

血管平滑筋細胞の表現型変化に及ぼす  
エストロゲンと植物エストロゲンの影響の比較  
—— 動脈硬化抑制との関連からの検討 ——

福 島 久 美  
西 田 昌 司

## Summary

### Comparison of the Effect of Estrogen and Phytoestrogen on Phenotypical Changes of Vascular Smooth Muscle Cells —A Study in Relation to the Suppression of Atherosclerosis—

FUKUSHIMA Kumi, NISHIDA Masashi

Randomized clinical trials on the effect of the hormone replacement therapy showed that oral administration of  $17\beta$ -estradiol did not reduce the risk of cardiovascular disease. Furthermore, it increased the risk of breast cancer in a studied population. In contrast, isoflavone, one of the phytoestrogens abundant in soy beans, is supposed to protect vasculatures from atherosclerosis, because of a low incidence of coronary heart disease in Asian countries where high level of soy products is consumed. Therefore we compared the effects of  $17\beta$ -estradiol and isoflavone on the development of atherosclerosis using cultured smooth muscle cells. Previous studies mainly examined the reduction of risk factors such as lipid metabolism and the prevention of early lesion such as fatty streak by estrogen-like substances. In this study, we divided atherosclerosis into three stages and focused on their effects on vascular smooth muscle cells.

We examined how estrogen and phytoestrogen affects on three phenotypes of smooth muscle cells: migration, uptake of modified low density lipoprotein (LDL), and type V collagen synthesis. Estrogen suppressed smooth muscle cell migration induced by platelet-derived growth factor (PDGF)-BB from the physiological concentration, enhanced uptake of modified LDL and synthesis of type V collagen only at the higher concentration. Isoflavone also inhibited cell migration at the physiological concentration, but this effect could not be detected at the higher concentration. As for the uptake of modified LDL, isoflavone did not enhance until  $10\mu\text{M}$ . Also it induced synthesis of type V collagen at  $10\text{pM}$ , but did not show significant difference at the higher concentrations.

These data suggest that both estrogen and isoflavone prevent atherogenic plaque formation by vascular smooth muscle cells, but may promote plaque instabilization by the alteration of extracellular matrix. This study emphasizes the need to evaluate influences of estrogen and isoflavone on each step of the atherosclerotic plaque formation.

## 1 背景

虚血性疾患とは血管の狭窄や血栓により末梢組織へ血液を供給できなくなる疾患の総称であり、狭心症や心筋梗塞、脳血管疾患に代表される。虚血性疾患は、近年、発症率が急激に増加して日本人の主な死因のひとつとなっているが、その原因となるのが動脈硬化である。動脈硬化は低比重リポタンパク（LDL）の血管壁への沈着から始まる。血管壁に沈着した LDL は酸化をはじめとする変性を受けて、内皮細胞の障害やマクロファージの浸潤などを引き起こす。その結果として生じる動脈硬化病変（プラーク）は、リピッド・コアと線維性キャップから構成されている。リピッド・コアはプラークの中心部に位置し、コレステロールを大量に溜め込んでいる。線維性キャップはそのリピッド・コアを覆うように存在する。病変が進行するとリピッド・コアは拡大し、線維性キャップは脆弱化する。最終的にはプラークは崩壊して急性の血管閉塞が起こり、虚血性疾患が発生する。

このようなプラークの形成・崩壊過程において、血管平滑筋細胞の表現型変化が重要な役割を占めることが明らかとなってきた。平滑筋細胞は正常血管では中膜に存在して収縮・弛緩することにより血圧を調節する働きを担っているが、変性 LDL や障害内皮細胞やマクロファージから分泌される生理活性物質の刺激により本来の性質を失い、合成型平滑筋に形質転換（脱分化）する。合成型となった平滑筋細胞は基底膜を分解し、中膜から内膜へと遊走する。内膜へ遊走した平滑筋細胞は盛んに増殖するとともに、変性 LDL を細胞内に取り込むようになる。過剰に変性 LDL を取り込んだ細胞はコレステロールエステルを大量に蓄積し、やがて泡沫化する。このような細胞によりリピッド・コアは形成される。また、内膜平滑筋細胞はコラーゲンをはじめとする細胞外マトリックスを合成する。この細胞外マトリックスにより線維性キャップは構成されており、その量と種類により線維性キャップの強度が決定する。線維性キャップの脆弱化を進める因子として V 型コラーゲンが挙げられる。V 型コラーゲンはコラーゲン線維の直径を制限するため、過剰な V 型コラーゲンは線維性キャップの脆弱化につながる。

一方、男性や閉経後女性と比較して閉経前女性では虚血性疾患罹患率が低い事などより、女性ホルモンであるエストロゲンは血管保護作用があると考えられている。実際、エストロゲンは動脈硬化の原因となるコレステロールの代謝を制御する<sup>1,2)</sup>ほか、血管細胞に直接働き抗動脈作用を示す。そのため閉経後女性に対するエストロゲン補充療法は虚血性心疾患の予防になると考えられ、その有効性についてはいくつかの疫学調査からも支持されてきた。このような背景を踏まえて、1993年から米国で閉経後女性におけるホルモン補充療法による虚血性心疾患への影響を調べるために大規模な臨床試験（HERS II）が行なわれた。虚血性心疾患の既往のある女性2800人をプラセボを服用する群と経口ホルモン薬（エストロゲンとプロゲステロン）を服用する群に分け、6.8年間追跡した。その結果、両者の間では有意な差が認められず、ホル

