

女性ホルモンエストロゲンと
アドレナリンの血管形成に与える影響
—培養血管内皮細胞を用いた検討—

西 田 昌 司
近 藤 奈津子

Summary

The Effects of Estradiol and Adrenaline on Angiogenesis —A Study Using Vascular Endothelial Cell Cultures—

NISHIDA Masashi, KONDOH Natsuko

During morphogenesis in human development, stem cells or precursor cells of vascular system actively divide, move and form vascular tree in embryo (vasculogenesis). However, vascular system retains plasticity even after adult stage of human. Endothelial cells of vasculature in ischemic tissue are activated by humoral factors and change their phenotype. They restart to build neo-vasculature in ischemic region as an adaptation phenomenon (angiogenesis).

Female hormone and exercise are two of the important humoral factors that modulate angiogenesis. Therefore, exercise in women may cause different effects on vasculature compared with men. Eventually, the incidence and severity of ischemic diseases are different between male and female. In this study, we examined the effects of a typical female hormone, 17β -estradiol and a typical humoral factor of exercise, adrenaline on angiogenesis using cultured vascular endothelial cells.

When bovine aortic endothelial cells cultured on a plastic dish were partially scraped off, cells were activated and migrated toward free space from the edge. We quantitated the distance of cell migration under microscopy. 17β -estradiol (100pM) and adrenaline (10nM) increased migration of endothelial cells, which was inhibited by specific estrogen receptor antagonist, ICI 182,780 and β -adrenergic receptor antagonist, propranolol. Co-administration of 17β -estradiol (100pM) and adrenaline (10nM) decreased cell motility compared to 17β -estradiol or adrenaline alone. Neither ICI 182,780 nor propranolol abrogated the effect of co-administration.

These results suggest that humoral milieu of sex difference and exercise exert their effects on angiogenesis in a cellular model via specific receptors, respectively. They also showed synergistic effect on cell migration. However, the mechanism of synergy was not receptor-mediated. Therefore, when applying exercise on women, it should be noted that the result may not be similar with that on men.

背景

心疾患と血管新生

心疾患の原因の一つとして、心筋への血流需給のアンバランスが挙げられる。動脈硬化による供給の減少、または心筋代謝の亢進による需要の増大によって心筋組織は虚血状態に陥り、心筋細胞不全や心筋細胞死、ひいては心不全や心筋壊死（心筋梗塞）が惹起される。しかし、心筋組織は単に血流不足により障害を被るのみならず、心筋虚血に対する適応現象として、心疾患の初期に健常な冠状動脈から新たな血管が作られて血液供給を増加することにより心筋虚血の進展を防ぐことが知られている¹。このような過程は血管新生と呼ばれ、既存の血管壁の構造が変化し、血管内腔を構成する内皮細胞が虚血領域に遊走、増殖して新たな管腔を形成し、さらに血管周囲に存在するペリサイトが遊走、増殖して成熟した血管を形成する。従って血管新生の調節には局所の血管内皮細胞に対する調節機構が重要な役割を占め、液性の血管新生促進因子と抑制因子の関与が検討されている²。

心疾患における性差

一方、心疾患の発症や進展には性差が存在する。一般的に虚血性心疾患は壮年男性に発症が多いとされるが、その罹患率の性差は年齢とともに変化する。特に、閉経期以降には女性の発病率が急激に上昇する³。閉経に伴うこのような虚血性心疾患の疫学上の変化を説明する生理学的な変化として、卵巣機能の急激な低下による 17β エストラジオール (E_2) 欠乏状態が注目を集めている。女性ホルモンとして同定された E_2 は、生殖年齢の女性生殖器に対する作用のみならず、胎生期や生殖器以外の組織に対する作用も発揮することが明らかとなっている。心血管系においても、心臓や血管壁に直接作用して、血管収縮性の調節⁴ や心血管保護作用⁵ を発揮していることも示されている。

エストロゲンは卵巣の莢膜細胞で産生されるアンドロゲンが原料となり、アロマターゼの働きでエストロゲンに転換され、卵胞顆粒膜細胞より血中に分泌される。エストロン (E_1)、エストラジオール (E_2)、エストリオール (E_3) の3種類のエストロゲンが血液中に存在する女性ホルモンとしてよく知られている。エストロゲンは、水酸基と環状の炭化水素骨格を併せ持つことから、血中では性ホルモン結合グロブリン蛋白質 (sex hormone-binding globulin; SHBG) に結合するものと遊離型として存在するものがある。 E_2 の場合、SHBG結合 E_2 が細胞膜で解離して利用されるか、または細胞内 E_2 濃度を高める機構が存在していると考えられている⁶。

