

plaques 内血管新生に及ぼすカテキンの影響

— 培養内皮細胞を用いた検討 —

濱田陽子* 西田昌司**

The Effects of Tea Catechin on Plaque Angiogenesis —Study Using Cultured Endothelial Cells—

HAMADA Yoko* NISHIDA Masashi**

Abstract

Blood vessel formation after birth (angiogenesis), occurs within ischemic lesion to salvage jeopardized hypoxic cells. It also occurs within atherosclerotic plaques in which inflammatory cells are releasing angiogenic factors. However, angiogenesis in atherosclerotic plaque increases the vulnerability of plaque and the incidence of symptomatic atherosclerotic diseases. Therefore, the inhibition of angiogenesis in plaque could prevent unstabilization of the plaque and the resulting ischemic disease.

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is one of key regulators of angiogenesis. Lysophosphatidylcholine (LysoPC) and sphingosine-1-phosphate (S1P), which are contained in low density lipoprotein (LDL) and oxidized LDL, are two major modifiers of VEGF action in atherosclerotic plaque. We applied these substances on cultured bovine vascular endothelial cells (BAEC) to mimic angiogenesis in atherosclerosis *in vitro*, and examined whether epigallocatechin-3-gallate (EGCG), the major green tea catechin, has inhibitory effects on plaque angiogenesis.

The effects of catechins were tested in three models of angiogenesis, namely, migration, growth and tube formation of BAEC. EGCG inhibited angiogenesis *in vitro* in Boyden chamber assay for migration step, cell counting assay for growth step and matrigel assay for tube formation step at concentration ranging from 1 to 50 μM. Therefore, EGCG could stabilize atherosclerotic plaques by inhibiting angiogenesis and prevent them from rupture.

キーワード：動脈硬化、血管新生、内皮細胞、カテキン

Key words: plaque angiogenesis, catechin, endothelial cell

*本学人間科学研究科博士前期課程修了生

**本学人間科学部環境・バイオサイエンス学科教授

連絡先：西田昌司 〒662-8505 西宮市岡田山4-1 神戸女学院大学人間科学部環境・バイオサイエンス学科
mnishida@mail.kobe-c.ac.jp

背景

公衆衛生の充実に伴い日本における感染症の発生頻度は減少傾向にあるが、悪性新生物と動脈硬化性疾患の頻度は増加の一途をたどっている。このうち動脈硬化は、加齢や高コレステロール血症、喫煙、糖尿病、高血圧などの生活習慣に伴う危険因子が、血管内皮細胞を障害することから始まる。血中で過剰となったコレステロール運搬体である低比重リポタンパク (low-density lipoprotein; LDL) は、内皮細胞の障害部位から内皮下に侵入し、速やかに酸化される。また、血中の単球やTリンパ球も障害部位に集簇・接着し、内皮下へと侵入する。侵入した単球はマクロファージに分化して酸化されたLDLを取り込み、細胞内にコレステロールエステルを蓄積した泡沫細胞となる。さらに中膜にある血管平滑筋細胞も形質転換を起こし、内膜へ遊走・増殖してコラーゲンやプロテオグリカンなどの細胞外マトリックスを合成・分泌する合成型平滑筋細胞になり、線維性被膜 (fibrous cap) を形成する¹⁾。このように、動脈硬化病変は、脂質が沈着した脂肪線条から中心部の泡沫細胞とそれを取り囲む平滑筋細胞、線維性被膜からなるプラークへと進行する。その過程でプラークの増大が動脈内腔の狭窄をきたし、血流が障害されることによって虚血性疾患を発症する。さらに、プラークの不安定化と破裂に伴う組織因子の遊離が起こると凝固系の賦活化と血小板凝集が生じ、血栓形成による動脈の急性閉塞をきたす。このような不安定プラークは中心に脂肪を多く含み、プラークを覆う平滑筋細胞と細胞外マトリックスからなる線維性被膜は極めて薄い。また、そのような線維性被膜にはマクロファージなどの炎症細胞の浸潤が著明である²⁾。

一方、動脈硬化病変では、血小板の活性化に伴ってスフィンゴシン1リン酸 (S1P) が放出される。S1Pは、内皮細胞や平滑筋細胞などを含む様々な細胞に対して、オートクリン、パラクリン的に作用し、増殖や遊走を促進する事が知られている³⁾。そのため、プラークを不安定化するもう一つの要因として、血管新生の関与が考えられる。血管新生とは、毛細血管を中心とした細小血管において既存の血管から新しい血管ネットワークが形成される現象である。生理的な血管新生としては、内皮細胞が分化し血管が形成される胎児期の血管形成、病理的な血管新生としては固形腫瘍に栄養を供給する腫瘍血管新生、虚血の際の側副血行路形成などが知られている。血管新生では、既存の血管内皮細胞が血管新生刺激に反応し、基底膜の消化、濃度勾配に従った内皮細胞の遊走、内皮細胞の増殖、新たな管腔の形成という4つのステップを経て、新たな血管が作られる¹⁾。動脈硬化における vasa vasorum (外膜栄養血管) からの血管新生の存在が病変の進展において大きな意味を持つという考え方が提唱され⁴⁾、現在では広く受け入れられている。病理学的な解析によると破裂を有するプラーク、出血を有するプラーク、壊死を有するプラークにおいていずれも血管新生が観察されており^{5),6)}、血管新生がプラークの不安定化・破綻に密接に関連することを示唆している。

現在行われている動脈硬化の予防法としては、生活習慣の改善や薬剤などにより血中のLDLを減少させ、抗酸化物質によりLDLの酸化変性を抑制することにより、プラークの形成自体

を予防するものが多い。我々が日常的に飲用する緑茶の主成分であるカテキンは、乾燥茶葉の10~18%と最も含量の高い成分である。そのほとんどが(−)エピ体であり、主成分は(−)−エピカテキン(EC)、(−)−エピガロカテキン(EGC)、(−)−エピガロカテキンガレート(EGCG)、(−)−エピカテキンガレート(ECG)の4種である。その中でもEGCGは、カテキンの中でも最も含有量が多く、活性も強いため、in vivoやin vitroの実験に多用されている⁷⁾。カテキン類には、血漿コレステロール濃度の上昇抑制⁸⁾、ならびにLDL酸化の抑制⁹⁾、また血小板の凝集抑制¹⁰⁾などの働きがあり、動脈硬化の発症抑制、ひいては心筋梗塞や脳梗塞の予防につながる可能性のあることが、in vitroおよびex vivo実験、動物実験などにより明らかにされている。しかし、plaquesの不安定化に直接関係する外膜の血管新生を抑制すると、plaques破綻に伴う急性の虚血性疾患を防ぐことに繋がると考えられる。Caoらは、がんの増殖や転移に必要な血管新生をEGCGが抑制することを明らかにしており¹¹⁾、EGCGが動脈硬化中期病変におけるplaques内血管新生をも抑制する可能性が示唆される。

