

AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

血压 (2004.03) 11巻3号:263～267.

【分子高血圧 最新の進歩】 温熱による新生内膜肥厚の抑制効果 熱ショック蛋白の発現と酸化ストレスの抑制の役割

岡田基, 長谷部直幸, 会澤佳昭, 井澤和眞, 川辺淳一, 菊池健次郎

温熱による新生内膜肥厚の抑制効果 —熱ショック蛋白の発現と酸化ストレスの抑制の役割—

岡田 基 長谷部直幸 会澤佳昭 井澤和真 川辺淳一
菊池健次郎

旭川医科大学第一内科

新生内膜の形成には平滑筋細胞の遊走増殖が重要な役割を示す。われわれは温熱に細胞増殖抑制効果があることに注目し、ラット大腿動脈カフ傷害血管での新生内膜形成における温熱の効果を検討した。心血管保護作用を有するHSP 72を誘導した温熱群では、新生内膜が有意に抑制された。血管の免疫組織化学染色による検討で、温熱群でMCP-1, NADPH oxidaseの発現抑制を認めた。また、血管平滑筋細胞と単球系細胞の共培養モデルにおいて、炎症系サイトカインおよび活性酸素の産生低下を認めた。これらの結果より、温熱は熱ショック蛋白の発現と酸化ストレス抑制を介する動脈硬化進展抑制効果がある可能性が示唆された。

はじめに

温浴にはさまざまな慢性の病気や疲労を癒してくれるはたらきがあり、薬物治療や外科的治療の及ばない慢性疾患の補助的治療として有効であることが多い。臨床においても温浴は、がんの温熱療法でがん細胞の増殖抑制効果が示されており、また循環器系では心不全治療に応用され¹⁾、さらに血管内皮機能の改善効果も示されている²⁾。温熱負荷をはじめ、さまざまなストレスにより、熱ショック蛋白は発現するが、そのなかでもとくにHSP 72 (heat shock protein 72)は虚血心に対してその発現が梗塞サイズを縮小することが報告されている³⁾。しかしながらそのメカニズムは十分に解明されていない。一方酸化ストレスは炎症反応や血管新生に重要な役割を演じており、とくに血管壁においてはNADPH oxidaseの役割が解明され、動脈硬化進展に重要である。そこで今回われわれは、ラットカフ血管内膜肥厚モデル

を用いてその組織標本作製し、温熱の効果を検討した。

1. 方法

1) 内膜肥厚モデルの作製

動脈硬化モデルとして、10週齢の雄SD (Sprague-Dawley) ラット大腿動脈にポリエチレンカフを巻き4週間飼育し新生内膜肥厚を作製した。温熱群は手術前日より41°C、15分間の温浴を4週間施行した。テイルカフ法により定期的に血圧を測定した。

2) 組織学的検査

大腿動脈の血管灌流固定標本作製し、中膜内膜比をヘマトキシリンエオジン染色にて評価し、免疫組織化学染色として、熱ショック蛋白の同定に抗HSP 27, 72抗体、炎症細胞の同定に抗ED-1, 2, 3抗体および抗MCP-1抗体、NADPH oxidaseの評価に抗p 22-phox抗体を

