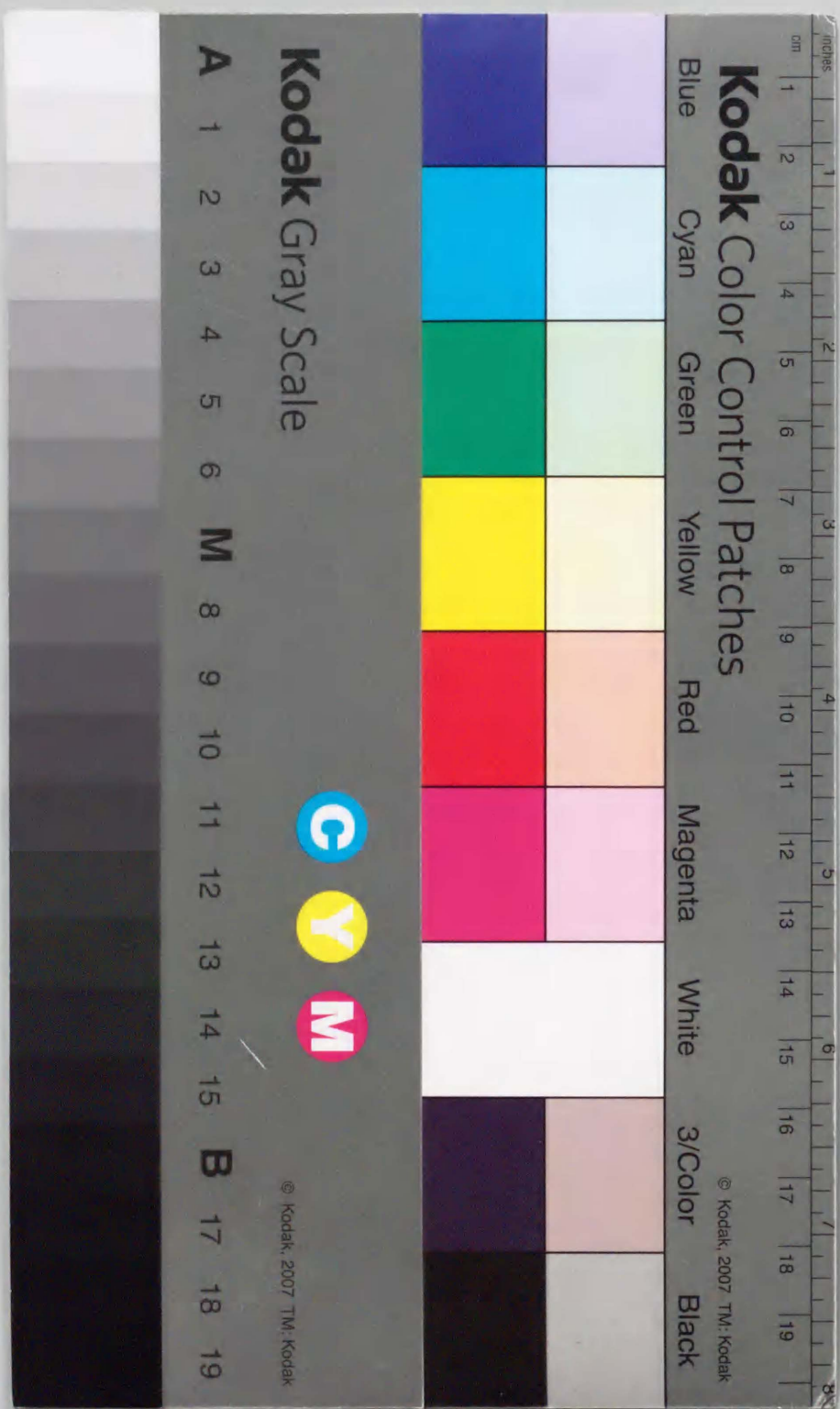


線溶調節を行う血管細胞に対するカドミウム
および鉛の毒性発現に関する研究

山本 千夏



①

線溶調節を行う血管細胞に対するカドミウム
および鉛の毒性発現に関する研究

山本 千夏

目次

緒言	1
実験方法	5
1. 材料	5
2. t-PA:Ag および PAI-1:Ag 抗原量の測定	6
3. フィブリンザイモグラフィ	6
4. 線溶蛋白遺伝子の発現	8
5. 細胞毒性	9
6. 蛋白合成	9
7. 細胞内カドミウム量	10
8. 細胞内メタロチオネイン量	10
9. 統計学的処理	11
第 I 章 血管内皮細胞の線溶調節に対するカドミウムの毒性発現	12
第 1 節 線溶蛋白の放出および液相の線溶活性	13
第 2 節 カドミウムの作用の特異性	16
第 3 節 細胞内へのカドミウムの蓄積, 細胞傷害および蛋白合成	17
第 4 節 自己分泌型増殖因子の関与の可能性	19
第 5 節 考察	23
第 II 章 血管内皮細胞の線溶調節に対する鉛の毒性発現	26
第 1 節 線溶蛋白の放出および液相の線溶活性	27
第 2 節 鉛の作用の特異性	29

第3節 生理的因子による線溶調節に対する鉛の作用	30
第4節 細胞傷害および蛋白合成	32
第5節 考察	33
第Ⅲ章 血管平滑筋細胞および線維芽細胞の線溶調節に対するカドミウム および鉛の毒性発現	36
第1節 血管平滑筋細胞の線溶蛋白放出に対するカドミウムの作用	38
第2節 線維芽細胞の線溶蛋白放出に対するカドミウムの作用	41
第3節 血管平滑筋細胞の線溶蛋白放出に対する鉛の作用	44
第4節 線維芽細胞の線溶蛋白放出に対する鉛の作用	47
第5節 考察	49
結論	52
参考論文	55
引用論文	56
謝辞	63

緒言

心疾患および脳疾患は日本人の死因別死亡率において2位および3位を占めるだけでなく、その死亡率の合計は第1位の悪性新生物を上回り、公衆衛生学上においても重要な問題となっている。この2つの死因の中では、心筋梗塞および脳梗塞が大きな比率を占めている。これらは、発症部位は異なるが、どちらも血管内の血栓形成を伴う疾患で、死亡率だけでなく、罹患率の面からも近年注目されている。動脈硬化症および高血圧症は互いに危険因子であり、心筋梗塞および脳梗塞の基礎疾患として重要である。

動脈硬化病変は、一般的には血管内膜における血管平滑筋細胞の増殖、血管内および血管組織内血液凝固、血管内皮傷害などの所見を呈する血管病変である。すなわち、動脈硬化巣内には結合組織に被覆された血管平滑筋細胞、マクロファージ、Tリンパ球の浸潤および壊死像、脂肪蓄積や血栓が一般的に観察される(Moore, 1981; Wight, 1989; Small, 1988)。Rossらはこのような変化を内皮傷害に対する動脈壁の反応として考え、傷害反応仮説としてまとめている(Ross, 1993)。それによると、血管内皮細胞の機能障害が生じると内皮細胞のターンオーバーの亢進や内皮下組織への単球の侵入が起こる。内膜に侵入した単球はマクロファージへと分化し、変性した脂質を取り込んで泡沫化し、血管平滑筋細胞に対する遊走・増殖因子である血小板由来増殖因子(PDGF)(Ross, 1990)などの増殖因子を放出し、平滑筋細胞の内膜への遊走と増殖を促進する。さらに、血管内皮細胞が剥離するような傷害が加わると血管壁の抗血栓性が失われ、血小板の活性化作用を有する内皮下組織が血液と直接接することによって血小板の粘着・凝集が起こり、このとき血小板からPDGFを初めとする平滑筋細胞遊走・増殖因子が大量に放出され、血管平滑筋細胞の内膜

への遊走および増殖が加速されて血管内膜の肥厚斑が形成される。従って、動脈硬化病変の発症の理解には、その初期段階としての内皮細胞機能障害の解明が不可欠である。

血管は内腔を一層に覆う血管内皮細胞、中膜を構成する血管平滑筋細胞および外膜の線維芽細胞から成り、それぞれが機能を発現している‘生きた組織’である。近年、血管内皮細胞が血液成分と内皮下組織との接触を妨げる障壁として存在しているだけでなく、様々な因子を産生・放出し、血管と血液の恒常性維持に寄与していることが明らかになってきた。血管内皮細胞は、一酸化窒素を本体とする内皮細胞由来弛緩因子 (Palmer et al., 1987) および持続的血管収縮因子であるエンドセリン (Yanagisawa et al., 1988) を産生・放出し、血管のトーンスの調節に積極的に関与している。また、血管内腔は抗血栓性を維持しており、血液が非常に凝固し易いものであるにもかかわらず通常血管内では凝固しないが、ひとたび血管内皮細胞が傷害を受けたときは速やかに血液凝固によって止血され、血管は修復される。このとき、不必要な血栓は線溶系によって除去される。このような血液の凝固・線溶を通じた血管の恒常性の維持は血管内皮細胞によって巧妙に調節されている。血管内皮細胞による血液凝固の調節は、血小板凝集抑制作用を有するプロスタサイクリン (Moncada and Vane, 1979) およびヘパリン様活性を有するヘパラン硫酸 (Shimada et al., 1985; Marcum et al., 1986) の産生・放出、ならびにトロンビンの凝固活性を抑制し、抗凝固活性へ転換するトロンボモジュリン (Esmon and Owen, 1981; Maruyama et al., 1984) の保持によって行われるのに対し、線溶系の調節は組織型プラスミノゲンアクチベーター (t-PA) (Levin and Loskutoff, 1982) およびその阻害因子であるプラスミノゲンアクチベーターインヒビター-1 (PAI-1) (Mourik et al., 1984; Gelehrter and Sznycer-Laszuk, 1986) の2つの因子のバランスによって調節されている。PAI-1 は液相中に放出されるとそのほとんどがすぐに不活性型 PAI-1 と

なり活性型 PAI-1 のみが t-PA と結合して不活性型複合体を形成する (Levin, 1986)。t-PA の他に、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター (u-PA) も内皮細胞によって産生・放出され t-PA と同様の活性を示すが、u-PA がフィブリン親和性をほとんど示さないのに対し、t-PA はフィブリンと高い親和性を有し、しかもフィブリンと結合することで活性が増強される (Hoylaerts et al., 1982; Ranby, 1982) ことから、t-PA と活性型 PAI-1 のバランスが血管内の線溶調節に重要であるとされる。血管内皮細胞だけでなく血管平滑筋細胞および線維芽細胞もまた t-PA および PAI-1 産生能を有しており (Herbert et al., 1994; Wojta et al., 1993; Hola et al., 1983), 血管内皮細胞層の傷害時あるいは血管の破綻時に内皮下組織が血液と接したときの線溶調節に関与していると考えられている。

ところで、重金属と血管病変との関連については、古くから多くの報告があるが、一連の報告にはふたつの特徴があった。第一は、動脈硬化を含む血管病変を引き起こすとされる重金属として、カドミウムおよび鉛が特に多く報告されてきたことである。例えば、疫学的にカドミウムの汚染地区に動脈硬化発症率が高く (Houtman, 1993) , 血管病変と環境カドミウム曝露には関係が見出され、(Carroll, 1966; Engvan and Perk, 1985) 鉛についても高血圧症との関係が (Menditto et al., 1994) が報告されている。また、動物実験において、カドミウムおよび鉛は動脈硬化および高血圧を誘発する (Revis et al., 1981; Schroeder and Vinton, 1962; Perry et al., 1983; Perry et al., 1988; Chai and Webb, 1988; Lal et al., 1991) という。しかしながら、第二の特徴は、このように血管病変を引き起こすとされるカドミウムおよび鉛の細胞レベルでの毒性発現機序はまったく不明であったことである。血管内皮細胞の機能障害が血管病変の発症・進展に重要であること、また動脈硬化病変を含む血管病変は一般に凝固促進性あるいは線溶活性の低下の結果と考えられる血栓形成性を伴うことから、内皮細胞が介在する線溶調節に対するカドミウムおよび鉛の

毒性発現を明らかにする必要がある。

本研究の目的は、カドミウムおよび鉛に曝露した血管内皮細胞からの線溶蛋白の産生・放出の変化およびその結果生じる液相の線溶活性の変化を細胞培養系を用いて検討することによって、内皮細胞が調節する線溶系に対するこれら重金属の毒性発現を明らかにし、これらの重金属による血管病変の誘発機構の理解に寄与することである。さらに、血管内皮細胞の傷害時に線溶調節を行うとされる血管平滑筋細胞および線維芽細胞についても同様の検討を行い、血液線溶調節を行う血管構成細胞に対するカドミウムおよび鉛の毒性発現様式とこれらの重金属に対する各細胞種の応答様式を明らかにすることである。

実験方法

1. 材料

ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞およびヒト胎児肺由来線維芽細胞 (IMR-90) は、American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) から購入した。ヒト大動脈由来血管平滑筋細胞、血管平滑筋細胞増殖培地およびヒト血管内皮細胞増殖培地は、倉敷紡績 (大阪) から購入した。ASF-301 培地は味の素 (東京) より、RPMI-1640 培地およびカルシウム・マグネシウム不含リン酸緩衝液 (CMF-PBS) は、ニッスイ製薬 (東京) よりそれぞれ購入した。牛胎児血清 (Fetal bovine serum; FBS) は、Summit (Ft. Collins, CO, USA) から購入した。細胞培養用 I 型コラーゲンコートディッシュおよびプレートは、岩城硝子 (千葉) より購入した。L-[¹⁴C(U)]ロイシン (10.8 GBq/mmol) および L-[3,4,5-³H(N)]ロイシン (5,328.0 GBq/mmol) は、New England Nuclear (Boston, MA, USA) から購入した。プラスミノゲン含有フィブリノーゲン (ウシ血漿由来) は、第一製薬 (東京) より購入した。組み換え bFGF および抗 TGFβ 抗体はそれぞれ Genzyme (Cambridge, MA, USA) およびキング醸造 (兵庫) から購入した。エンドセリン-1 およびウシ血漿由来トロンビン (1950 NIH U/mg protein) は、Sigma (St. Louis, MO, USA) より購入した。t-PA 抗原 (t-PA:Ag) および PAI-1 抗原 (PAI-1:Ag) 測定キットは、Boopool (Umea, Sweden) より、MTT 測定キットは、Chemicon International (Temecula, CA, USA) からそれぞれ購入した。QuickPrep Micro mRNA purification kit は、Pharmacia (Uppsala, Sweden) より購入した。Gene Amp RNA PCR kit は、Perkin Elmer (Foster, CA, USA) より購入した。トランスファーメンブラン (Hybond N⁺) は、Amersham (Little Chalfont, England, UK) より購入した。アガロースは、宝酒造 (滋賀) より購入した。アクリルアミド (モノマー) およびドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、クマシーブリリアントブルー-R-250 (CBB) は、ナカライテックスよ

り購入した。塩化カドミウム、塩化鉛、乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性測定キットおよびその他の試薬は、和光純薬工業 (大阪) より購入した。

2. t-PA:Ag および PAI-1:Ag の測定

血管内皮細胞は 24 穴プレート中に血管内皮細胞増殖培地で、37°C、5%CO₂ の条件下でコンフルエントまで培養後、培地を除去し、細胞層を無血清 ASF-301 培地で 2 回洗い、新鮮な無血清 ASF-301 培地中で、塩化カドミウム (0.5 1 or 2 μM) あるいは塩化鉛 (1, 2, 5 or 10 μM) の存在下で原則として 24 時間培養した。処理後、培地を回収し、蓄積した t-PA:Ag および PAI-1:Ag を定量した。この培地は以下に述べるフィブリンザイモグラフィーによる t-PA および u-PA の活性測定にも供した。培地回収後の細胞層は、MTT 法による細胞数の計測に用いた。

3. フィブリンザイモグラフィー

Chart 1. にフィブリンザイモグラフィー (Matsuo, 1988) の概略を示す。0.05% フィブリノーゲン (プラスミノーゲンを含む) および 30% トロンビンを含む SDS-ポリアクリアミドゲル (7.5%) を作製した。このときフィブリンマトリックスも均一に形成される。処理後の培養上清をメルカプトエタノールなどの還元剤を含まないサンプル緩衝液 (0.15 M トリス-塩酸緩衝液, pH 6.8, 3% SDS, 30% グリセロール, 0.03% BPB) と 3 : 1 になるように調製し、37°C で 1 時間インキュベートした。作製した 7.5% ポリアクリアミドゲルにアプライし、200 V, 30 mA の条件下で電気泳動を行った。泳動後、ゲルを 2.5% Triton X-100 で 1 時間振盪し、ゲル中の SDS を除いた。この操作で泳動されたプラスミノーゲンアクチベーターの活性が回復する。次に、0.1 M グリシン-水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 8.3) 中で、37°C で 24~48 時間静置した。このゲルを 0.25% CBB で染色後、脱色液 (7.5% 酢酸, 5% メタノール)