E_2 の作用は核内受容体であるエストロゲン受容体 α とエストロゲン受容体 β によって発揮される。エストロゲン受容体はエストロゲン依存性の転写因子であり、エストロゲン応答配列 (ERE) の近傍に位置する下流応答遺伝子を調節する⁷。血管形成過程においても、 E_2 はエスト

ロゲン受容体を介して内皮細胞の増殖、遊走、管腔形成を促進することが *in vitro*、*in vivo* の実験系において知られている⁸。

心疾患と運動

また、運動も心疾患の病態を修飾する重要な因子である。運動が心疾患を抑制する原因としては、体脂肪率の減少、血中リポ蛋白の改善、耐糖能およびインスリン感受性の改善、血圧の低下などがあげられる。これらは、肥満、高コレステロール血症、糖尿病、高血圧といった心疾患の危険因子への作用である。しかし、運動はこれらの危険因子に対する作用とは別に、心臓や血管に直接作用し、その機能や構造を変化させることも知られている^{9,10}。運動は冠血流量を増加し、血管内皮に対するシェアストレスを増加させ、血管に対する刺激作用を持つ。また持続的な血管への刺激は NO 産生に関連する酵素の発現を増加させ、内皮機能を改善する。さらに、骨格筋においては、運動により血管新生促進因子である VEGF (vascular endothelial growth factor) の蛋白質や mRNA、また VEGF 受容体である Flt-1 が上昇することが明らかにされている¹¹。

運動時の生体反応を司る液性因子であるアドレナリンは副腎髄質で産生される。アドレナリン受容体には α と β のサブタイプが存在する。さらに α 受容体は $\alpha 1$ と $\alpha 2$ に、 β 受容体は $\beta 1$ と $\beta 2$ 、 $\beta 3$ に分類される¹²。生体内では組織によって α 受容体、 β 受容体の密度、比率が異なり、多様な作用が発揮される。例えば血管においては、平滑筋への $\alpha 1$ 受容体刺激は血管収縮を引き起こし、 $\beta 2$ 受容体刺激は cAMP を増加させ血圧低下に関与する。内皮細胞においてもアドレナリンは $\beta 2$ 受容体に結合して細胞内の Ca^{2+} を増加させ、一酸化窒素 (NO) 合成酵素；(NOS) が活性化される¹³。

女性における運動と心疾患

女性において運動は心疾患の予防に作用することが明らかにされている。一次予防としては激しい運動か歩行かといった運動強度に関わらず、心疾患の発症を減少する¹⁴。また、軽度の運動は虚血性心疾患・心不全の予防に有効であることが実証されており、心疾患の治療法の一つとして心疾患の重症度の判定を経て運動療法が処方されている。しかし、疾患発症のリスクとして性差が重要な因子であるにも関わらず、心疾患の予防を検討した研究は男性を対象として行われた研究が大半であり、女性に対するエビデンスが少ない現状では男性と同じ運動ガイドラインが女性にも推奨されている。

女性においても、男性と同様に身体活動による血糖値、血中脂質などの危険因子の改善が間接的に虚血性疾患予防効果をもたらすと考えられてきた¹⁵。しかし、エストロゲンと運動がともに血管系に作用することが明らかとなったことより、両者の血管内皮細胞に対する相互作用が、女性の心疾患の予防に特異的に関与している可能性が考えられる。

目的

女性における心疾患予防に果たす運動の役割を細胞レベルで明らかにすることを目的に、培養血管内皮細胞を用い、血管形成のステップである細胞遊走モデルを作成し、女性ホルモンエストロゲンと運動の液性因子アドレナリンの細胞遊走に及ぼす影響を検討した。

方法

内皮細胞培養

ウシ大動脈内皮細胞 (BAEC) はダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) (Sigma) に10%ウシ胎児血清 (FBS) で培養した。E₂の影響はグルコースを添加したフェノール・グルコースフリーダルベッコ改変イーグル培地 (IMEM) (Sigma) に10%活性炭処理済ウシ胎児血清 (CD-FBS) を添加して検討した。実験には7代目から19代目の細胞を用いた。

