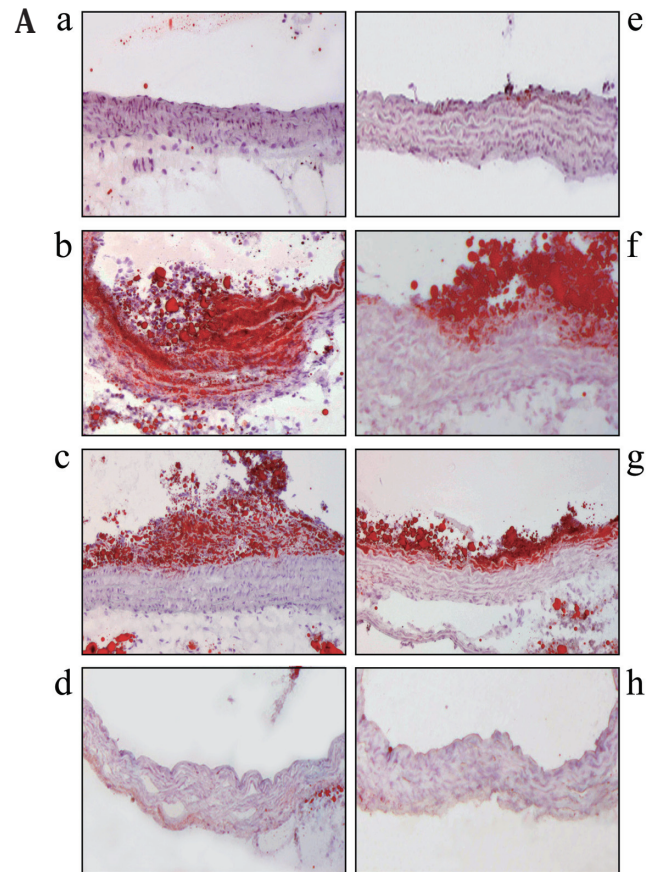


Fig. 1. Sex difference in atherosclerotic area and effect of olmesartan in apolipoprotein-deficient (ApoEKO) mice. ApoEKO mice were treated with a high-cholesterol diet or standard normal diet for 6 weeks as described in “Materials and Methods”. Olmesartan was administered at a dose of 0.5 or 3 mg/kg/day for 2 weeks before sampling. Aortic samples were taken and cross sections were prepared as described in “Methods”. (A) Representative results of oil red-O staining of proximal aorta. Magnification $\times 200$. (B) Morphometric analysis of atherosclerotic area and lipid area in cross sections of proximal aorta. Values are mean $\pm$ SE of 7-8 experiments. * $p < 0.05$ vs. HCD. ND: standard normal diet, HCD: high-cholesterol diet, Olm: olmesartan, (a~d) male mice, (e~h) female mice. a and e: ND, b and f: HCD, c and g: olmesartan (0.5 mg/kg/day), d and h: olmesartan (3.0 mg/kg/day).

量のolmesartanでは、血圧に影響を与えず（雄性マウス 対照群: 114.5 ± 4.2 mmHg, olmesartan投与群: 114.6 ± 1.6 mmHg, 雌性マウス 対照群: 118.6 ± 6.1 mmHg, olmesartan投与群: 115.7 ± 9.2 mmHg, 卵巣摘出群 併用投与群: 117.1 ± 6.3 mmHg), 血中コレステロール値にも影響を与えなかった (olmesartan投与群: 1628 ± 98 mg/dL, 併用群: 1654 ± 68 mg/dL).

