

アンジオテンシン II 受容体遮断薬, アンジオテンシン変換酵素阻害薬,
3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル (HMG) CoA 還元酵素阻害薬, アムロジピン
及びエパルレスタットによる培養脳底動脈平滑筋細胞増殖に対する作用

山口友明,^{*,a} 井田 隆,^b 平賀正純,^b 大石一彦,^c 内田幸宏,^c 越前宏俊^d

**Effects of Angiotensin II Receptor Blockers, Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors,
3-Hydroxy-3-Methyl Glutaryl (HMG) CoA Reductase Inhibitors, Amlodipine and
Epalrestat on Cultured Basilar Artery Smooth Muscle Cell Proliferation**

Tomoaki YAMAGUCHI,^{*,a} Takashi IDA,^b Masazumi HIRAGA,^b

Kazuhiko OISHI,^c Masaatsu K. UCHIDA,^c and Hirotoshi ECHIZEN^d

Departments of Hospital Pharmacy^a and Internal Medicine,^b Nakano General Hospital, 4-59-16 Chuou,
Nakano-ku, Tokyo 164-8607, Japan, and Departments of Pharmacology^c and Pharmacotherapy,^d
Meiji Pharmaceutical University, 2-522-1 Noshio, Kiyose City, Tokyo 204-8588, Japan

(Received August 27, 2003; Accepted December 24, 2003; Published online January 5, 2004)

Proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMC) stimulated by oxidative stresses and reactive oxygen species (ROS) may play a pivotal role in the pathogenesis of atherosclerosis. Antiatherosclerotic effects of angiotensin II receptor blockers, angiotensin converting enzyme inhibitors, HMG CoA reductase inhibitors, calcium channel blocker and epalrestat were studied with an *in vitro* guinea-pig basilar artery smooth muscle cell (GBa-SM3) culture system over 3 days incubated with 0 to 10% of fetal bovine serum. Results demonstrated that simvastatin (0.1 mM), fluvastatin (0.3 mM), amlodipine (0.2 mM) and epalrestat (1 mM) elicited significant ($p < 0.05$ or 0.01) antiproliferative effects, whereas losartan (1 mM), valsartan (1 mM), enalapril (0.1 mM), captopril (1 mM), trandolapril (0.01 mM), pravastatin (0.7 mM) did not. In conclusion, the present *in vitro* VSMC culture system may serve as a comprehensive screening method for pleiotropic effects of commonly used therapeutic agents.

Key words—angiotensin II; statin; amlodipine; epalrestat; pleiotropic effect; vascular smooth muscle cell

緒 言

高血圧症や高脂血症は動脈硬化病態を基盤とする虚血性心疾患、脳血管障害、慢性腎不全などの独立した危険因子である。これまでの大規模臨床試験により、カルシウムチャンネル遮断薬 (CCB)、アンジオテンシン変換酵素阻害薬 (ACEI) 及びアンジオテンシン II 受容体遮断薬 (ARB) による降圧治療や、3-ヒドロキシ-3-メチルグリタリル (HMG) CoA 還元酵素阻害薬 (スタチン薬) による高脂血症の治療が、これらの動脈硬化合併症の発症を抑制し、患者の長期生命予後を改善することが証明された。¹⁾

しかし、近年、これらの薬物は、それぞれの主要な薬理作用である降圧効果や血清脂質異常改善効果では説明されない、動脈硬化病態進展の抑制作用 (しばしば pleiotropic 作用と呼ばれる) を有していることが知られるようになった。

Pleiotropic 作用の機序については多くの説があるが、中でも、これらの薬物による血管平滑筋 (vascular smooth muscle cells, VSMC) の増殖抑制作用は最も注目されている。^{2,3)} これは、VSMC の増殖が初期動脈硬化病変の中核となる病変であるためである。VSMC の増殖には、高血圧による血管平滑筋への機械的ストレスや高脂血症による血管壁内の酸化 LDL 蓄積による酸化ストレスが惹起する活性酸素種 (ROS) の生成を契機とする一連の細胞内情報伝達系の賦活化が深く関係していることが知られている。^{2,3)} したがって、降圧作用やコレステ