遊走モデルの作成

細胞遊走能の検討には、創傷を作成した内皮細胞の遊走を測定した。BAEC をグリッド線付ディッシュ (直径60mm) に 2×10^6 コ / 5 ml 播種し、接着後、IMEM/10%CD-FBS で培養した。コンフルエントになった細胞をセルスクレーパー (イワキ) を用いて直交する2本分かきとり創傷を作成し、ホルモンを含まない無血清培地 (IMEM/グルコース1.2g/L、0.1%ゼラチン [w/v]) に交換した。創傷直後、24時間後に画像取得装置アクアコスモス (浜松ホトニクス) を用いて、位相差顕微鏡像の画像撮影 (×100) を行った。創傷した場所から遊走細胞の先端までの距離を1皿あたり3視野、1視野あたり10箇所ずつを定量した。定量には、画像解析ソフト Photoshop (Adobe 社製) と Wacom 社製タブレットを使用した。

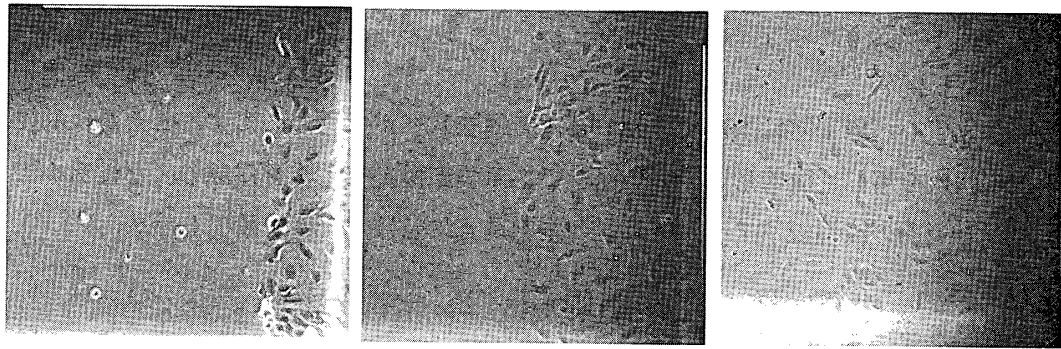
結果

遊走能モデル

培養内皮細胞 (BAEC) を用いた血管形成モデルとして、血管新生の第一段階である既存血管からの内皮細胞遊走のステップに着目し、培養細胞の創傷作成による細胞遊走モデルを作成した。血管形成における基底膜の分解後と同様に創傷により接着刺激を失った細胞は、活性化され NO や VEGF を放出する。これらの生理活性物質は内皮細胞の細胞骨格やインテグリン、モーター蛋白を活性化して細胞の運動を惹起する。今回の実験においても、創傷作成後5時間、24時間後には創傷部位からスペースへ向かって遊走する細胞が観察された (図1)。

エストロゲンの影響

女性における血管形成の細胞モデルとして、培養液中の E₂の有無により、創傷後の培養内皮細胞の遊走能が変化するか否かを検討した。通常のもediumで増殖、播種した細胞をホルモンフリーmediumに E₂ (100pM) を添加した培養液で48時間培養して創傷を作成し、再度



a. 創傷直後

b. 5時間後

c. 24時間後

図1 内皮細胞遊走の時間過程

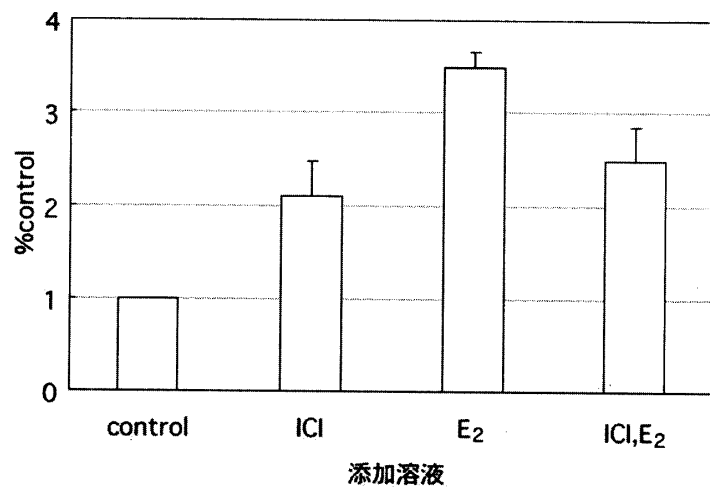


図2 エストロゲンと ICI182,780の内皮細胞遊走能に及ぼす影響

同濃度の E₂を添加して24時間後の細胞遊走能を検討した。DMSOのみを添加したコントロールに対し E₂を添加すると細胞遊走が促進された。以後この濃度を女性モデルとして用いた (図2)。