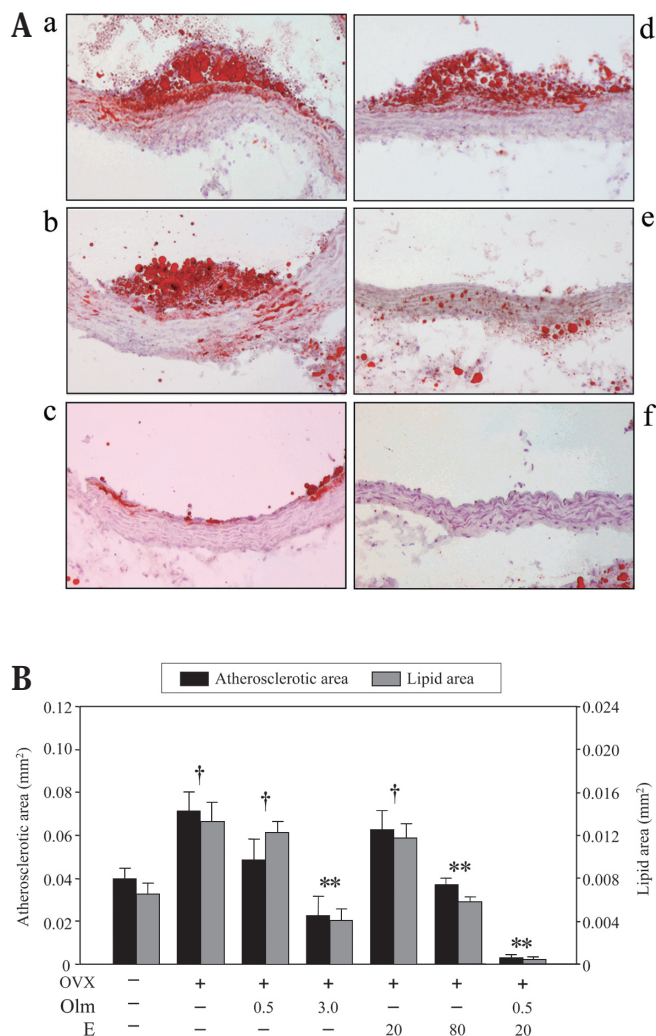


Fig. 2. Effect of estrogen and olmesartan on atherosclerotic area in ovariectomized ApoEKO mice. Female ApoEKO mice were ovariectomized and treated with HCD as described in “Methods”. 17β-estradiol was administered at a dose of 20 or 80 μg/kg/day for 14 days before sampling. Olmesartan was administered at a dose of 0.5 or 3.0 mg/kg/day 14 days before sampling. Aortic samples were taken as described in Figure 1. (A) Representative results of oil red-O staining of proximal aorta. Magnification x 200. (B) Morphometric analysis of atherosclerotic area and lipid area in cross sections of proximal aorta. Values are mean ± SE of 7-8 experiments. †p < 0.05 vs. HCD, **p < 0.01 vs. HCD + OVX. OVX: ovariectomy, Olm: olmesartan, E: 17β-estradiol. a: control (OVX mice), b: olmesartan (0.5 mg/kg/day), c: olmesartan (3.0 mg/kg/day), d: 17β-estradiol (20 μg/kg/day), e: 17β-estradiol (80 μg/kg/day), f: olmesartan (0.5 mg/kg/day) and 17β-estradiol (20 μg/kg/day).

動脈硬化性病変に対するolmesartanとエストロゲンの相互作用効果

Fig. 3に示すように、superoxide産生は大動脈において高コレステロール食投与で増加を示したが、この増加は雄性マウスや卵巣摘出マウスに比べ、雌性マウスでは減弱をしていた。また、NADPH oxidase活性も高コレステロール食投与で増加を認めたが、その増加も雄性マウスや卵巣摘出マウスに比べ、雌性マウスでの抑制が認められた (Fig. 5)。NADPH oxidaseのサブユニットであるp47^{phox}のmRNA発現についても検討したところNADPH oxidaseと同様の結果が認められた (Fig. 6A)。卵巣摘出マウスにおいては、80 μg/kg/dayの17β-estradiol投与でsuperoxide産生、NADPH oxidase活性とp47^{phox} mRNAレベルの上昇が有意に抑制された (Fig. 4, 5, 6A)。一方、3 mg/kg/dayのolmesartanはsuperoxide産生、NADPH oxidase活性とp47^{phox} mRNA発現を抑制したが、この抑制効果は雌

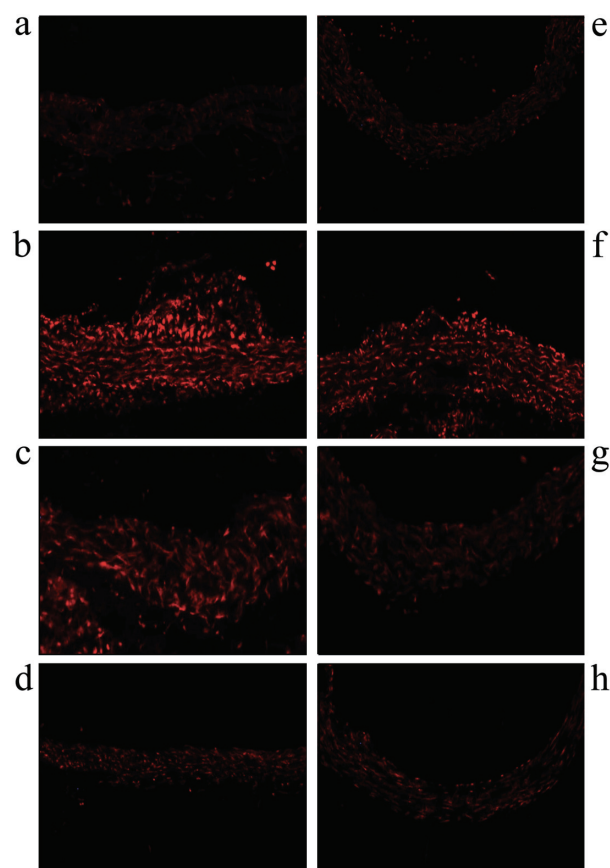


Fig. 3. Sex difference on superoxide production in ApoEKO mice. Freshly frozen sections of proximal aorta were prepared and superoxide was detected with dihydroethidium as described in “Materials and Methods”. Olmesartan and 17β-estradiol were administered as described in Figure 2. (a~d) male mice, (e~h) female mice. a and e: ND, b and f: HCD, c and g: olmesartan (0.5 mg/kg/day), d and h: olmesartan (3.0 mg/kg/day).

性マウスでより強く認められた (Fig. 3, 5, 6A). 特に, 比較的低用量の olmesartan (0.5 mg/kg/day) は, 雄性マウスや卵巣摘出マウスにおける superoxide 産生, NADPH oxidase 活性, p47^{phox} mRNA 発現上昇に影響を与えなかったが, 雌性マウスにおいては, 明らかにこれらの変化を抑制した (Fig. 4, 5, 6A). 比較的低用量の 17 β -estradiol (20 μ g/kg/day) と olmesartan (0.5 mg/kg/day) は, 単独では上記の変化に影響を及ぼさなかったが, これら両者を併用すると, superoxide 産生, NADPH oxidase 活性, p47^{phox} mRNA 発現が有意に抑制された (Fig. 4, 5, 6A). 近位大動脈における AT₁ 受容体 mRNA 発現は高コレステロール食により増加したが, その増加は雌性マウスに比べ, 雄性マウスや卵巣摘出マウスでは大きかった. また, AT₁ 受容体 mRNA 発現は 17 β -estradiol (80 μ g/kg/day) では発現が抑制されたが, olmesartan による影響は認められなかった (Fig. 6B).

