

# Effects of cytochrome P450 inhibitors on agonist-induced Ca<sup>2+</sup> responses and production of NO and PGI<sub>2</sub> in vascular endothelial cells

メタデータ	言語: jpn 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	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1254">http://hdl.handle.net/10271/1254</a>

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 <sup>2+</sup> responses and production of NO and PGI <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) 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<sub>2</sub> 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 $\mu$ M)、エコナゾール (10 $\mu$ M)、ミコナゾール (10 $\mu$ M) を使用した。アゴニストとして BK (10nM)、TG (1 $\mu$ M) を用いた。細胞内カルシウム濃度は、fura-2/AM (2 $\mu$ M) を用いた画像解析法により測定し、NO と PGI<sub>2</sub> 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<sub>1 $\alpha$</sub>  濃度をそれぞれ測定した。

### 〔結果〕

- レセプター依存性アゴニストである BK (10nM) 刺激時に、内皮細胞内カルシウム濃度は、コントロール値 (F340/F380 ratio:  $0.8 \pm 0.1$ ) から速やかに上昇し (peak F340/F380 ratio:  $4.6 \pm 0.4$ ,  $p < 0.001$ )、その後緩やかに低下した。
- BK (10nM) 刺激時の細胞内カルシウム濃度上昇に対して、SKF (30, 50, 100 $\mu$ M) は、有意な抑制作用を示した (peak F340/F380 ratio:  $3.7 \pm 0.2$ ,  $3.7 \pm 0.6$ ,  $2.8 \pm 0.6$ ,  $p < 0.05$ )。
- BK (10nM) 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。
- 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 $\mu$ M) 刺激時、内皮細胞内カルシウム濃度は、コントロール値 (F340/F380 ratio:  $0.7 \pm 0.1$ ) から約 2 分でピークに達し (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。
- TG (1 $\mu$ M) 刺激時の細胞内カルシウム濃度上昇に対して、SKF (30, 50, 100 $\mu$ M) は、濃度依存的な抑制作用を示した (peak F340/F380 ratio:  $3.4 \pm 0.4$ ,  $2.2 \pm 0.4$ ,  $1.2 \pm 0.2$ ,  $p < 0.05$ )。
- SKF とは構造の異なる CYP 阻害薬である econazole (10 $\mu$ M) と miconazole (10 $\mu$ M) は、BK (10nM) 刺激時のカルシウム濃度上昇を抑制し (peak F340/F380 ratio: econazole  $2.5 \pm 0.5$ ,  $p < 0.05$ , miconazole  $2.6 \pm 0.5$ ,  $p < 0.05$ )、同様に、TG (1 $\mu$ M) 刺激のカルシウム濃度上昇も抑制した (peak F340/F380 ratio: econazole  $1.1 \pm 0.1$ ,  $p < 0.05$ , 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/10<sup>6</sup>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(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、PGL<sub>2</sub>産生の指標である6-keto-PGF<sub>1α</sub>産生量(ng/10<sup>6</sup>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(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PGL<sub>2</sub>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PGL<sub>2</sub>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PGL<sub>2</sub>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PGL<sub>2</sub>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I<sub>2</sub>(PGL<sub>2</sub>)、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(Ca<sup>2+</sup>)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Ca<sup>2+</sup>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Ca<sup>2+</sup>濃度変化、NO、およびPGL<sub>2</sub>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Ca<sup>2+</sup>濃度は、fura-2/AM(2μM)を用いた画像解析法で測定し、NOとPGL<sub>2</sub>産生の指標として、免疫アッセイを用いてcGMPと6-keto-PGF<sub>1α</sub>濃度を測定した。
- 2) 結果：BK刺激時に、内皮細胞内Ca<sup>2+</sup>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Ca<sup>2+</sup>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Ca<sup>2+</sup>濃度上昇後にSKFを投入すると、細胞内Ca<sup>2+</sup>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Ca<sup>2+</sup>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Ca<sup>2+</sup>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。