^{a)}中野総合病院薬剤科, ^{b)}同内科, ^{c)}明治薬科大学薬理学教室, ^{d)}同薬物治療学教室
e-mail: nghph@nakanosogo.or.jp

ロール低下作用を持つ薬物は、VSMC に対する機械的ストレスや酸化ストレスの緩和を介して動脈硬化性合併症発症抑制効果を発揮することが期待される。

しかし、VSMC の増殖には、上記の仮想的な増殖刺激の他にもアンジオテンシン II による NAD(P)H 酸化酵素の活性化を介する ROS の産生、転写調節因子 NF- κ B, TGF- β や炎症性サイトカイン (IL-6 等) の産生を介する VSMC 内の情報伝達系の賦活も重要な関係を持っており、^{4,5)} 降圧作用や高脂血症改善効果の他に、上記の VSMC 増殖機構を抑制する作用を持つ薬物は、より強力な抗動脈硬化作用を有する可能性がある。例えば、pleiotropic 作用を有するスタチン薬は、直接 Rho キナーゼ活性を調節し血管内狭窄抑制作用や NO の生成を促進する作用や、炎症性サイトカインの産生を抑制する作用を持つことが知られている。^{6,7)} また、CCB でも、アムロジピンのように、それ自体が ROS 消去作用に関係する抗酸化作用を有するものは、他の CCB よりも強力な抗動脈硬化作用によると想定される臓器機能保護作用を有する可能性が示唆されている。⁸⁾

このような経緯により、降圧薬や高脂血症治療薬の動脈硬化抑制効果を評価する際には、従来の薬理効果の指標のみならず個別薬物の pleiotropic 作用、特に VSMC に対する増殖抑制作用を検討することが临床上重要となっている。^{9,10)}

薬物の VSMC における増殖刺激抑制効果を評価するためには、それらの薬物の全身効果である降圧効果やコレステロール低下作用の影響を受けない *in vitro* 実験系の VSMC の増殖モデルを利用するのが理想的である。

我々は、ウシ胎児血清 (FBS) 添加条件下でのモルモット脳底動脈平滑筋細胞 (GBa-SM3) 培養系を確立しており、¹¹⁾ この実験系を用いてアムロジピンやフルバスタチンなどの pleiotropic 作用を有すると考えられる薬物の VSMC 増殖抑制効果の評価を radical scavenger であるエダラボンとの相互作用を交えて検討した。¹²⁾

本研究では、上記の実験系を用いて、臨床試験の結果から臓器保護作用を有する可能性が指摘されている多くの ACEI 及び ARB、スタチン薬、アムロジピンの pleiotropic 作用を同一条件下で比較検討

することを試みた。

方 法

実験に使用した薬物試薬は、スクリーニングを目的として下記の市販薬剤を粉碎し、全量 10 ml の蒸留水に添加・攪拌液を用いた。

薬剤は、ニューロタン錠 50 mg[®] (ロサルタンカリウム)、ディオバン錠 80 mg[®] (バルサルタン)、レニベース錠 5 mg[®] (マレイン酸エナラプリル)、カプトプリル錠 25 mg[®] (カプトプリル)、オドリック錠 1 mg[®] (トランドラプリル)、リポバス錠 5 mg[®] (シンバスタチン)、ローコールカプセル 20 mg[®] (フルバスタチンナトリウム)、メバロチン錠 10 mg[®] (プラバスタチンナトリウム)、アムロジン錠 5 mg[®] (ベシル酸アムロジピン)、キネダック錠 50 mg[®] (エバルレスタット) であった。各薬物は、上記の方法で作成した原溶液から、それぞれ 30 μ l を採取し、VSMC 培養液に添加したため、細胞培養液中の最終濃度は、上記の薬物について順に 1, 1, 0.05, 0.1, 1, 0.1, 0.3, 0.7, 0.2, 1 mM であった。