培養血管平滑筋細胞における NADPH oxidase 活性に対するエストロゲンの効果

Fig. 7に示すように, Ang IIはVSMCにおけるNADPH oxidase活性上昇を引き起こした (15分後にピーク). 17 β -estradiol (10⁻⁸ M) 単独ではNADPH oxidaseに影

響を与えなかったが, Ang IIによるNADPH oxidase活性上昇を抑制した. さらに17 β -estradiolはAT₁受容体発現には影響せず, 一方AT₂受容体はこのVSMCにおいては検知されなかった (データ不提示).

考 察

これまでの報告において, 17 β -estradiolはApoEKOマウスにおいてで抗動脈硬化作用をしめしている²⁷⁾. これは血中リポ蛋白に対する17 β -estradiolの効果で一部説明できる. 本研究では, 高コレステロール食投与による脂肪沈着を伴った動脈硬化性病変形成が, 雄性マウスや卵巣摘出マウスに比して, 雌性マウスにおいて抑制され, 卵巣摘出マウスにおける変化は17 β -estradiol投与により回復した (Fig. 2). 今回用いた17 β -estradiol投与量で, 卵巣摘出により, 血中エストロゲン濃度の著しい低下を認め (対照群: 224.6 $\pm$ 16.8 pg/mL, 卵巣摘出群: 54.6 $\pm$ 2.6 pg/mL), エストロゲン投与 (80 μ g/kg/day) にて血中エストロゲン濃度の回復を認めた. この血中エストロゲン濃度は正常雌性ApoEKOマウスと同様であり, 有効な量であると考えられる²⁸⁾. また, 本研究においては, 脂肪沈着と動脈硬化性病変の変化が平行しており, 一般的にはこれ

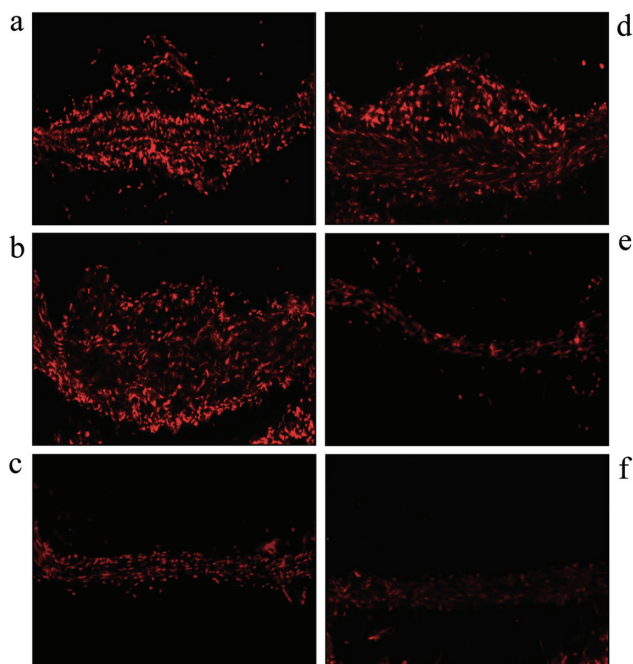


Fig. 4. Effect of olmesartan and estrogen on superoxide production in ovariectomized ApoEKO mice. Superoxide was detected with dihydroethidium as described in “Materials and Methods”. Olmesartan and 17 β -estradiol were administered as described in Figure 2. a: control (OVX mice), b: olmesartan (0.5 mg/kg/day), c: olmesartan (3.0 mg/kg/day), d: 17 β -estradiol (20 μ g/kg/day), e: 17 β -estradiol (80 μ g/kg/day), f: olmesartan (0.5 mg/kg/day) and 17 β -estradiol (20 μ g/kg/day).

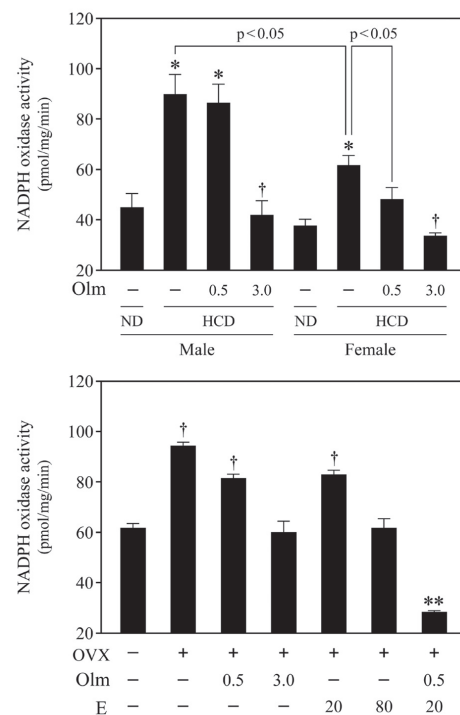


Fig. 5. Effect of olmesartan and estrogen on NADPH oxidase activity in ApoEKO mice. Protein samples were prepared and NADPH oxidase activity was measured as described in “Methods”. Olmesartan and 17 β -estradiol were administered as described in Figure 2. Values are mean $\pm$ SE of 7-8 experiments. *p < 0.05 vs. ND, †p < 0.05 vs. HCD, **p < 0.01 vs. HCD + OVX. OVX: ovariectomy, Olm: olmesartan, E: 17 β -estradiol.