モン補充療法は虚血性心疾患予防には効果がないと結論された<sup>3)</sup>。この臨床試験ではプラセボ群で HMG-CoA 還元酵素阻害剤を服用している率が多い、プロゲステロンの濃度が高いなどの問題があるが、虚血性心疾患の既往のある人が対象者となったことが期待に反した結果をもたらしたと考えられる。エストロゲンの血管保護作用に関しては、コレステロール代謝改善<sup>1,2)</sup>や内皮細胞における機能改善<sup>4)</sup>、平滑筋細胞における増殖・遊走抑制<sup>5,6)</sup>などが言われており、初期動脈硬化病変の形成に関わるものがほとんどで、エストロゲンの中期以降の動脈硬化への影響についての研究が欠如している。

エストロゲンと構造が似ており、またエストロゲン受容体と親和性がある物質が植物界にも存在する。これらは植物エストロゲンと呼ばれ、イソフラボン、クメスタン、リグナンの3種に分類される。中でも大豆に含まれているイソフラボンはエストロゲン受容体に対する親和性が最も強く、生体内でも活性があることが分かった。大豆を多く摂取する日本を含む東南アジアでは生殖器の癌や心臓病、骨粗鬆症の発症率、死亡率が低いことより、イソフラボンとの相関が注目されはじめた。その結果、イソフラボンは組織や細胞の種類によりエストロゲン受容体に対してアゴニストとしてもアンタゴニストとしても働くこと、また、エストロゲン受容体を介する作用以外にもチロシンキナーゼ阻害<sup>7)</sup>や DNA トポイソメラーゼ阻害<sup>8)</sup>などの作用があることが明らかとなった。血管においてはエストロゲンと同調して働き、コレステロール代謝改善<sup>9)</sup>や抗酸化作用<sup>10)</sup>などを通して保護的な作用をしている。また、血管壁の細胞にも直接作用して、内皮細胞による一酸化窒素産生<sup>11)</sup>やマクロファージによる tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  の分泌<sup>12)</sup>、平滑筋細胞の増殖抑制<sup>13)</sup>などの作用があることがわかった。このように、イソフラボンはエストロゲンと同様のメカニズムで動脈硬化の発症を抑えることが示唆された。しかしながら、エストロゲンと同様、中期以降の病変への影響についての検討がなされておらず、HERS II でみられたように二次予防への効果の有無が懸念される。

## 2 目 的

エストロゲン、イソフラボンの抗動脈硬化作用に関しては現在までに多くの研究があるが、その多くは動脈硬化の危険因子や初期病変形成に関わるものである。そのため、今回の研究では動脈硬化の進行過程を3段階に区切り、各段階へこれらの物質が影響を示すか否かを検討した。具体的には初期病変として平滑筋細胞の遊走能、中期病変として平滑筋細胞の変性 LDL の取り込み能、後期病変として平滑筋細胞のコラーゲン産生能を取り上げた。エストロゲンとして血中に最も豊富に存在する17 $\beta$ -エストラジオール (E2) を、イソフラボンとしては最もエストロゲン活性の強いゲニステインを用いた。

## 3 方 法

### (1) 細胞培養

ラット大動脈平滑筋細胞は、エキスプラント法を用いて単離、培養した。SD 系の雄性ラットから大動脈を摘出し、内膜と外膜を剥離した中膜標本を作製した。3 mm 角に切断した中膜

標本を培養液で覆った培養皿に密着させて数日間培養し、平滑筋細胞が遊走しはじめた時点で中膜標本を取り除き、培養を継続して増殖させた。このようにして得られた平滑筋細胞を、10%ウシ胎児血清 (FBS) (ニチレイ) 含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) (Sigma) を用いて37℃、5%CO<sub>2</sub>で培養した。培養液は3、4日おきに交換した。

## (2) 遊走能の検討

細胞遊走能の検討は改変ボイデンチャンバー法を用いて行った。

96穴ケモタキシスチャンバー (NEURO PROBE) をラミニン (BTI) で処理したフレイムフィルター (PVP フリー、孔径8μm) により上下に仕切った。チャンバーの下段には遊走因子として10ng/mlの血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor-BB; PDGF-BB) を、上段にはトリプシン処理した平滑筋細胞を10<sup>5</sup>個/ウェル添加した。E2、ゲニステインは細胞とともに上段に添加した。37℃で6時間インキュベートした後、フィルターを外してディフクイック (国際試薬) で細胞を染色し、顕微鏡下 (400倍) で遊走細胞数を数えた。フィルターの総孔数に対する遊走細胞数をパーセントで表し遊走能とした。

## (3) 変性 LDL 取り込み能の検討

トリプシン処理した平滑筋細胞を96穴プレート (FALCON) に10<sup>5</sup>個/ウェルの細胞密度で播種してコンフルエントに達するまで培養した後、0.5%FBSを含む培養液に交換して24時間インキュベートした。25ng/ml PDGF-BBを加えてさらに24時間培養後、DiIで標識したアセチル化低比重リポタンパク (DiI-acLDL/BTI) を8mg/ml添加した。24時間、細胞にDiI-acLDLを取り込ませた後、蛍光プレートリーダー (フルオロスキャン/大日本製薬) で蛍光強度 (ex. 518nm, em. 590nm) を測定した。E2、ゲニステインはPDGF-BBとともに加えた。