アドレナリンの影響

内皮細胞を用いた血管新生モデルに、さらに運動の要因を加えた細胞モデルを作成した。運動の液性因子として副腎髄質ホルモンであるアドレナリンを用い、BAEC創傷による遊走モデルにアドレナリンを添加して検討を行った。

創傷前にアドレナリン 1 nM~1 μM を添加し、48時間培養した。創傷直後再びアドレナリンを同濃度添加し、遊走能を測定した。何も添加していないコントロールに対し、アドレナリンは 1~10nM の濃度で細胞遊走を有意に促進した。また、1 μM の濃度では細胞形態が変化し、細胞同士が密着し退縮した様子が観察された (図3)。

受容体拮抗薬の影響

次に、エストロゲン受容体拮抗薬である ICI182,780とアドレナリン β 受容体拮抗薬である

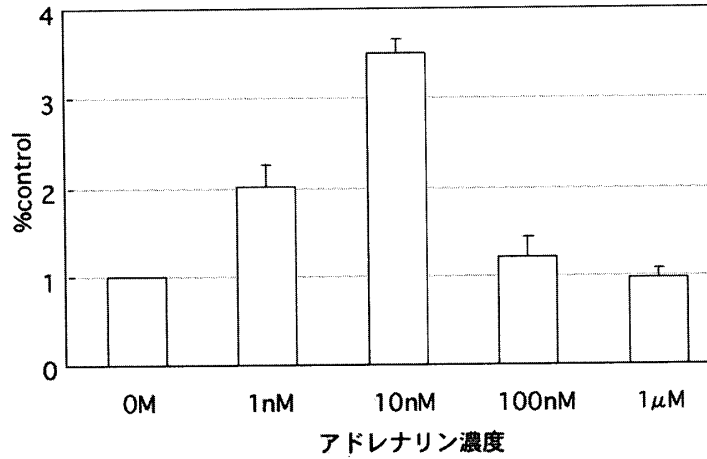


図3 アドレナリンの内皮細胞遊走能に及ぼす影響

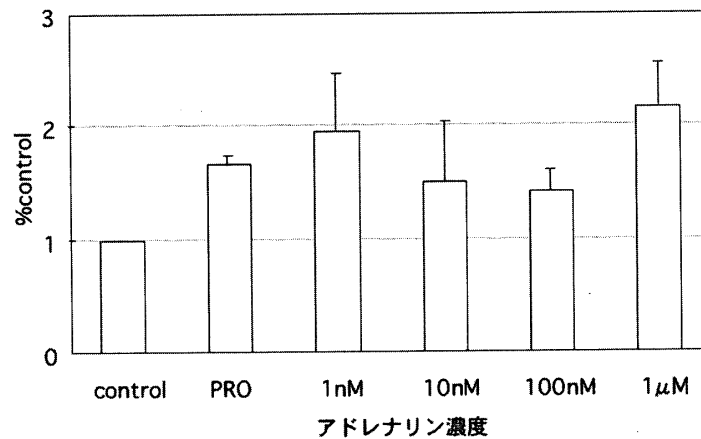


図4 プロプラノロールの内皮細胞遊走能に及ぼす影響

プロプラノロールを用いて、エストロゲンとアドレナリンが細胞遊走に与えた影響がエストロゲン α 受容体、及び β 受容体を介したものであるか否かを検討した。はじめにエストロゲンの細胞遊走促進作用が受容体を介したものであるか否かを検討するため、ICI182,780 (1 nM)を添加し15分培養した後にエストロゲン (100pM)を添加して48時間培養した。創傷作成後同濃度のICI182,780、エストロゲンを添加し、24時間後の細胞遊走を測定した。ICI182,780のみを添加したコントロールに対し、ICI182,780とエストロゲンを添加すると遊走能が促進された。しかしその程度はエストロゲンを単独で投与したときよりも抑制されていた(図2)。次に、アドレナリンの細胞遊走に与える影響が受容体を介したものであるか否かを検討した。プロプラノロール (10 μ M)を添加し、15分培養した後にアドレナリン (1 n~1 μ M)を添加して48時間培養した。創傷作成後同濃度のプロプラノロール、アドレナリンを添加し、24時間後の細胞遊走を測定した。アドレナリンを単独で添加したときとは異なり、細胞遊走は促進されなかった(図4)。