で脱色した。培養上清中のプラスミノーゲンアクチベーターによりゲル中のプラスミノーゲンから変換されたプラスミンがフィブリンを溶解し、培養上清中の線溶活性がフィブリン溶解窓として検出され、溶解窓の分子量から t-PA と PAI-1 の活性を鑑別した。

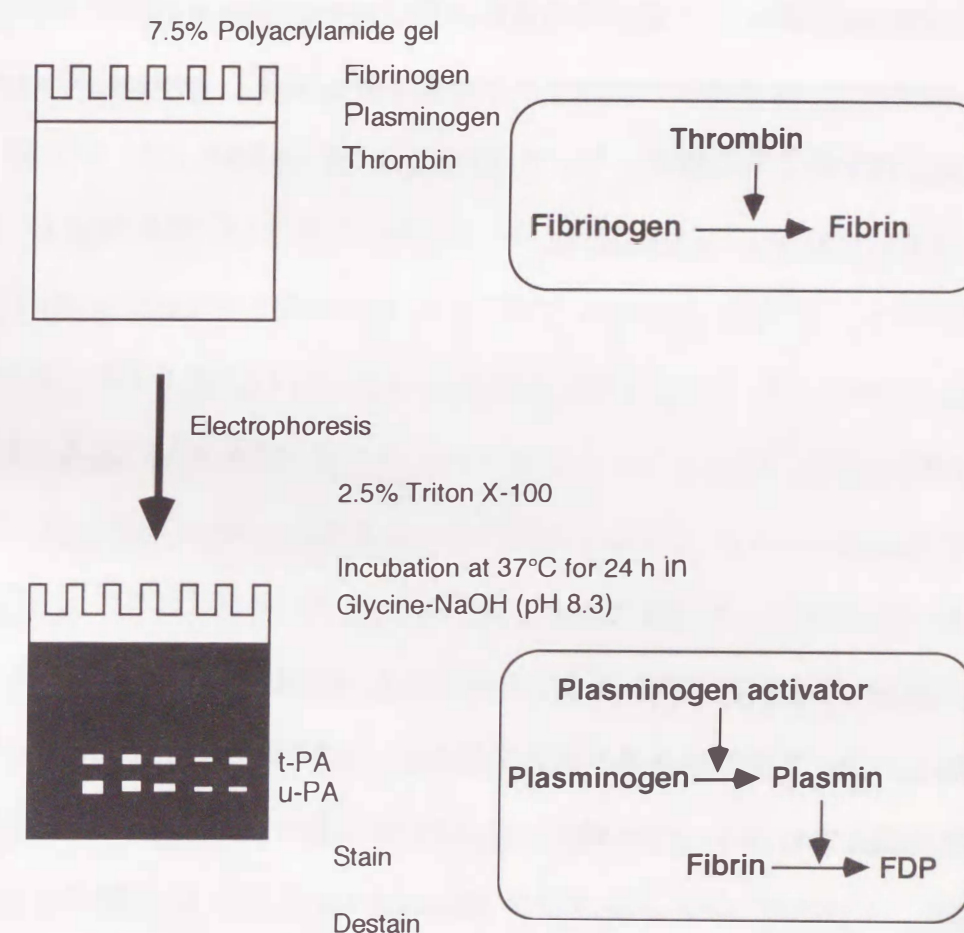


Chart 1. Procedure of fibrin zymography

4. 線溶蛋白遺伝子の発現

血管内皮細胞は 100 mm ディッシュ中に血管内皮細胞増殖培地で、37°C、5% CO₂ の条件下でコンフルエントまで培養後、培地を無血清 ASF-301 培地に交換し、塩化カドミウム (0.5, 1 or 2 μM) あるいは、塩化鉛 (1, 2 or 5 μM) の存在下で 24 時間処理した。処理後、培地を取り除き、細胞層を CMF-PBS で 2 回洗い、QuickPrep Micro mRNA purification kit を用いて Poly (A)⁺ mRNA を抽出した。PCR 用マイクロチューブに 300 ng/20 μl Poly (A)⁺ mRNA 溶液を調製し、Gene Amp RNA PCR kit を用いて、線溶蛋白遺伝子の Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) を行った。プライマーの forward (F), reverse (R) およびプローブの配列は以下のように設定した。すなわち、t-PA mRNA については、F: 5'-CGA AGG ATT TGC TGG GAA GT-3', R: 5'-TGC GGT TCT TCA GCA CGT GG-3' およびプローブ: 5'-TAC GAG GAC CAG GGC ATC AG-3' (Itagaki et al., 1991), PAI-1 mRNA については、F: 5'-ATG GGA TTC AAG ATT GAT GA-3', R: 5'-TCA GTA TAG TTG AAC TTG TT-3' およびプローブ: 5'-AGA GAG CCA GAT TCA TCA AT-3' (Loskutoff et al., 1987) とした。6 × GLB (Gel loading buffer III: 0.25% ブロモフェノールブルー, 0.25% キシレンシアノール FF および 30% グリセロール) および 120 μg/ml 臭化エチジウムが 1:1 になるように調製し、PCR 反応液 6 μl に対し 3 μl 加え、2% アガロースゲルにアプライし、泳動用緩衝液 (0.04 M トリス酢酸, 0.001 M EDTA, 0.1 μg/ml 臭化エチジウム) を用い、100 V で 15 分間泳動した。泳動後、トランスファーメンブラン (Hybond N⁺) に 0.4 M 水酸化ナトリウムを用いて転写した。メンブランに、120 mJ, 30 秒 UV を照射し固定した。ハイブリバツクに中に入れたメンブランに対し、ハイブリダイズバッファーを 0.1 ml/cm² 加え、50°C で 2 時間プレハイブリダイズを行った後、ハイブリダイズバッファーを新しいものと交換し、³²P 標識プローブを加え、50°C において 18~24 時間ハイブリダ

イゼーションを行った。ハイブリダイゼーション終了後、メンブランを、20 × SSC (0.3 M 塩化ナトリウム, 0.03 M クエン酸ナトリウム, 0.1% SDS) 中で、10 分間の洗浄を 2 回行った後、オートラジオグラフィーを行った (-80°C, 12 時間)。

5. 細胞毒性

血管内皮細胞は 24 穴プレート中に血管内皮細胞増殖培地で、37°C、5% CO₂ の条件下でコンフルエントまで培養後、培地を取り除き、無血清 ASF-301 培地に交換した後、塩化カドミウムあるいは塩化鉛の存在下で原則として 24 時間培養した。培養終了後、培地に逸脱した LDH 活性を測定し、非特異的細胞傷害 (細胞毒性) の指標とした。

6. 蛋白合成

血管内皮細胞は 6 穴プレート中に血管内皮細胞増殖培地でコンフルエントまで培養後、培地を無血清 ASF-301 培地に交換し、塩化カドミウムあるいは塩化鉛で処理し、処理終了 3 時間前に 15 kBq/ml [¹⁴C]ロイシンあるいは [³H]ロイシンでパルスラベルした。処理後、培地を除去し、細胞層は氷冷 CMF-PBS で 2 回洗浄後、氷冷 CMF-PBS 0.75 ml を加え、ラバーポリスマンでかき取り、細胞懸濁液として回収した。ウエルを 0.75 ml の氷冷 CMF-PBS で洗い、洗液を細胞懸濁液に加えた。細胞懸濁液を超音波処理し、細胞ホモジネートを調製し、その 5% トリクロロ酢酸不溶性画分に取り込まれた放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。細胞ホモジネートの一部は、蛍光法による DNA 定量 (Kissane and Robins, 1958) に供した。

7. 細胞内カドミウム量

血管内皮細胞は 6 穴プレート中に血管内皮細胞増殖培地でコンフルエントまで培養後、培地を無血清 ASF-301 培地に交換し、塩化カドミウム (0.5, 1 or 2 μ M) で 24 時間処理した。処理後、培地を除去し、細胞層を氷冷 CMF-PBS で 2 回洗浄後、氷冷 10 mM EDTA 含有酢酸緩衝液 (pH 5.5) 1.5 ml を加え、72 時間 4°C で金属を抽出した。72 時間後、抽出液を回収し、細胞層を同緩衝液で洗い、洗液を抽出液に合わせた。抽出液中の金属量をフレイムレス原子吸光光度計 (日本ジャーレルアッシュ社製 AA8500) で測定した。細胞層は 0.75 ml の CMF-PBS 存在下、ラバーポリスマンでかき取り、細胞懸濁液として回収した。ウェルを 0.75 ml の氷冷 CMF-PBS で洗い、洗液を細胞懸濁液に加えた。細胞懸濁液を超音波処理し、細胞ホモジネートを調製した。細胞ホモジネートを蛍光法による DNA の定量 (Kissane and Robins, 1958) に用いた。

8. 細胞内メタロチオネイン量

血管内皮細胞は 60 mm デイッシュ中にコンフルエントまで培養後、培地を無血清 ASF-301 培地に交換し、塩化カドミウム (0.5, 1 or 2 μ M) で 24 時間処理した。処理後、培地を除去し、細胞層は氷冷 CMF-PBS 0.25 ml で 2 回洗浄後、0.25 M シュークローズ 1 ml 存在下、ラバーポリスマンでかき取り、細胞懸濁液として回収した。ウェルを 0.75 ml の氷冷 CMF-PBS で洗い、洗液を細胞懸濁液に加え超音波処理し、細胞ホモジネートを調製し、これに含まれるメタロチオネインをカドミウム-ヘム法 (Onosaka et al., 1978) の変法で以下のように定量した。細胞ホモジネート 0.5 ml をマイクロチューブに移し、0.5 ml の 0.1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) および 50 μ l の 10 ppm 塩化カドミウム溶液を加え混和後、室温に 10 分間放置した。放置後、2% ウシヘモグロビン 0.1 ml を加え、2 分間煮沸し、10000 $\times g$ で 5 分間

遠心した。ヘモグロビンの添加、煮沸および遠心をさらに 2 回繰り返した後、フレイムレス原子吸光光度計を用いて上清のカドミウム量を測定し、細胞内メタロチオネイン量を算出した。細胞ホモジネートの一部を蛍光法による DNA の定量 (Kissane and Robins, 1958) に用いた。

9. 統計学的処理

実験結果の統計的有意差は、Student の *t*-test で分析し、 $P < 0.05$ を有意とした。

第 I 章 血管内皮細胞の線溶調節に対するカドミウムの毒性発現

血液線溶系は血管内皮細胞が産生・放出している t-PA と PAI-1 のバランスによって調節されている。線溶系の亢進あるいは凝固亢進による相対的な線溶活性の低下は、血栓症や全身出血傾向およびそれらに続く臓器の虚血性病変（梗塞）の要因となる。血中の PAI-1 レベルの増大が血栓症の発症に重要な要因とする臨床的報告もあり (Dawson and Henny, 1992; Schneiderman et al., 1992), t-PA と PAI-1 のバランスの異常を明らかにすることは、動脈硬化病変に含まれる血栓形成を理解する上で重要である。

環境汚染物質であるカドミウムは動脈硬化および高血圧を引き起こすことが知られているが、特に血管内腔を一層で覆っている血管内皮細胞に対する毒性発現はまったく不明であった。最近、細胞培養系を用いた実験でカドミウムが血管内皮細胞に対して細胞毒性を発現し、細胞層からの内皮細胞の脱離を促進し、内皮下組織と血液との接触を妨げる障壁としての機能を破壊し得ること (Kaji et al., 1992a) が示された。また、細胞毒性を示さない濃度のカドミウムが細胞層のグリコサミノグリカンの産生を増加させる (Kaji et al., 1994a) 結果、細胞表面のヘパリン様活性が上昇すること (Kaji et al., 1994b), この変化はカドミウムが大型ヘパラン硫酸プロテオグリカン分子種パルカンの産生過程でそのコア蛋白の合成を促進させることに起因すること (Ohkawara et al., 1997) が明らかにされており、カドミウムが血管内皮細胞の機能変化を惹起することが示唆されている。

そこで本章では、培養血管内皮細胞を用いて線溶蛋白 (t-PA および PAI-1) の放出に対するカドミウムの作用を調べ、その結果生じる液相の線溶活性の変化についても検討を加えた。

第 1 節 線溶蛋白の放出および液相の線溶活性

Fig. I-1 に、血管内皮細胞からの t-PA:Ag および PAI-1:Ag 放出に対するカドミウムの作用を示す。t-PA:Ag の放出は、2 μM までのカドミウムによる影響を受けなかった。これに対し、PAI-1:Ag 放出は、1 μM 以上のカドミウムによって濃度依存的に有意に増加していた。この結果は、カドミウムが血管内皮細胞からの PAI-1:Ag 放出を選択的に増加させることを示している。次に、t-PA:Ag および PAI-1:Ag 放出に対するカドミウムの作用の経時的变化を調べた。Fig. I-2 に示すように、カドミウムは PAI-1:Ag 放出を 24 時間において有意に促進していた。しかしながら、t-PA:Ag 放出については 24 時間においても有意な変化は認められなかった。

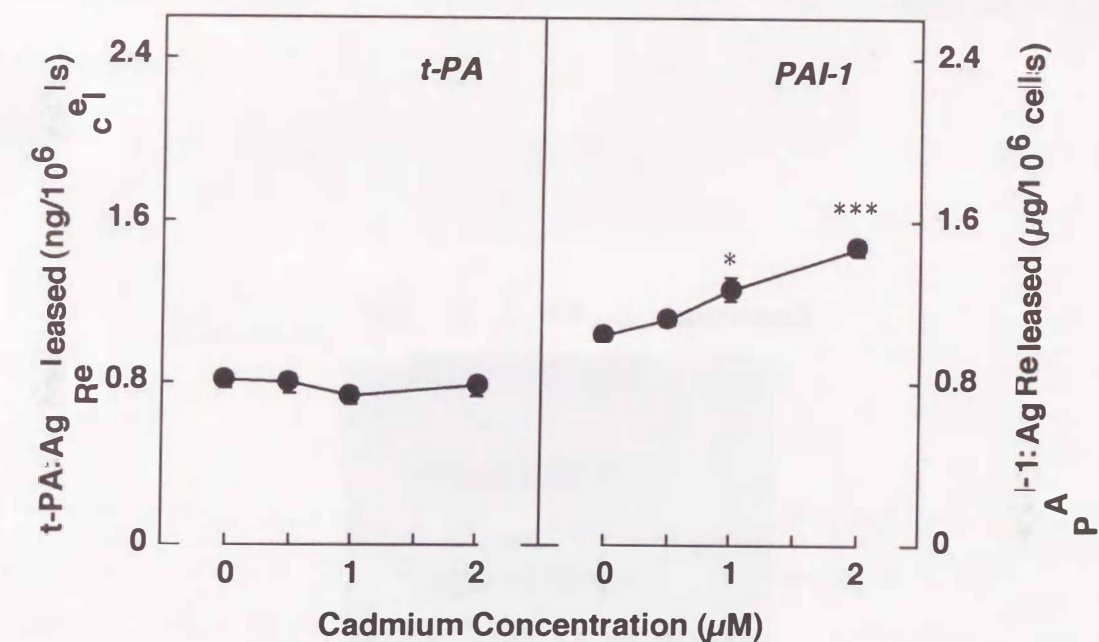


Fig. I-1. Effect of cadmium on the release of t-PA:Ag and PAI-1:Ag from cultured vascular endothelial cells. Confluent cultures of endothelial cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence or absence of cadmium chloride (0.5, 1 or 2 μM). Values are means \pm S.E. of six samples. Significantly different from the corresponding control, * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$.

