



Effects of cytochrome P450 inhibitors on agonist-induced Ca^{2+} responses and production of NO and PGI₂ in vascular endothelial cells

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 竹内, 和彦 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1254

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 401号	学位授与年月日	平成15年 3月26日
氏 名	竹 内 和 彦		
論文題目	Effects of cytochrome P450 inhibitors on agonist-induced Ca^{2+} responses and production of NO and PGI_2 in vascular endothelial cells (血管内皮細胞におけるアゴニスト誘発性カルシウム応答および NO、プロスタグランジン I_2 産生に対するチトクローム P450 阻害薬の作用)		

博士(医学) 竹内和彦

論文題目

Effects of cytochrome P450 inhibitors on agonist-induced Ca^{2+} responses and production of NO and PGI_2 in vascular endothelial cells

(血管内皮細胞におけるアゴニスト誘発性カルシウム応答および NO、プロスタグランジン I_2 産生に対するチトクローム P450 阻害薬の作用)

論文の内容の要旨

[はじめに]

NOをはじめプロスタグランジン I_2 (PGI_2) や内皮由来過分極因子 (EDHF) などの内皮依存性血管拡張因子の産生は、内皮細胞内カルシウム濃度の変化により調節されることが認められている。最近、EDHFの産生に cytochrome P450 (CYP) の関与が報告されているが、CYP が他の内皮依存性血管拡張因子産生や細胞内カルシウムイオン濃度におよぼす影響については明らかではない。本研究では、bradykinin (BK)、thapsigargin (TG) 刺激時の血管内皮細胞内カルシウムイオン濃度変化および NO、 PGI_2 産生に対する CYP 阻害薬の作用を検討した。

[方法]

対照としてブタ大動脈初代培養血管内皮細胞を用いた。CYP 阻害薬として SKF525A (SKF; 30-100 μM)、エコナゾール (10 μM)、ミコナゾール (10 μM) を使用した。アゴニストとして BK (10 nM)、TG (1 μM) を用いた。細胞内カルシウム濃度は、fura-2/AM (2 μM) を用いた画像解析法により測定し、NO と PGI_2 産生の指標として、免疫イムノアッセイを用いて cGMP と 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ 濃度をそれぞれ測定した。

[結果]

- 1) レセプター依存性アゴニストである BK (10 nM) 刺激時に、内皮細胞内カルシウム濃度は、コントロール値 ($\text{F340/F380 ratio: } 0.8 \pm 0.1$) から速やかに上昇し ($\text{peak F340/F380 ratio: } 4.6 \pm 0.4, p < 0.001$)、その後緩やかに低下した。
- 2) BK (10 nM) 刺激時の細胞内カルシウム濃度上昇に対して、SKF (30, 50, 100 μM) は、有意な抑制作用を示した ($\text{peak F340/F380 ratio: } 3.7 \pm 0.2, 3.7 \pm 0.6, 2.8 \pm 0.6, p < 0.05$)。
- 3) BK (10 nM) による細胞内カルシウム濃度上昇後に SKF を投与すると、細胞内カルシウム濃度は急激に減少し、SKF の除去により細胞内カルシウム濃度は再上昇することが認められた。
- 4) 細胞内カルシウムストア部位 Ca^{2+} -ATPase の選択的阻害薬である TG (1 μM) 刺激時、内皮細胞内カルシウム濃度は、コントロール値 ($\text{F340/F380 ratio: } 0.7 \pm 0.1$) から約 2 分でピークに達し ($\text{F340/F380 ratio: } 4.2 \pm 0.4, p < 0.001$)、その後も持続的な上昇を示した。
- 5) TG (1 μM) 刺激時の細胞内カルシウム濃度上昇に対して、SKF (30, 50, 100 μM) は、濃度依存的な抑制作用を示した ($\text{peak F340/F380 ratio: } 3.4 \pm 0.4, 2.2 \pm 0.4, 1.2 \pm 0.2, p < 0.05$)。
- 6) SKF とは構造の異なる CYP 阻害薬である econazole (10 μM) と miconazole (10 μM) は、BK (10 nM) 刺激時のカルシウム濃度上昇を抑制し ($\text{peak F340/F380 ratio: econazole } 2.5 \pm 0.5, p < 0.05, \text{miconazole } 2.6 \pm 0.5, p < 0.05$)、同様に、TG (1 μM) 刺激のカルシウム濃度上昇も抑制した ($\text{peak F340/F380 ratio: econazole } 1.1 \pm 0.1, p < 0.05, \text{miconazole } 1.0 \pm 0.1, p < 0.05$)。

- 7) BK(10nM)刺激により、NO 産生の指標である cGMP 産生量(pg/10⁶cells)は、コントロールの 9 ± 5 から 156 ± 24 へと増加したが(p<0.05)、SKF(50μM、100μM)投与により、それぞれ 53 ± 35、10 ± 9 へと抑制された(p<0.05)。
- 8) BK(10nM)刺激により、PGL₂ 産生の指標である 6-keto-PGF_{1α} 産生量(ng/10⁶cells)は、コントロールの 23 ± 6 から 525 ± 162 へと増加したが(p<0.05)、SKF(50μM、100μM)投与により、それぞれ 381 ± 26、58 ± 9 に抑制された(p<0.05)。

[考察]

CYP 阻害薬は、アゴニスト誘発性の内皮細胞内カルシウム濃度上昇を抑制し、NO と PGL₂ 産生を低下させることが示された。CYP は、血管内皮細胞内カルシウム濃度を調節することにより、EDHF 産生ばかりでなく、NO と PGL₂ 産生調節に関わり、内皮依存性血管拡張反応を制御することが明らかとなった。