目的

本研究においては、動脈硬化におけるplaques内血管新生に及ぼすカテキンの影響を分子生物学的に検討する事を目的とする。そのため、血管新生の細胞モデルとして、血管内皮細胞の遊走、増殖、管腔形成モデルを作成する。plaques内血管新生モデルとしては、内皮細胞刺激因子であるVEGF、動脈硬化のplaquesの主要構成成分であるリゾフォスファチジルコリン(Lyso PC)、動脈硬化病変の血小板の活性化に伴い放出されるS1Pを用い、カテキンがこれらのモデルにいかなる影響を与えるかを検討する。

方法

(ア) 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社製)に10%ウシ胎児血清(FBS)を増殖因子として添加した培養液を用いて培養した。細胞周期を同期させる実験においては0.5%FBSを添加した培養液を用いた。

(イ) 細胞遊走能の測定

血管新生における刺激物質の濃度勾配に従った細胞の遊走は、96穴ケモタキシスチャンバー(NEURO PROBE)を用いて検討した。

ケモタキシスチャンバーは、細胞浮遊液を入れるトップウェルと遊走因子を入れるボトムウェル、さらに両者を仕切る有孔性のフィルターからなる。フィルターには、PVPフリー、孔径8μmのフレームフィルター(NEURO PROBE)を用い、ラミニン溶液(1μg/ml)に浸した後に風乾して使用した。チャンバーのボトムウェルに遊走因子を、トップウェルにはトリプシン処理したBAECを1×10⁶コ/ml添加し、37℃で6時間インキュベートした。その後、フィルターを回収してメタノール固定し、さらにディフクイック(国際試薬)で細胞を染色した。フィルター内へ遊走した細胞数を、顕微鏡下(400倍)で計測した。細胞遊走因子として用い

た一般的な血管新生因子である VEGF (PEPRO TECH)、動脈硬化に特異的な因子である LysoPC (SIGMA) と S1P (SIGMA) は、細胞播種と同時に添加した。EGCG (WAKO) を用いる実験では、ケモタキシスチャンバーに播種する前の24時間のみ細胞に添加して培養した。

(ウ) 細胞増殖能の測定

細胞増殖能の検討には、WST-1 反応を用いた。テトラゾリウム塩である WST-1 は、生存細胞のミトコンドリア呼吸鎖にのみ活性のあるコハク酸塩テトラゾリウム塩還元酵素によってホルマザン色素に分解される。よってホルマザン色素溶液の吸光度は生細胞数と直線的な相関がある。96穴プレートに BAEC 5×10^5 コ/100 μ lを播種した。細胞数測定は経日的に行い、測定日に Pre mix WST-1 試薬（宝酒造）を10 μ lずつ添加し、細胞数を測定した。37°C 5 %CO₂ インキュベータ内で30分反応させた後に、プレートリーダー (Bio-Rad) を用いて対照波長655 nm、測定波長450nm で生細胞数を測定した。VEGF、LysoPC と S1P は、初日に全ウェルに WST-1 試薬と同時に添加し、EGCG は全ウェルに細胞播種前の24時間のみ添加して処理を行った。

(エ) 管腔形成能の定量

管腔形成能の検討には、マトリゲル (Beckton Dickinson Lab Ware) 中でのチューブ形成を用いた。マトリゲルを用いて内皮細胞を培養すると毛細血管様のチューブを形成することから、in vitro での血管形成モデルとして用いられている。マトリゲルは氷上にて12時間以上かけて溶解し、使用するピペット、プレート、1.5ml チューブも予め 4 °Cで冷却した。細胞溶液とマトリゲルは実験開始の直前に混合した。

無血清培養液中の BAEC (4×10^5 コ/400 μ l) にマトリゲル200 μ lを加えて24穴プレートに播種し、24時間後と3日目に画像撮影 ($\times 100$) を行った。3日目の撮影写真の管腔部分をタブレット (Wacom) を使用して一定の太さでトレースし、トレースした線のピクセル数を Photoshop (Adobe 社製) を用いて測定した。1穴あたりランダムに3視野撮影して検討を行った。VEGF、LysoPC と S1P は、全ウェルに細胞播種前の6時間のみ添加し、EGCG は全ウェルに細胞播種前の24時間のみ添加した。

(オ) 統計

結果は平均値と標準誤差でグラフに示した。有意差は統計ソフト JMP (SAS) を用い、ANOVA で分散分析を行った後、Tukey の HSD 検定で多重比較を行った。コントロール群との比較は Dunnett の検定を使用した。

結 果

(ア) ボイデンチャンバーアッセイによる細胞遊走の検討

培養内皮細胞 (BAEC) を用いた血管新生モデルとして、血管新生の第一ステップである血管新生刺激の濃度勾配に従った内皮細胞の遊走を、ボイデンチャンバーアッセイにて検討し

た。一般的な血管新生因子である VEGF を遊走因子としてボトムウェルに添加した血管新生モデルでは、VEGF を添加した全ての群において、VEGF を添加しなかったコントロール群と比較して遊走が有意に促進された。(図 1)

動脈硬化に特異的な因子である LysoPC を遊走因子としてボトムウェルに添加したところ $10\text{ }\mu\text{M}$, $20\text{ }\mu\text{M}$ の LysoPC 添加群では LysoPC を添加しなかったコントロール群と比較して遊走が有意に抑制され、LysoPC を VEGF (1 ng/ml) に加えてボトムウェルに添加した動脈硬化における血管新生モデルでは、VEGF 1 ng/ml と LysoPC を添加した群において、LysoPC を $5\text{ }\mu\text{M}$ 以上添加した群で LysoPC を添加しなかったコントロール群と比較して、有意に細胞遊走を抑制した。(図 1)

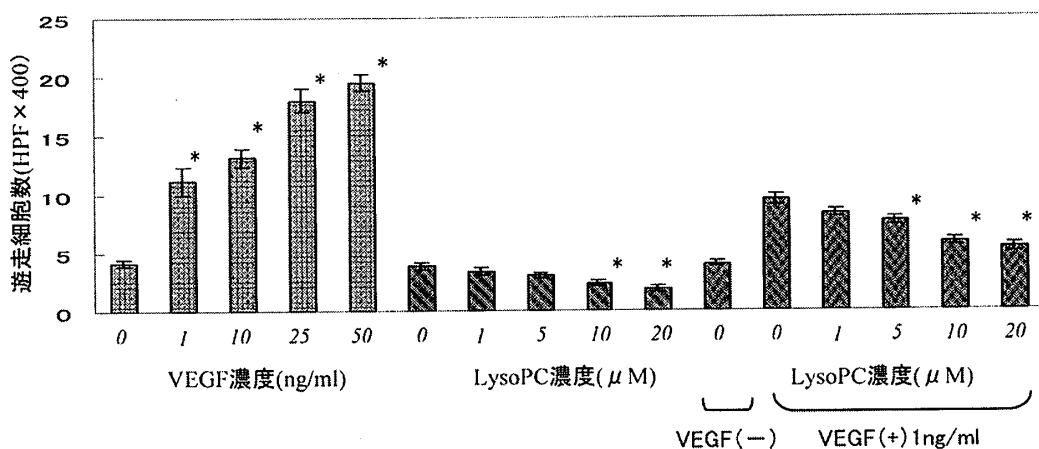


図 1 VEGF と LysoPC の細胞遊走に及ぼす影響

また、動脈硬化に特異的な因子である S1P を遊走因子としてボトムウェルに添加したところ 10nM 以上の S1P 添加群では S1P を添加しなかったコントロール群と比較して遊走が有意に促進され、S1P を VEGF (1 ng/ml) に加えてボトムウェルに添加した動脈硬化における血管新生モデルでは、VEGF 1 ng/ml と S1P を添加した全ての群において、VEGF と S1P を添加しなかったコントロール群と比較して、遊走が有意に促進された。(図 2)