エストロゲンとアドレナリンの影響

女性における血管形成モデルにアドレナリンを添加し女性における運動が内皮細胞遊走に与

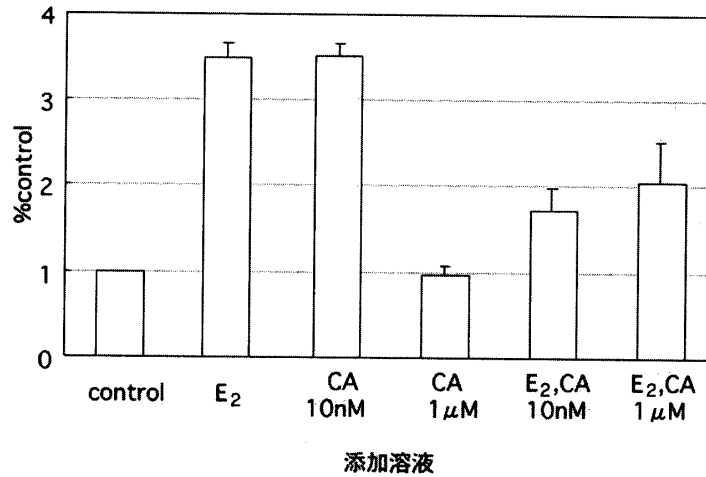


図5 エストロゲンとアドレナリンの内皮細胞遊走能に及ぼす影響

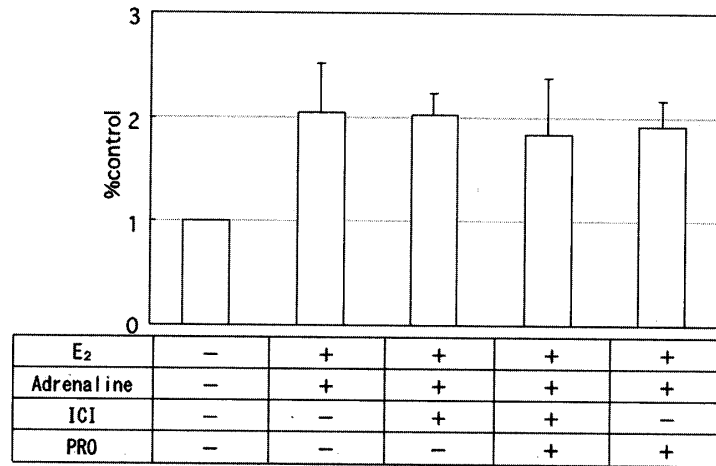


図6 プロプラノロールとICI182,780の内皮細胞遊走能に及ぼす影響

える影響を検討した。E₂ (100pM) とアドレナリン (10n, 1µM) をそれぞれ添加し、48時間培養した後に創傷を作成した。創傷作成後、同濃度のE₂とアドレナリンを添加して24時間後の細胞遊走を測定した。E₂とアドレナリンを低濃度 (10nM) で添加した群では、細胞遊走は同濃度のE₂またはアドレナリンを単独で添加したときよりも抑制された (図5)。一方、E₂とアドレナリンを高濃度 (1µM) で添加すると、細胞遊走がアドレナリンを単独で添加した細胞よりも促進された。そこで高濃度アドレナリン存在下でのE₂の細胞遊走促進作用がエストロゲンα受容体、β受容体を介したものであるか否かを各々の拮抗薬を用いて検討した。ICI 182,780、プロプラノロールを単独で添加した場合、双方を同時に添加した場合のいずれにおいても、拮抗薬を添加していないコントロールに対して有意な差は得られなかった (図6)。

考察

生体内での血管形成において内皮細胞は細胞外基質、遊走、増殖、管腔形成のすべてのステップにおいて主役となる。培養血管内皮細胞においても遊走、増殖、管腔形成といった現象が観察されることから、内皮細胞の単独培養による細胞遊走モデルを作成して性差と運動の血