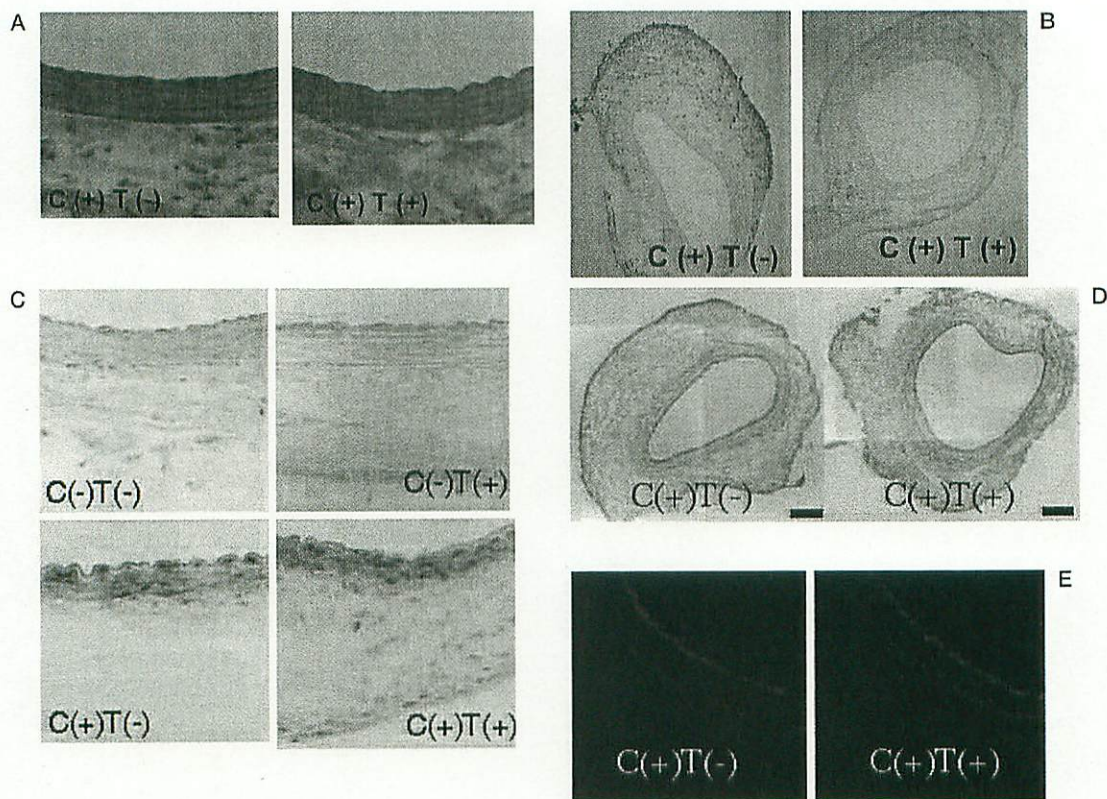


図 1. カフ傷害血管における温熱の影響

A: ヘマトキシリンエオシン染色, B: 抗 ED-1 抗体による免疫組織化学染色, C: 抗 HSP 72 抗体による免疫組織化学染色, D: 抗 MCP-1 抗体による免疫組織化学染色, E: 抗 p22-phox 抗体による蛍光免疫組織化学染色.

C(+), (-): カフ傷害群, 非傷害群; T(+), (-): 温熱治療群, 非治療群.

(Okada M *et al.*, 2004⁴⁾より改変引用)

用いて評価した.

3) ウェスタンブロット解析

ラット胸部大動脈およびヒト胸部大動脈培養平滑筋細胞 (hVSMC) において, 温熱での HSP 72 の発現を確認するために, 抗 HSP 72 抗体を用いてウェスタンブロット法を施行した.

4) ELISA

hVSMC と単球系細胞であるヒト骨髄単球性白血病細胞株 (THP-1) 細胞を 1:1 で共培養し, 培養上清中の HSP 70 (誘導性の HSP 72 を含む) およびサイトカイン (TNF- α : tumor necrosis factor- α , IL-1 β), ケモカイン (MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1) 濃度を測定した.

5) フローサイトメトリー

温熱刺激による THP-1 細胞の活性酸素の産生能を, 蛍光プローブ CDCFH を用いたフローサイトメーターで評価した.

6) 統計解析

すべてのデータは平均 \pm 標準誤差で表示した. $p < 0.05$ を統計学的に有意と判断した.

2. 結果

1) 新生内膜肥厚の抑制

コントロール群では内膜中膜比 34% の新生内膜肥厚を認めたが, 温熱群ではその肥厚は有意に抑制されていた ($n=8$, $p < 0.001$) (図 1A)⁴⁾.