なお、レニベース[®]、オドリック[®]、リポバス[®] は、プロドラックで、血漿中で速やかに活性体に変換するが、今回の検討ではどの程度変換しているかは検討せず、また、ニューロタン[®]の活性代謝物 (未変化体の 10—40 倍の活性) の影響も検討しなかった。

モルモット脳底動脈細胞由来の平滑筋細胞 (GBa-SM3) の培養は、大石らの報告¹¹⁾ に従った。簡略に記すと、GBa-SM3 細胞は、100 単位/ml のペニシリン、0.1 mg/ml のストレプトマイシン、10% のウシ胎児血清 (FBS)、及び 1.67 mg/ml の NaHCO₃ を加えたダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) 中にて、空気 95%、CO₂ 5%、37°C の条件で 3 日間培養した。

増殖実験では、市販の 24 穴培養プレートの各ウエルに、FBS を含有しない DMEM に GBa-SM3 細胞を 10⁴ cells/ml 個含む細胞懸濁液を 400 μ l ずつ均等に注入し、ついで、各薬剤溶液を 30 μ l 又は対照群には蒸留水 30 μ l を加え、最後に FBS を各ウエルの最終濃度が 0, 1, 2, 5, 10% になるよう添加して、最終的な細胞培養液量を 500 μ l とした。各 FBS 濃度条件に対して試験薬剤と対照群は、それぞれ 2 ウエルずつ実験を行い、最終的な増殖実験後の細胞数

は、培養終了後の24穴プレートの上層に残留した培養液を除去したのち、上層をリン酸緩衝液 (PBS) 1 ml で洗浄、除去したのち、細胞を10%ホルマリンを含むPBS 0.5 ml にて固定し、0.1% Triton 含有の1 ml PBS で洗浄後、ヘマトキシリン液 250 μ l にて10分間細胞を染色し、染色液を除去したのち、顕微鏡下で平滑筋細胞数を計測した。細胞数は異なる4区域 (各0.5 \times 0.5 mm の矩形) の計測値を平均した。GBa-SM3細胞の培養系では、細胞増殖が培養液中のFBSの濃度依存的に刺激されるため、¹²⁾ 各種薬物のGBa-SM3細胞の増殖に対する効果は異なる濃度 (1, 2, 5, 10%) のFBS共存下でGBa-SM3増殖曲線を作成し、各種薬剤存在下でのFBS-GBa-SM3細胞増殖効果曲線全体の変化として、群間の差異を二元配置分散分析 (ANOVA) により行った。対照群と各試験薬群の差異についての多重比較はFisher's protected least significant difference (PLSD) 法により行い、危険率5%で有意と判定した。

結 果

Figure 1にGBa-SM3培養系における、各種薬物及び対照群の培養液FBS濃度に対応する細胞増殖曲線を示した。データを見やすくするため、図では、同効薬群別にFig. 1(A)からFig. 1(D)にデータを分けて表示した。したがって、各図における対照群値は同一データである。図から明らかなように、被験薬を培養液中に含まない対照群の細胞増殖は、FBS濃度1から10%の範囲でFBSの濃度依存的に増加した。培養液中にARBを添加した場合には、特にバルサルタンで増殖抑制傾向を示すものの、統計的有意差には至らなかった (Fig. 1(A))。

また、4種のACEIについて検討した場合も、どの薬物も対照群と比較して細胞増殖曲線に統計的に有意な効果は生じなかった (Fig. 1(B))。一方、スタチン薬については、フルバスタチン、プラバスタチンいずれも対照群と比較して有意 ($p < 0.05$) なGBa-SM3細胞の増殖抑制効果を生じた (Fig. 1(C))。