## (4) コラーゲン産生能の検討

平滑筋細胞によるV型コラーゲンの産生はV型コラーゲン特異抗体を用いたウェスタンブロット法により検出を行った。

コンフルエントになった平滑筋細胞にE2、ゲニステインを添加して48時間培養後、1×サンプルバッファー (50mM Tris-HCl [pH6.8], 2%SDS [w/v], 0.2nM DTT, 10%Glycerol [v/v]) でサンプルを回収した。超音波処理後、DC Protein Assay (Bio-Rad) を用いてサンプル中の蛋白質を定量した。

サンプルを10%アクリルアミドゲルで電気泳動した後、セミドライ式ブロッティング装置を用いてPVDFメンブレンに蛋白質を転写した。メンブレンを4℃で一晩ブロッキングした後、抗V型コラーゲン抗体 (8μg/ml、第一ファインケミカル) と1時間反応させた。TweenPBS洗浄後、ペルオキシダーゼで標識した二次抗体、抗マウスIgM抗体 (ZYMED) と1時間反応させ、ECL advance (Amersham) を用いた発光法で蛋白質を検出した。得られたバンドは画像解析ソフト CS Analyzer (ATTO) を用いて解析した。

## (5) 解析

統計ソフト JMP (SAS) を用いて得られた結果を解析した。ANOVA を行った後に Tukey の HSD 検定を行い、 $p$  値が 0.05 未満の場合を有意差があるとした。

## 4 結果

### (1) 平滑筋細胞の遊走能

#### ①遊走モデル

細胞遊走は以下の 3 つに大別される；①刺激のない状態でおこるランダムな運動 (random motion)、②刺激のある条件下で起こる方向性のない化学運動 (chemokinesis)、③刺激物質 (遊走因子) の濃度勾配にしたがって起こる化学遊走 (chemotaxis)<sup>14)</sup>。このうち、動脈硬化血管で見られる平滑筋細胞の遊走は化学遊走に当てはまる。平滑筋細胞は障害内皮細胞やマクロファージから分泌される生理活性物質を遊走因子として、中膜から内膜へと遊走する。

この化学走化性を培養平滑筋細胞で模擬するためケモタキシスチャンバーを用いた。ケモタキシスチャンバーでは下段に添加している遊走因子にひきつけられるように、上段に加えている細胞がフィルターの孔を通過して遊走する。一定時間 (6 時間) 後、フィルターを貫通している細胞を染色することにより、細胞の遊走能を観察することができる。今回、遊走因子として、動脈硬化血管においても病変形成に大きく関与している血小板由来増殖因子 (PDGF-BB) を用いた。10ng/ml PDGF-BB は平滑筋細胞の遊走を 2.6 倍亢進した。

#### ②エストロゲンの影響

女性ホルモン、エストロゲンは抗動脈硬化作用を持つといわれているが、平滑筋細胞への直接的な影響を調べるため、遊走能への関与の有無を検討した。E2 は細胞とともにケモタキシスチャンバーの上段に添加した。10pM E2 は PDGF-BB による細胞遊走を 74.5%、10 $\mu$ M では 56.4% まで阻害した。(図 1)

#### ③イソフラボンの影響

大豆に含まれるイソフラボンが動脈硬化の初期病変形成を抑制するか否かを検討するため、ゲニステインを細胞に添加して実験を行った。その結果、10pM のゲニステインは PDGF-BB に誘発された細胞遊走を 61.9% に抑制した。1 nM でも同様の遊走抑制を示したが、100nM 以上ではその作用は見られなかった。(図 1)

### (2) 平滑筋細胞の変性 LDL 取り込み能

#### ①変性 LDL 取り込みの実験モデル

血液中に過剰に LDL が存在すると、LDL は血管壁に沈着して侵入する。その後 LDL は酸化をはじめとする変性を受け、動脈硬化病変を形成するように血管細胞に働きかける。変性した LDL は通常の LDL 受容体からではなく、スカベンジャー受容体から細胞内に取り込まれる。スカベンジャー受容体は、LDL 受容体とは異なり負のフィードバック機構を持たないため、際限なく変性 LDL を取り込む。そのため変性 LDL を過度に取り込んだ細胞は、細胞内にコレステ

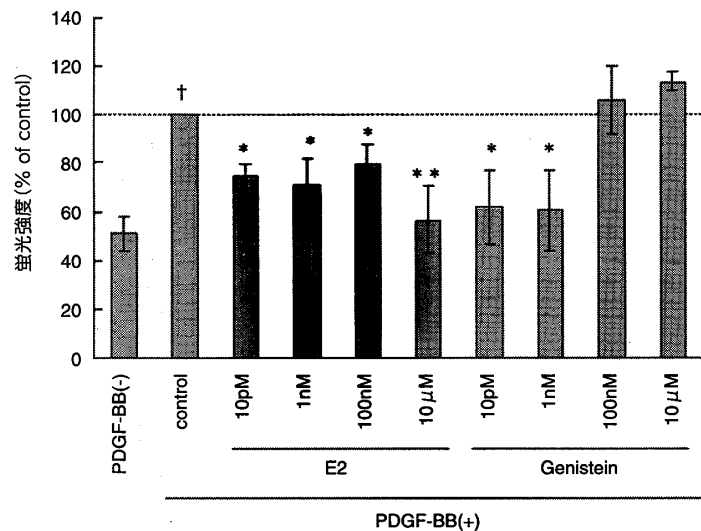


図1. 平滑筋細胞の遊走能に及ぼす E2 とゲニステインの影響

PDGF-BB (10ng/ml) を遊走因子として平滑筋細胞の遊走をケモタキシスチャンバーを用いて検討した。

細胞は1ウェルあたり  $1 \times 10^5$  個播種し、6時間インキュベートした。

\* :  $p < 0.05$  vs control, \*\* :  $p < 0.05$  vs 10pM E2, † :  $p < 0.05$  vs PDGF-BB (-)