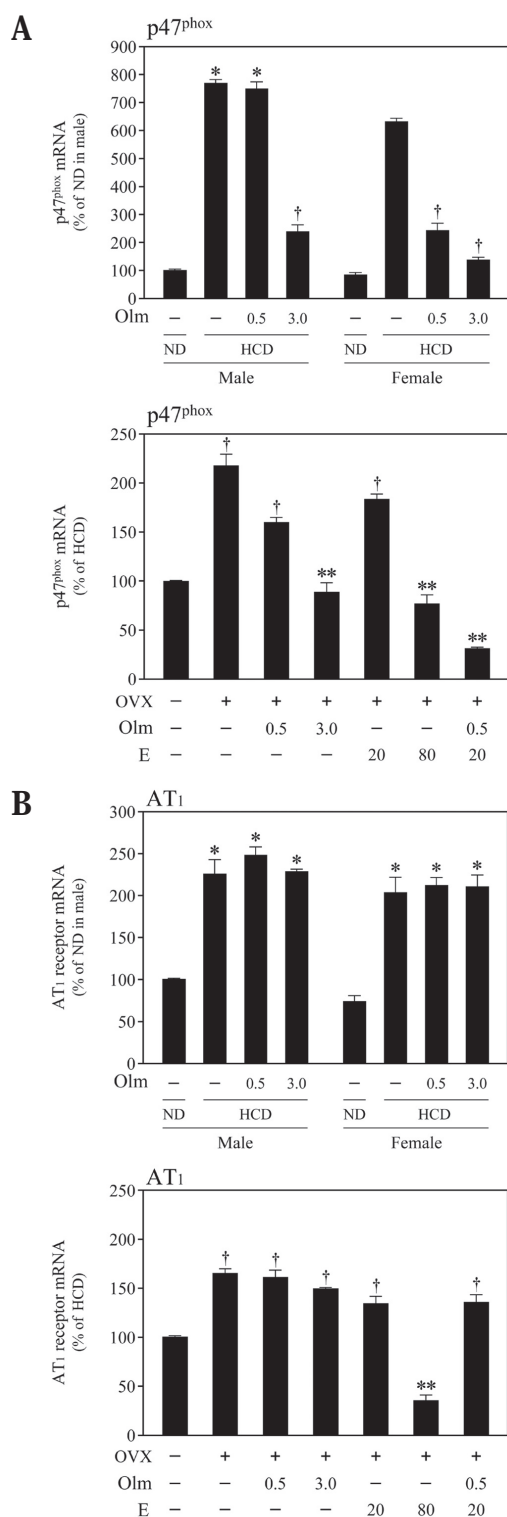


Fig. 6. Effect of olmesartan and estrogen on expression of p47^{phox} and AT₁ receptor in ApoEKO mice. Aortic samples were taken from ApoEKO mice as described in Figure 1. Levels of p47^{phox} mRNA and AT₁ receptor mRNA were assayed by quantitative real time RT-PCR as described in "Methods". (A) Effect of combination of olmesartan and estrogen on expression of p47^{phox} mRNA in ApoEKO mice. (B) Effect of combination of olmesartan and estrogen on expression of AT₁ receptor mRNA in ApoEKO mice. Values are mean $\pm$ SE of 5 experiments. * $p < 0.05$ vs. ND, † $p < 0.05$ vs. HCD, ** $p < 0.05$ vs. HCD + OVX.

らが一致することはすくないが、12週齢という脂肪沈着が主の時期の動脈硬化を検討しているためと考えられる²⁹⁾。さらに、血中コレステロール値は雌雄差を認めず(雄性マウス: 1684 ± 96 mg/dL, 雌性マウス: 1592 ± 79 mg/dL), エストロゲンや olmesartan による影響は認めなかったので脂質代謝以外の作用が関与していると考ええる(エストロゲン投与群: 1557 ± 57 mg/dL, olmesartan 投与群: 1628 ± 98 mg/dL)。Cathapermalら³⁰⁾は、17 β -estradiolがエストロゲン受容体を介して superoxide に刺激された VSMC 増殖を抑制すると報告しており、Strehlowら³¹⁾は17 β -estradiolが VSMC において Ang II によるフリーラジカル産生増加を抑制すると報告している。本実験においては、superoxide 産生、NADPH oxidase 活性と p47^{phox} mRNA 発現が雄性マウスに比べ雌性マウスで有意に抑制されており、また雌性マウスにおいては、卵巣摘出による増強と17 β -estradiol投与で改善することを明らかにした (Fig. 3, 4, 5, 6A)。

Superoxide 産生と NADPH oxidase の活性化は動脈硬化性病変形成に重要な役割を担っており³²⁻³⁵⁾, Ang II は AT₁ 受容体を介して NADPH oxidase を活性化することで酸化ストレスの主要な調節を行っている^{10, 11)}。これに対して、エストロゲンはレニン-アンジオテンシン系に拮抗し³⁶⁾, また肝細胞でのアンジオテンシノーゲン合成はエストロゲンにより調節されると報告されている³⁷⁾。エストロゲンはレニンとアンジオテンシン変換酵素を低下させ、その結果 Ang II の産生を抑制するといわれている^{38, 39)}。さらにエストロゲン投与により大動脈組織あるいは VSMC で AT₁ 受容体発現が抑制されるという報告もある^{40, 41)}。我々はこれまでに、17 β -estradiol が AT₁ 受容体由来の extracellular signal-