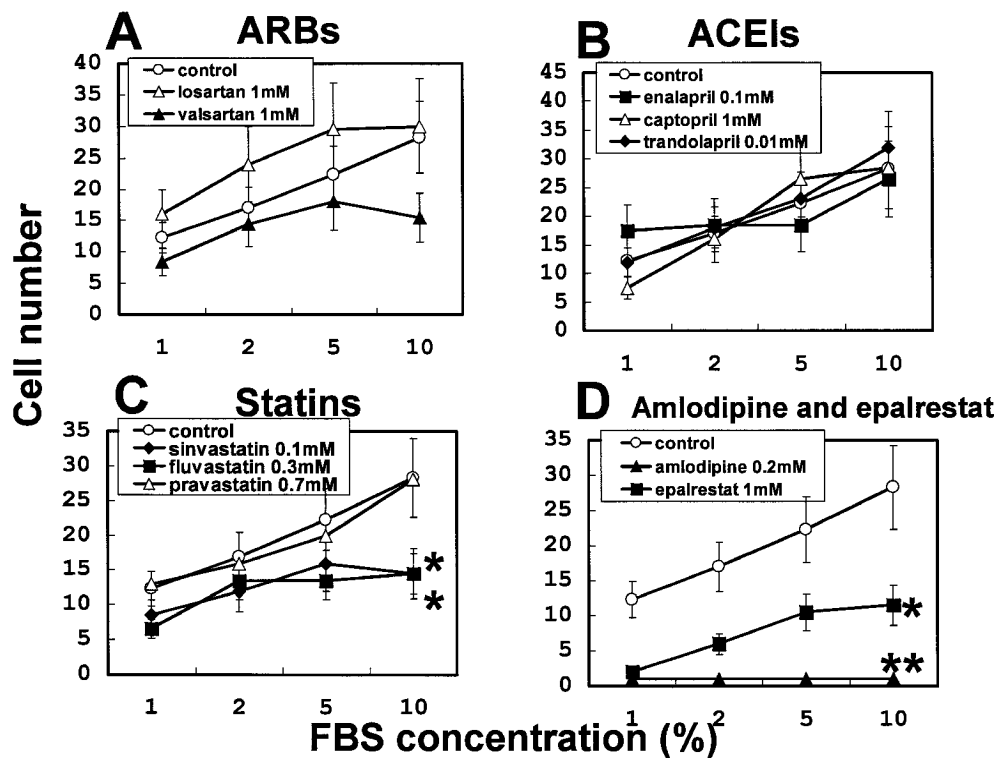


Fig. 1. The Effects of ARB, ACEI, Statin, Amlodipine and Epalrestat the Proliferation of Guinea-pig Basilar Artery Smooth Muscle Cells (GBa-SM3) with Different Concentrations of Fetal Bovine Serum (FBS)

The cells were seeded at the density of 2.5×10^4 /plate and incubated for 3 days. Each symbol is corresponded to drug in this legend. Control is common within ABCD. Data are means \pm S.E. (n=4) * $p < 0.05$ as compared to the control. ** $p < 0.01$ as compared to the control.

考 察

VSMC の増殖は、動脈硬化症の早期病態に重要な生体反応と考えられているため、^{2,3)} 動脈硬化関連病態に使用する薬物の VSMC 増殖抑制作用は、臨床的に重要な意義を持つと推測される。したがって、本研究で用いた *in vitro* の VSMC 増殖モデルは、各種薬物の抗動脈硬化作用のよいスクリーニング系になる可能性がある。

今回は、この *in vitro* モデルを用いて、動脈硬化関連病変の治療に頻用されている循環器疾患治療薬物で薬理作用の異なるものの抗動脈硬化作用を評価した。その結果、アムロジピン、スタチン薬、及びアルドース還元酵素阻害薬であるエパルレストアットが上記 VSMC の増殖を有意に抑制することを明らかにした (Fig. 1)。

本実験系は、上記薬物の降圧効果やコレステロール低下作用などの薬理作用の影響を受けない *in vitro* 状況下での VSMC の増殖を評価しているため、観察された薬物による細胞増殖抑制は、個々の薬物のいわゆる pleiotropic 作用を評価しているものと考えられる。これらの結果は、本研究で用いた VSMC 増殖モデルが、いわゆる pleiotropic 作用スクリーニングに有用な方法であることを示唆していると考えられる。今回用いた VSMC 増殖モデルで最も強力な平滑筋増殖抑制作用が観察されたのは、CCB のアムロジピンであった (Fig. 1(D))。