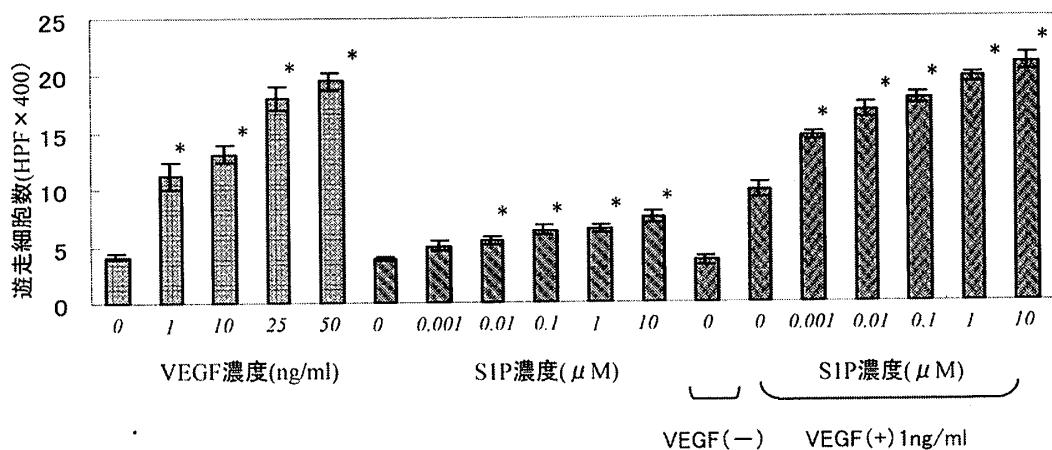


図 2 VEGF と S1P の細胞遊走に及ぼす影響

さらに、EGCG が細胞遊走に及ぼす影響を検討した。EGCG による細胞播種前24時間の前処

理は、VEGF 1 ng/ml による細胞増殖を、何れの EGCG 濃度においても EGCG を添加しなかったコントロール群と比較して有意に抑制した。S1P 1 μM による細胞遊走に対する EGCG の影響を検討したところ、EGCG を 10 μM 以上添加した群において、EGCG を添加しなかったコントロール群と比較して、遊走が有意に抑制された。動脈硬化における血管新生モデル（VEGF 1 ng/ml と S1P 1 μM を添加したモデル）においては、EGCG を添加した全ての群において、EGCG を添加しなかったコントロール群と比較して遊走が有意に抑制された。（図 3）

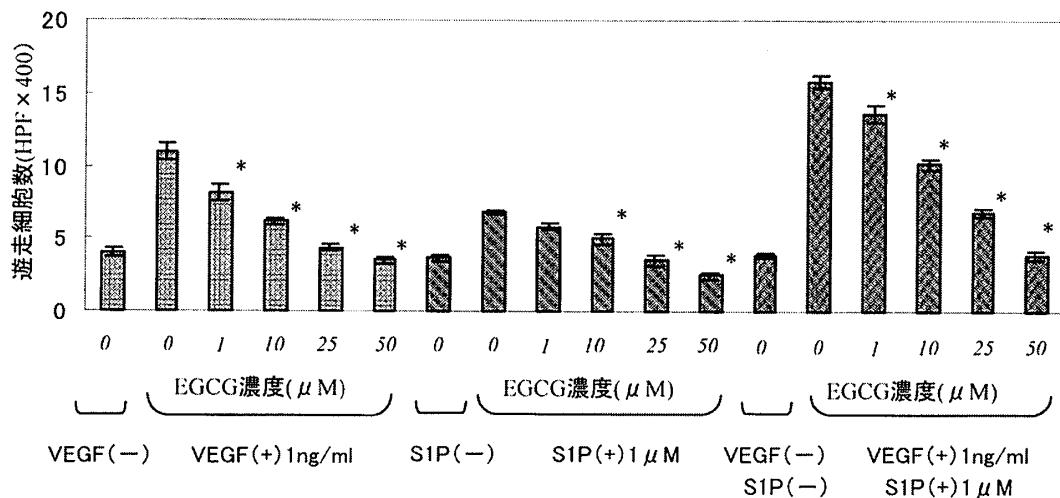


図3 EGCG の細胞遊走に及ぼす影響

(イ) 細胞増殖能の検討

次に内皮細胞を用いた血管新生モデルとして血管形成の第二のステップとなる増殖に着目し、細胞増殖を検討した。細胞を 96 穴プレートに播種し、2 時間後に接着した細胞の培養液を低血清（0.5%FBS 含有）の培養液に交換し、24 時間培養することにより細胞周期をそろえた後、細胞増殖を 1 ~ 5 日目に WST-1 試薬で測定した。BAEC は 5×10^5 コ/ウェルで培養すると、1 日目から 2 日目にかけて対数増殖が測定された。以後、WST-1 反応を用いた細胞増殖の検討は、対数増殖期である 1 日目から 2 日目にかけて測定を行い、1 ~ 2 日目の増殖の割合をグラフ化することに決定した。

一般的な血管新生因子である VEGF が細胞増殖に及ぼす影響を検討した。 5×10^5 コ/ウェルの細胞を 96 穴プレートに播種し、VEGF を全ウェルに、WST-1 溶液は測定するウェルに添加し、インキュベータ内で 30 分反応させた後に、プレートリーダーを用いて対照波長 655 nm、測定波長 450 nm で生細胞数を測定した。VEGF を添加した全ての群において、VEGF を添加しなかったコントロール群と比較して増殖が有意に促進された。（図 4）動脈硬化に特異的な因子である LysoPC を添加したところ、10 μM, 20 μM の LysoPC 添加群では LysoPC を添加しなかったコントロール群と比較して増殖が有意に促進された。LysoPC と VEGF (1 ng/ml) を添加した動脈硬化における血管新生モデルでは、VEGF 1 ng/ml と LysoPC を 5 μM 以上添加した群において、LysoPC を添加しなかったコントロール群と比較して、増殖が有意に促進された。（図 4）