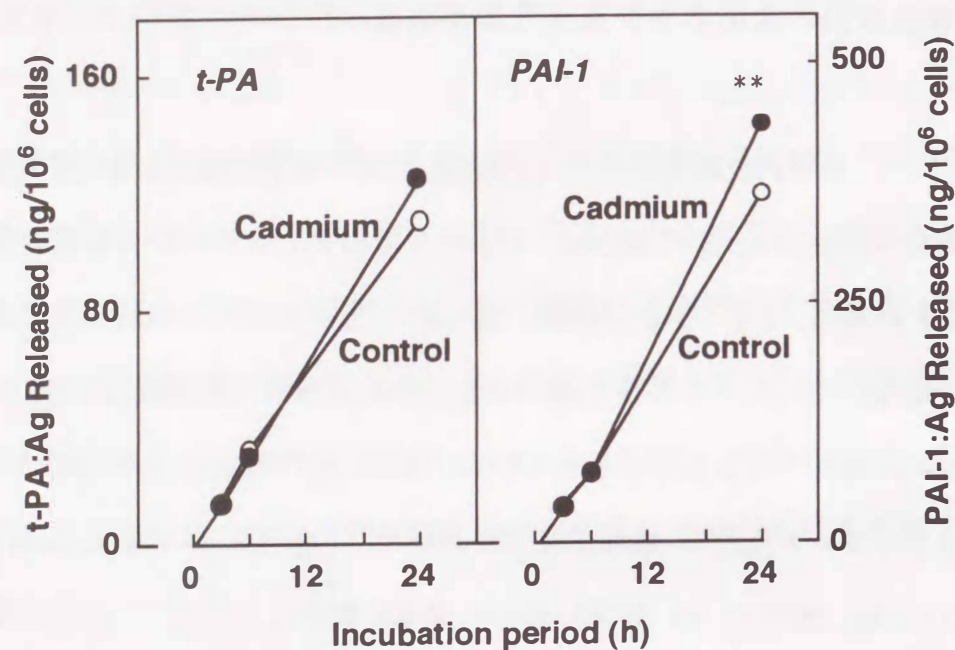


Fig. I-2. Effect of cadmium on the release of t-PA:Ag and PAI-1:Ag from cultured vascular endothelial cells. Confluent cultures of endothelial cells were incubated at 37°C for 3, 6 or 24 h in the presence or absence of cadmium chloride (1 μ M). Values are means \pm S.E. of six samples. O, control; \bullet , cadmium treatment. Significantly different from the corresponding control, ** $P < 0.01$.

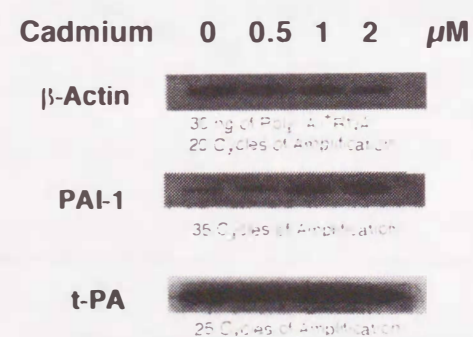


Fig. I-3. PAI-1 and t-PA gene expression in vascular endothelial cells after exposure to cadmium. Confluent cultures of endothelial cells were incubated 37°C for 24 h in the presence or absence of cadmium chloride (0.5, 1 or 2 μ M). Thirty nanograms of poly (A⁺) RNAs from confluent cultures of endothelial cells were amplified by RT-PCR. The PCR amplification was performed for 35 cycles (PAI-1) or 25 cycles (t-PA).

カドミウムが PAI-1:Ag の放出を促進することが認められたので、次に、カドミウムに曝露した血管内皮細胞の PAI-1 遺伝子の発現を RT-PCR で調べた。Fig. I-3 に示すように、PAI-1 mRNA レベルはカドミウムの濃度依存的に増加していた。2 μ M カドミウム処理では対照と比べて約 12 倍の増加が認められた。これに対し、t-PA mRNA レベルはカドミウムによる影響を受けなかった。従って、カドミウムが血管内皮細胞の PAI-1 産生を転写レベルで選択的に増加させる結果、その放出を促進したことが明らかになった。カドミウムによる PAI-1 放出の選択的な促進が液相中の線溶活性に及ぼす影響をカドミウム処理血管内皮細胞のコンディションドメディウムのフィブリンザイモグラフィーによって検討した。Fig. I-4 に示すように、コンディションドメディウムには t-PA および u-PA の活性が認められ、カドミウムの濃度に依存してともに低下しているのが観察された。すなわち、血管内皮細胞において、カドミウムが選択的に PAI-1 産生を促進する結果、液相中の線溶活性が低下することが示された。

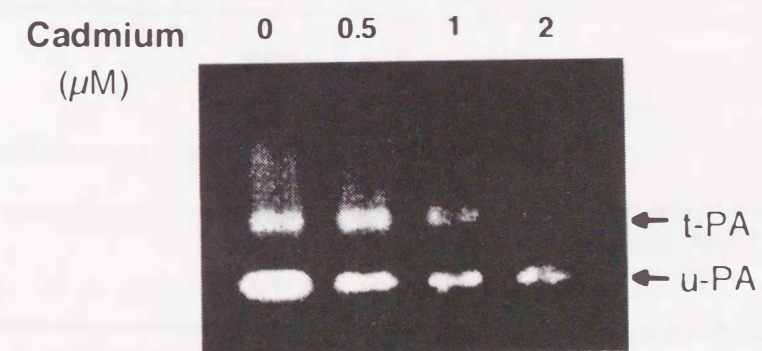


Fig. I-4. Fibrin zymography of the conditioned medium of cultured vascular endothelial cells. Confluent cultures of endothelial cells were incubated 37°C for 24 h in the presence or absence of cadmium chloride (0.5, 1 or 2 μ M).

第2節 カドミウムの作用の特異性

カドミウムによる血管内皮細胞から PAI-1:Ag 放出促進作用が明らかになったが、この促進が重金属に一般的な作用である可能性が考えられる。そこで、鉛、銅、ニッケルおよび亜鉛に曝露した血管内皮細胞からの PAI-1:Ag 放出を検討し、カドミウムの作用と比較した。Table I-1 に示すように、カドミウムおよびニッケルに PAI-1:Ag 放出に対する促進作用が認められたが、カドミウムにおいてより強い促進が認められた。しかしながら、鉛、銅および亜鉛にはそのような促進作用は認められなかった。従って、カドミウムは血管内皮細胞において PAI-1:Ag の放出を選択的に増加させる重金属のひとつであり、重金属に一般的な作用ではないことが示された。

Table I-1
Effect of heavy metals on the release of PAI-1:Ag from cultured vascular endothelial cells

	PAI-1:Ag Released ($\mu\text{g}/10^6$ cells)
Control	1.291 \pm 0.025
Cadmium	1.735 \pm 0.002**
Lead	1.146 \pm 0.074
Copper	1.487 \pm 0.070
Nickel	1.650 \pm 0.111*
Zinc	1.324 \pm 0.039

Confluent cultures of endothelial cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence or absence of cadmium chloride, lead chloride, copper chloride, nickel chloride, and zinc sulfate at 1 μM each. Values are means \pm S.E. of four samples. Significantly different from the control, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

第3節 細胞内へのカドミウムの蓄積、細胞傷害および蛋白合成

Table I-2. に、血管内皮細胞内へのカドミウムの蓄積を示す。細胞内カドミウムの蓄積は、カドミウムの処理濃度に依存的に増加していた。

カドミウムによる血管内皮細胞からの PAI-1:Ag 放出促進作用が、カドミウムによる非特異的な細胞毒性への応答、あるいは蛋白合成の非特異的な促進による可能性が考えられるので、カドミウムに曝露した血管内皮細胞からの LDH の逸脱および細胞層酸不溶性画分への ^3H ロイシンの取り込みをそれぞれ非特異的な細胞傷害および全体的な蛋白合成の指標として調べた。Table I-3 に示すように、カドミウムは死細胞から逸脱するとされる LDH の逸脱にも ^3H ロイシンの取り込みにも有意な影響を及ぼさず、形態学的にも変化が無かったので、カドミウムの PAI-1:Ag 放出促進作用が細胞傷害によるものでも、非特異的な蛋白合成の刺激によるものでもないことが示された。

Fig. I-5 に、カドミウムに曝露した血管内皮細胞におけるメタロチオネインの蓄積を示す。メタロチオネインは重金属の毒性を軽減することが知られている低分子量蛋白である (Probst et al., 1977) が、血管内皮細胞においてもメタロチオネインは

Table I-2
Accumulation of cadmium in cultured vascular endothelial cells

	Cadmium Accumulation ($\text{pmol}/\mu\text{g DNA}$)
Control	N.D.
0.5 μM Cadmium	148.9 \pm 5.2
1 μM Cadmium	167.3 \pm 4.0
2 μM Cadmium	178.5 \pm 8.2

Confluent cultures of endothelial cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence or absence of cadmium chloride (0.5, 1, 2 or 5 μM). Values are means \pm S.E. of five samples.

カドミウムによって濃度依存的に誘導されており, PAI-1:Ag 放出が促進される条件下でもカドミウムに対する防御応答が行われ, 細胞内にカドミウムが蓄積しても細胞毒性が発現されないことが示唆された。

Table I-3
The leakage of lactate dehydrogenase (LDH) and the incorporation of [³H]leucine into the acid-insoluble fraction in cultured vascular endothelial cells treated with or without cadmium

	LDH leakage (IU/L)	[³ H]Leucine incorporation (dpm/ μ g DNA)
Control	2.546 \pm 0.096	2344 \pm 77
0.5 μ M Cadmium	2.206 \pm 0.138	2477 \pm 56
1 μ M Cadmium	2.058 \pm 0.173	2635 \pm 17
2 μ M Cadmium	2.173 \pm 0.117	2583 \pm 106

Confluent cultures of endothelial cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence or absence of cadmium chloride (0.5, 1 or 2 μ M) and labeled with or without [³H]leucine during the last 3 h of the incubation. Values are means \pm S.E. of five samples.

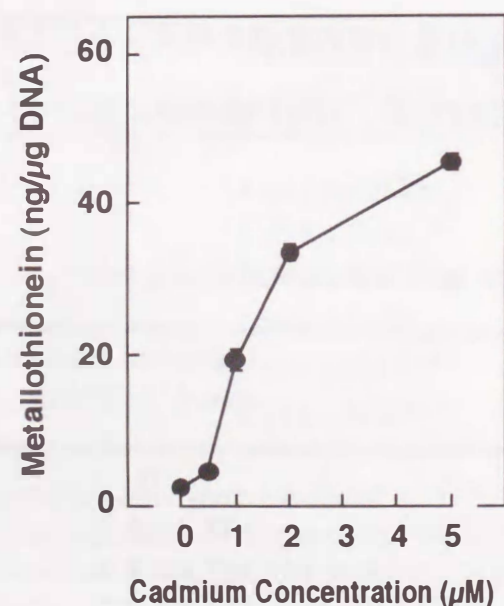


Fig. I-5. Accumulation of metallothionein in cultured vascular endothelial cells. Confluent cultures of endothelial cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence or absence of cadmium chloride (0.5, 1 or 2 μ M). Values are means \pm S.E. of five samples.

第4節 自己分泌型増殖因子の関与の可能性

ところで, 血管内皮細胞は自己分泌型機能調節因子の産生能を有している。塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) は血管内皮細胞が産生している代表的な自己分泌型機能調節因子であるが, その分子中にはシグナル配列が存在せず, 重篤に傷害された内皮細胞あるいは死細胞から逸脱し, その活性を発現すると考えられている (Gajdusek and Carbon, 1989; Rifkin and Moscatelli, 1989)。カドミウムの PAI-1:Ag 放出促進作用がカドミウムによって傷害された血管内皮細胞から逸脱した bFGF による二次的な作用である可能性が考えられる。しかしながら, bFGF による線溶蛋白の産生・放出への影響は不明であった。

また, 形質転換増殖因子 β (TGF β) は血管内皮細胞からの PAI-1 放出を選択的に促進することが知られているサイトカインであり, 血管内皮細胞は TGF β の産生能も有している (Keski-Oja, 1988; Schleef et al., 1988)。カドミウムの作用が TGF β を介し二次的に PAI-1 放出を促進させた可能性も考えられる。

さらに, エンドセリン-1 は, 血管内皮細胞において細胞内カルシウム依存性の経路を介してその産生・放出が刺激されることが知られている血管収縮ペプチドである。カドミウムは細胞内においてカルシウムアナログとして働き得ることが知られている (Habermann, 1983) ので, カドミウムがカルシウム依存性の経路を刺激し, エンドセリン-1 の産生・放出を増加させた結果, 二次的に PAI-1 放出が促進された可能性も考えられる。しかしながら, エンドセリンによる線溶蛋白の産生・放出への影響も不明であった。

そこで, カドミウムによる血管内皮細胞からの PAI-1:Ag 放出促進作用が血管内皮細胞が産生する bFGF, TGF β およびエンドセリンを介した二次的な作用である可能性について検討した。

まず、血管内皮細胞からの線溶蛋白放出に対する bFGF の作用を検討した。Fig. I-6 に示すように 1 ng/ml 以上の bFGF は血管内皮細胞からの PAI-1 放出を濃度依存的に有意に抑制していた。t-PA 放出も bFGF によって有意に抑制されていた。線溶蛋白の放出に対する bFGF のこのような作用様式は、PAI-1 放出を選択的に促進させたカドミウムの作用様式とはまったく異なっており、カドミウムの作用が bFGF を介したものではないことが示唆された。

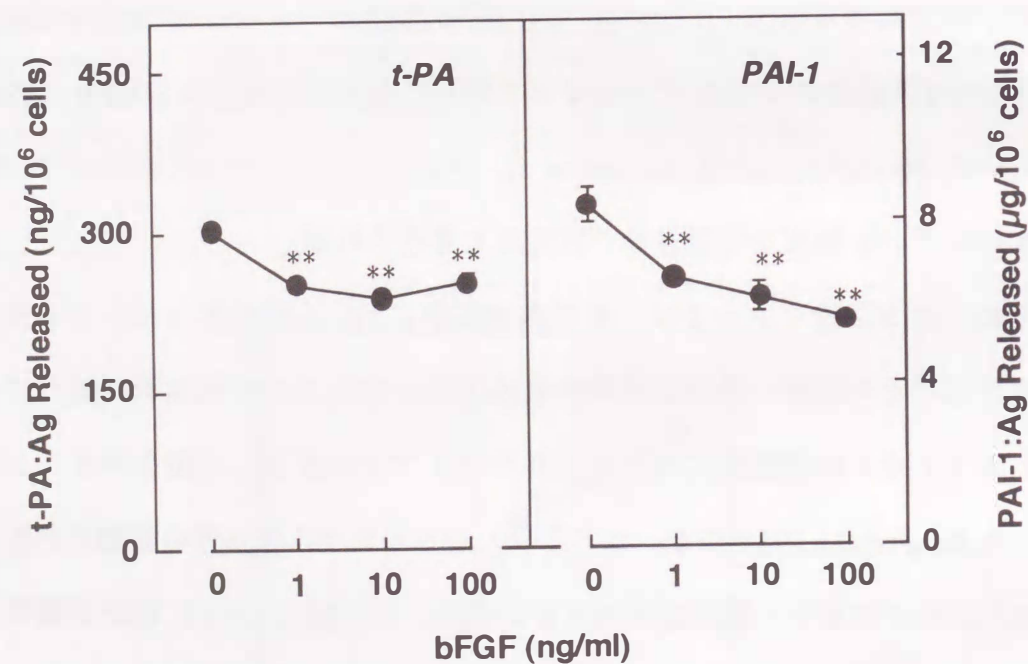


Fig. I-6. Effect of bFGF on the release of t-PA:Ag and PAI-1:Ag from cultured vascular endothelial cells. Confluent cultures of endothelial cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence or absence of bFGF (1, 10 or 100 ng/ml). Values are means \pm S.E. of six samples. Significantly different from the corresponding control, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

次に、エンドセリンについても同様の検討を行ったところ、Fig. I-6 に示すように 1 nM 以上のエンドセリン-1 は血管内皮細胞からの t-PA 放出を濃度依存的に有意に抑制していた。これに対し PAI-1 放出はエンドセリン-1 による影響を受けなかった。線溶蛋白の放出に対するエンドセリン-1 のこのような作用様式も、カドミウムの作用様式とはまったく異なっていた。従って、カドミウムの PAI-1 放出促進作用がエンドセリン-1 を介したものではないことも示唆された。

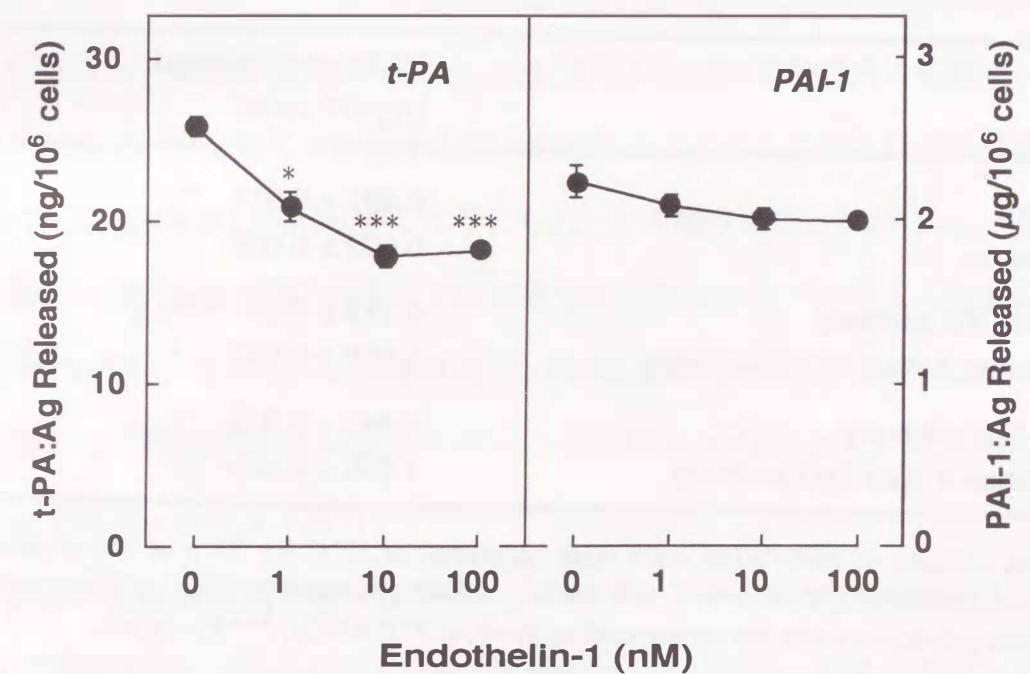


Fig. I-7. Effect of endothelin-1 on the release of t-PA:Ag and PAI-1:Ag from cultured vascular endothelial cells. Confluent cultures of endothelial cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence or absence of bFGF (1, 10 or 100 nM). Values are means \pm S.E. of six samples. Significantly different from the corresponding control, * $P < 0.05$; *** $P < 0.01$.