管形成に及ぼす影響の検討を試みた。

エストロゲンとアドレナリン単独の作用

女性の生理的濃度として100pMのエストロゲンを添加すると細胞遊走は促進された。また、アドレナリン単独では運動時の血中濃度である1 nM~10nMの濃度で細胞遊走を促進した。ノルアドレナリンは受容体を介して脂肪細胞におけるVEGF産生を高めること¹⁶、アドレナリンは内皮細胞においてリポポリサッカリド(LPS)と相加的にIL-6(VEGFを分泌誘導するサイトカイン)の産生を高めること¹⁷が知られており、内皮細胞においてもアドレナリンは受容体を介して、同様の作用を発揮する可能性が考えられる。一方、高濃度(1 μ M)のアドレナリンは細胞形態に影響を与えることが観察された。これらのエストロゲンとアドレナリンの細胞遊走に対する作用がエストロゲン受容体(ER)及び、アドレナリン受容体(α 受容体、 β 受容体)を介したものであるか否か受容体拮抗薬を用いて検討した。

受容体拮抗薬の影響

エストロゲンの作用機構には膜表面及び核内に存在するERを介して遺伝情報の転写を促進する作用(genomic action)とERを介さずに直接生理活性物質と反応する作用(non-genomic action)が存在する¹⁸。ICI182,780で前培養し、エストロゲンを添加すると、エストロゲン単独で投与した場合に比べ、遊走が抑制されたことからエストロゲンはERを介したメカニズムでも細胞遊走を促進することが示された。ただし、ER拮抗薬ICI182,780のみを添加した群でも遊走能が促進されたが、これはICI182,780がERに結合することでシグナル伝達を部分的に活性化するパーシャルアゴニストとして作用することを示唆している。

一方、アドレナリンの作用機構には α 、 β 受容体を介して遺伝情報の転写を促進する作用と受容体を介さずに活性酸素を産生する作用が存在する¹⁹。今回は β 受容体遮断薬であるプロプラノロールを用いた。はじめにプロプラノロールのみを添加した群で細胞遊走が促進された。 α 、 β 受容体はどちらも膜貫通型G蛋白受容体である。プロプラノロールにもICI182,780と同様に受容体に結合し、パーシャルアゴニストとして遊走促進に作用する可能性が考えられる。また、心疾患において β 受容体遮断薬は心筋 β 1受容体を遮断し、心拍数と心筋収縮力をおとし、心臓の酸素需要を抑制する。心筋においてはアドレナリンが過剰に刺激すると β 1受容体の発現量、感受性が低下し心不全症状が生じる。 β 遮断薬が心不全を改善するのは、心筋細胞の β 受容体を遮断すると同時に β 受容体を増加させ、再感作するメカニズムが明らかにされつつある²⁰。よって内皮細胞に対しても高濃度のアドレナリン刺激を遮断し、アドレナリンの内皮細胞活性化作用を増強することで二相性に細胞遊走は促進された可能性もある(1 nM、1 μ M)。さらにプロプラノロールで前培養し、アドレナリン(1 μ M)を添加すると、細胞遊走が促進されたことより、高濃度のアドレナリンは受容体を介して細胞形態に変化を与え、細胞遊走を抑制していたと考えられる。

エストロゲンとアドレナリンの相加的影響

10nM と 1 μ M のアドレナリンと、エストロゲンを同時に添加すると、10nM ではアドレナリン単独で添加したものよりも遊走は抑制され、1 μ M では遊走は促進された。後者の作用はエストロゲン、アドレナリンどちらの受容体拮抗薬を用いても変化しなかったことからエストロゲンとアドレナリンが直接作用し、細胞遊走に影響を与えたと考えられる。アドレナリンは活性酸素産生作用、エストロゲンには活性酸素除去作用が存在する²¹。より高濃度のアドレナリンが産生した活性酸素はエストロゲンの代謝を促進し、細胞を保護したと考えられる。またエストロゲンとアドレナリンは代謝酵素 (COMT) を拮抗した可能性もある²²。

女性における運動と心疾患

今回の実験系において、女性ホルモンエストロゲンが内皮細胞を活性化して遊走能を促進したことから、エストロゲンは血管形成調節に重要なホルモンである可能性が示唆された。したがって閉経期以降の女性ホルモンの低下は血管形成能を低下させ、心疾患発症のリスクを高めると考えられる。また内皮細胞の遊走能において、アドレナリンはエストロゲンと相加的に作用した。このことは、女性における運動は女性ホルモンの作用と密接な関連を持つことを示しており、今後、女性独自のデータに基づき、女性の各年代における運動の心疾患に及ぼす影響を検討していくことが重要となろう。