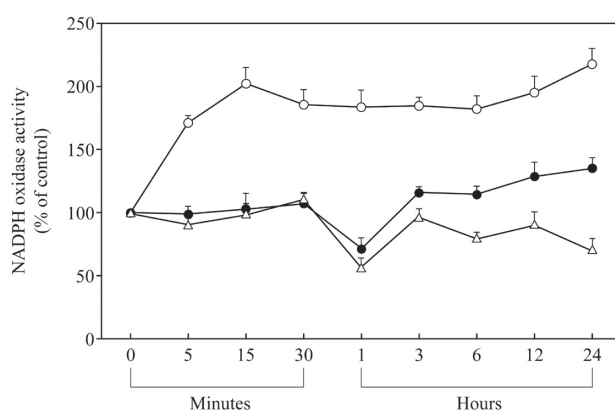


Fig. 7. Effect of estrogen on NADPH oxidase activity induced by Ang II in cultured VSMC. Subconfluent VSMC were incubated with Ang II (10^{-7} M) and 17 β -estradiol (10^{-8} M) for 0, 5, 15, 30 minutes, and 1, 3, 6, 12, 24 hours. NADPH oxidase activity was measured by the chemiluminescence method using lucigenin as described in "Methods". Values are expressed as mean $\pm$ SE of 4 experiments. ○: Ang II (10^{-7} M), △: 17 β -estradiol (10^{-8} M), ●: Ang II with 17 β -estradiol.

regulated kinase (ERK) と *c-fos* 発現を抑制し、VSMCの増殖を阻害する事を報告した²⁵⁾。これらの結果からARBが動脈硬化に対するエストロゲンの抑制効果をさらに増強する可能性が考えられる。本研究の結果では、動脈硬化及び酸化ストレスに対するolmesartanの抑制効果は雄性マウスや卵巣摘出マウスと比べ、雌性マウスで強く認められ (Fig. 1, 2, 3, 4, 5, 6A), 卵巣摘出マウスにおいては、比較的低用量のolmesartanと17 β -estradiolの併用により脂肪沈着、動脈硬化性病変、superoxide産生、NADPH oxidase活性とp47^{phox} mRNA発現を抑制するのを認めた (Fig. 2, 4, 5及び6A)。Lavignerら⁴²⁾は、VSMCからのsuperoxide産生はNADPH oxidaseがp47^{phox}成分を必要とすることを報告しており、これらの結果は我々の結果とあわせると、エストロゲンが少なくとも一部は酸化ストレスへの抑制を介してARBの抗動脈硬化作用に貢献していること、AT₁受容体とエストロゲンのクロストークが血管障害の進展に対して重要な影響を与えることを示している。また、活性酵素種の一つである一酸化窒素(NO)は、血管壁において通常NO合成酵素(NOS)により産生され、血管拡張や、血小板凝集抑制、平滑筋増殖抑制、単球付着抑制などの作用を介し抗動脈硬化作用を有すると考えられている。Oemarら⁴³⁾は、人の動脈硬化性病変において、NOの産生とNOSの発現が低下しており、NO産生を刺激すると、動脈硬化性病変の進行を抑制すると報告している⁴⁴⁾。従って、本研究における動脈硬化モデルマウスの病変形成や、エストロゲンとARBによる抑制効果についても、NO産生調節が関与する可能性も残っている。さらに、最近ARBであるolmesartanがendothelinを介したsuperoxide産生を抑制することが報告されており⁵³⁾、olmesartanの動脈硬化抑制作用にはendothelinを介するsuperoxide産生を抑制する経路が含まれる可能性も考えられ、今後さらなる検討が必要と思われる。

本研究ではAT₁受容体mRNA発現は、雌性マウスに比べ雄性マウスや卵巣摘出マウスで著しい増加を認め、それらは17 β -estradiol (80 μ g/kg/day) 投与で抑制を認めたが、olmesartan投与では変化がみられなかった (Fig. 6B)。この結果はエストロゲンによるAT₁受容体mRNA発現の抑制作用がエストロゲンの抗動脈硬化作用を増強する可能性を示している。しかし、卵巣摘出群において、比較的低用量のエストロゲンとolmesartanの併用による明らかな動脈硬化性病変、superoxide産生とNADPH oxidase活性の抑制を認めたが (Fig. 2, 4及び5)、このときAT₁受容体発現には変化が認められなかった (Fig. 6B)。また、粥状動脈硬化病変の炎症巣においては、アンジオテンシン変換酵素(ACE) およびAngII, AT受容体の発現が認められており⁴⁵⁾、本研究では、卵巣摘出やエストロゲンによる組織Ang IIへの影響を認めなかった。これらの

結果は、エストロゲンとAT₁受容体拮抗薬 (ARB) 併用による抗動脈硬化作用には、AT₁受容体発現調節以外の要因が働いていることを示している。Ang IIはAT₁受容体を介して、NADPH oxidase活性によるLDLコレステロールの酸化⁴⁶⁾、macrophage chemoattractant protein I (MCP-1) やvascular cell adhesion molecule (VCAM) の発現を増加させ^{47, 48)}、血管平滑筋細胞を増殖し⁶⁾動脈硬化を促進させる。