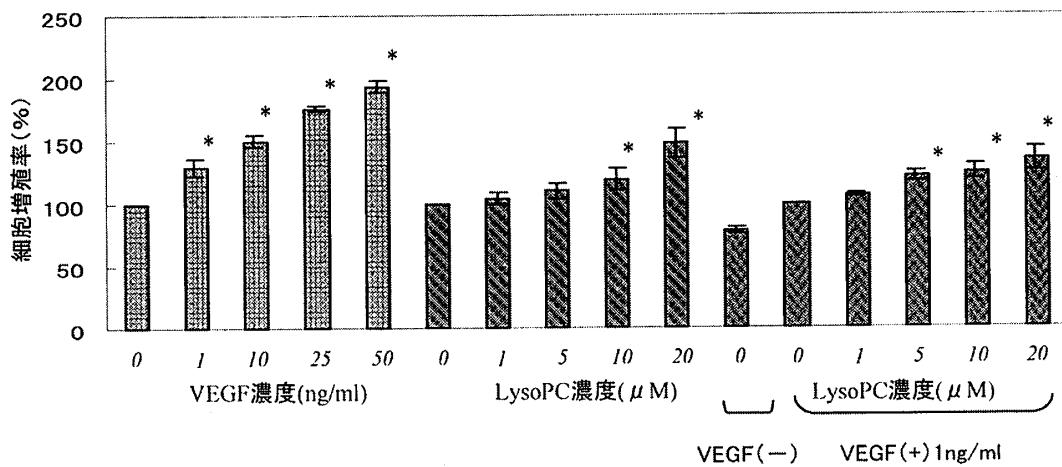


図4 VEGF と LysoPC の細胞増殖に及ぼす影響

また、動脈硬化に特異的な因子である S1P を添加したところ、 $1\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$ の S1P 添加群では S1P を添加しなかったコントロール群と比較して増殖が有意に促進され、S1P を VEGF (1 ng/ml) に加えて添加した動脈硬化における血管新生モデルでは、VEGF 1 ng/ml と S1P を $0.1\mu\text{M}$ 以上添加した群において、S1P を添加しなかったコントロール群と比較して、増殖が有意に促進された。(図5)

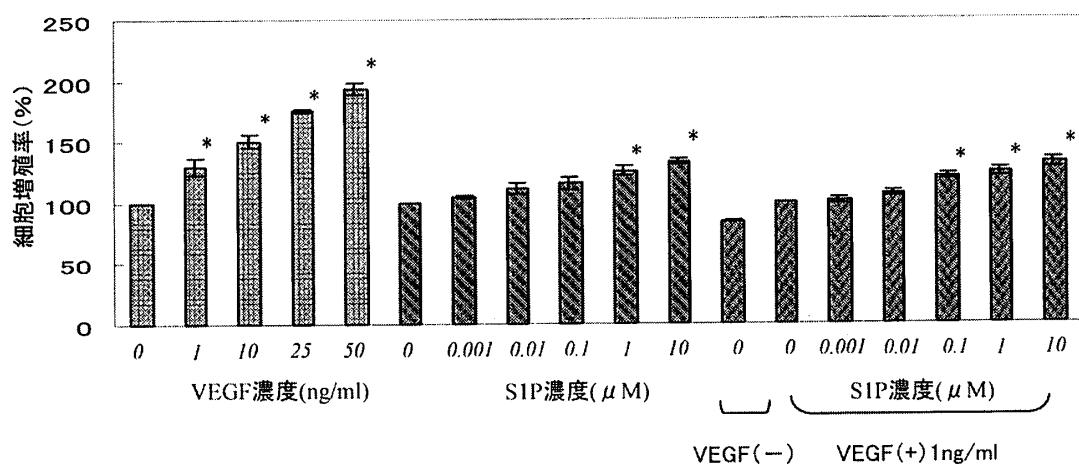


図5 VEGF と S1P の細胞増殖に及ぼす影響

さらに、EGCG の細胞増殖に及ぼす影響を検討した。EGCG は、細胞播種前の24時間のみ処理を行った VEGF 1 ng/ml による細胞増殖は、EGCG を $10\mu\text{M}$ 以上添加した群において、EGCG を添加しなかったコントロール群と比較して、有意に抑制された。(図6) LysoPC $5\mu\text{M}$ による細胞増殖に対する EGCG の影響を検討したところ、EGCG $10\mu\text{M}$ 以上添加した群において、EGCG を添加しなかったコントロール群と比較して、増殖が有意に抑制された。動脈硬化における血管新生モデル (VEGF 1 ng/ml と LysoPC $5\mu\text{M}$ を添加したモデル) においては、EGCG を $10\mu\text{M}$ 以上添加した群で、EGCG を添加しなかったコントロール群と比較して増殖が有意に抑制された。(図6) また、S1P $1\mu\text{M}$ による細胞増殖に対する EGCG の影響を検討したところ、EGCG を $10\mu\text{M}$ 以上添加した群において、EGCG を添加しなかったコントロール群と比較して、増殖が有意に抑制された。動脈硬化における血管新生モデル (VEGF 1 ng/ml と S1P $1\mu\text{M}$ を

添加したモデル）においても、EGCG を $10\mu M$ 以上添加した群では、EGCG を添加しなかったコントロール群と比較して、増殖が有意に抑制された。（図 7）