ロールエステルを溜め込むこととなり、やがて泡沫化する。この泡沫化した細胞がプラークのリピッド・コアを形成するようになり、プラークの不安定化を進める。このように泡沫化する細胞としてはマクロファージがよく知られているが、平滑筋細胞もスカベンジャー受容体を発現しており、マクロファージ同様、泡沫化するころがわかってきた。また、後期病変ではリピッド・コア中の泡沫細胞の多くが平滑筋細胞由来であることが確認された。

今回、培養細胞を用いて検討するにあたり、変性 LDL として安定性の高いアセチル化 LDL を用いた。また、この LDL を可視化するために蛍光物質、DiI で標識した。この DiI-acLDL を培養液とともに細胞に添加しておく、細胞内に顆粒状に DiI が観察される。

平滑筋細胞は一般的に変性 LDL を取り込まない細胞として知られており、DiI-acLDL の取り込みも内皮細胞に比べて10分の1以下であった。そのため、ベースとなる変性 LDL 取り込み能を上げるために PDGF-BB で活性化した。PDGF-BB を DiI-AcLDL 添加24時間前に加えることにより、その取り込みは2.8倍上昇した。(図2)

## ②エストロゲンの影響

動脈硬化の中期病変にあたる平滑筋細胞の変性 LDL 取り込み能にエストロゲンが与える影響を検討するため、PDGF-BB と同時に DiI-acLDL 添加24時間前に E2 を培養液に加えた。100 nM までの E2 は DiI-acLDL の取り込みに変化を与えなかったが、10μM では取り込みを31.3% 亢進した。100μM ではさらに高い取り込みを示した (4.2倍)。(図2D、図3)

## ③イソフラボンの影響

大豆摂取の動脈硬化進行に対する影響を検討するため、イソフラボンの一種であるゲニステインを用いて検討を行った。10μM までのゲニステインは変性 LDL の取り込みに影響を及ぼさなかったが、100μM では取り込みを1.5倍亢進した。(図3)

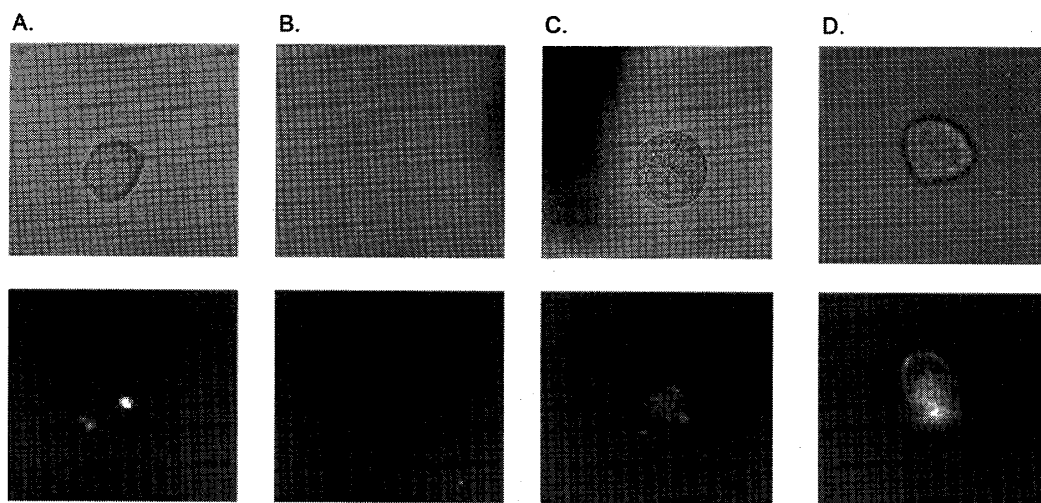


図2. Dil-acLDLの取り込み

Dilで標識したアセチル化LDL (25ng/ml) を添加して24時間後、蛍光像を撮影した。

E2 (10 $\mu$ M) は PDGF-BB と同時に添加した。上は可視光、下は蛍光像

- A. 内皮細胞 (露光時間: 112ms)
- B. 平滑筋細胞 PDGF-BB (-) (露光時間: 332ms)
- C. 平滑筋細胞 PDGF-BB (+) (露光時間: 332ms)
- D. 平滑筋細胞 PDGF-BB (+)、E2 (+) (露光時間: 332ms)