Xuら⁴⁹⁾は、ARB投与によるAT₂受容体活性が心血管保護作用に重要であると示しており、Wuら⁵⁰⁾は、AT₂受容体刺激でMCP-1の発現を低下させることを示している。一方、エストロゲンは、MCP-1を低下させ⁵¹⁾、extracellular signal-regulated kinase (ERK) 活性を抑制する⁵²⁾。以上より、ARBによるAT₂受容体刺激作用とエストロゲンの刺激作用が相乗的に脂肪沈着と動脈硬化性病変を抑制している可能性が考えられた。

また、VSMCを用いた結果よりエストロゲンが直接Ang IIによるNADPH oxidase活性を阻害する可能性も考えられ、VSMCを用いた検討では、Fig. 7に示すようにAng IIはNADPH oxidase活性を時間依存性に増加させ、エストロゲン単独では活性に変化を与えなかったが、Ang IIとエストロゲンの同時投与により5分以内にAng IIによる活性上昇が抑制された。このときAT₁受容体は変化しなかった。このことはVSMCにおいて、エストロゲンがAng IIを介したNADPH oxidase活性を直接抑制することを示しており、その作用は、発現が比較的短時間で生じている。

さらに、細胞質サブユニットと細胞膜サブユニットの複合体がNADPH oxidaseとして働き⁸⁾、AT₁受容体を介したAng IIの刺激により、細胞質サブユニットの細胞膜サブユニットへの移動と結合することがNADPH oxidase活性を引き起こすことがいわれている^{54, 55)}。以上のことより、NADPH oxidaseの細胞質サブユニットが細胞膜サブユニットへの移動をエストロゲンが比較的短時間に抑制するnon-genomic作用ももつ可能性が考えられる。

今回の研究より、動脈硬化性病変に対して、少なくとも一部は酸化ストレスを抑制することで、エストロゲンがAT₁受容体を介したAng II刺激を抑制すること、ARBとエストロゲン刺激との間に相乗作用がある可能性が考えられた。

これまでの臨床的な知見として、更年期の女性では、心血管系疾患発症頻度が増加するといわれ⁵⁶⁾、これに対して、エストロゲン補充を行なうホルモン補充療法の効果がHERS研究で検討されている⁵⁷⁾。臨床研究では、個々の患者の条件を同一にするのが困難であること、プロゲステロンの問題、高すぎるエストロゲン用量の影響、コンプライアンスの悪さなどの問題点があり、臨床の場におけるエストロゲンの有用性に関しては、現在も論議されている。我々の実験では、

動脈硬化モデルマウスにおいて、エストロゲンが動脈硬化性病変及び酸化ストレスに対し抑制的に働くことを示唆する結果が得られた。この結果は、エストロゲン製剤が動脈硬化抑制作用を有する可能性を示しているが、この点に関しても、今後臨床の場でさらに検討を重ねることが重要であると考えられる。さらに、実験的には、雄性動脈硬化マウスに17 β -estradiol投与を行う検討が有用であると思われるが、この点については、過去にも検討されておらず、今後の研究の課題であると考えられる。

結 論

1. apolipoprotein E遺伝子欠損 (ApoEKO) マウスにおける動脈硬化形成に対し、エストロゲン及びアンジオテンシンIIタイプI (AT₁) 受容体拮抗薬、olmesartan, の作用について酸化ストレスとの関連性から検討した。
2. ApoEKOマウスの卵巣摘出は動脈硬化及び酸化ストレスを増強させ、エストロゲン (80 μ g/kg/day) 投与により改善を認めた。
3. olmesartan (3 mg/kg/day) 投与は酸化ストレスと動脈硬化性病変を著明に抑制したが、その抑制作用は雄性マウスや卵巣摘出マウスに比べ、雌性マウスでより強く認められた。一方それぞれ単独では影響を与えない比較的低用量のolmesartan (0.5 mg/kg/day) あるいはエストロゲン (20 μ g/kg/day) の併用投与では、動脈硬化性病変や酸化ストレスの減少を認めた。
4. 以上の結果からエストロゲンとARBが相乗的に酸化ストレスの抑制と共に動脈硬化を改善する事が明らかとなった。
5. さらに、AT₁受容体刺激作用とエストロゲン作用との関連性について明確にするため、アンジオテンシンII受容体サブタイプのうち、AT₁受容体を主に発現している培養血管平滑筋細胞を用い以下の実験を行った。
6. 培養血管平滑筋細胞をアンジオテンシンIIにより刺激するとNADPH oxidase活性の上昇が認められ、この上昇はエストロゲンを同時に投与することにより減弱した。この際、エストロゲンによるAT₁受容体発現への影響を認めなかった。
7. 以上の結果より、エストロゲンは動脈硬化性病変に対し、AT₁受容体拮抗薬の作用を増強させることが明らかとなった。培養血管平滑筋細胞を用いた実験から、この作用は血圧や血中コレステロールの変化を介したものではなく、エストロゲンの直接的な作用であると考えられた。これらの結果はARBとエストロゲン補充の併用療法が、更年期にみられる心血管疾患に対する効果的な治療となる可能性を示唆するものと思われた。

謝 辞

本研究にあたり、御指導、御協力を頂きました愛媛大学医学部 医化学心血管生物学分野 堀内正嗣教授、岩井將助教授、埼玉医科大学腎臓内科学教室 鈴木洋通教授および教室員各位に深く感謝致します。なお本研究の一部は第27回日本高血圧学会総会において発表した。