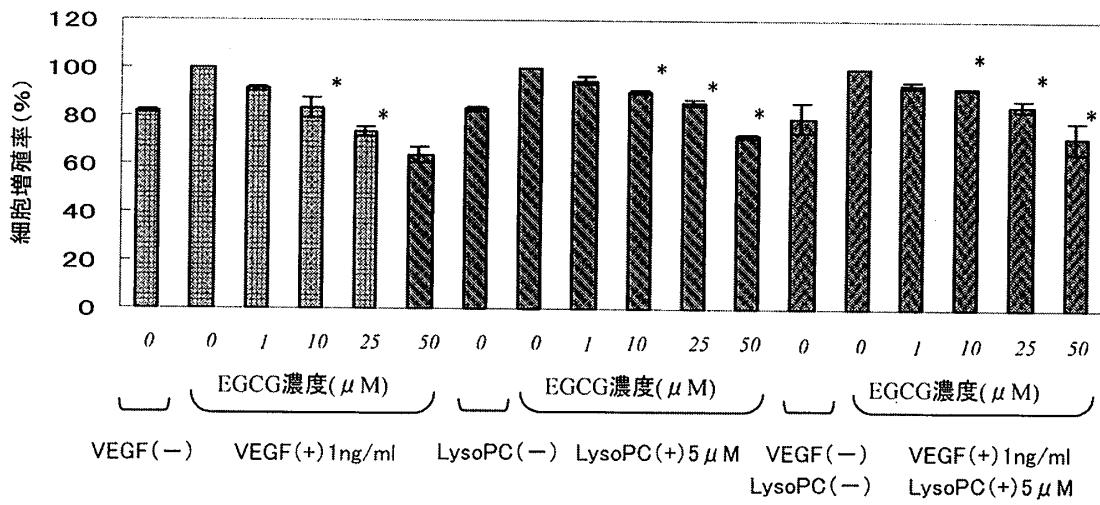


図6 EGCG の細胞遊走に及ぼす影響

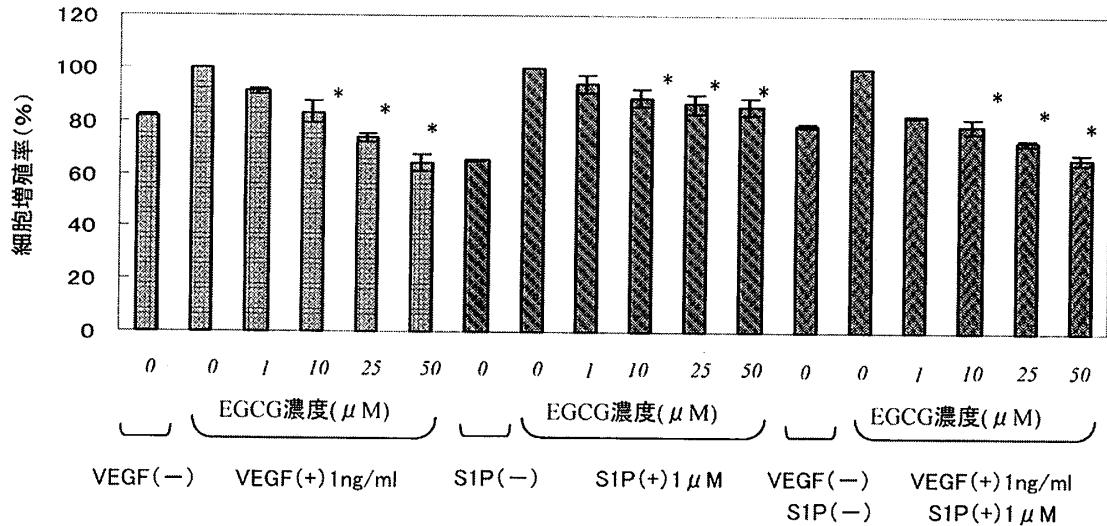


図7 EGCG の細胞増殖に及ぼす影響

(ウ) 管腔形成能の検討

次に、内皮細胞を用いた血管新生モデルとして、血管新生の第三のステップとなる管腔形成を検討した。

VEGF を添加した全ての群において、VEGF を添加しなかったコントロール群と比較して管腔形成が有意に促進された。（図 8）動脈硬化に特異的な因子である LysoPC をゲル化前 6 時間のみ添加したところ、LysoPC を添加しなかったコントロール群と比較して管腔形成が抑制された傾向は見られたが有意差はなかった。動脈硬化における血管新生モデル（VEGF 1 ng/ml と LysoPC 5 μM を添加したモデル）においても、LysoPC を添加しなかったコントロール群と比較して管腔形成が抑制される傾向は見られたが有意差はなかった。（図 8）

また、動脈硬化に特異的な因子である S1P でゲル化前 6 時間のみ処理すると、S1P を添加しなかったコントロール群と比較して管腔形成が促進される傾向が見られたがやはり有意差は

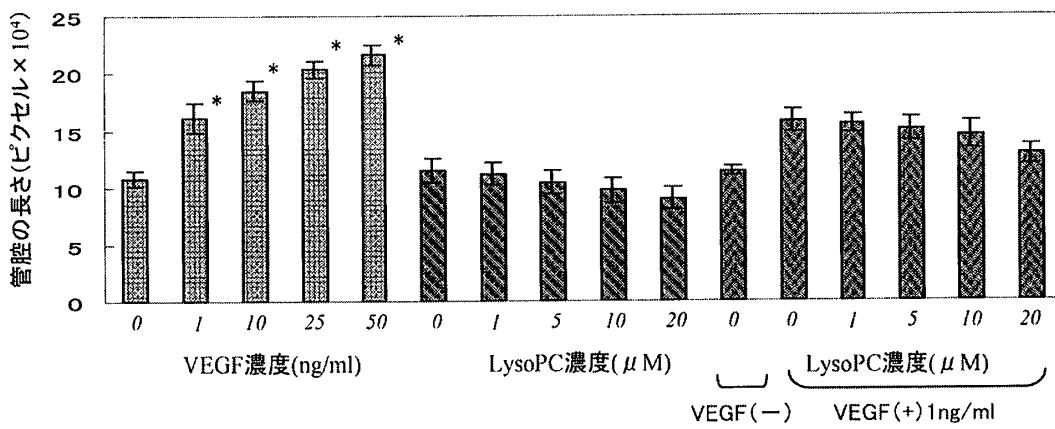


図8 VEGFとLysoPCの管腔形成に及ぼす影響

なかった。動脈硬化における血管新生モデルでは、VEGF 1 ng/ml と S1P を10nM 以上添加した群においてS1Pを添加しなかったコントロール群と比較して管腔形成が有意に促進された。(図9)

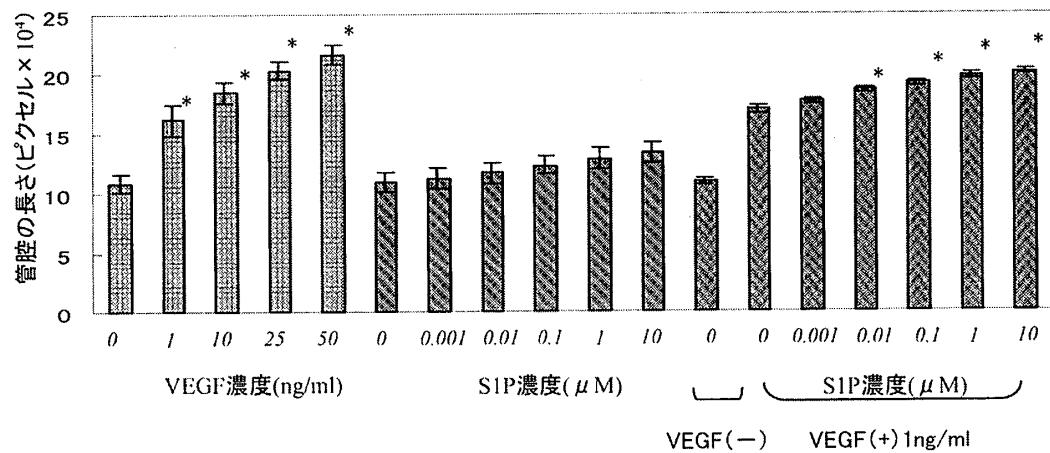


図9 VEGFとS1Pの管腔形成に及ぼす影響

次に、EGCGの管腔形成に及ぼす影響を検討した。EGCGは、細胞播種前の24時間のみ処理を行った。VEGF 1 ng/ml による管腔形成は、EGCGを50μM以上添加した群においては、EGCGを添加しなかったコントロール群と比較して有意に抑制された。(図10) S1Pを添加した群においては、S1Pを添加しなかったコントロール群と比較して管腔形成が促進される傾向が見られたが有意差はなく、動脈硬化における血管新生モデル (VEGF 1 ng/ml と S1P 1 μM を添加したモデル)においては、EGCGを50μM以上添加した群では、EGCGを添加しなかったコントロール群と比較して、管腔形成が有意に抑制された。(図10)