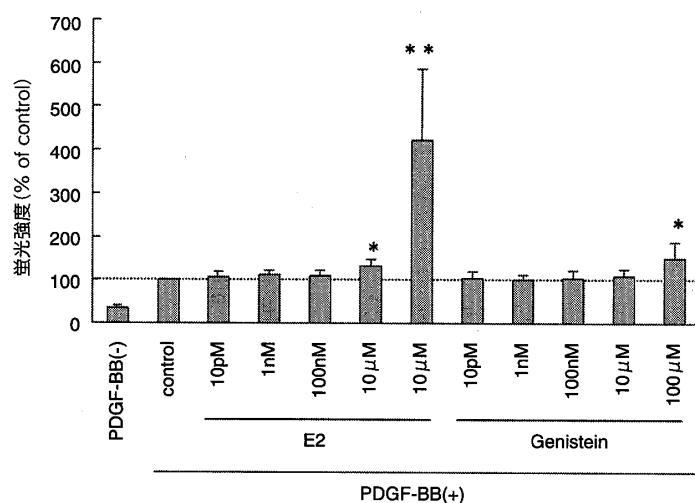


図3. 平滑筋細胞の変性LDL取り込み能に及ぼすE2、ゲニステインの影響

PDGF-BB (25ng/ml) とともにE2、ゲニステインを培養液に添加して24時間培養した後、Dil-acLDLを添加した。

24時間後に細胞内に取り込まれたDil-acLDLの蛍光を測定した。

\*:  $p < 0.05$  vs control, \*\*:  $p < 0.05$  vs 10 $\mu$ M E2

### (3) V型コラーゲン産生能

#### ①実験モデル

コラーゲンは生体内でもっとも豊富に存在する蛋白質であり、全蛋白質の3分の1を占める。コラーゲンには19種類のサブタイプが同定されており、それぞれ異なる分布と役割を示す。血管壁にはI型、III型、IV型、V型コラーゲンが存在する。I型、III型、V型コラーゲンは線維性コラーゲンに分類され、細胞間の空間を埋めている。IV型コラーゲンは基底膜の主要構成



成分である。正常血管、動脈硬化血管どちらの場合も、平滑筋細胞はコラーゲンを合成している。中膜平滑筋細胞はⅠ型とⅢ型コラーゲンを多く産生して、血圧の変動に対処できるようになっているが、内膜平滑筋細胞はⅤ型コラーゲンを合成する割合が増す。Ⅴ型コラーゲンは他の線維性コラーゲンと異なり、本来切り離されるはずのプロペプチドが残存する。そのため、コラーゲン線維を形成する際にⅤ型コラーゲンが取り込まれると他の線維性コラーゲンの会合を妨げることとなる。その結果、コラーゲン線維の直径（太さ）は制限されて弱い線維となる。プラークの線維性キャップは内膜平滑筋細胞によって合成されたコラーゲンから主に構成されている。そのため、Ⅴ型コラーゲンが多くコラーゲン線維に取り込まれて線維性キャップの脆弱化が進行する。実際に動脈硬化血管の内膜や線維性キャップでは正常血管に比べてⅤ型コラーゲンの割合が増加している<sup>15)</sup>。

今回、SDS-PAGEで分子量別にコラーゲンを分離後、ウェスタンブロット法を用いてⅤ型コラーゲンの検出を行った。この方法ではプロコラーゲン、片方のプロペプチドが切り離されたプロコラーゲン、成熟したコラーゲンの3つのバンドが検出される<sup>16)</sup>。今回はそのうち、プロコラーゲンと成熟したコラーゲンを解析した。プロコラーゲンはRNAから翻訳されてすぐの蛋白質であり、細胞内での構造である。一方、成熟したコラーゲンは細胞外に分泌されるときに構造であり、コラーゲン線維に取り込まれていると考えられる。そのため、今回はプロコラーゲンをコラーゲンの産生、成熟したコラーゲンをコラーゲンの蓄積として解釈した。

## ②エストロゲンの影響

線維性キャップの脆弱化とエストロゲンの相関を検討するために、コンフルエントになった培養平滑筋細胞にエストロゲンを1pMから1μMを添加し、48時間培養後、ウェスタンブロット法でⅤ型コラーゲンを検出した。その結果、エストロゲンはプロコラーゲンの産生を1pMから促進する傾向を示し、1μMで有意差が得られた。また、成熟したコラーゲンにおいては10nMから有意に増加させ、1μMではさらに蓄積を促進した。(図4)

## ③イソフラボンの影響

イソフラボンが線維性キャップの脆弱化に関わっているか否かを検討するために、エストロゲン同様、イソフラボン添加48時間後に蛋白質を回収してⅤ型コラーゲンの検出を行った。イソフラボンはプロコラーゲンの産生を100nMをピークに減少させる傾向を示したが有意差は得られなかった。また、成熟したコラーゲンは10pMでは有意に増加したが、それ以上の濃度では増加させず、10μMでは減少させる傾向がみられた。(図4)

# 5 考 察

女性ホルモンであるエストロゲンと大豆に含まれるイソフラボンは互いに類似した構造を有し、共通の作用を持つ。これらはともに抗動脈硬化作用があるといわれているが、その分子レベルでの作用については明らかになっていない点が多い。そこで、今回、血管平滑筋細胞の表現型の変化を動脈硬化の初期、中期、後期病変に分け、それぞれの段階にこれらの物質がどのように影響を及ぼすかを実験することにより、動脈硬化への関与を検討した。