次に、カドミウムの PAI-1 放出促進作用が TGFβ を介した二次的な作用である可能性を、抗 TGFβ 抗体の存在下におけるカドミウムの作用を調べることによって検討した。Table I-4 に示すように、カドミウムによる PAI-1:Ag 放出促進作用は、抗 TGFβ 抗体の存在下においても認められた。従って、カドミウムの PAI-1:Ag 放出促進作用が TGFβ を介したものではないことも示唆された。

Table I-4
Effect of anti-TGFβ antibody on cadmium-induced stimulation of PAI-1:Ag release from vascular endothelial cells.

	PAI-1:Ag Released (μg/10 ⁶ cells)	
Control	0.491 ± 0.018]**
Cadmium	0.622 ± 0.028	
Anti-TGFβ antibody	0.729 ± 0.031]**
Cadmium + Anti-TGFβ antibody	1.069 ± 0.036	
Anti-IgG antibody	0.841 ± 0.023]**
Cadmium + Anti-IgG antibody	1.106 ± 0.065	

Confluent cultures of endothelial cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence or absence of cadmium chloride at 2 μM each. Values are means ± S.E. of four samples. Significantly different from the corresponding control, **P < 0.01; ***P < 0.001.

第5節 考察

血管内皮細胞の機能障害が動脈硬化病変の引き金になっているように、内皮細胞を傷害する因子は血管病変の誘発因子になり得る (Ross, 1993)。カドミウムは血管病変を引き起こす因子であることが報告されてきた重金属である (Revis et al., 1981; Schroeder, 1964; Schroeder, 1965; Evans and Weingarten, 1990; Niwa and Suzuki, 1982) が、本章においてカドミウムが PAI-1 の産生・放出を選択的に促進する結果、液相の線溶活性を低下させる因子であることが示された。この結果は、カドミウムが誘発する動脈硬化病変などの血管病変はこの重金属が血管内皮細胞に対し直接作用して線溶活性を低下させることが引き金になることを示唆するものであった。すなわち、動脈硬化病変においては血管内および血管組織内の凝固が一般的に観察されるが、内皮細胞が介在する線溶活性のカドミウムによる低下は動脈硬化病変における凝固促進性に反映すると考えられ、その機序のひとつが PAI-1 産生の転写段階での選択的な刺激であることが示された。なお、カドミウムと血液凝固系の関係については、カドミウムが組織因子 (血液凝固第III因子) を直接的にしかも顕著に活性化し、外因系血液凝固カスケードを作動させ得ることが報告されている (Corson and Konigsberg, 1980)。

血管内皮細胞層酸不溶性画分への [³H]ロイシンの取り込みおよび培地中への LDH の逸脱がカドミウムによって変化しなかったことから、PAI-1 産生・放出の促進がカドミウムによる非特異的な蛋白合成の変化や細胞毒性への応答ではないことが示された。カドミウムが別の蛋白を誘導し、その蛋白が二次的に PAI-1 放出のみを促進した可能性があり、その候補として PAI-1 産生のみを促進することが報告されている TGFβ (Schleef et al., 1988) および IL-1β (Schleef et al., 1988; Saksela et al., 1987; Sawdey et al., 1989) が考えられるが、抗 TGFβ 抗体存在下でもカドミウムの

作用が認められたことからカドミウムの作用が TGF β を介したとは考えられず、また血管内皮細胞は IL-1 β の産生能がないことからカドミウムの作用が IL-1 β を介したとも考えられない。また、bFGF およびエンドセリン-1 は血管内皮細胞が産生している自己分泌型機能調節因子であるが、これらの線溶蛋白放出への作用様式はカドミウムの作用様式とはまったく異なっていたことから、これらの因子の二次的な関与もないことが示された。

一方、血管内皮細胞の PAI-1 産生はプロテインキナーゼCの活性化で促進される (Kooistra et al., 1991), 細胞内 cyclic AMP の増加によって抑制される (Francis and Neely, 1989)。従って、カドミウムによる PAI-1 産生の促進は、プロテインキナーゼCの活性化あるいは細胞内 cyclic AMP 量の減少に起因する可能性が考えられる。しかしながら、トロンビン (Erickson et al., 1985) やホルボールエステル (Kooistra et al., 1991; Grulich-Henn and Müller-Burghaus, 1990) などのプロテインキナーゼCを活性化するのは血管内皮細胞からの t-PA および PAI-1 放出をともに促進し、一方コレラトキシン、フォルスコリン、IBMX およびプロスタグランジンE₁ などの細胞内 cyclic AMP レベルを増加させるものは t-PA および PAI-1 の放出をともに抑制する (Francis and Neely, 1989)。ヒスタミンは t-PA 放出を促進するが PAI-1 放出には影響を与えず (Hanss and Collen, 1987), t-PA および PAI-1 の放出は必ずしも共役しないことが示されているがその機序は不明である。血管内皮細胞内にはカドミウムが蓄積していたが、その70~80%は可溶性画分においてメタロチオネインと結合して毒性発現に関与していないことが分かっている (Kaji et al., 1992a)。従って、細胞内に蓄積したカドミウムの20~30%の毒性発現型が、PAI-1 の産生・放出を選択的に刺激する細胞内情報伝達経路に対して毒性を発現したと推察されるがその経路は現在未解明であり、カドミウムの PAI-1 産生に対する毒性発現機構の解明は今後の課題である。

以上をまとめると、カドミウムが血管内皮細胞の PAI-1 の産生・放出を選択的に促進する結果、液相中の線溶活性を低下することが示された。すなわち、カドミウムが血管内皮細胞表層において血液を抗線溶に傾けることが示唆された。このようなカドミウムの作用は、自己分泌型機能調節因子による二次的な作用であるというよりも細胞内に蓄積した毒性発現型のカドミウムが PAI-1 産生を選択的に促進する細胞内情報伝達経路を刺激した可能性が高いと推察された。カドミウムは単に直接的に血液凝固を促進するだけでなく、血管内皮細胞が調節する線溶活性を低下させることを通じて血液の凝固促進性を強めることが推察された。このようなカドミウムの作用は、カドミウムによって誘発される血管病変における凝固促進性の理解に重要であると考えられた。

第II章 血管内皮細胞の線溶調節に対する鉛の毒性発現

鉛は、カドミウムと同様に動脈硬化および高血圧を引き起こすことが知られているが、細胞レベルでの毒性発現機序が不明であった重金属である (Revis et al., 1981; Perry et al., 1988; Chai and Webb, 1988; Lal et al., 1991)。細胞培養系を用いた研究では、鉛が血管内皮細胞に対して、細胞毒性を発現せずに血管内皮細胞へヘパラン硫酸の産生を抑制すること (Kaji et al., 1991) およびその産生の抑制がコア蛋白あたりのヘパラン硫酸の糖鎖数の減少に起因すること (Kaji et al., 1997) が示されてきた。さらに、血管内皮細胞の増殖が鉛によって抑制される (Kaji et al., 1995a) のに対し、血管平滑筋細胞の増殖は刺激される (Fujiwara et al., 1995) ことも明らかにされている。これらの結果は、鉛が血管内皮細胞を含む血管構成細胞の機能異常を通じて、血管病変を誘発させることを示唆するとともに、その毒性発現様式がカドミウムの様式とは異なることを示すものであった。

前章において、カドミウムが血管内皮細胞からの PAI-1 放出を選択的に促進する結果、液相中の線溶活性を低下させることが明らかとなった。そこで、カドミウムと同様に血管病変を誘発する鉛についても、線溶蛋白の放出に対する作用を明らかにすることが必要である。

そこで本章では、培養血管内皮細胞を用いて t-PA および PAI-1 の放出に対する鉛の作用を調べ、その結果生じる液相の線溶活性の変化についても検討を加えるとともに、血管内皮細胞の線溶蛋白の放出を指標としたときの鉛の毒性発現様式をカドミウムの作用様式と比較した。

第1節 線溶蛋白の放出および液相の線溶活性

Fig. II-1 に、血管内皮細胞からの t-PA:Ag および PAI-1:Ag 放出に対する鉛の作用を示す。t-PA:Ag については、2 μM 以上の鉛による有意な放出の抑制が認められた。これに対し、PAI-1:Ag 放出については、10 μM までの鉛による有意な変化は認められなかった。この結果は、血管内皮細胞において鉛が t-PA:Ag 放出を選択的に抑制することを示していた。

血管内皮細胞の培養上清中の線溶活性をフィブリンザイモグラフィで調べたところ、Fig. II-2 に示すように、t-PA および u-PA の活性が認められたが、鉛による u-PA 活性の変化は認められなかった。これに対し、t-PA 活性は5 μM の鉛によって低下していた。

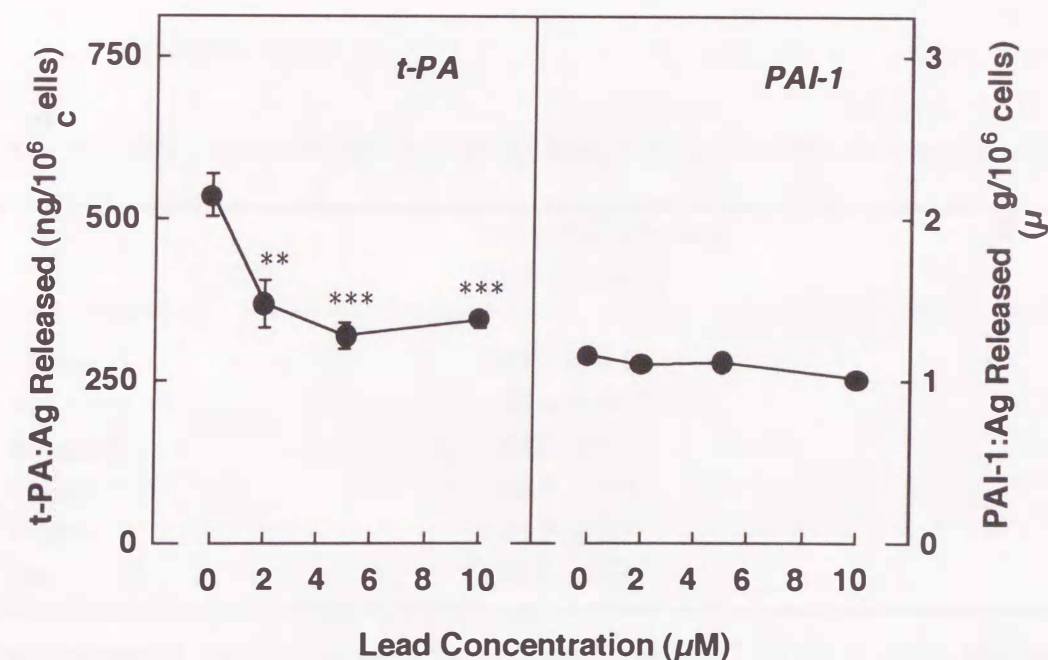


Fig. II-1. Effect of lead on the release of t-PA:Ag and PAI-1:Ag from cultured vascular endothelial cells. Confluent cultures of endothelial cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence or absence of lead chloride (2, 5 or 10 μM). Values are means \pm S.E. of six samples. Significantly different from the corresponding control, ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

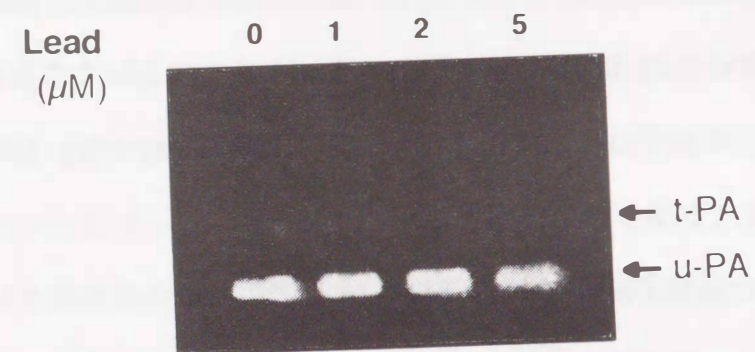


Fig. II-2. Fibrin zymography of the conditioned medium of cultured vascular endothelial cells. Confluent cultures of endothelial cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence or absence of lead chloride (1, 2 or 5 μM).

第2節 鉛の作用の特異性

鉛が血管内皮細胞からの t-PA 放出を抑制することが明らかになったので、鉛の作用の特異性を検討した。Table II-1 に示すように、鉛、カドミウム、銅、ニッケルおよび亜鉛に曝露した血管内皮細胞からの t-PA:Ag 放出を調べたところ、鉛に有意な放出の抑制が認められた。ニッケルに t-PA:Ag 放出を低下させる傾向が認められたが有意ではなく、その他の重金属には t-PA:Ag 放出抑制作用は認められなかった。すなわち、鉛は血管内皮細胞において t-PA:Ag の放出を選択的に促進する特有の重金属であることが示された。

Table II-1

Effect of heavy metals on the release of t-PA:Ag from cultured vascular endothelial cells

	t-PA:Ag Released (ng/10 ⁶ cells)
Control	144.4 ± 4.5
Lead	128.4 ± 4.0*
Cadmium	149.8 ± 8.7
Copper	134.7 ± 0.5
Nickel	126.5 ± 7.3
Zinc	134.3 ± 5.2

Confluent cultures of endothelial cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence or absence of lead chloride, cadmium chloride, copper chloride, nickel chloride, and zinc sulfate at 1 μM each. Values are means ± S.E. of four samples. Significantly different from the control, * $P < 0.05$.

第3節 生理的因子による線溶調節に対する鉛の作用

鉛が血管内皮細胞からの t-PA:Ag 放出を抑制することが示されたが、これが生理的因子が介在する線溶調節に影響をおよぼす可能性が考えられる。そこで、t-PA 放出を促進することが報告されているトロンビン (Levin et al., 1984) と、前章において t-PA 放出を抑制することが明らかになったエンドセリン-1 (Kaji et al., 1992b) 存在下における鉛の作用について調べた。

Fig. II-2 に、トロンビン存在下における鉛の作用を示す。血管内皮細胞からの t-PA:Ag 放出はトロンビンによって有意に促進された。これに対し、鉛はトロンビン存在下においても t-PA:Ag 放出を有意に抑制し、トロンビンによる刺激は減弱された。

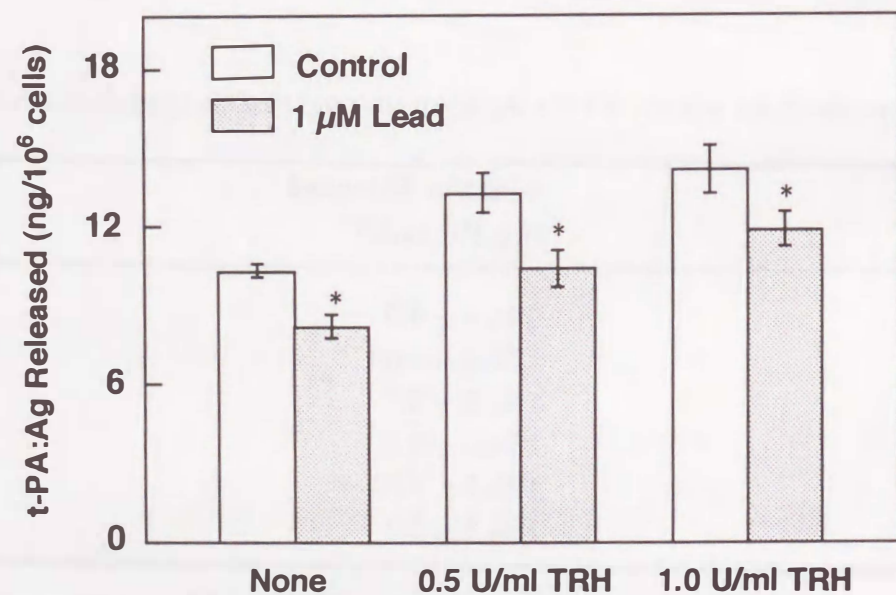


Fig. II-3. Effect of lead on the thrombin-induced increase in the release of t-PA:Ag from cultured vascular endothelial cells. Confluent cultures of endothelial cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence or absence of lead (1 μM) combined with or without thrombin (0.5 or 1.0 NIH units/ml). Values are means ± S.E. of four samples. Significantly different from the corresponding control, **P* < 0.05. THR, thrombin.