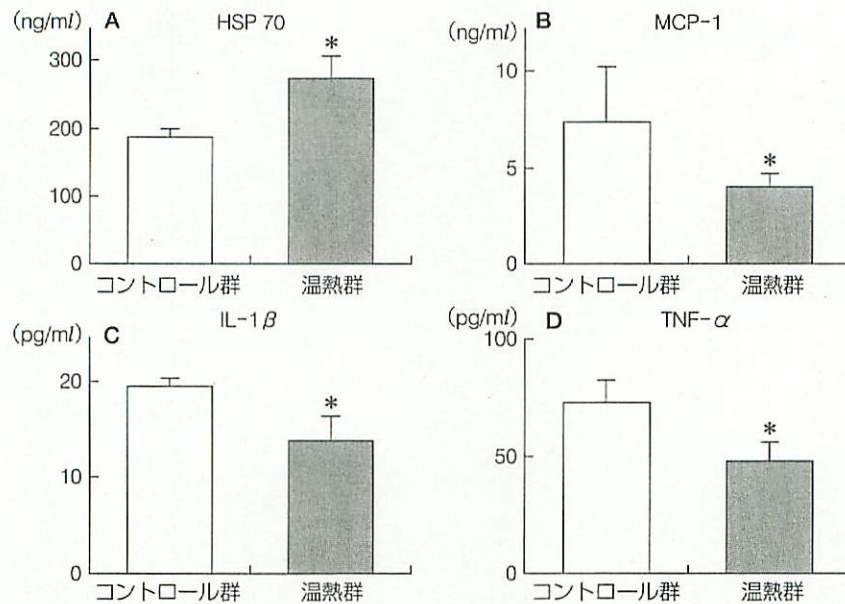


図 2. 温熱処理群とコントロール群での HSP 70(A), MCP-1(B), IL-1 β (C), TNF- α (D) の発現の比較
* p<0.05 対コントロール

2) 血圧の変化

術前, 3 日後, 1, 2, 4 週間の温浴前の血圧測定ではいずれも両群間に収縮期, 拡張期血圧および脈拍数に有意差はなく, 温浴によるストレス増加はないと考えられた。

3) 細胞浸潤

カフ傷害血管の外膜には著しい細胞浸潤を認めため, 単球・マクロファージのマーカーである抗 ED-1 抗体で免疫組織化学染色したところ, ED-1 陽性細胞の著しい浸潤を認めた。一方温熱群の外膜における細胞浸潤数は有意に減少していた (59.4%control)。さらに組織親和性の高い抗 ED-2, ED-3 抗体での評価も同様に温熱群で浸潤細胞数の減少を認めた (それぞれ 54.9%, 58.0% control, p<0.05) (図 1 B)。

また, マクロファージのケモカインであり炎症のマーカーとしても評価されている MCP-1 の発現も温熱群で明らかに減少した (図 1 D)。

4) 熱ショック蛋白の発現

HSP 27 はもともと血管平滑筋細胞に高濃度に存在するといわれており, コントロール群と温熱群では明らかな発現の差を認めなかった。一方, ストレス誘導性の

HSP 72 は温熱群で増強されたが, カフ傷害のみでは発現しなかった (図 1 C)。

hVSMC を用いた ELISA 法では培養上清中の HSP 70 は温熱群で有意に上昇した。

サイトカイン濃度は温熱群で有意に抑制された (図 2)。

ウェスタンブロット法を用いた解析では, 温熱群の大動脈における HSP 72 の発現は単回温浴後 6 時間より認められ 72 時間まで持続した。さらに 1 週間連続温浴群で明らかに発現の亢進を認めた。また温度変化による影響では 41°C 以上の負荷で HSP 72 の発現が増強した (図 3)。

5) 活性酸素

41°C, 15 分間の温熱処理した THP-1 細胞をホルボールエステル (PMA) 200 nM で刺激後, 活性酸素産生量を比較した。温熱群では有意にその産生量が減少した (44.4%control, n=6, p<0.01) (図 4)。

蛍光免疫染色を用いた血管標本では, NADPH oxidase のサブユニットである p22-phox の発現を観察したところ, カフ傷害血管の外膜を中心に発現していた p22-phox は温熱群で明らかに減少していた (図 1 C)。