引用文献

- 1) Pyorala K, Laakso M, Uusitupa M. Diabetes and atherosclerosis: an epidemiologic view. *Diabetes Metab Rev* 1987;3:463-524.
- 2) Steenland K, Thun M, Lally C, Heath C Jr. Environmental tobacco smoke and coronary heart disease in the American Cancer Society CPS-II cohort. *Circulation* 1996;94:622-8.
- 3) Weber DS, Taniyama Y, Rocic P, Seshiah PN, Dechert MA, Gerthoffer WT, et al. Phosphoinositide-dependent kinase 1 and p21-activated protein kinase mediate reactive oxygen species-dependent regulation of platelet-derived growth factor-induced smooth muscle cell migration. *Circ Res* 2004;94:1219-26.
- 4) Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, Harrison DG, Galis ZS. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest* 1996;98:2572-9.
- 5) Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M, Yin Q, Shah A, Harrison DG, et al. Role of NADH/NADPH oxidase-derived H₂O₂ in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension* 1998;32:488-95.
- 6) Taniyama Y, Griendling KK. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension* 2003;42:1075-81.
- 7) Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 2000;86:494-501.
- 8) Griendling KK, Sorescu D, Lassegue B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2175-83.
- 9) Dzau VJ. Tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease: a unifying hypothesis. *Hypertension* 2001;37:1047-52.
- 10) Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD,

- Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994;74:1141-8.
- 11) Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling KK. Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ Res* 2002;91:406-13.
 - 12) Lerner DJ, Kannel WB. Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes: a 26-year follow-up of the Framingham population. *Am Heart J* 1986;111:383-90.
 - 13) Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Manson JE, Rosner B, Speizer FE, et al. Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease. Ten-year follow-up from the Nurses' Health Study. *N Engl J Med* 1991;325:756-62.
 - 14) Rossouw JE. Hormones, genetic factors, and gender differences in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 2002;53:550-7.
 - 15) Walsh B, Schiff I, Rosner B, Greenberg L, Ravinkar V, Sacks FM. Effects of postmenopausal estrogen replacement on the concentrations and metabolism of plasma lipoprotein. *N Engl J Med* 1991;325:1196-204.
 - 16) Liu HW, Iwai M, Takeda-Matsubara Y, Wu L, Li JM, Okumura M, et al. Effect of estrogen and AT1 receptor blocker on neointima formation. *Hypertension* 2002;40:451-7.
 - 17) Leri A, Liu Y, Wang X, Kajstura J, Malhotra A, Meggs LG, et al. Overexpression of insulin-like growth factor-1 attenuates the myocyte renin-angiotensin system in transgenic mice. *Circ Res* 1999;84:752-62.
 - 18) Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D, Williams RA. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis* 1987;68:231-40.
 - 19) Zhang SH, Reddick RL, Burkey B, Maeda N. Diet-induced atherosclerosis in mice heterozygous and homozygous for apolipoprotein E gene disruption. *J Clin Invest* 1994;94:937-45.
 - 20) Ozaki M, Kawashima S, Yamashita T, Hirase T, Namiki M, Inoue N, et al. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase accelerates atherosclerotic lesion formation in apoE-deficient mice. *J Clin Invest* 2002;110:331-40.
 - 21) Szocs K, Lassegue B, Sorescu D, Hilenski LL, Valppu L, Couse TL, et al. Upregulation of nox-based NAD(P)H oxidases in restenosis after carotid injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:21-7.
 - 22) Iwai M, Liu HW, Chen R, Ide A, Okamoto S, Hata R, et al. Possible inhibition of focal cerebral ischemia by angiotensin II type 2 receptor stimulation. *Circulation*. 2004, in press.
 - 23) Kolbeck RC, She ZW, Callahan LA, Nosek TM. Increased superoxide production during fatigue in the perfused rat diaphragm. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:140-5.
 - 24) Hayashida W, Horiuchi M, Dzau VJ. Intracellular third loop domain of angiotensin II type-2 receptor. Role in mediating signal transduction and cellular function. *J Biol Chem* 1996;271:21985-92.
 - 25) Horiuchi M, Hayashida W, Akishita M, Tamura K, Daviet L, Lehtonen JY, et al. Stimulation of different subtypes of angiotensin II receptors, AT1 and AT2 receptors, regulates STAT activation by negative crosstalk. *Circ Res* 1999;84: 876-82.
 - 26) Takeda-Matsubara Y, Nakagami H, Iwai M, Cui TX, Shiuchi T, Akishita M, et al. Estrogen activates phosphatases and antagonizes growth-promoting effects of angiotensin II. *Hypertension* 2002;39:41-5.
 - 27) Bourassa PA, Milos PM, Gaynor BJ, Breslow JL, Aiello RJ. Estrogen reduces atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:10022-7.
 - 28) Edwards MW, Bain SD, Bailey MC, Lantry MM, Howard GA. 17 beta estradiol stimulation of endosteal bone formation in the ovariectomized mouse: an animal model for the evaluation of bone-targeted estrogens. *Bone* 1992;13:29-34.
 - 29) Jawien J, Nastalek P, Korbut R. Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol* 2004;55:503-17.
 - 30) Cathapermal S, Lavigne MC, Leong-Son M, Alibadi T, Ramwell PW. Stereoisomer-specific inhibition of superoxide anion-induced rat aortic smooth-muscle cell proliferation by 17beta-estradiol is estrogen receptor dependent. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;31:499-05.
 - 31) Strehlow K, Rotter S, Wassmann S, Adam O, Grohe C, Laufs K, et al. Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. *Circ Res* 2003;93:170-7.
 - 32) Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, Ishizaka N, Griendling KK. p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1996;271:23317-21.