次に、エンドセリン-1 存在下における鉛の作用を検討したところ、Fig. II-3 に示すように、鉛の t-PA:Ag 放出抑制作用はエンドセリン-1 存在下でも認められた。すなわち、エンドセリン-1 による血管内皮細胞の t-PA:Ag 放出の抑制が、鉛によって強められることが示された。

これらの結果から、生理的因子であるトロンビンおよびエンドセリン-1 による t-PA 放出が、鉛によって抑制的な修飾を受けることが示唆された。

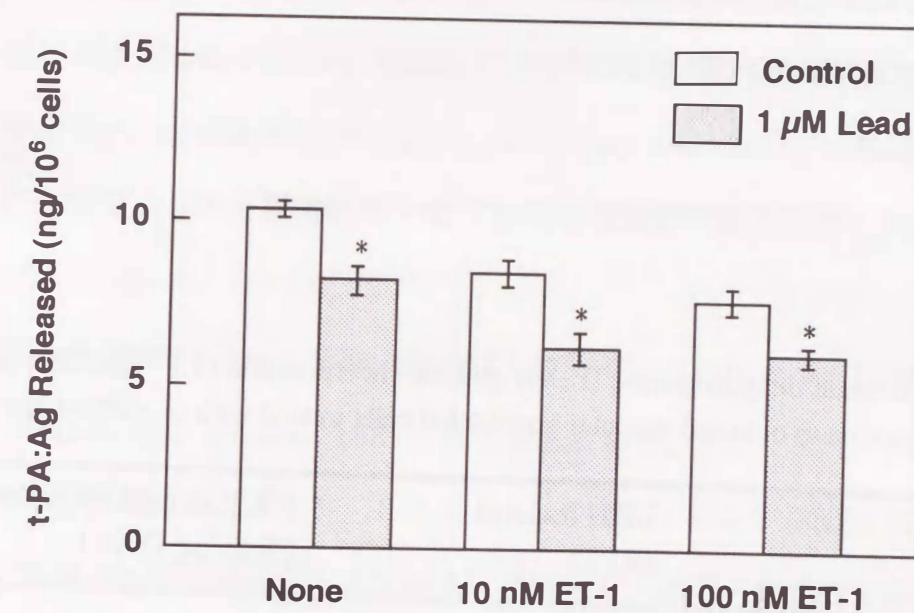


Fig. II-4. Effect of lead on the endothelin-1-induced increase in the release of t-PA:Ag from cultured vascular endothelial cells. Confluent cultures of endothelial cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence or absence of lead (1 μM) combined with or without endothelin-1 (10 or 100 nM). Values are means ± S.E. of four samples. Significantly different from the corresponding control, **P* < 0.05. ET-1, endothelin-1.

第4節 細胞傷害および蛋白合成

血管内皮細胞からの t-PA:Ag 放出が鉛によって抑制されることが示されたが、鉛の作用が、鉛による非特異的な細胞傷害あるいは非特異的な蛋白合成の阻害による可能性が考えられる。そこで、鉛処理した血管内皮細胞から逸脱した LDH の活性および細胞層酸不溶性画分への¹⁴Cロイシンの取り込みを調べたが、Table II-3 に示すように、培地中への LDH の逸脱の増加も、¹⁴Cロイシンの取り込みも5 μM 以下の鉛によって有意に変化しなかった。従って、血管内皮細胞からの t-PA:Ag 放出に対する鉛の抑制作用は、鉛による細胞傷害によるものでも非特異的な蛋白合成の阻害によるものでもないことが示された。

Table II-3

The leakage of lactate dehydrogenase (LDH) and the incorporation of [¹⁴C]leucine into the acid-insoluble fraction in cultured vascular endothelial cells treated with or without lead

	LDH leakage (IU/L)	[¹⁴ C]Leucine incorporation (dpm/μg DNA)
Control	8.838 ± 0.165	1886 ± 94
1 μM Lead	6.484 ± 0.306	1818 ± 155
2 μM Lead	5.892 ± 0.733	1975 ± 138
5 μM Lead	9.375 ± 0.124	1864 ± 107

Confluent cultures of endothelial cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence or absence of lead chloridat (1, 2 or 5 μM) and labeled with or without [¹⁴C]leucine during the last 3 h of the incubation. Values are means ± S.E. of five samples.

第5節 考察

動脈硬化、高血圧および血栓症は相互に強く関係している。血管内皮細胞は血管収縮 (Yanagisawa, 1988) および血液凝固・線溶系の調節によってそれら血管病変の防御に関与していると考えられている。本章において、鉛が血管内皮細胞からの t-PA 放出を選択的に抑制し、その結果液相中の線溶活性を低下させることが示された。この結果から、鉛が誘発する血管病変が抗線溶に起因する凝固促進性の増強が含まれることを示唆された。すなわち、鉛は、内皮細胞増殖の阻害 (Kaji et al., 1995) とその結果としての傷害内皮の修復阻害 (Fujiwara et al., 1997) や血管平滑筋細胞増殖の刺激 (Fujiwara et al., 1995) だけでなく、血管内皮細胞層のヘパラン硫酸プロテオグリカンの代謝異常 (Kaji et al., 1991; Kaji et al., 1997) に起因する凝固促進性および本章で示された線溶活性の低下を通じて血管病変の発症と進展に寄与し得ることが示唆された。

血管内皮細胞の t-PA の産生・放出はトロンビン (Levin et al., 1988) およびヒスタミン (Hanss and Collen, 1987) に刺激されるが、エンドセリン (Kaji et al., 1992b), TGFβ (Saksela, 1987), IL-1β (Schleef, 1988) および TNFα (Schleef, 1988) によって抑制されることが知られている。すなわち、血管内皮細胞は自発的に t-PA を産生・放出するだけでなく、血管の生理的あるいは病理的状态に応じて生理的因子に应答して t-PA の産生・放出を調節し、血管組織の恒常性維持に寄与するものとされている。本章において、トロンビンおよびエンドセリン-1 による t-PA 放出の調節を鉛が抑制的に修飾することが示された。この結果から、鉛が自発的な t-PA 放出を抑制するだけでなく、生理的因子による t-PA 放出の促進的調節に対しては阻害的に作用し、抑制的調節に対しては過剰な抑制を誘発し、線溶系の正常な調節を妨げることが示唆された。

血管内皮細胞 t-PA の産生・放出を介する細胞内情報伝達経路については、プロテインキナーゼCの活性化 (Grulich-Henn and Müller-Berghaus, 1990) による刺激と細胞内 cyclic AMP の増加 (Francis and Neely, 1989) および細胞内カルシウムの増加 (Kaji et al., 1992b) による抑制が知られている。従って、鉛による t-PA 放出の減少は (i) プロテインキナーゼCの阻害, (ii) 細胞内 cyclic AMP 量の増加, (iii) 細胞内カルシウムの増加の可能性が考えられる。鉛処理血管内皮細胞における $[^{14}\text{C}]$ ロイシンの取り込みおよび LDH の培地中への逸脱を調べたが変化はなく、鉛の作用が細胞傷害および非特異的蛋白合成の変化による可能性は排除できる。鉛は細胞内カルシウムを増加させるだけでなく (Goldstein, 1977) 細胞内でカルシウムアナログとして作用し得る (Goldstein and Ar. 1983)。しかしながら、エンドセリンは細胞内カルシウム量を増加させ (Takuwa, 1990; Yokoyama, 1991) その結果 t-PA の産生・放出を抑制する (Kaji et al., 1992b) にもかかわらず、エンドセリン-1 存在下でも鉛による t-PA 放出の抑制が認められたことから、鉛の作用が細胞内カルシウム依存性の経路を介しているとは考えにくい。予備的な実験において、鉛はアデニレートシクラーゼ活性化剤フォルスコリンの存在下においても t-PA:Ag 放出を抑制したが、ホスホジエステラーゼ阻害剤 IBMX および 8-Bromo cyclic AMP の存在下では鉛の作用は消失し、鉛がホスホジエステラーゼを阻害することによって細胞内 cyclic AMP を増加させ、t-PA の産生・放出を抑制した可能性が示唆されている。しかしながら、鉛による血管内皮細胞の t-PA 産生・放出の抑制機序についての詳細は不明である。

以上の結果から、鉛が血管内皮細胞の t-PA 放出を非特異的な蛋白合成の変化および細胞毒性の発現を伴うことなく抑制することが示された。前章において示されたようにカドミウムは血管内皮細胞からの PAI-1 放出を選択的に促進することによって液相の線溶活性を低下させるのに対し、本章において鉛は t-PA 放出を選択的に抑制することによって液相の線溶活性を低下させることが示唆された。すなわち、血

管内皮細胞の線溶調節において、カドミウムは PAI-1 の産生・放出に毒性を発現するのに対し、鉛は t-PA の産生放出に対して毒性を発現することが明らかとなった。これらの結果は、カドミウムと鉛が血管内皮細胞の線溶調節に対して異なる作用様式で共に線溶活性を低下させる重金属であることを示していた。鉛による血管内皮細胞表層の線溶活性の低下は、血管内の血液を凝固促進性に傾け、動脈硬化を含む血管病変の発症と進展に寄与するものと推察された。

第Ⅲ章 血管平滑筋細胞および線維芽細胞の線溶調節に対するカドミウムおよび鉛の毒性発現

血管は、内腔を一層に覆う血管内皮細胞、中膜の血管平滑筋細胞および外膜の線維芽細胞から構成されている。血管内皮細胞が血液と直接接する唯一の細胞であり血液凝固・線溶系の調節を通じて血管内凝固を防ぐことを最も重要な役割としているのに対し、血管平滑筋細胞および線維芽細胞の主な役割はそれぞれ血管のトーン調節および血管組織構造の維持であるとされる。

しかしながら、ひとたび内皮細胞層が重篤に傷害を受けた場合および血管が破綻した場合、血管平滑筋細胞および線維芽細胞は血液と接することになり、このとき凝固・線溶系の調節に関与すると考えられる。すなわち、血管平滑筋細胞および線維芽細胞が産生するデルマタン硫酸プロテオグリカンは、血液中に存在するトロンビンインヒビターのひとつであるヘパリンコファクターIIとトロンビンの不活性型複合体の形成を促進する (McGuire and Tollefsen, 1987)。血管平滑筋細胞および線維芽細胞は、血小板凝集に対して阻害活性を有するプロスタサイクリンの産生能も有する (Coughlin et al., 1981; Ali and Barrett, 1980)。

ところで、血管平滑筋細胞は動脈硬化病変の進展にともない中膜へ遊走・増殖し内膜肥厚斑を形成するが、そのような場合には一般的に血栓が存在し、凝固促進性と動脈硬化病変との関連が示唆される。血管内皮細胞だけでなく、血管平滑筋細胞および線維芽細胞も t-PA および PAI-1 の産生能を有し (Herbert et al., 1994; Wojta et al., 1993; Hola et al., 1983)、生理的には血管内皮細胞層の傷害時および血管破綻時の線溶活性の調節に関与するものと考えられている。しかしながら、内皮下組織における線溶活性が低下したときフィブリン塊の除去が不十分となり、結果的に凝固促進性の所見を呈することが起こり得る。実際、動脈硬化病変を含む動脈

で PAI-1 遺伝子の発現が後進している例が報告されている (Schneiderman et al., 1992)。従って、動脈硬化病変の発症・進展に寄与し得るとされるカドミウムおよび鉛が、内皮下組織を構成する血管平滑筋細胞および線維芽細胞の線溶調節にどのような作用様式で毒性を発現するのかを明らかにする必要がある。

前章までの検討において、カドミウムは PAI-1 放出の選択的な促進を通じて、また鉛は t-PA 放出の選択的な抑制を通じて、ともに血管内皮表層の線溶活性を低下させることが明らかになった。本章の目的は、前章までの知見を基に、血管平滑筋細胞および線維芽細胞の線溶蛋白放出に対するカドミウムおよび鉛の作用を検討し、内皮下組織の線溶調節に対するカドミウムおよび鉛の毒性発現様式を明らかにすることである。さらに、その毒性発現様式を内皮細胞に対するものと比較することによってカドミウムおよび鉛の線溶調節に対する毒性発現の細胞種依存性を明らかにすることである。

第1節 血管平滑筋細胞の線溶蛋白放出に対するカドミウムの作用

Fig. III-1 に、血管平滑筋細胞からの t-PA:Ag および PAI-1:Ag 放出に対するカドミウムの作用を示す。t-PA:Ag および PAI-1:Ag 放出は、カドミウムの濃度に依存的にとも抑制されていた。そこで、カドミウム処理血管平滑筋細胞の液相の線溶活性をフィブリンゼイモグラフィで検討したところ、Fig. III-2 に示すように、カドミウム処理血管平滑筋細胞の培養上清中には u-PA 活性は検出されたが、t-PA 活性は検出されなかった。この u-PA 活性はカドミウムの濃度依存的に低下していた。

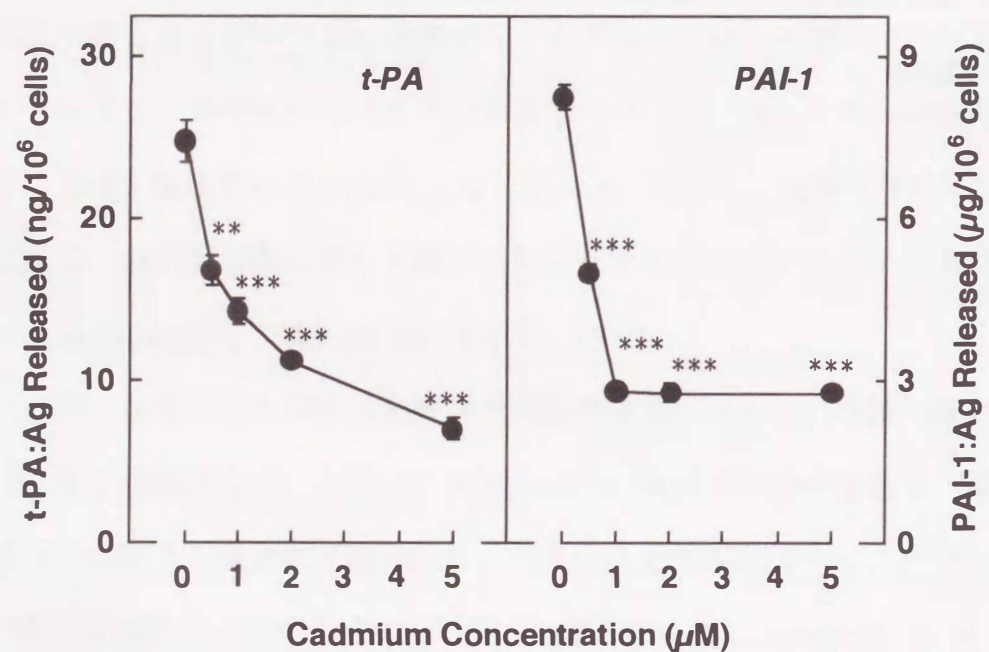


Fig. III-1. Effect of cadmium on the release of t-PA:Ag and PAI-1:Ag from cultured vascular smooth muscle cells. Confluent cultures of vascular smooth muscle cells were incubated 37°C for 24 h in the presence or absence of cadmium chloride (2, 5 or 10 μM). Values are means ± S.E. of six samples. Significantly different from the corresponding control, ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Table III-1 にカドミウムに曝露した血管平滑筋細胞から培地中へ逸脱した LDH の活性および細胞層酸不溶性画分への [³H] ロイシンの取り込みを示す。2 μM 以上のカドミウムによって LDH の逸脱の増加および [³H] ロイシンの取り込みの減少が認められた。しかしながら、t-PA:Ag および PAI-1:Ag 放出の抑制が認められた 0.5 および 1 μM のカドミウムによる LDH の逸脱増加および [³H] ロイシンの取り込みの減少は認められず、血管平滑筋細胞においてカドミウムが細胞毒性の発現や蛋白合成の抑制を伴わずに t-PA:Ag および PAI-1:Ag 放出を抑制し得ることが示唆された。

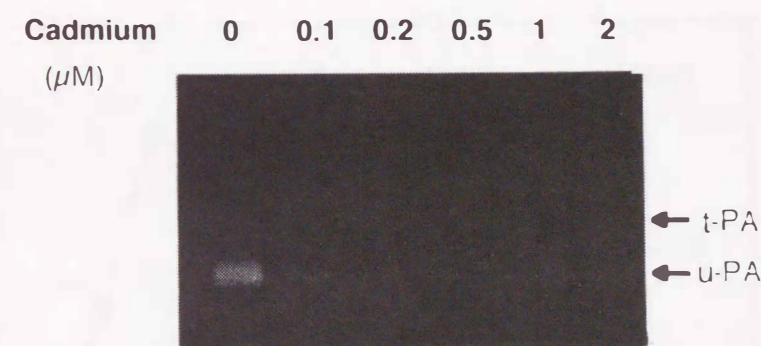


Fig. III-2. Fibrin zymography of the conditioned medium of cultured vascular smooth muscle cells. Confluent cultures of vascular smooth muscle cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence or absence of cadmium chloride (0.1, 0.2, 0.5, 1 or 2 μM).