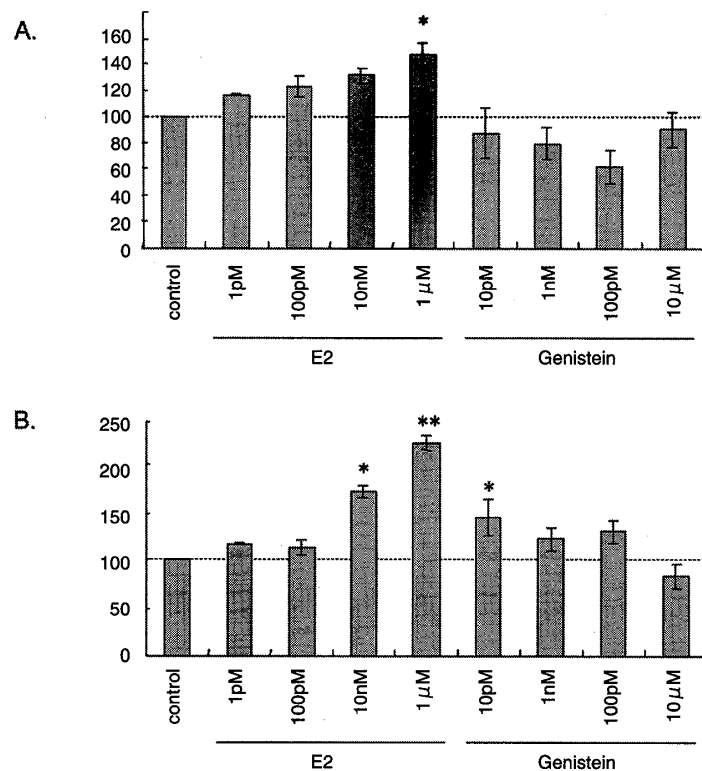


図4. 平滑筋細胞のV型コラーゲン産性能に及ぼすE2、ゲニステインの影響  
 コンフルエントになった平滑筋細胞にE2およびゲニステインを添加して48時間培養後、  
 蛋白質を回収し、ウェスタンブロット法でV型コラーゲンを検出した。  
 A. V型プロコラーゲン B. 成熟したV型コラーゲン

## (1) エストロゲンの動脈硬化に及ぼす影響

### ①血管平滑筋細胞の遊走能

ケモタキシスチャンバーを用いた細胞遊走モデルにおいて、E2は10pMからPDGF-BB刺激による平滑筋細胞の遊走を抑制し、10μMではさらに強い抑制作用を示した。

PDGF-BBは細胞膜にある受容体を介して作用し、mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路およびphosphatidylinositol 3'-kinase (PI3K)を活性化することにより平滑筋細胞の遊走を促進する<sup>14)</sup>。E2の遊走抑制作用はこれらのシグナル伝達阻害であると考えられる。エストロゲンには $\alpha$ と $\beta$ の二種類の受容体が同定されており、平滑筋細胞を含め血管細胞には両方の受容体の発現が確認されている。Dubeyら<sup>6)</sup>はエストロゲン受容体拮抗薬、ICI182,720を用いた実験において、エストロゲンの平滑筋細胞への遊走抑制作用が受容体を介したものであると証明した。さらにGeralsら<sup>17)</sup>の研究により、この作用はエストロゲン受容体 $\beta$ を介したp38およびp42/44MAPKのリン酸化阻害によるものであることが明らかにされた。

### ②血管平滑筋細胞の変性LDL取り込み能

PDGF-BB刺激下の平滑筋細胞においてDiI-acLDLの取り込みにE2は生理的濃度では影響を及ぼさなかったが、10μM以上では有意に取り込みを亢進した。

PDGF-BBはprotein kinase C (PKC)を活性化することによりスカベンジャー受容体の誘発と活性化を促進すること<sup>18)</sup>が知られており、高濃度E2はPKCの働きを増強したと考えられ

る。E2のPKCへの作用についてはいくつかの報告がある。ラットを用いた実験において、E2は血管平滑筋細胞のPKCの活性を抑制した<sup>19)</sup>。しかし、一方でモルモットの子宮動脈および大動脈平滑筋細胞においてはE2はPDGF-BBと相乗的にPKCを活性化する<sup>20)</sup>。このように相反する結果が報告されているが、PKCには複数のアイソザイムが同定されており、そのアイソザイムの差によるためと考えられる。今回得られた結果はKeyesらの報告と一致しており、同様のメカニズムでE2はPDGF-BBによるPKC活性化を増強するように働いた事が示唆されるが、PKCのアイソザイムについては明らかになっていない。

### ③血管平滑筋細胞のV型コラーゲン産生能

E2は平滑筋細胞において1 $\mu$ MからV型コラーゲンの産生を、10nMからその蓄積を促進した。

V型コラーゲンの $\alpha 1$ 鎖の遺伝子(Col5 $\alpha 1$ )のプロモーター領域にはエストロゲン応答配列(ERE)に類似した配列があり、マウス子宮においてE2はCol5 $\alpha 1$ の発現量を増加させた<sup>21)</sup>。今回の検討においてもE2は血管平滑筋細胞でV型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖の産生を促進したのは、Col5 $\alpha 1$ のEREに作用した結果であると示唆される。

また、V型コラーゲンの蓄積はその産生よりも低濃度のE2で促進された。これはE2が蛋白質の分泌を促進したか、あるいは分解を抑制したと考えられる。コラーゲンなど細胞外マトリックスの分解にはマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)が大きな役割を果たしている。MMP遺伝子ファミリーは11種類が同定されており、その一次構造や基質特異性の違いから4つの群(コラゲナーゼ群、ゼラチナーゼ/IV型コラゲナーゼ群、ストロムライシン群、その他)に分かれる。V型コラーゲンは線維性コラーゲンであるがコラゲナーゼ群ではなくゼラチナーゼ群(MMP-2、-9)により分解される。E2は血管壁においてMMP-9の活性を抑制する<sup>22)</sup>ため、V型コラーゲンの蓄積が増加したと考えられる。

### ④臨床への応用

今回の検討により、血管平滑筋細胞において生理的濃度のE2は遊走を抑制することにより、初期動脈硬化を抑制することが示唆された。しかし、中期、後期病変に関与する変性LDLの取り込みやV型コラーゲンの産生・蓄積を促進することより、E2は動脈硬化の進行を促進する可能性もあることが示された。

HERS-IIでは虚血性心疾患の予防におけるエストロゲンの効果が検討され、いままで広くいわれてきたエストロゲンの抗動脈硬化作用に否定的な結果が得られた。これは対象となったのが虚血性心疾患の既往のある女性であったためではないかと、今回の結果から考察される。