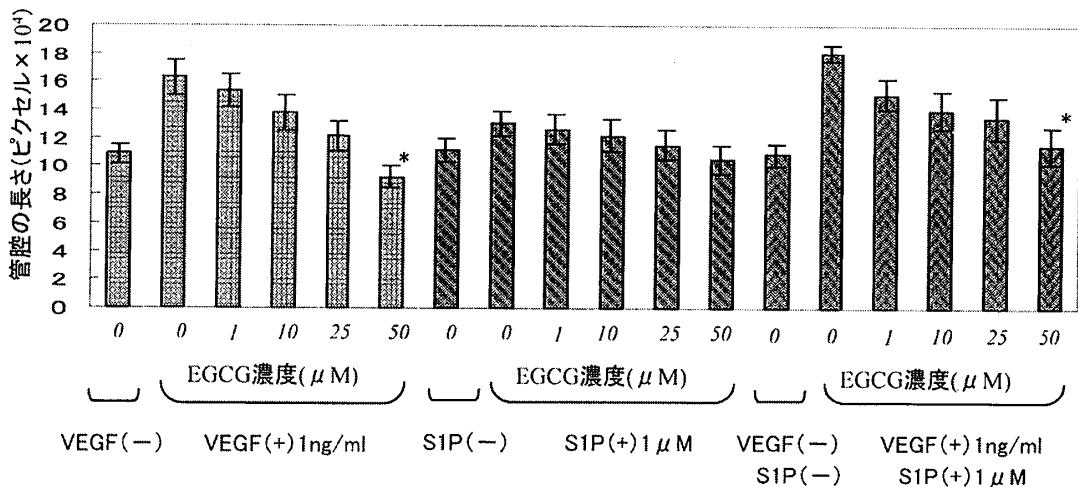


図10 EGCG の管腔形成に及ぼす影響

考 察

動脈硬化におけるプラーカ内血管新生に及ぼすカテキンの影響を培養細胞レベルで検討した。

(ア) 本研究で用いた血管新生モデルについて

内膜の内皮細胞は、血管の最も重要な構成細胞であり、血管新生においても、内皮細胞はプロテアーゼを産生して基底膜やその周囲の細胞外マトリックスを消化し、刺激の方向へと遊走する。基底膜を越えて間質へと浸潤を開始した内皮細胞は、さらに遊走と増殖とによってその細胞数を増す。このとき、内皮細胞はVE-カドヘリンによって互いに連結し、管腔形成物を形成するという一連の血管新生のステップにおける主役となる。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、細胞増殖モデル、管腔形成モデルを作成して血管新生刺激(VEGF)と動脈硬化に特異的な因子(LysoPC, S1P)を加え動脈硬化モデルを作成し、同モデルにおけるカテキンの影響の検討を試みた。

遊走能モデル

細胞遊走とは細胞の運動性と細胞外マトリックスとの接着に依存した現象である。細胞遊走モデルとして血管新生刺激物質の濃度勾配に従った化学遊走を測定することのできるボイデンチャンバー モデル¹²⁾を用いた。ボイデンチャンバー モデルでは、チャンバーの間に挿入するフィルターには8 μmの孔が開いており、その孔を通り抜けることにより細胞は上のチャンバーから遊走物質の存在する下のチャンバーへと移動する。その際、細胞がフィルターに接着できるように細胞外マトリックスで処理をする。今回の検討では基底膜の構成成分であるラミニンを用いた。

このモデルにおける遊走のメカニズムは、上のチャンバーにある静止期の細胞にフィルター

を通して下のチャンバーの血管新生刺激が作用すると、細胞は活性化されて基底膜成分であるラミニンを融解し、刺激の方向（下段）へ向かって仮足を伸ばし、細胞膜の ruffling を形成するとともに、インテグリンを介して細胞外マトリックスと接着する¹⁾。それと同時に、細胞内にアクチン、ミオシン、トロポミオシン、 α -アクニチンが重合したミクロフィラメント束を形成し、ミクロフィラメント束を収縮させることによって細胞全体を進行方向へ牽引する。このとき細胞の進行する側でマトリックスに接着し、退縮する側ではマトリックスから離解することで遊走が可能となると考えられる。

増殖能モデル

増殖細胞を位相差顕微鏡下で観察すると、培養ディッシュにまばらに播種した細胞は数日後に対数増殖期をむかえ、増殖の後にコンフルエントになって細胞数がプラトーに達すると、以後、細胞数は増加しなかった。同モデルで WST-1 反応を用いて細胞増殖を検討すると、対数増殖期、コンフルエント期が観察された。しかしプラト一期に達すると、顕微鏡下での細胞数は減少しないが WST-1 活性は低下した。WST-1 活性はミトコンドリア呼吸鎖の活性を測定していることから、増殖期ではミトコンドリア数、ミトコンドリア活性が高いが、コンフルエント期では活性が減少してしまうと考えられる。

従って、WST-1 反応による細胞数の計測は一般的に広く用いられているが、細胞増殖の時間横断的な計測には適しておらず、同一の細胞増殖時期においてインターベンションによる細胞数の変化を検討するには適していると考えられる。

管腔形成能の検討

血管新生における管腔形成は、マウス骨肉腫から採取した細胞外マトリックス（マトリゲル）中のチューブ形成能で検討した。内皮細胞をマトリゲル中に播種すると内皮細胞が細長い形状に連結することが知られている。これは、個々の内皮細胞が輪を形成するとともに細胞同士が結合して複合体となり、中央に空間を持つチューブを形成することによる¹³⁾。内皮細胞の管腔形成を調整する分子として、VE-カドヘリンが挙げられる。カドヘリンはアドヘレンスジャンクションに局在し、Ca イオン依存性に相互に結合する細胞間接着分子であり、細胞内ドメインには α -カテニン、 β -カテニン、ビンキュリンを介してアクチンが結合している。カドヘリンには互いに相容性のある複数の分子が同定されており、カドヘリンファミリーを形成しているが、このうち VE-カドヘリンは内皮細胞に特異的に存在し、発生の初期から発現することが知られている。VE-カドヘリン遺伝子を欠損した内皮細胞では、管腔構造は形成されないか著明に障害される¹⁴⁾ことが報告されている。従って、細胞膜のインテグリンと細胞外マトリックスとの解離、再接着が管腔形成にとって重要であると考えられる。

(イ) 血管新生における VEGF の影響の検討

これらの血管新生の各段階を代表する培養内皮細胞モデルを用いて一般的な内皮細胞刺激因子である VEGF の血管新生に対する作用を検討した。その結果、VEGF は、内皮細胞遊走能、内