参考文献

1. 児玉龍彦, 高橋潔, 渋谷正史 1997 「心臓および各臓器の血管と病気」『血管生物学』120-174
2. 佐藤靖史 2000 「血管新生概論」『血管新生研究の新展開』18-31
3. Lerner, D. J., Kannel, W. B. 1986 Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes: A 26 year follow-up of the Framingham population. *Am Heart J* **111** 383-390
4. Lew, R., Komesaroff, P., Williams, M. et al. 2003 Endogenous estrogens influence endothelial function in young men. *Circulation Research* **93** 1127-1133
5. Losordo, D. W., Isner, J. M. 2001 Estrogen and angiogenesis a review. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21** 6-12
6. 玉舎輝彦 1999 「エストロゲンレセプター」『エストロゲン—新しい視点から見た作用と臨床—』メジカルビュー社 24-33
7. Muller, M. D. 2000 Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors α and β . *Proc Natl Acad Sci USA* **97** 10972-10977
8. Morales, D. E., McGowan, K. A., Grant, D. S. et al. 1995 Estrogen promotes angiogenic activity in human umbilical vein cells in vitro and in a murine model. *Circulation* **91** 755-763
9. Yamashita, N., Nishida, M., Hoshida, S. et al. 1997 The protective effect of exercise on acute myocardial infarction in rat. *J Am Coll Cardiol* **29** (suppl), A 270
10. Vita, J. A., Keaney, Jr, J. F. 2000 Exercise-toning up the endothelium? *N Engl J Med* **34** 2503-2505
11. Lloyd, P. G., Prior, B. A., Yang, H. T. et al. 2003 Angiogenic growth factor expression in rat skeletal muscle in response to exercise training. *Am J Physical Heart Circ Physiol* **284** H1668-1678
12. Hoffman, B. B. 2001 Catecholamines sympathomimetic drugs and adrenergic receptor antagonist. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics 10th edition 215-268

13. 大谷修, 堀尾善幸 2002 「循環動態の調節」『人体の正常構造と機能Ⅱ循環器』日本医事新報社 78-79
14. Manson, J. E., Hu, F. B., Rich-Edwards, J. W. et al. 1999 A prospective study of walking as compared with vigorous exercise in the prevention of coronary heart disease in women. *N Engl J Med* **34** 1, 650-658
15. 川久保清, 李延秀 2000 「女性における生活習慣改善の虚血性心疾患予防効果；身体活動, 運動」『女性における虚血性心疾患』医学書院 124-129
16. Fredriksson, M. J., Lindquist, M. J., Bronnikov, G. E. et al. 2000 Norepinephrine induces vascular endothelial growth factor gene expression in brown adipocytes through a β -adrenoreceptor/cAMP/Protein kinase A pathway involving Src but independently of Erk 1/2. *The Journal of Biological Chemistry* **275** (18) 13802-13811
17. Cornikiewicz, A., Sautner, T., Brostjan, C. et al. 2000 Catecholamines up-regulate lipopolysaccharide-induced IL-6 production in human microvascular endothelial cells. *FASEB J* **14** 1093-1100
18. Mendelsohn, M. E. 2000 Nongenomic, estrogen receptor-mediated activation of endothelial nitric oxide synthase. *Circ Res* 87956-87960
19. Zhou, Q., Hulea, S., Kummerow, F.A. 1995 Effects of adrenochrome and epinephrine on human arterial endothelial cells in vitro. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* **89** (1) 111-126
20. 児玉龍彦, 高橋潔, 渋谷正史 1997 「血管治療薬の分子生物学」『血管生物学』175-204
21. Prokai, L., Prokai-Tatrai, K., Perjesi, P. et al. 2003 Quinol-based cyclic antioxidant mechanism in estrogen neuroprotection. *Proc Natl Acad Sci USA* **100** (20), 11741-11746
22. Dubey, R. K., Zacharia, L. C., Gillespie, D. G. et al. 2003 Catecholamines block the angiotensin II effect of estradiol on human glomerular mesangial cells. *Hypertension* **42** 349-355

(原稿受理 2004年4月13日)