また、虚血性疾患で入院した患者の院内死亡率を調べた研究では75歳以下では女性のほうが優位に高く、この傾向は若年ほど顕著に認められた<sup>23)</sup>。

このようなデータと合わせて、女性に見られる虚血性疾患での低い死亡率は発症率の低さに起因するものであり、いったん病気が発症すると女性ホルモンは悪影響を及ぼすと示唆される。

エストロゲン補充療法は更年期症状や骨粗鬆症、コレステロール改善などに対して有益であるが、実施する際には動脈硬化の有無を確認することが重要となってくる。

## (2) イソフラボンの動脈硬化に及ぼす影響

### ①血管平滑筋細胞の遊走能

PDGF-BB に誘発された血管平滑筋細胞の遊走をゲニステインは10pM から有意に抑制した。しかしこの作用は100nM 以上では見られなくなった。

ゲニステインはPDGF-BB による MAPK 活性を抑制することが報告されており<sup>6)</sup>、これによって平滑筋細胞の遊走を抑制していると考えられる。ゲニステインはエストロゲン受容体との親和性を有しており、その結合能はエストロゲン受容体 $\alpha$ よりエストロゲン受容体 $\beta$ のほうが20倍強く、E2に匹敵する<sup>24, 25)</sup>。Geraldら<sup>17)</sup>により報告されたように、平滑筋細胞におけるE2の遊走抑制作用はエストロゲン受容体 $\beta$ が大きく関与しているため、低濃度で見られたゲニステインの遊走抑制作用も同様のメカニズムを介していると考えられる。しかし高濃度のゲニステインではその作用が見られなかった。このことより高濃度ではエストロゲン受容体を介した作用以外の働きを発揮した可能性がある。

### ②血管平滑筋細胞の変性 LDL 取り込み能

ゲニステインは血管平滑筋細胞の変性 LDL 取り込み能に10 $\mu$ M までは影響を及ぼさなかったが、100 $\mu$ M で取り込み能を亢進した。しかしその程度は同濃度のE2に比べるとはるかに低い。今回の検討において、感受性の差が出たものであると考えられる。ゲニステインはエストロゲン受容体に対してE2と匹敵する結合能を有しているが、エストロゲン受容体による転写活性能はエストロゲンの1/1,000から1/10,000であり<sup>26)</sup>、その結合能とは一致しない。今回の結果からは高濃度エストロゲンおよびゲニステインの変性 LDL 取り込み能亢進はエストロゲン受容体を介したもののか、またゲノムを介して作用しているかは明らかではないが、ゲニステインはエストロゲンと同様の機序で作用し、その作用はエストロゲンよりも高濃度を要すると考えられる。

### ③血管平滑筋細胞のV型コラーゲン産生能

ゲニステインはV型コラーゲンの産生には影響を及ぼさなかったが、10pM で有意に蓄積を促進した。しかし、それ以上の濃度ではその作用は見られなかった。このことより10pM のゲニステインはV型コラーゲンの細胞外への分泌あるいはV型コラーゲンの分解に関わっていることが示唆される。

### ④臨床への応用

ゲニステインは生理的濃度で平滑筋細胞の遊走を抑制した。このことよりゲニステインは初期動脈硬化を抑制すると考えられる。中期病変である平滑筋細胞の変性 LDL 取り込み能を100 $\mu$ M で亢進したことより動脈硬化の進行促進が示唆されるが、この濃度は生理的濃度をなかに上回る濃度であるため、実際には作用しないと考えられる。しかし10pM のゲニステインはV型コラーゲンの蓄積を促進したことより、動脈硬化血管においてプラークの不安定化に関与する可能性がある。

これらより日本をはじめとする東南アジアでの虚血性疾患による死亡率の低さは動脈硬化の発症を抑えることによるものであると示唆される。

今日、イソフラボンは健康食品のひとつとして注目を集めているが、本研究において高濃度のゲニステインは動脈硬化の予防効果を失い、中期、後期病変においては病態を悪化させると示唆される結果が得られた。そのため、サプリメントなどの過剰な摂取には注意が必要であり、また既に動脈硬化を進行している人にとっては悪影響を及ぼす可能性がある。健康食品としてのイソフラボンには更なる検討が必要であると考えられる。

## 6 まとめ

今回、エストロゲンとイソフラボンが動脈硬化の各段階へ及ぼす影響を平滑筋細胞を用いて検討した。その結果、動脈硬化の初期病変においてはエストロゲン、イソフラボンともに予防効果があることが明らかとなった。しかし中期、後期病変に関しては両物質とも悪影響を及ぼす可能性が認められた。現在、エストロゲンやイソフラボンの動脈硬化への影響に関する研究は発症、すなわち初期病変に偏っており、その中期以降の病変についての検討はなされていなかった。そのため、今回はエストロゲン、イソフラボンによる動脈硬化への影響を包括的に捉える必要性を示すことができた。今後、平滑筋細胞のみならず内皮細胞やマクロファージなどへの作用やその機序について解明していくことが期待される。