皮細胞増殖能、管腔形成能のいずれも促進することが明らかとなった。

内皮細胞には VEGF 受容体のうちの Flt-1 と Flk-1 / KDR が発現している¹⁵⁾ことが知られているが、内皮細胞増殖の主なシグナルは Flk-1 / KDR から発信される¹⁶⁾。VEGF が VEGF 受容体に結合すると受容体のダイマー化と細胞内チロシンキナーゼドメインの自己リン酸化を惹起し、PLC-γ とその下流の PKC, PI 3 キナーゼ、さらに下流の Akt, Src ファミリーの細胞質チロシンキナーゼである ERK 1 / 2 や JNK や p38などの MAP キナーゼ、STAT, FAK などの細胞内シグナル伝達系を賦活化する。これらのうち細胞増殖にとって最も重要と考えられる ERK 1 / 2 は、他の増殖因子の刺激においては通常 Ras→Raf→MEK 経路で活性化される¹⁷⁾が、VEGF 刺激での血管内皮細胞の Ras 活性化は微弱であり、Flk-1 / KDR からのシグナルが PLC-γ→PKC→Raf→MEK を介して ERK 1 / 2 に伝わる経路が主体であると報告されている¹⁸⁾。

また、VEGF の細胞内シグナル伝達経路のうち、細胞遊走にとって最も重要と考えられる PI 3 キナーゼとその下流の Akt, Src ファミリーの細胞質チロシンキナーゼは、PI 3 キナーゼ→Rac→Rho の経路で活性化されることがアクチンの再構成と VE-カドヘリンと β-カテニンを細胞間接着部位に移動させることにより管腔構造の形成に寄与することが明らかとなっている¹⁹⁾。

(ウ) 血管新生における動脈硬化因子の影響

動脈硬化に特異的な因子である LysoPC と S1P それぞれを内皮細胞に添加し、血管新生に対する作用を検討した。LysoPC を添加した細胞においては、内皮細胞増殖能を促進し、S1P を添加した細胞においては、内皮細胞遊走能、内皮細胞増殖能、管腔形成能のいずれも促進することが明らかとなった。さらに、VEGF と LysoPC、VEGF と S1P を細胞に添加した動脈硬化細胞モデルにおいては、前者は VEGF のみ、LysoPC のみの細胞増殖能を相乗的に促進し、後者は、VEGF のみ、S1P のみの細胞遊走能、内皮細胞増殖能、管腔形成能のいずれも相乗的に促進した。

動脈硬化のプラークを構成する主要な脂質である LDL の酸化変性の過程で、PC (ホスファチジルコリン) は LysoPC (リゾフォスファチジルコリン) へと分解される。LysoPC は、単球およびリンパ球に対する走化活性を有すること^{20),21)}、内皮細胞に作用しその内皮依存性弛緩を抑制すること^{22),23)}、内皮細胞での接着分子 VCAM-1 あるいは ICAM-1 の発現を誘導する²⁴⁾ことが示されている。また、LysoPC は G2A, GPR4 といった GPCR (G タンパク質共役型受容体) を介してシグナルが伝達される^{25),26)}。LysoPC が受容体に結合すると、三量体型 G タンパク質の Gi を介して細胞内 Ca イオンの上昇と ERK の活性化を惹起し、細胞増殖に関与する²⁷⁾事も知られている。本研究において、LysoPC の細胞増殖に対するメカニズムは、以下のように考えられる。LysoPC は自身の受容体に結合して Gi→Ras→Raf→MEK→ERK 1 / 2 経路が活性化され、また LysoPC 単体での細胞増殖に対して、VEGF 存在下では細胞増殖を相乗的に促進したことから、LysoPC は VEGF の働きを増強させた可能性が示唆される。

S1P はスフィンゴ脂質の代謝産物であり、動脈硬化病変においては主に血小板の活性化に伴って放出され、内皮細胞や平滑筋細胞に対して、オートクリン、パラクリン的に作用し、増

殖や遊走を促進することが知られている。また、S1PはEDG-1, EDG-3, EDG-5, EDG-6, EDG-8のリガンドとして作用することも明らかになっており、内皮細胞は、EDGのうちEDG-1とEDG-3を発現している²⁸⁾。EDG-1は三量体型Gタンパク質のGiを介して細胞内Caイオンの上昇とERKの活性化を惹起して細胞増殖に関与するのに対し、EDG-3はGqやG₁₃を介して低分子量Gタンパク質であるRacやRhoを活性化し、アクチンの再構成とVE-カドヘリンとβ-カテニンを細胞間接着部位に移動させることにより管腔構造の形成に関与する²⁹⁾ことが明らかとなっている。しかし、VEGFは細胞増殖のみならず細胞遊走も促進するが、VEGF存在下でLysoPCは細胞遊走に影響を及ぼさなかったことから、VEGFのシグナル伝達において、増殖と遊走のシグナルの分岐点である上流のVEGFレセプターリン酸化にLysoPCは影響を及ぼしていることが推察できる。VEGFレセプターにはY951³⁰⁾, Y1054, Y1059^{31), 32)}, Y1175, Y1214³³⁾といったリン酸化部位が知られているが、それぞれのリン酸化部位は、リン酸化されると異なったシグナル伝達を行うものと考えられる。

(エ) 血管新生におけるEGCGの影響

EGCGが細胞遊走、増殖、管腔形成に及ぼす影響を検討した。数杯の緑茶を摂取した後の血中EGCG濃度は約1μM程度であるが、培養系でのEGCG濃度とは単純に比較できない。予備実験にてEGCGを100μM以上添加したところ、細胞遊走、増殖両モデルとも細胞死が観察されたため、本研究においては、1～50μMのEGCGを添加した。EGCGはVEGFによる培養内皮細胞の内皮細胞遊走能、内皮細胞増殖能、管腔形成能のいずれも、抑制することが明らかとなった。また、LysoPCによる細胞増殖、S1Pによる細胞遊走能、増殖能、管腔形成能のいずれも、EGCGは抑制することが明らかとなった。さらに、培養内皮細胞をVEGFにて刺激した上で動脈硬化に特異的な因子であるLysoPC、S1Pを添加した動脈硬化モデルを作成し、内皮細胞遊走、増殖能、管腔形成能に対するEGCGの影響を検討した。EGCGは、動脈硬化モデルにおいて、細胞遊走能、増殖能、管腔形成能のいずれも抑制することが明らかとなった。

EGCGは、発がん予防等に効果があることが多くの実験により証明されている⁸⁾。その機能のかなりの部分は抗酸化性に関連していると考えられている。近年、EGCGについてはEGCGの受容体-67kDaラミニン受容体(67LR)が発見された。67LRはさまざまがん細胞や組織で発現してがん細胞の浸潤や転移に関与している³⁴⁾ことから、腫瘍マーカーとしても注目されている。これまでに報告してきたEGCGのがん細胞増殖抑制作用の少なくとも一部は67LRを介して発現することが明らかにされた。従って、本研究におけるEGCGの細胞遊走、増殖、管腔形成抑制作用についても、67LRを介した作用である可能性が示唆される。VEGF刺激により67LR発現が亢進し、EGCGの67LRを介したシグナル伝達が内皮細胞遊走、増殖、管腔形成を抑制したと考えられる。EGCGの細胞遊走と細胞増殖に対する具体的な抑制メカニズムの解明はなされていないが、遊走抑制については、Flk-1/KDRからのシグナルが細胞内チロシンキナーゼドメインの自己リン酸化からPI3キナーゼ→Rac→Rhoに伝わる経路のいずれかを阻害したと考えられる。増殖抑制についても、Flk-1/KDRからのシグナルが細胞内チロシンキナーゼドメインの自己リン酸化からPLC-γ→PKC→Raf→MEKを介してERK1/2に伝わる経路のい