- 33) Barry-Lane PA, Patterson C, van der Merwe M, Hu Z, Holland SM, Yeh ET, et al. p47phox is required for atherosclerotic lesion progression in ApoE(-/-) mice. *J Clin Invest* 2001;108:1513-22.
- 34) Lassegue B, Sorescu D, Szocs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, et al. Novel gp91phox homologues in vascular smooth muscle cells: nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ Res* 2001;88:888-94.
- 35) Fukui T, Ishizaka N, Rajagopalan S, Laursen JB, Capers QIV, Taylor WR, et al. p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. *Circ Res* 1997;80:45-71.
- 36) Kuroski de Bold ML. Estrogen, natriuretic peptides and the renin-angiotensin system. *Cardiovasc Res* 1999;41:524-31.
- 37) Klett C, Ganten D, Hellmann W, Kaling M, Ryffel GU, Weimar-Ehl T, et al. Regulation of angiotensinogen synthesis and secretion by steroid hormones. *Endocrinology* 1992;130:3660-8.
- 38) Schunkert H, Danser AH, Hense HW, Derckx FH, Kurzinger S, Reigger GA. Effects of estrogen replacement therapy on renin-angiotensin system in postmenopausal women. *Circulation* 1997;95:39-45.
- 39) Sanada M, Higashi Y, Nakagawa K, Sasaki S, Kodama I, Sakashita T, et al. Estrogen replacement therapy in postmenopausal women augments reactive hyperemia in the forearm by reducing angiotensin converting enzyme activity. *Atherosclerosis* 2001;158:391-7.
- 40) Nickenig G, Baumer AT, Grohe C, Kahlert S, Strehlow K, Rosenkranz S, et al. Estrogen modulates AT1 receptor gene expression in vitro and vivo. *Circulation* 1998;97:2197-201.
- 41) Nickenig G, Strehlow K, Wassmann S, Baumer AT, Albory K, Sauer H, et al. Differential effects of estrogen and progesterone on AT(1) receptor gene expression in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 2000;102:1828-33.
- 42) Lavigne MC, Malech HL, Holland SM, Leto TL. Genetic demonstration of p47phox-dependent superoxide anion production in murine vascular smooth muscle cells. *Circulation* 2001;104:79-84.
- 43) Oemar BS, Tschudi MR, Godoy N, Brovkovich V, Malinski T, Luscher TF. Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis. *Circulation* 1998;97:2494-8.
- 44) Boger RH, Bode-Boger SM, Brandes RP, Phivthong-ngam L, Bohme M, Nafe R, et al. Dietary L-arginine reduces the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits: comparison with lovastatin. *Circulation* 1997;96: 1282-90.
- 45) Diet F, Pratt RE, Berry GJ, Momose N, Gibbons GH, Dzau VJ. Increased accumulation of tissue ACE in human atherosclerotic coronary artery disease. *Circulation* 1996;94:2756-67.
- 46) Keidar S, Kaplan M, Hoffman A, Aviram M. Angiotensin II stimulates macrophage-mediated oxidation of low density lipoproteins. *Atherosclerosis* 1995;115:201-15.
- 47) Chen XL, Tummala PE, Olbrych MT, Alexander RW, Medford RM. Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1998;83: 952-9.
- 48) Tummala PE, Chen XL, Sundell CL, Laursen JB, Hammes CP, Alexander RW, et al. Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature: A potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis. *Circulation* 1999;100:1223-9.
- 49) Xu J, Carretero OA, Liu YH, Shesely EG, Yang F, Kapke A, et al. Role of AT2 receptors in the cardioprotective effect of AT1 antagonists in mice. *Hypertension* 2002;40:244-50.
- 50) Wu L, Iwai M, Li Z, Shiuchi T, Min LJ, Cui TX, et al. Regulation of inhibitory protein-kappaB and monocyte chemoattractant protein-1 by angiotensin II type 2 receptor-activated Src homology protein tyrosine phosphatase-1 in fetal vascular smooth muscle cells. *Mol Endocrinol* 2004;18:666-78.
- 51) Janis K, Hoeltke J, Nazareth M, Fanti P, Poppenberg K, Aronica SM. Estrogen decreases expression of chemokine receptors, and suppresses chemokine bioactivity in murine monocytes. *Am J Reprod Immunol* 2004;51:22-31.
- 52) Hwang KC, Lee KH, Jang Y. Inhibition of MEK1,2/ERK mitogenic pathway by estrogen with antiproliferative properties in rat aortic smooth muscle cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002; 80:85-90.
- 53) Yao L, Kobori H, Rahman M, Seth DM, Shokoji T, Fan Y, et al. Olmesartan improves endothelin-induced hypertension and oxidative stress in rats. *Hypertens Res* 2004;27:493-500.
- 54) Touyz RM, Chen X, Tabet F, Yao G, He G, Quinn MT, et al. Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H

oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circ Res* 2002;90:1205-13.

55) Wassmann S, Laufs U, Muller K, Konkol C, Ahlbory K, Baumer AT, et al. Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:300-5.

56) Kannel WB, Hjortland MC, McNamara PM,

Gordon T. Menopause and risk of cardiovascular disease: the Framingham study. *Ann Intern Med* 1976;85:447-52.

57) Grady D, Applegate W, Bush T, Furberg C, Riggs B, Hulley SB. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS): design, methods, and baseline characteristics. *Control Clin Trials* 1998;19: 314-35.