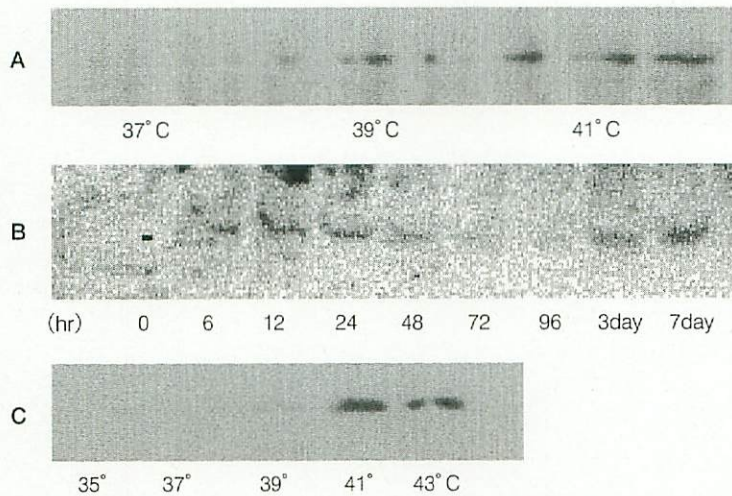


図 3. 各温度における単回入浴 24 時間後の HSP 72 の発現
 A: ラット大動脈での HSP 72 の発現 (n=3), B: 41°C 単回入浴後の各経過時間における HSP 72 の発現, C: hVSMC における HSP 72 の発現

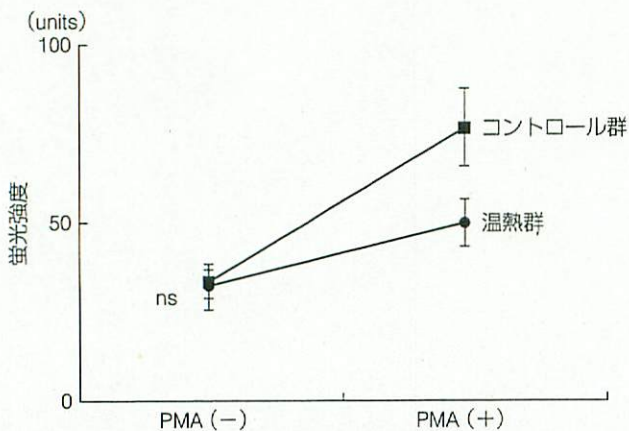


図 4. 温熱による活性酸素産生量の比較 (THP-1 細胞)

3. 考察

本研究でわれわれはカフ傷害血管モデルによる新生内膜の肥厚が温熱治療で抑制されることを初めて報告した。このメカニズムは HSP 72 の発現と酸化ストレスの抑制によると考えられる。

細胞に熱をはじめとする各種のストレスを負荷すると HSP が誘導され、細胞内で蛋白変性の阻止・修復作用を促進し細胞機能の制御に関与することから、分子シャペロンとして機能する。最近の研究により、HSP は炎症などのストレスに対し発現を増強させ細胞保護的にはたらいっていることがわかってきている。とくに循環器領域に

おいては HSP 72 が虚血傷害に対し保護的にはたらくことが虚血再灌流モデルで確認されている。また、HSP 70 を誘導した血管平滑筋細胞は虚血や過酸化水素、サイトカイン刺激での増殖、遊走が抑制される。

さらに、酸化ストレスは細胞の活性化を誘導し、炎症や増殖の機転となりうる。NADPH oxidase は好中球やマクロファージなどにおける生体防御機構としてのスーパーオキシド産生系として同定されたが、この系は血管内皮細胞や平滑筋細胞にも存在することがわかった。NADPH oxidase の膜コンポーネントである p 22-phox はヒトの動脈硬化病変の内膜や外膜に発現することが報告されている⁵⁾。われわれの結果も同様に p 22-phox はカフ周囲の外膜に強く発現していたが、温熱で低下した。*in vitro* の結果からも THP-1 細胞の活性酸素産生量は温熱で減少した。したがって、温熱により外膜と炎症細胞の酸化ストレスは低下することが判明した。さらに MCP-1 の発現も低下し、サイトカインの産生量も減少したことから、温熱による新生内膜形成の抑制のメカニズムとして、炎症細胞浸潤が抑制され、そこから産生されるサイトカインが減少し、細胞増殖へのシグナルが低下したと考えられた。さらに中膜に強く発現した HSP 72 が保護的にはたらき血管平滑筋細胞の活性、遊走が抑制された可能性がある。



おわりに

今後、臨床においても温熱療法が熱ショック蛋白の発現と酸化ストレス抑制などの機序により動脈硬化進展抑制効果をもたらす可能性が示唆された。

文献

- 1) Imamura M *et al* : *J Am Coll Cardiol* **38** : 1083, 2001
- 2) Ikeda Y *et al* : *Jpn Circ J* **65** : 434, 2001
- 3) Ooie T *et al* : *Circulation* **104** : 1837, 2001
- 4) Okada M *et al* : *Circulation*, 2004 (in press)
- 5) Sorescu D *et al* : *Circulation* **105** : 1429, 2002