NO や PGL₂ は、血小板凝集抑制、血管平滑筋増殖抑制、単球の血管壁への接着抑制作用が報告されており、CYP による NO や PGL₂ の産生制御は、血管恒常性の維持にも関わる可能性が示唆された。

[結論]

CYP 阻害薬は、アゴニスト誘発性の内皮細胞内カルシウム応答を抑制し、内皮依存性血管拡張因子産生を低下させることが示された。

論文審査の結果の要旨

内皮依存性血管拡張因子の NO、プロスタグランジン I₂(PGL₂)、内皮由来過分極因子(EDHF)などの産生は、内皮細胞内カルシウム(Ca²⁺)濃度の変化により調節されている。EDHF の産生に cytochrome P450 (CYP)の関与が報告されているが、CYP が他の内皮依存性血管拡張因子や細胞内 Ca²⁺ 濃度にどのような影響を与えるのかについては明らかにされていない。申請者は、bradykinin(BK)と thapsigargin(TG)刺激を加えた時の血管内皮細胞内 Ca²⁺ 濃度変化、NO、および PGL₂ 産生に与える CYP 阻害薬の効果を検討した。

1) ブタ大動脈初代培養血管内皮細胞を用い、CYP 阻害薬として SKF525A(SKF; 30-100μM)、エコナゾール(10μM)、ミコナゾール(10μM)を使用した。アゴニストは BK(10nM)、TG(1μM)を用いた。細胞内 Ca²⁺ 濃度は、fura-2/AM(2μM)を用いた画像解析法で測定し、NO と PGL₂ 産生の指標として、免疫イムノアッセイを用いて cGMP と 6-keto-PGF_{1α} 濃度を測定した。

2) 結果：BK 刺激時に、内皮細胞内 Ca²⁺ 濃度は、コントロール値(F340/F380 ratio : 0.8 ± 0.1)から速やかに上昇し(peak F340/F380 ratio : 4.6 ± 0.4, p<0.001)、その後緩やかに低下した。

・BK 刺激時の細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇を、SKF(30、50、100μM)は、抑制した(peak F340/F380 ratio : 3.7 ± 0.2、3.7 ± 0.6、2.8 ± 0.6, p<0.05)。

・BK による細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇後に SKF を投入すると、細胞内 Ca²⁺ 濃度は急激に減少し、SKF の除去により再上昇した。

・TG 刺激時、内皮細胞内 Ca²⁺ 濃度は、コントロール値(F340/F380 ratio : 0.7 ± 0.1)から約 2 分でピークに達し(F340/F380 ratio : 4.2 ± 0.4, p<0.001)、その後も持続的な上昇を示した。

・TG 刺激時の細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇に対して、SKF(30、50、100μM)は、濃度依存的な抑制作用を示した。

(peak F340/F380 ratio : 3.4 ± 0.4 , 2.2 ± 0.4 , 1.2 ± 0.2 , $p < 0.05$)。

- ・ econazole と miconazole は、BK 刺激時の Ca^{2+} 濃度上昇を抑制し (peak F340/F380 ratio : econazole 2.5 ± 0.5 , $p < 0.05$, miconazole 2.6 ± 0.5 , $p < 0.05$)、同様に、TG 刺激の Ca^{2+} 濃度上昇も抑制した (peak F340/F380 ratio : econazole 1.1 ± 0.1 , $p < 0.05$, miconazole 1.0 ± 0.1 , $p < 0.05$)。
 - ・ BK 刺激により、cGMP 産生量 (pg/ 10^6 cells) は、コントロールの 9 ± 5 から 156 ± 24 へと増加したが ($p < 0.05$)、SKF ($50 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$) 投与により、それぞれ 53 ± 35 , 10 ± 9 へと抑制された ($p < 0.05$)。
 - ・ BK 刺激により、6-keto-PGF_{1 α} 産生量 (ng/ 10^6 cells) は、コントロールの 23 ± 6 から 525 ± 162 へと増加したが ($p < 0.05$)、SKF ($50 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$) 投与により、それぞれ 381 ± 26 , 58 ± 9 に抑制された ($p < 0.05$)。
 - ・ 得られた結果から申請者は、CYP 阻害薬は、アゴニスト誘発性の内皮細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を抑制し、NO と PGI₂ 産生を低下させると推測した。CYP は、血管内皮細胞内 Ca^{2+} 濃度を調節することで、EDHF 産生ばかりでなく、NO と PGI₂ 産生調節に関与し、内皮依存性血管拡張反応を制御することが明らかであると考察した。
 - ・ また CYP による NO や PGI₂ の産生制御は、血管恒常性の維持にも関わる可能性を示唆した。
- 以上から、申請者は CYP 阻害薬は、アゴニスト誘発性の内皮細胞内カルシウム応答を抑制し、内皮依存性血管拡張因子産生を低下させることが示唆されると結論した。

この発表の際、申請者に対して次のような質問がなされた。

- 1) EDHF の本体はどのようなものが考えられているか
- 2) 血管を拡張させたいときは、NO、PGI₂ などと同時に EDHF も分泌されるのか
- 3) Thapsigargin とはどのような物質か
- 4) Thapsigargin は Ca^{2+} ATPase を阻害しての Ca^{2+} の leak を起こすのか
- 5) ブタ大動脈内皮 cell を選んだ理由は、種差があるのでは
- 6) SKF と econazole で抑制したときの反応の違いは
- 7) CYP 阻害薬の作用機序は
- 8) NO production etc も CYP 阻害薬で抑制されるのか
- 9) 3 種の拡張因子の作用程度の内訳はどうか、あるいは作用部位の違いは

これらの質問に対し申請者の解答は概ね適切であり、本研究での問題点を十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 佐藤 重 仁

副査 金山 尚 裕 副査 近藤 一 直