## 引用文献

- 1) Hong MK, Romm PA, Reagan K, Green CE, Rackley CE. Effects of estrogen replacement therapy on serum lipid values and angiographically defined coronary artery disease in postmenopausal women. *Am J Cardiol.* 1992; 69: 176-178.
- 2) Nabulsi AA, Folsom AR, White A, Patsch W, Geiss G, Wu KK, Szklo M. Association of hormone-replacement with various cardiovascular risk factors in postmenopausal women. *N Engl J Med.* 1993; 328: 1069-1075
- 3) Grady D, Herrington D, Bittner V, Blumenthal R, Davidson M, Hlatky M, Hsia J, Hulley S, Herd A, Khan S, Newby LB, Waters D, Vittinghoff E, Wenger N. Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy. Heart and estrogen/progestin replacement study follow-up (HERS II). *JAMA.* 2002; 288: 49-57
- 4) Bouchet L, Krust A, Dupont S, Chambon P, Bayard F, Arnal JF. Estradiol accelerates reendothelialization in mouse carotid artery through estrogen receptor-alpha but not estrogen receptor-beta. *Circulation.* 2001; 103: 423-8.
- 5) Lavigne MC, Ramwell PW, Clarke R. Inhibition of estrogen receptor function promotes porcine coronary artery smooth muscle cell proliferation. *Steroids.* 1999; 64: 472-480
- 6) Dubey RK, Jackson EK, Gillespie DG, Zacharia LC, Imthurn B, Keller PJ. Clinically used estrogens differentially inhibit human aortic smooth muscle cell and mitogen-activated protein kinase activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 964-972
- 7) Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M, Fukami Y. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J. Biol. Chem.* 1987; 262: 5592-5595
- 8) McCabe MJ Jr, Orrenius S. Genistein induces apoptosis in immature human thymocytes by inhibiting topoisomerase-II. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993; 194: 944-950
- 9) Anderson JW, Johnstone BM, Cook Newell ME. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N Engl J Med.* 1995; 333: 276-282

- 10) Tikkanen MJ, Wahala K, Ojala S, Vihma V, Alercreutz H. Effect of soy bean phytoestrogen intake on low density lipoprotein oxidation resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998; 95: 3106-3110
- 11) Walker HA, Dean TS, Sanders TA, Jackson G, Ritter JM, Chowienczyk PJ. The phytoestrogen genistein produces acute nitric oxide-dependent dilation of human forearm vasculature with similar potency to 17 $\beta$ -estradiol. *Circulation.* 2001; 103: 258-62.
- 12) Gottstein N, Ewins BA, Eccleston C, Hubbard GP, Kavanagh IC, Minihane AM, Weinberg PD, Rimbach G. Effect of genistein and daidzein on platelet aggregation and monocyte and endothelial function. *Br J Nutr.* 2003; 89(5): 607-16.
- 13) Dubey RK, Gillespie DG, Imthurn B, Rosseli M, Jackson EK, Keller PJ. Phytoestrogens inhibit growth and MAP kinase activity in human aortic smooth muscle cells. *Hypertension.* 1999; 33: 177-182
- 14) Iijima K, Yoshizumi M, Hashimoto M, Akishita M, Kozaki K, Ako J, Watanabe T, Ohike Y, Son B, Yu J, Nakahata K, Ouchi Y. Red wine polyphenols inhibit vascular smooth muscle cell migration through two distinct signaling pathways. *Circulation.* 2002; 105: 2404-2410
- 15) Morton LF, Barnes MJ. Collagen polymorphism in the normal and diseased blood vessel wall. Investigation of collagen type I, III, V. *Atherosclerosis.* 1982; 42: 41-51
- 16) Pickering JG, Ford CM, Tang B, Chow LH. Coordinated effects of fibroblast growth factor-2 on expression of fibrillar collagens, matrix metalloproteinases, and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases by human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17: 475-482
- 17) Geraldès P, Sirois MG, Tanguay JF. Specific contribution of estrogen receptors on mitogen-activated protein kinase pathways and vascular cell activation. *Circ Res.* 2003; 93: 399-405
- 18) Inaba T, Gotoda T, Shimano H, Shimada M, Harada K, Kozaki K, Watanabe Y, Hoh E, Motoyoshi K, Yazaki Y. Platelet-derived growth factor induces c-fms and scavenger receptor genes in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1992; 267: 13107-12.
- 19) Kanashiro CA, Khalil RA. Gender-related distinctions in protein kinase C activity in rat vascular smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001; 280: C34-45.
- 20) Keyes LE, Moore LG, Walchak SJ, Dempsey EC. Pregnancy-stimulated growth of vascular smooth muscle cells: importance of protein kinase C-dependent synergy between estrogen and platelet-derived growth factor. *J Cell Physiol.* 1996; 166: 22-32
- 21) Watanabe H, Suzuki A, Kobayashi M, Takahashi E, Itamoto M, Lubahn DB, Handa H, Iguchi T. Analysis of temporal changes in the expression of estrogen-regulated genes in the uterus. *J Mol Endocrinol.* 2003; 30: 347-358
- 22) Potier M, Karl M, Elliot SJ, Striker GE, Striker LJ. Response to sex hormones differs in atherosclerosis-susceptible and-resistant mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003; 285: E1237-45
- 23) 坂井誠、千田宏司「高齢者における器質的虚血性心疾患の男女差」村山正博（監修）『女性における虚血性心疾患』医学書院 2000；40-49
- 24) Kuiper GGJM, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson J. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor  $\beta$ . *Endocrinology.* 1998; 139: 4252-4263
- 25) Morito K, Hirose T, Kinjo J, Hirakawa T, Okawa M, Nohara T, Ogawa S, Inoue S, Muramatsu M, Masamune Y. Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Biol Pharm Bull.* 2001; 24: 351-356
- 26) Breinholt V, Larsen JC. Detection of weak estrogenic flavonoids using a recombinant yeast strain and a modified MCF 7 cell proliferation assay. *Chem Res Toxicol.* 1998; 11(6): 622-629.

(原稿受理 2005年4月7日)