Table III-1

The leakage of lactate dehydrogenase (LDH) and the incorporation of [³H]leucine into the acid-insoluble fraction in cultured vascular smooth muscle cells treated with or without cadmium

	LDH leakage (IU/L)	[³ H]Leucine incorporation (dpm/μg DNA)
Control	19.8 ± 1.9	9510 ± 424
0.5 μM Cadmium	16.5 ± 0.2	8607 ± 310
1 μM Cadmium	22.9 ± 0.8	10182 ± 369
2 μM Cadmium	38.8 ± 2.7**	1353 ± 107***
5 μM Cadmium	49.9 ± 1.9***	542 ± 18***

Confluent cultures of vascular smooth muscle cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence or absence of cadmium chloride (0.5, 1, 2 or 5 μM) and labeled with or without [³H]leucine during the last 3 h of the incubation. Values are means ± S.E. of five samples. Significantly different from the corresponding control, ***P* < 0.01; ****P* < 0.001.

第2節 線維芽細胞の線溶蛋白放出に対するカドミウムの作用

Fig. III-3 に、線維芽細胞の線溶蛋白の放出に対するカドミウムの作用を示す。線維芽細胞からの t-PA:Ag 放出は、1 μM 以上のカドミウムによって有意に増加していた。これに対し、PAI-1:Ag 放出は 5 μM 以下のカドミウムによる影響を受けなかった。カドミウム処理線維芽細胞の液相の線溶活性を調べたところ、Fig. III-4 に示すように、t-PA および u-PA の活性が認められ、ともにカドミウムの濃度に依存的に上昇していた。

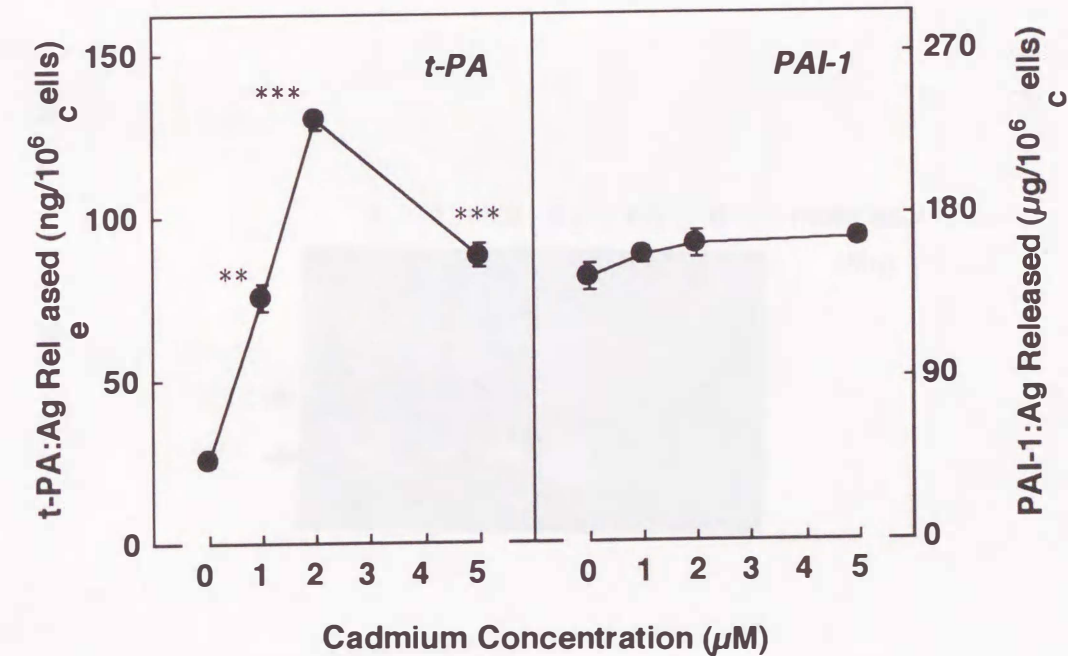


Fig. III-3. Effect of cadmium on the release of t-PA:Ag and PAI-1:Ag from cultured fibroblasts. Confluent cultures of fibroblasts were incubated at 37°C for 24 h in the presence or absence of cadmium chloride (1, 2 or 5 μM). Values are means ± S.E. of six samples. Significantly different from the corresponding control, ***P* < 0.01; ****P* < 0.001.

カドミウム処理線維芽細胞について、培地中への LDH の逸脱および細胞層酸不溶性画分への [³H] ロイシンの取り込みを調べたところ、Table III-2 に示すように、LDH の培地中への逸脱は 5 μM のカドミウムによって有意に増加していたが、 [³H]ロイシンの取り込みに有意な変化は認められなかった。従って、カドミウムによる t-PA:Ag 放出の促進が 2 μM で最大になったのは、5 μM のカドミウムが細胞毒性を発現したためと推察される。しかしながら、2 μM 以下のカドミウムは細胞毒性の発現および非特異的な蛋白合成の変化を伴わずに線維芽細胞からの t-PA:Ag 放出を選択的に促進し、その結果液相の線溶活性が上昇することが示唆された。

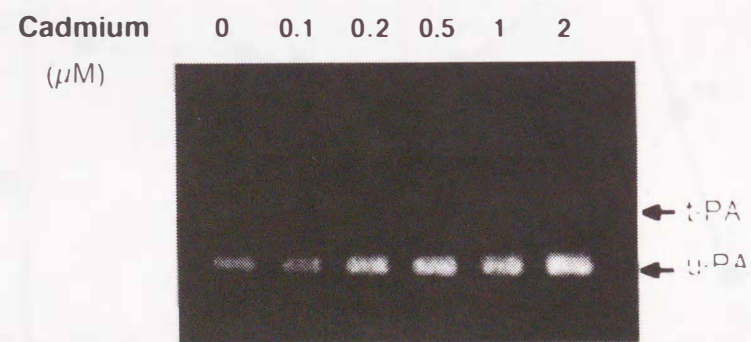


Fig. III-4. Fibrin zymography of the conditioned medium of cultured fibroblasts. Confluent cultures of fibroblasts were incubated at 37°C for 24 h in the presence or absence of cadmium chloride (0.1, 0.2, 0.5, 1 or 2 μM).

Table III-2

The leakage of lactate dehydrogenase (LDH) and the incorporation of [³H]leucine into the acid-insoluble fraction in cultured fibroblasts treated with or without cadmium

	LDH leakage (IU/L)	[³ H]Leucine incorporation (dpm/μg DNA)
Control	1.24 ± 0.02	5491 ± 373
0.5 μM Cadmium	1.20 ± 0.06	6711 ± 422
1 μM Cadmium	1.07 ± 0.06	5972 ± 150
2 μM Cadmium	1.34 ± 0.07	6198 ± 410
5 μM Cadmium	1.89 ± 0.03***	5205 ± 242

Confluent cultures of fibroblasts were incubated at 37°C for 24 h in the presence or absence of lead chloride (0.5, 1, 2 or 5 μM) and labeled with or without [³H]leucine during the last 3 h of the incubation. Values are means ± S.E. of five samples. Significantly different from the corresponding control, ****P* < 0.001.

第3節 血管平滑筋細胞の線溶蛋白放出に対する鉛の作用

Fig. III-5 に、血管平滑筋細胞からの線溶蛋白の放出に対する鉛の作用を示す。t-PA および PAI-1 放出は鉛によってともに有意に抑制されていたが、t-PA 放出においてより強い抑制が認められた。液相の線溶活性については、u-PA 活性だけが検出されたが、鉛による活性低下が観察された。

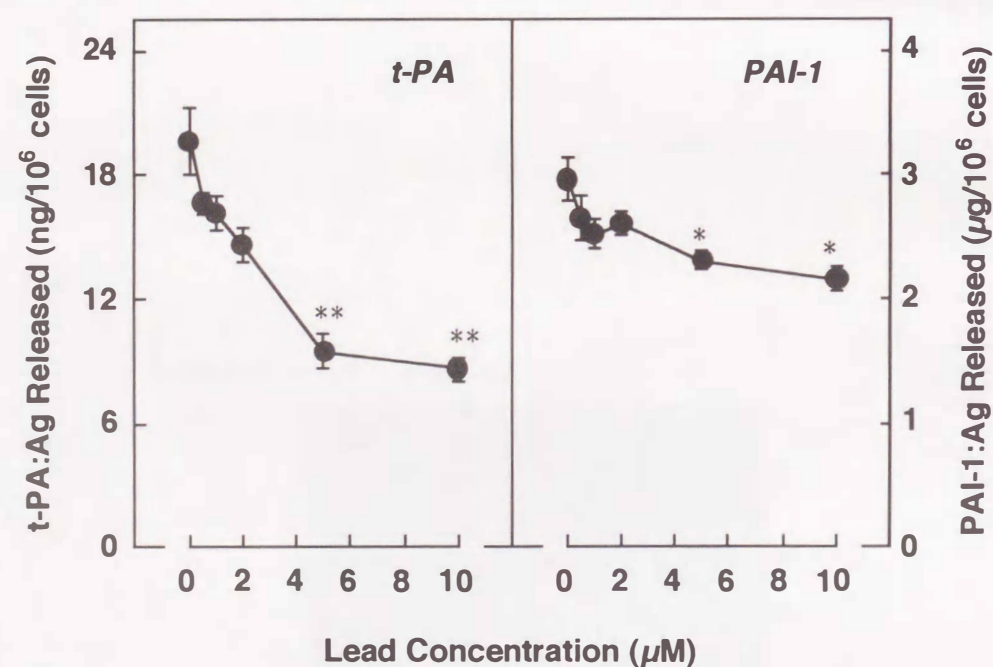


Fig. III-5. Effect of lead on the release of t-PA:Ag and PAI-1:Ag from cultured vascular smooth muscle cells. Confluent cultures of vascular smooth muscle cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence or absence of lead chloride (0.5, 1, 2, 5 or 10 µM). Values are means ± S.E. of six samples. Significantly different from the corresponding control, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Table III-3 に、鉛に曝露した血管平滑筋細胞からの LDH の培地中への逸脱および細胞層酸不溶性画分への [¹⁴C] ロイシンの取り込みを示す。5 µM 以上の鉛による LDH の逸脱の低下が認められたが、 [¹⁴C] ロイシンの取り込みには有意な変化は認められなかった。これらの結果は、鉛で処理した血管平滑筋細胞において認められた t-PA:Ag および PAI-1:Ag 放出の抑制が、非特異的な蛋白合成の抑制および細胞傷害によるものではないことが示唆していた。

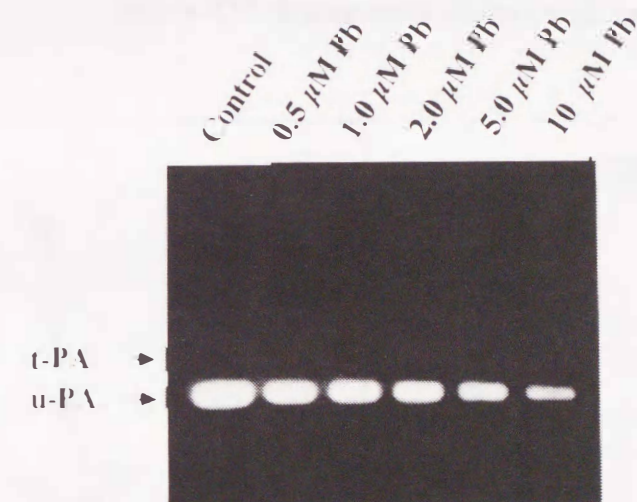


Fig. III-6. Fibrin zymography of the conditioned medium of cultured vascular smooth muscle cells. Confluent cultures of vascular smooth muscle cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence or absence of lead chloride (0.5, 1, 2, 5 or 10 µM).

Table III-3

The leakage of lactate dehydrogenase (LDH) and the incorporation of [¹⁴C]leucine into the acid-insoluble fraction in cultured vascular smooth muscle cells treated with or without lead

	LDH leakage (IU/L)	[¹⁴ C]Leucine incorporation (dpm/μg DNA)
Control	9.53 ± 0.63	3171 ± 117
0.5 μM Lead	8.10 ± 0.59	3170 ± 92
1 μM Lead	8.84 ± 0.22	3319 ± 39
2 μM Lead	8.91 ± 0.41	3428 ± 151
5 μM Lead	6.54 ± 0.83**	3596 ± 49
10 μM Lead	6.42 ± 0.49**	3333 ± 66

Confluent cultures of vascular smooth muscle cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence or absence of lead chloride (0.5, 1, 2, 5 or 10 μM) and labeled with or without [¹⁴C]leucine during the last 3 h of the incubation. Values are means ± S.E. of five samples. Significantly different from the corresponding control, ***P* < 0.01.

第4節 線維芽細胞の線溶蛋白放出に対する鉛の作用

Fig. III-7 に、線維芽細胞からの t-PA:Ag および PAI-1:Ag の放出に対する鉛の作用を示す。線維芽細胞において、鉛は t-PA:Ag 放出を濃度依存的に抑制していた。しかしながら、PAI-1:Ag 放出は逆に鉛の濃度に依存的に増加していた。このとき、Fig. III-8 に示すように、鉛処理線維芽細胞の液相の線溶活性は低下していた。

このときの培地中への LDH の逸脱および細胞層酸不溶性画分への [¹⁴C]ロイシンの取り込みを調べたところ、Table III-4 に示すように、LDH の培地中への逸脱は 10 μM までのカドミウムによる有意な変化は認められず、[¹⁴C]ロイシンの取り込みは 1 μM 以上の鉛で有意に増加していたが、その程度はわずかであった。

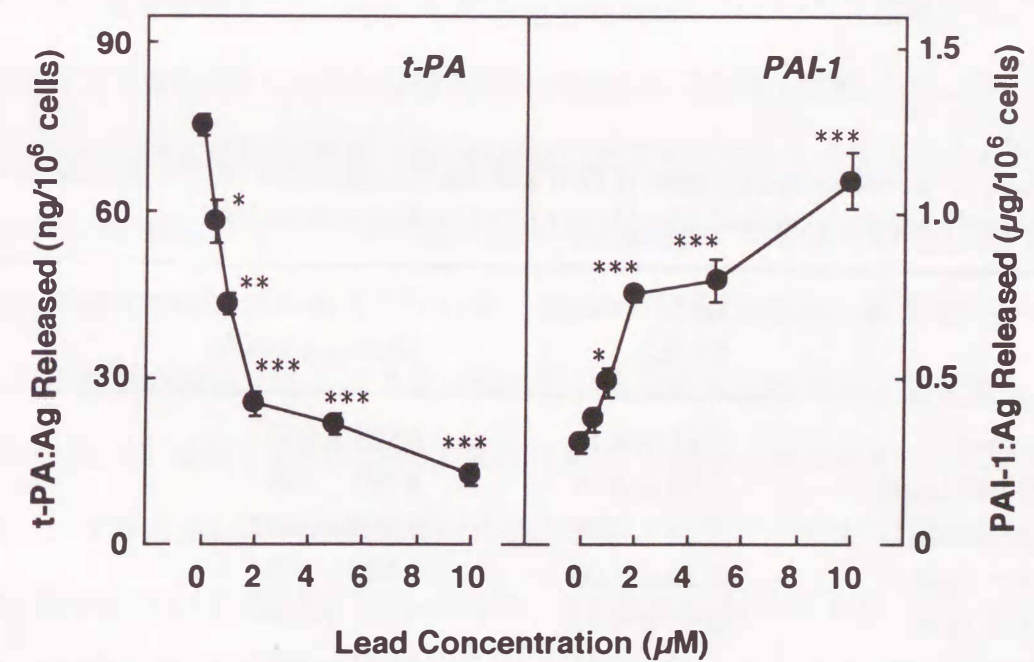


Fig. III-7. Effect of lead on the release of t-PA:Ag and PAI-1:Ag from cultured fibroblasts. Confluent cultures of fibroblasts were incubated at 37°C for 24 h in the presence or absence of lead chloride (0.5, 1, 2, 5 or 10 μM). Values are means ± S.E. of six samples. Significantly different from the corresponding control, **P* < 0.05; ****P* < 0.001.