すれかを EGCG が阻害したと考えられる。

以上より、動脈硬化病変では、動脈硬化に特異的な因子である LysoPC と S1P が VEGF による血管新生を促進してplaquesの不安定化ならびに虚血性疾患への移行を惹起するが、EGCG はこのような LysoPC, S1P の作用を抑制する可能性が考えられる。今後、EGCG の作用メカニズムの解明と動脈硬化治療薬としての応用が期待される。

引用文献

- 1) 佐藤靖史 2000 『よくわかる血管のバイオロジー』 羊土社 89-94.
- 2) 渋谷正史 2000 『血管研究の最前線に迫る』 羊土社 107-110.
- 3) Liu, Y 2000 Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J. Clin. Invest.* 106: 951-61.
- 4) Barger A. C, Beeuwkes R 3rd, Lainey L. L et al Hypothesis: vasa vasorum and neovascularization of human coronary arteries. A possible role in the pathophysiology of atherosclerosis. *N Engl J Med.* 1984, 310: 175-7.
- 5) Tenaglia A N, Peters K G, Sketch M H Jr et al 1998 Neovascularization in atherectomy specimens from patients with unstable angina: implications for pathogenesis of unstable angina. *Am Heart J.* 135: 10-4.
- 6) McCarthy M J, Loftus I M, Jones L et al 1999 Angiogenesis and the atherosclerotic carotid plaque: an association between symptomatology and plaque morphology. *J Vasc Surg.* 30: 261-8.
- 7) 村松 敬一郎、杉山 公男 等 2002 『茶の機能』 学会出版センター 52-77.
- 8) Brown M D 1999 Green tea (*Camellia sinensis*) extract and its possible role in the prevention of cancer. *Altern Med Rev.* 4: 360-70.
- 9) Miura S, Watanabe M, Tomita T et al 1994 The inhibitory effects of tea polyphenols (flavan-3-ols derivatives) on Cu²⁺ mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *Biol Pharm Bull.* 17 (12): 1567-72.
- 10) Tomita T, Miura Y Chiba E et al 1999 Antiatherogenic effects of tea polyphenols (flavan-3-ols) in humans and apo E-deficient mice. *Basic Life Sci.* 66: 471-82.
- 11) Y. Cao and R. Cao 1999 Angiogenesis inhibited by drinking tea. *Nature.* 398: 3811.
- 12) Babaei, Saeid, Stewart, Duncan J. 2002 Overexpression of endothelial NO synthase induces angiogenesis in a co-culture model. *Cardiovascular Research* 55: 190-200.
- 13) Kubota Y, Kleiman H. K, Moritani G. R et al. 1988 Role of laminin and endothelial cells into capillary-like structures. *J Cell Biol.* 107(4): 1589-98.
- 14) Vittet D, Buchou T, Schweitzer A et al. 1997 Targeted null-mutation in the vascular endothelial-cadherin gene impairs the organization of vascular-like structures in embryoid bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94: 6273-6278.
- 15) Shibuya M 1999 Structure and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 and -2. *Microbiol. Immunol.* 237; 59-83.
- 16) Shalaby F, Rossant J, Schuh AC et al 1995 Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature,* 376: 62-66.
- 17) Meadows KN, Bryant P, and Pumiglia K 2001 Vascular endothelial growth factor induction of the angiogenic phenotype requires Ras activation. *J Biol Chem.* 276: 49289-49298.
- 18) Takahashi T, Ueno H, and Shibuya M 1999 VEGF activates protein kinase synthesis in primary endothelial cells. *Oncogene,* 18: 2221-2230.
- 19) Matsumoto T and Claesson-Welsh L 2001 VEGF receptor signal transduction. *Sci STKE.* 2001: RE21.
- 20) Quinn MT, Parthasarathy S, Steinberg D 1988 Lysophosphatidylcholine: atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85: 2805-9.

- 21) McMurray HF, Parthasarathy S, Steinberg D 1993 Oxidatively modified low density lipoprotein is a chemoattractant for human T lymphocytes. *J Clin Invest.* 92: 1004–8.
- 22) Kugiyama K, Kerns SA, Morrisett JD et al 1990 Impairment of low-density lipoproteins. *Nature.* 344: 160–2.
- 23) Yokoyama M, Hirata K, Miyake R 1990 Lysophosphatidylcholine: essential role in the inhibition of endothelium-dependent vasorelaxation by oxidized low density lipoprotein. *Biochem Biophys Res Commun.* 168: 301–8.
- 24) Kume N, Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr 1992 Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. *J Clin Invest.* 90: 1138–44.
- 25) Zhu K, Baudhuin LM, Hong G et al 2001 Sphingosylphosphorylcholine and lysophosphatidylcholine are ligands for the G protein-coupled receptor GPR 4. *J Biol Chem.* 276: 41325–35.
- 26) Kabarowski JH, Zhu K, Le LQ et al 2001 Lysophosphatidylcholine as a ligand for the immunoregulatory receptor G 2 A. *Science.* 293: 702–5.
- 27) Huang TY, Chen HI, Liu CY et al 2002 Lysophosphatidylcholine alters vascular tone in rat aorta by suppressing endothelial $[Ca^{(2+)}]$ (I) signaling. *J Biomed Sci.* 9 : 327–33.
- 28) Lee M J, Thanqada S, Claffey KP et al 1999 Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell.* 99: 301–12.
- 29) Liu Y, Wada R, Yamashita T et al 2000 Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J Clin Invest.* 106: 951–61.
- 30) Matsumoto T, Bohman S, Dixelius J, Berge T, Dimberg A, Magnusson P, Wang L, Wikner C, Qi JH, Wernstedt C, Wu J, Bruheim S, Mugishima H, Mukhopadhyay D, Spurkland A, and Claesson-Welsh L: 2005; VEGF receptor-2 Y; 951; signaling and a role for the adapter molecule TSAd in tumor angiogenesis. *EMBO J.* 24: 2342–2353.
- 31) Dougher M and Terman BI: 1999; Autophosphorylation of KDR in the kinase domain is required for maximal VEGF-stimulated kinase activity and receptor internalization. *Oncogene,* 18: 1619–1627.
- 32) Kendall RL, Rutledge RZ, Mao X, Tebben AJ, Hungate RW, and Thomas KA: 1999; Vascular endothelial growth factor receptor KDR tyrosine kinase activity is increased by autophosphorylation of two activation loop tyrosine residues. *J Biol Chem,* 274: 6453–6460.
- 33) Takahashi T, Yamaguchi S, Chida K, and Shibuya M: 2001; A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO J.* 20: 2768–2778.
- 34) Tachibana H, Koga K, Fujimura Y et al, 2004 A receptor for green tea polyphenol EGCG. *Nature Structural & Molecular Biology,* 11: 380–381.

(原稿受理 2007年3月14日)