他の CCB、ニフェジピンやジルチアゼムでは、このような pleiotropic 作用は報告されていない。今回使用したアムロジピン濃度は 0.2 mM で細胞毒性としての結果とも考えられるが、我々は、以前の研究で、同薬は 0.1 μ M の低濃度から G_{Ba}-SM3 細胞の増殖を抑制することを確認しているため、¹²⁾ アムロジピンが今回検討した薬物中で最強の pleiotropic 作用を有すると考える。アムロジピンの pleiotropic 作用については、Ca チャネル抑制作用を発現する濃度よりも低い濃度で平滑筋増殖抑制を発揮することが他の研究者からも報告されており、¹³⁾ その機序としては、血管内皮細胞からの NO 遊離の抑制を示唆する報告があるが、¹⁴⁾ 今回の実験系で用いた細胞は内皮細胞を含まない VSMC 細胞系であるため、本研究で観察された VSMC 増殖抑制作用は内皮からの NO 遊離の抑制作用以外の作

用機序が想定された。

これまでの研究で、ある種のスタチン薬でも pleiotropic 作用が観察されることが報告されている。本研究では、フルバスタチンとシンバスタチンに有意な増殖抑制効果を認めた (Fig. 1(C)) が、この結果は、Corsini ら¹⁵⁾ のヒト血管平滑筋由来細胞を用いた研究の結果とよく一致するものであった。従来、スタチン薬の pleiotropic 作用の機序としては、レニン-アンギオテンシン系の抑制、内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) の脱感作 (down-regulation)、薬物分子自体の抗酸化作用、抗炎症作用、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) 阻害作用、Rho キナーゼ阻害作用などの多種の機構の関与が示唆されている。^{7,8,16)}

今回採用した、*in vitro* の VSMC 培養系では、血漿由来のアンギオテンシン II 及び内皮細胞由来の NOS の関与は考え難いため、想定される機構中、この 2 要因以外の機構が増殖抑制作用の主因であると推測されたが、いずれの機構が主要に関与するかについては断定に至らなかった。一方、スタチン薬でもプラバスタチンでは VSMC の増殖に何ら影響を認めなかった。この理由については不明であるが、プラバスタチンはスタチン薬の中でも特に水溶性が高いため、肝細胞のように特殊な有機イオン・トランスポーターが細胞膜に発現している細胞以外では細胞内移行が少ないとする報告がある。¹⁷⁾

したがって、スタチン薬の VSMC 内への移行性の差異が本研究を説明する可能性があるが、今回の実験では細胞内外の薬物濃度を測定していないため、この仮説は証明できなかった。

動脈硬化病変の発症に関係する機構は複雑であるが高血圧による血管壁進展による機械的ストレスには、強力な血管収縮作用を発揮するアンギオテンシン II が深く関与している可能性がある。また、アンギオテンシン II は、NAD(P)H 酸化酵素の刺激を介して ROS の産生を亢進させる機序でも VSMC の増殖を刺激する作用を有することが知られている。^{4,5)} 今回の実験では、ARB 及び ACEI は統計的に有意な VSMC 増殖抑制作用を示さなかった。

我々は予備の実験にて、G_{Ba}-SM3 細胞増殖モデルでは、アンギオテンシン II の増殖促進作用は比較的弱く、1 mM と比較的高濃度で有意な増殖促進作用を発揮することを確認している (未発表デー

タ)。また、今回使用した実験系では培養液中にアンジオテンシン II を添加しない限り、アンジオテンシン II による VSMC への増殖刺激作用はほとんどないと推測される。それゆえ、本実験系では、ARB や ACEI に顕著な増殖抑制作用が観察されなかった可能性が考えられる。