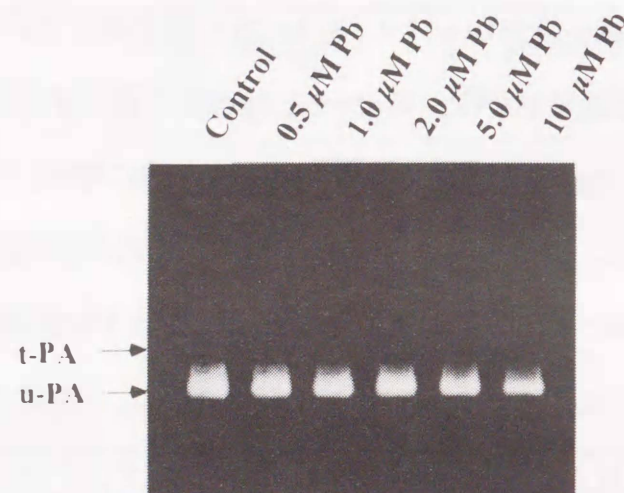


Fig. III-8. Fibrin zymography of the conditioned medium of cultured fibroblasts. Confluent cultures of fibroblasts were incubated at 37°C for 24 h in the presence or absence of lead chloride (0.5, 1, 2, 5 or 10 μM).

Table III-4

The leakage of lactate dehydrogenase (LDH) and the incorporation of [¹⁴C]leucine into the acid-insoluble fraction in cultured fibroblasts treated with or without lead

	LDH leakage (IU/L)	[¹⁴ C]Leucine incorporation (dpm/μg DNA)
Control	1.11 ± 0.11	6518 ± 233
0.5 μM Lead	0.84 ± 0.09	6780 ± 349
1 μM Lead	1.24 ± 0.02	7215 ± 364*
2 μM Lead	1.10 ± 0.02	7449 ± 175*
5 μM Lead	0.95 ± 0.13	7475 ± 129*
10 μM Lead	1.32 ± 0.11	3333 ± 241*

Confluent cultures of fibroblasts were incubated at 37°C for 24 h in the presence or absence of lead chloride (0.5, 1, 2, 5 or 10 μM) and labeled with or without [¹⁴C]leucine during the last 3 h of the incubation. Values are means ± S.E. of five samples. Significantly different from the corresponding control, **P* < 0.05.

第5節 考察

血管内皮下組織構成する血管平滑筋細胞および線維芽細胞も t-PA および PAI-1 産生能を有し、内皮細胞層の傷害時あるいは血管組織の破綻時の線溶系を調節しているとされる。本章において、カドミウムおよび鉛がともに血管平滑筋細胞からの t-PA および PAI-1 放出を抑制することが示された。PAI-1 は、液相に放出されると大部分が潜在型となって t-PA との不活性型複合体の形成能を失い、一部の活性型だけが線溶系の調節に関与する (Levin, 1986) ので、カドミウムおよび鉛に曝露した血管平滑筋細胞においては、t-PA 放出の減少が線溶活性に強く反映するものと推察される。血管平滑筋細胞の培養上清においては t-PA 活性が検出されなかったが、カドミウムおよび鉛による u-PA 活性の低下が認められ、t-PA が液相で減少していたことから t-PA 活性も低下し、全体として線溶活性は低下していると推察される。そのような血管平滑筋細胞に由来する線溶活性のカドミウムおよび鉛による低下は、動脈硬化病変における凝固促進性（血栓の形成）に寄与し得るものと考えられた。

血管平滑筋細胞の PAI-1 放出量は血管内皮細胞および線維芽細胞に比べて顕著に多かった。この結果は、血管平滑筋細胞においては血液凝固・線溶調節のバランスが、血栓維持の傾向にあることを示唆しているのかもしれない。すなわち、血管中膜においては、血管平滑筋細胞が大量の PAI-1 を産生・放出することによって、血管破綻による出血の防止と血液凝固に関与するプロテアーゼからの組織の保護が優先的に行われている可能性が考えられる。液相における PAI-1 は t-PA および u-PA を不活性化するだけでなく、アンチトロンビン活性を有するとする報告 (Ehrlich et al., 1991) もあり、カドミウムおよび鉛によって引き起こされる PAI-1 放出の減少は、t-PA 放出の抑制に起因する線溶活性の低下とともに血管内皮下組織における凝固促進性を高め、血管組織の修復に引き続く血栓の溶解を阻害し、凝固プロテアー

ゼからの血管中膜の保護を弱めることが推察された。

一方、線維芽細胞においては、カドミウムは t-PA 放出を選択的に刺激し、結果として、液相の t-PA 活性が上昇した。これに対し、鉛は t-PA 放出を顕著に抑制し、PAI-1 放出を逆に顕著に促進する結果、液相の線溶活性を低下させた。すなわち、線溶蛋白の放出を指標としたとき、線維芽細胞はカドミウムと鉛に対してまったく異なった応答を示すことが明らかとなった。このようなカドミウムと鉛の毒性発現様式の違いは、血管内皮細胞においても認められたものであり、同一の重金属が細胞種に依存した様式で毒性を発現するだけでなく、同一の細胞種が異なる重金属に対して異なる様式で応答することが明らかとなった。

カドミウムは血管平滑筋細胞において LDH の逸脱の増加と [³H]ロイシンの取り込みを顕著な減少させたことは、カドミウムによる t-PA および PAI-1 放出抑制の一部がこの金属の細胞毒性に起因する蛋白合成能の低下によることを示唆している。実際、血管平滑筋細胞はカドミウムを細胞内に多く蓄積するにもかかわらずメタロチオネインの誘導能が低く (Kaji et al., 1996)、その結果カドミウムの細胞毒性に対して感受性が高い (Kaji et al., 1995b)。しかしながら、そのような細胞毒性の発現 (LDH の逸脱の増加) が認められない低濃度のカドミウムも血管平滑筋細胞からの t-PA および PAI-1 放出を抑制していたことは、この重金属による線溶蛋白放出の抑制が単純に細胞毒性に起因しないことを示唆している。一方、鉛による血管平滑筋細胞からの t-PA および PAI-1 放出の抑制および線維芽細胞に対するカドミウムおよび鉛の作用は、 [³H]ロイシンの取り込みおよび LDH の逸脱に非依存的であった。従って、カドミウムおよび鉛が血管平滑筋細胞および線維芽細胞において t-PA および PAI-1 の産生・放出を調節する細胞内情報伝達経路に作用したことが推察されるが、同一の重金属が細胞種に依存した様式で毒性を発現するだけでなく、同一の細胞種が異なる重金属に対して異なる様式で応答すること、さらに t-PA 放出および

PAI-1 放出が必ずしも共役していないことから、(i) カドミウムおよび鉛の作用点の違い、(ii) 血管平滑筋細胞および線維芽細胞における作用点の違い、および (iii) t-PA および PAI-1 産生における作用点の違い、の存在が予想され、その解明は今後の課題である。

以上より、カドミウムおよび鉛が血管内皮細胞だけでなく血管平滑筋細胞および線維芽細胞の線溶調節に対しても毒性を発現することが示された。しかしながら、その毒性発現様式は各細胞種によって異なり、前章までに示された血管内皮細胞の t-PA および PAI-1 の放出に対するカドミウムおよび鉛の作用が血管内皮細胞のこれらの重金属に対する特有の応答であることが確認された。線溶蛋白の放出を指標としたとき、同一の重金属が血管内皮細胞、血管平滑筋細胞および線維芽細胞に対して細胞種に依存した様式で毒性を発現するだけでなく、同一の細胞種がカドミウムおよび鉛に対して異なった様式で応答し得ること、さらに t-PA 放出および PAI-1 放出のカドミウムおよび鉛に対する応答が必ずしも共役していないことが明らかになった。これらの結果は、血管組織においてカドミウムおよび鉛が線溶調節の制御を複雑に攪乱することを示唆し、これらの重金属によって引き起こされる血管病変 (Revis et al., 1981) および出血性の血管傷害 (Arvidson, 1983) に線溶調節の異常が含まれる可能性が示された。

結論

血管病変を誘発するとされるカドミウムおよび鉛の細胞レベルでの毒性発現を明らかにする目的で、血管病変を理解する上で重要な血管内皮細胞、血管平滑筋細胞および線維芽細胞の線溶調節に対するカドミウムおよび鉛の毒性発現様式を細胞培養系を用いて検討し、以下の結果を得た。

1. 血管内皮細胞の線溶調節に対するカドミウムの毒性発現

血管内皮細胞において、カドミウムは細胞毒性の発現および蛋白合成レベルの変化を起こさない条件で t-PA の産生・放出には影響を及ぼさず PAI-1 の産生・放出を選択的に促進し、液相の線溶活性を低下させることが示された。このような PAI-1 の産生・放出促進作用は、ニッケルにも認められたがその程度はカドミウムに比べて弱く、他の重金属には認められなかった。従って、カドミウムは PAI-1 の産生・放出を選択的に促進する特有の重金属として、内皮細胞が調節する線溶活性の低下を通じて血液の凝固促進性を強め、動脈硬化を含む血管病変の発症と進展に寄与するものと考えられた。

2. 血管内皮細胞の線溶調節に対する鉛の毒性発現

これに対し、鉛は PAI-1 の産生・放出に影響を及ぼさずに t-PA 放出を選択的に抑制し、液相の線溶活性を低下させることが示された。血管内皮細胞に対するこのような鉛の作用は他の重金属には認められず、鉛が t-PA の産生・放出を選択的に抑制する特有の重金属であることが示唆された。内皮細胞に対する鉛の細胞毒性の発現および蛋白合成レベルの変化は認められなかった。従って、鉛はカドミウムと同様に、内皮細胞が調節する線溶活性の低下を通じて血液の凝固促進性を強め、動

脈硬化を含む血管病変の発症と進展に寄与するものと考えられたが、その毒性発現様式はカドミウムとはまったく異なることが明らかとなった。

3. 血管平滑筋細胞および線維芽細胞の線溶調節に対するカドミウムおよび鉛の毒性発現

血管平滑筋細胞において、カドミウムおよび鉛はともに t-PA および PAI-1 の産生・放出を抑制し、結果として液相の線溶活性を低下させることが示唆された。一方、線維芽細胞においては、カドミウムが PAI-1 の産生・放出には影響を及ぼさず t-PA の産生・放出を選択的に促進することによって液相の線溶活性を上昇させるのに対し、鉛は t-PA の産生・放出を抑制するだけでなく PAI-1 の産生・放出を促進することによって液相の線溶活性を低下させることが示唆された。従って、カドミウムおよび鉛が同一の細胞種に対して異なる様式で毒性を発現し得るだけでなく、各細胞種は同一の重金属に対して異なる様式で応答し得ることが明らかとなった (Chart 2)。

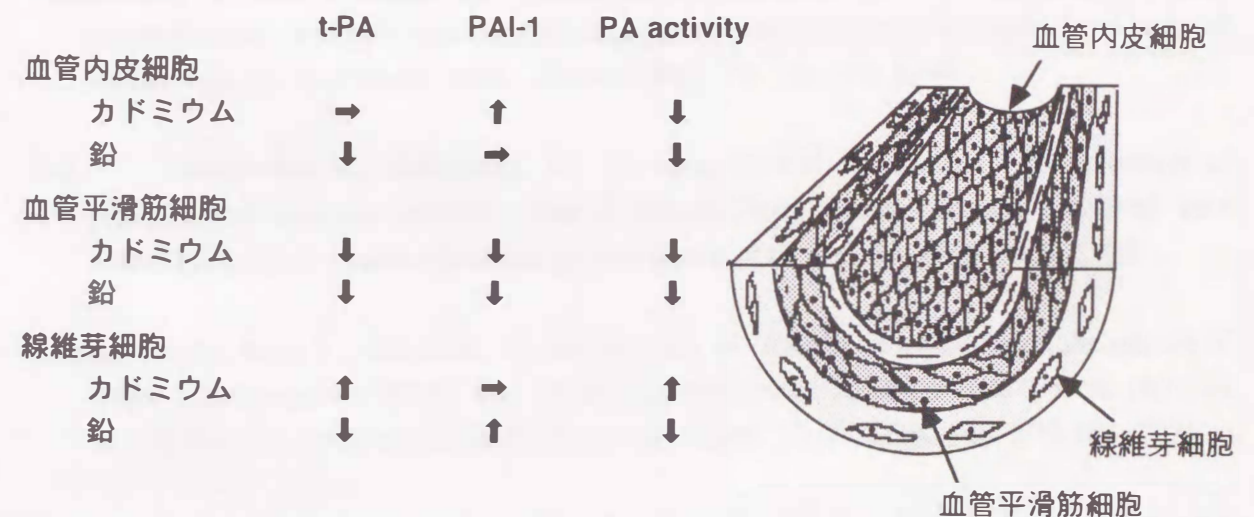


Chart 2. 血管構成細胞の線溶蛋白放出および線溶活性に対するカドミウムおよび鉛の作用. ↑, 促進; ↓, 抑制; →, 変化なし.

以上から、カドミウムおよび鉛が誘発する動脈硬化病変などの血管病変の発症と進展が血管を構成する細胞が行う線溶調節の攪乱を含むことが示唆されるとともに、カドミウムおよび鉛に対する血管内皮細胞、血管平滑筋細胞および線維芽細胞の多様な応答様式と各細胞種に対するカドミウムおよび鉛の異なった毒性発現様式が明らかとなった。

参考論文

本研究の内容は、以下の論文に公表した。

Kaji, T., **Yamamoto, C.**, Sakamoto, M. and Kozuka, H. Inhibitory effect of lead on the release of tissue plasminogen activator from human vascular endothelial cells in culture. *Toxicology*, **73**: 219-227, 1992.

Yamamoto, C., Kaji, T., Sakamoto, M. and Koizumi, F. Effect of endothelin on the release of tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 from cultured human endothelial cells and interaction with thrombin. *Thromb. Res.*, **67**: 619-624, 1992.

Yamamoto, C., Kaji, T., Sakamoto, M. and Kozuka, H. Cadmium stimulation of plasminogen activator inhibitor-1 release from human vascular endothelial cells in culture. *Toxicology*, **83**: 215-223, 1993.

Yamamoto, C., Kaji, T., Furuya, M., Sakamoto, M., Kozuka, H. and Koizumi, F. Basic fibroblast growth factor suppresses tissue plasminogen activator release from cultured human umbilical vein endothelial cells but enhances that from cultured human aortic endothelial cells. *Thromb. Res.*, **73**: 255-263, 1994.

Yamamoto, C., Kaji, T., Sakamoto, M., Kozuka, H. and Koizumi, F. Calcium regulation of tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 release from cultured human vascular endothelial cells. *Thromb. Res.*, **74**: 163-168, 1994.

Kaji, T., **Yamamoto, C.**, Sakamoto, M., Kozuka, H. and Koizumi, F. Suppression of plasminogen activator inhibitor type 1 release from cultured human umbilical vein endothelial cells by basic fibroblast growth factor. *Life Sci.*, **54**: 1563-1569, 1994.

Yamamoto, C., Kaji, T., Sakamoto, M. and Kozuka, H. Effects of cadmium on the release of tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 from cultured human vascular smooth muscle cells and fibroblasts. *Toxicology*, **106**: 179-185, 1996.

Yamamoto, C., Miyamoto, A., Sakamoto, M., Kaji, T. and Kozuka, H. Lead perturbs the regulation of spontaneous release of tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 from vascular smooth muscle cells and fibroblasts in culture. *Toxicology*, **117**: 153-161, 1997.