また、アルドース還元酵素阻害薬、エバルレスタットは有意な VSMC 増殖抑制作用を示した (Fig. 1(D))。同薬は、ポリオール代謝活性作用を介して protein kinase C (PKC) の活性を低下させることが報告されているので^{18,19)} VSMC に対する酸化ストレスの細胞内情報伝達経路に關与する PKC の阻害を介して抑制された可能性があると考えた。我々の実験系は、薬物の pleiotropic 作用を介する抗動脈硬化作用をスクリーニングに有用であると考えますが、評価対象となった薬物の培養液中濃度が、臨床使用量における血漿中薬物濃度をかなり上回る (70 倍から 8800 倍) ことが *in vivo* への外挿を考える際に解決すべき問題点であると考えた。したがって、他の実験で 0.1 μM で増殖抑制作用を発現することが確認されているアムロジピンを除き、今回の実験系で得られた結果を直接臨床試験で観察される pleiotropic 作用に外挿することは慎重であらねばならないと考える。

したがって、今後、より低濃度域における増殖抑制効果の検討や、異なる酸化ストレス条件下での検討を加えることは是非とも必要であると考えた。しかし、本実験系は、各種治療薬物の pleiotropic 作用を簡便にスクリーニングし得る他に代え難い利点を有するため、他の *in vitro* 実験系の結果、長期の *in vitro* 動物又は臨床試験の結果と対照させつつ今後も更なる検討を加えるに値する方法であると考えた。

REFERENCES

- 1) Chobanian A. V., Bakris G. L., Black H. R., Cushman W. C., Green L. A., Izzo J. L. Jr., Jones D.W., Materson B.J., Oparil S., Wright J. T. Jr., Roccella E. J., National Heart, Lung, and Blood Institute Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure, *JAMA*, **289**, 2560–2572 (2003).
- 2) Offermann M. K., Medford R. M., *Stroke*, **3**, 52–57 (1994).
- 3) Alexander R. W., *Hypertension*, **25**, 155–161 (1995).
- 4) Schieffer B., Schieffer E., Hilfiker-Kleiner D., Hilfiker A., Kovanen P. T., Kaartinen M., Nussberger J., Harringer W., Drexler H., *Circulation*, **101**, 1372–1378 (2000).
- 5) Ross R., *Nature*, **362**, 801–809 (1993).
- 6) Laufs U., Marra D., Node K., Liao J. K., *J. Biol. Chem.*, **274**, 21926–21931 (1999).
- 7) Laufs U., La Fata V., Plutzky J., Liao J.K., *Circulation*, **97**, 1129–1135 (1998).
- 8) Tulenko T., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **26**, S11–S17 (1995).
- 9) Lafont A., Libby P., *J. Am. Coll. Cardiol.*, **32**, 283–285 (1998).
- 10) Morishita R., *Nippon Naika Zasshi* 20; 91, 116–120 (2002).
- 11) Oishi K., Itoh Y., Isshiki Y., Kai C., Takeda Y., Yamaura K., Ohmuro T. H., Uchida K. M., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **279**, C1432–C1442 (2000).
- 12) Yamaguchi T., Oishi K., Uchida M. K., Echizen H., *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 1706–1710 (2003).
- 13) Tulenko T. N., Sumner A. E., Chen M., Huang Y., Laury-Kleintop L., Fedinand F. D., *Am. Heart J.*, **141**, S1–S11 (2001).
- 14) Xiaoping Z., Thomas H. H., *Circulation*, **97**, 576–580 (1998).
- 15) Corsini A., Pazzucconi F., Armaboldi L., Pfister P., Fumagalli R., Paoletti R., Sirtori G. R., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **31**, 773–778 (1998).
- 16) Faggiotto A., Paoletti R., *Hypertension*, **23**, 987–996 (1999).
- 17) Hamelin B. A., Turgeon J., *Trends Pharmacol. Sci.*, **19**, 26–37 (1998).
- 18) Yasunari K., Kohno M., Kano H., Yokokawa K., Horio T., Yoshikawa J., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **15**, 2207–2212 (1995).
- 19) Yasunari K., Kohno M., Kano H., Minami M., Yoshikawa J., *Hypertension*, **35**, 1092–1098 (2000).