引用文献

- Arvidson, B. Influence of age on the development of cadmium-induced vascular lesion in rat sensory ganglia. *Environ. Res.* 32: 240-246, 1983.
- Ali, A.E., Barrett, J.C. and Eling, T.E. Prostaglandin and thromboxane production by fibroblasts and vascular endothelial cells. *Prostaglandins* 20: 667-688, 1980.
- Carroll, R.E. The relationship of cadmium in the air to cardiovascular disease death rates. *J. Am. Med. Assoc.* 198: 267-269, 1966.
- Carson, S.D. and Konigsberg, W.H. Cadmium increases tissue factor (Coagulation factor III) Activity by facilitating its reassociation with lipids. *Science* 208: 307-309, 1980.
- Chai, S.S. and Webb, R.C. Effects of lead on vascular reactivity. *Environ. Health Perspec.* 78: 85-89, 1988.
- Coughlin, S.R., Moskowitz, M.A., Antoniades, H.N. and Levine, L. Serotonin receptor-mediated stimulation of bovine smooth muscle cell prostacyclin synthesis and its modulation by platelet-derived growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 7134-7138, 1981.
- Dawson, S. and Henny, A. The status of PAI-1 as risk factor for arterial and thrombotic disease; a review. *Atherosclerosis* 95: 105-117, 1992.
- Engvan, J. and Perk, J. prevalence of hypertension among cadmium-exposed workers. *Arch. Environ. Health*, 40: 185-190, 1985.
- Erickson, L.A., Schleaf, R.R., Ny, T. and Loskutoff, D.J. The fibrinolytic system of the vascular wall. *Clin. Haematol.* 12: 513-530, 1985.
- Ehrlich, H.J., Keijer, J., Preissner, K.T., Gebbink, R.K. and Pannekoek, H. Functional interaction of plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) and heparin. *Biochemistry* 30: 1021-1028, 1991.
- Esmon, D.T. and Owen, W.G. Identification of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 2249-2252, 1981.
- Evans, D.H. and Weingarten, K. The effect of cadmium and other metals on vascular smooth muscle of the dogfish shark, *Squalus acanthius*. *Toxicology* 61: 275-281, 1990.
- Francis, R.B., Jr. and Neely, S. Inhibition of endothelial secretion of tissue-type plasminogen activator and its rapid inhibitor by agents which increase intracellular cyclic AMP. *Biochim. Biophys. Acta.* 1012: 207-213, 1989.

- Fujiwara, Y., Kaji, T., Yamamoto, C., Sakamoto, M. and Kozuka, H. Stimulatory effect of lead on the proliferation of cultured vascular smooth-muscle cells. *Toxicology* 98: 105-110, 1995.
- Fujiwara, Y., Kaji, T., Sakurai, S., Sakamoto, M. and Kozuka, H. Inhibitory effect of lead on the repair of wounded monolayers of cultured vascular endothelial cells. *Toxicology* 117: 193-198, 1997.
- Gajdusek, C.M. and Carbon, S. Injury-induced released of basic fibroblasts growth factor from bovine aortic endothelium. *J. Cell. Physiol.* 139: 570-579, 1989.
- Gelehrter, T.D. and Sznycer-Laszuk, R. Thrombin induction of plasminogen activator inhibitor in cultured human endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 77: 165-169, 1986.
- Goldstein, G.W. and Ar, D. Lead activates calmodulin-sensitive process. *Life Sci.* 33: 1001-1006, 1983.
- Goldstein, G.W., Wolinsky, J.S. and Csjetey, J. Isolated brain capillaries: A model for the study of lead encephalopathy. *Ann. Neurol.* 1: 235-239, 1977.
- Grulich-Henn, J. and Müller-Burghaus, G. Regulation of endothelial tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 synthesis by diacylglycerol, phorbol ester and thrombin. *Blut* 61: 38-44, 1990.
- Habermann, E., Crowell, K. and Janicki, P. Lead other metals can substitute for Ca^{2+} in calmodulin. *Arch. Toxicol.* 54: 61-70, 1983.
- Hanss, M. and Collen, D. Secretion of tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor by cultured human endothelial cells: modulation by thrombin, endotoxin and histamine. *J. Lab. Clin. Med.* 109: 97-104, 1987.
- Herbert, J.M., Lamarche, I., Prabonnaud, V., Dol, F. and Gauthier, T. Tissue-plasminogen activator is a potent mitogen for human aortic smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 269: 3076-3080, 1994.
- Hola, E.G., Wikson, E.L. and Dowdle, E.B. The regulation of tissue plasminogen activator activity by human fibroblasts. *Cell* 34: 273-279, 1983.
- Houtman, J.P. Prolonged low-level cadmium intake and atherosclerosis. *Sci. Total Environ.* 38: 31-36, 1993.
- Hoylaerts, M., Rijken, D.C., Lojnen, H.R. and Collen, D. Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator: role of fibrin. *J. Biol. Chem.* 257: 2912-2919, 1982.

- Itagaki, Y., Yasuda, H., Morinaga, T., Mitsuda, S. and Higashio, K. Purification and characterization of tissue plasminogen activator secreted by human embryonic lung diploid fibroblasts, IMR-90 cells. *J. Biol. Chem.* 269: 24316-24320, 1991.
- Kaji, T., Yamamoto, C. and Sakamoto, M. Effect of lead on the glycosaminoglycans metabolism of bovine aortic endothelial cells in culture. *Toxicology* 68: 249-257, 1991.
- Kaji, T., Mishima, A., Yamamoto, C., Sakamoto, M. and Koizumi, F. Effect of cadmium on the monolayer maintenance of vascular endothelial cells in culture. *Toxicology* 71: 267-276, 1992a.
- Kaji, T., Yamamoto, C., Sakamoto, M. and Koizumi, F. Endothelin modulation of tissue plasminogen activator release from human vascular endothelial cells in culture. *Blood Coagulat. Fibrinol.* 3: 5-10, 1992b.
- Kaji, T., Ohkawara, S., Inada, M., Yamamoto, C., Sakamoto, M. and Kozuka, H. Cadmium stimulation of glycosaminoglycan synthesis by cultured vascular endothelial cells: Comparison of various cell types. *Biol. Pharm. Bull.* 17: 454-457, 1994a.
- Kaji, T., Ohkawara, S., Yamamoto, C., Sakamoto, M. and Kozuka, H. Cadmium-induced alteration of glycosaminoglycans with an enhancement of heparin-like activity in cultured vascular endothelial cells. *Toxicology* 94: 161-171, 1994b.
- Kaji, T., Fujiwara, Y., Hoshino, M., Yamamoto, C., Sakamoto, M. and Kozuka, H. Inhibitory effect of lead on the proliferation of cultured vascular endothelial cells. *Toxicology* 95: 87-92, 1995a.
- Kaji, T., Yamamoto, C., Miyajima, S., Suzuki, M., Fujiwara, Y., Sakamoto, M., Koizumi, F. Vascular smooth muscle cells in culture are highly sensitive to cadmium cytotoxicity without species-related differences: comparison with Chang liver cells. *Biol. Pharm. Bull.* 18: 1392-1395, 1995b.
- Kaji, T., Suzuki, M., Yamamoto, C., Imaki, Y., Miyajima, S., Fujiwara, Y., Sakamoto, M., Kozuka, H. Sensitive response of cultured vascular smooth-muscle cells to cadmium cytotoxicity: comparison with vascular endothelial cells and kidney epithelial LLC-PK1 cells. *Toxicol. Lett.* 89: 131-137, 1996.
- Kaji, T., Ohkawara, S., Nakajima, M., Yamamoto, C., Fujiwara, Y., Miyajima, S. and Koizumi, F. Lead-induced alteration of heparan sulfate proteoglycans in cultured vascular endothelial cells. *Toxicology* 118: 1-10, 1997.
- Keski-Oja, J., Raghoebar, R., Sawdey, M., Loskutoff, D.J., Postlethwaite, A.E., Kang, A.H. and

- Moses, H.L. Regulation of mRNA for type-1 plasminogen activator inhibitor, fibronectin, and type I procollagen by transforming growth factor- β . *J. Biol. Chem.* 263: 3111-3115, 1988.
- Kissane, J.M. and Robins, E. The fluorometric measurement of deoxyribonucleic acid in animal tissue with special reference to the central nervous system. *J. Biol. Chem.* 233: 184-188, 1958.
- Kooistra, T., Bosma, P.J., Toet, K., Cohen, L.H., Griffioen, M., vanden Berg, E., Clercq, L.L. and van Hinsbergh, V.W.M. Role of protein kinase C and cyclic adenosine monophosphate in the regulation of tissue-type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor-1 and platelet-derived growth factor mRNA levels in human endothelial cells. Possible involvement of proto-oncogenes *c-jun* and *c-fos*. *Atheroscler. Thromb.* 11: 1042-1052, 1991.
- Lal, B., Murthy, R.C., Anand, M., Chandra, S.V., Kumar, R., Tripathi, O. and Srimal, R.C. Cardiotoxicity and hypertension in rats after oral lead exposure. *Drug Chem. Toxicol.* 14: 305-318, 1991.
- Levin, E.G. Quantitation and properties of the active and latent plasminogen activator inhibitors in cultures of human endothelial cells. *Blood* 67: 1309-1313, 1986.
- Levin, E.G. and Loskutoff, D.J. Cultured bovine aortic endothelial cells produce both urokinase and tissue-plasminogen activators. *J. Cell Biol.* 94: 631-636, 1982.
- Levin, E.G., Marzec, U., Anderson, J. and Harker, L.A. Thrombin stimulates tissue plasminogen activator release from cultured human endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 74: 1988-1995, 1984.
- Loskutoff, D.J., Linders, M., Keijer, J., Veerman, H., Van Heerikhuizen, H. and Pannekoek, H. Structure of the human plasminogen activator inhibitor 1 gene: Nonrandom distribution of introns. *Biochemistry* 26: 3763-3768, 1987.
- Marcum, J.A., Atha, D.H., Fritze, L.M.S., Nawroth, P., Stern, D. and Rosenberg, R.D. Cloned bovine aortic endothelial cells synthesize anticoagulant active heparan sulfate proteoglycan. *J. Biol. Chem.* 261: 7507-7515, 1986.
- Matsuo, C., Fukao, H. and Matso, O. Characterization of plasminogen activator produced by an established cell line from human ovary. *J. Cell. Physiol.* 134: 253-260, 1988.
- Maruyama, I., Salem, H.H. and Majerus, P.W. Coagulation factor V a binds to human umbilical vein endothelial cells and accelerates protein C activation. *J. Clin. Invest.*

- 74:224-230, 1984.
- Menditto, A., Morisi, G., Spagnolo, A. and Menotti, A. Association of blood lead to blood pressure in men aged 55 to 75 years: effect of selected social and biochemical confounders. *Environ. Health Perspect.* 102: 107-111, 1994.
- Moncada, S. and Vane, J.R. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxan A₂, and prostacyclin. *Pharmacol. Rev.* 30: 293-331, 1979.
- Moore, S. Responses of the arterial wall injury. *Diabetes* 30: 8-13, 1981.
- Mourik, J.A.V., Lawrence, D.A. and Loskutoff, D.J. Purification of an inhibitor of plasminogen activator (antiactivator) synthesized by endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 259: 14914-14921, 1984.
- McGuire, E.A. and Tollefsen, D.M. Activation of heparin cofactor II by fibroblasts and vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 262: 169-175, 1987.
- Niwa, A. and Suzuki, A. Effect of cadmium on the tension of isolated rat aorta (A Possible mechanism for cadmium-induced hypertension). *J. Toxicol. Sci.* 7: 51-60, 1982.
- Ohkawara, S., Yamamoto, C., Fujiwara, Y., Sakamoto, M. and Kaji, T. Cadmium induces the vascular endothelial cells. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* in press.
- Onosaka, S., Tanaka, K., Doi, M. and Okahara, K. A simplified procedure for determination of metallothionein in animal tissues. *Eisei Kagaku* 24: 128-131, 1978.
- Palmer, R.M.J., Rees, D.D., Ashton, D.S. and Moncada, S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153: 1251-1256, 1987.
- Perry, H.M., Erlanger, M.W. and Perry, E.F. Effect of a second metal on cadmium-induced hypertension. *Arch. Environ. Health* 38: 80-85, 1983.
- Perry, H.M., Erlanger, M.W. and Perry, E.F. Increase in the blood pressure of rats chronically fed low levels of lead. *Environ. Health Perspect.* 78: 107-111, 1988.
- Probst, G.S., Bousquet, W.F. and Miya, T.S. Correlation of hepatic metallothionein concentrations with acute cadmium toxicity in the mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 39: 61-69, 1977.
- Ranby, M. Studies on the kinetics of plasminogen activation by tissue plasminogen activator. *Biochim. Biophys. Acta* 704: 461-469, 1982.
- Revis, N.W., Zinsmeister, A.R., and Bull, R. Atherosclerosis and hypertension induction by lead and cadmium ions: An effect prevented by calcium ion. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- USA 78: 6494-6498, 1981.
- Rifkin, D.B. and Moscatelli, D. Recent developments in the cell biology of basic fibroblast growth factor. *J. Cell Biol.* 109: 1-6, 1989.
- Ross, R. Localization of PDGF-B protein macrophages in all phases of atherogenesis. *Science* 248: 1009-1012, 1990.
- Ross, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362: 801-809, 1993.
- Saksela, O., Moscatelli, D. and Rifkin, D.B. The opposing effects of basic fibroblast growth factor beta on the regulation of plasminogen activator activity in capillary endothelial cells. *J. Cell Biol.* 105: 957-963, 1987.
- Sawdey, M., Pador, T.J. and Loskutoff, D.J. Regulation of type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression in cultured bovine aortic endothelial cells. Induction by transforming growth factor- β , lipopolysaccharide and tumor necrosis factor- α . *J. Biol. Chem.* 264: 10396-10401, 1989.
- Schleef, R.R., Bevilacqua, M.P., Sawdey, M., Gimbrone, M.A. and Loskutoff, D.J. Cytokine activation of vascular endothelium. Effects on tissue-type plasminogen activator and type-1 plasminogen activator inhibitor. *J. Biol. Chem.* 263: 5797-5803, 1988.
- Schneiderman, J., Sawdey, M.S., Keeton, M.R., Bordin, G.M., Bernstein, E.F., Dilley, R.B. and Loskutoff, D.J. Increased type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression in atherosclerotic human arteries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6998-7002, 1992.
- Schroeder, H.A. Cadmium hypertension in rats. *Am. J. Physiol.* 207: 62-66, 1964.
- Schroeder, H.A. Cadmium as a factor in hypertension. *J. Chron. Dis.* 18: 647-656, 1965.
- Schroeder, H.A. and Vinton, W.H. Hypertension induced in rats by small doses of cadmium. *Am. J. Physiol.* 202: 515-518, 1962.
- Shimada, K., Kusumoto, I. and Ozawa, T. The potency of heparin-like activity of glycosaminoglycans released by human endothelial cells in culture. *Experientia* 41: 671-673, 1985.
- Small, D.M. Progression and regression of atherosclerotic lesions. Insights from lipid physiological biochemistry. *Atherosclerosis* 67: 9-16, 1987.
- Wight, T.N. Cell biology of arterial proteoglycans. *Atherosclerosis* 9: 1-20, 1989.
- Wojta, J., Gallicchio, M., Zoellner, H., Hufnagl, P., Last, K., Filoonzi, E.L., Binder, B.R., Hamilton, J.A. and McGrath, K. Thrombin stimulates expression of tissue-plasminogen

activator and plasminogen activator inhibitor type-1 in cultured human vascular smooth muscle cells. *Thromb. Haemost.* 70: 469-474, 1993.

Takuwa, Y., Kasuya, Y., Takuwa, N., Yanagisawa, M., Goto, K., Kasaki, T. and Yamashita, K. Endothelin receptor is coupled to phospholipase C via a pertussis toxin-insensitive guanine nucleotide-binding regulatory protein in vascular smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.* 85: 653-658, 1990.

Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K. and Masaki, T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature.* 332: 411-415, 1988.

Yokoyama, K., Kohno, M., Yasunari, K., Murakawa, K. and Takeda, T. Endothelin-3 regulates endothelin-1 production in cultured human endothelial cells. *Hypertension* 18: 304-315, 1991.

謝辞

本研究の細部にわたり終始御懇篤な御指導を賜りました北陸大学薬学部環境科学教室 鍛冶利幸助教授に深甚なる感謝の意を表しますとともに、御指導ならびに御鞭撻を賜りました富山医科薬科大学 狐塚 寛名誉教授ならびに富山医科薬科大学医学部第二病理学教室 小泉富美朝教授に深謝致します。

また、実験の遂行にあたり多くの御協力を賜りました北陸大学薬学部環境科学教室 坂元倫子教授、宮元章子修士および中谷（古谷）美紀学士ならびに、終始御支援を頂きました藤原泰之助手および宮島三和子助手をはじめとする北陸大学薬学部環境科学教室の皆様にご礼申し上げます。さらに、遺伝子発現の実験方法に関して御指導下さいました金沢大学医学部第二生化学教室 山本 博教授および山岸昌一講師に深謝致します。

本研究をまとめ提出する機会を与えて頂きました富山医科薬科大学薬学部毒理学教室 根本信雄教授に深く感謝致します。

最後に、本研究は、平成6年度文部省科学研究費補助金奨励研究（A）(No. 06772160)、平成7年度文部省科学研究費補助金奨励研究（A）(No. 07772194)、平成8年度文部省科学研究費補助金奨励研究（A）(No. 08772120) および平成7年度北陸大学特別研究助成によって遂行したことを付記します。

