血管内皮細胞における ATP 放出経路

大池 正宏¹⁾, Guy Droogmans²⁾, 伊東 祐之¹⁾

要約: 血管内皮細胞は様々な生理活性物質を分泌して血管の緊張や増殖の調節に関わり, その機能は血中の液性因子や血球との接触, さらに血流や血圧で加わる機械的な刺激によってもたらされる。これらの調節機構のひとつとして, 機械刺激によって内皮から ATP が放出され, オートクリン/パラクリンの自身あるいは周囲の細胞に作用して一酸化窒素の産生などをもたらす反応が知られている。ATP の放出は血管内皮細胞以外にも種々の上皮系および非上皮系細胞で観察されているが, このメカニズムにはなお不明な点が多い。特に, どのような経路を通して ATP が放出されるのかについては未だ結論が得られていない。トランスポーターによる能動輸送, ATP 含有小胞の開口放出, 陰性荷電物質としての ATP が透過する陰イオンチャンネルを介した放出などが可能性として示されているが, これらのうち血管内皮細胞で報告されているのは, 開口放出と容積感受性陰イオンチャンネル (以下 VRAC) およびコネキシンを通じた放出である。我々はウシ大動脈内皮細胞を用い, VRAC 阻害薬による VRAC 電流と ATP 放出の抑制の濃度反応関係が一致していることを観察した。また, 低濃度の細胞外 ATP によって VRAC 電流が電位依存性に抑制され, この現象が $K_d(0)1.0 \text{ mM}$, チャンネル結合部位の電気的距離 0.41 とした透過型阻害薬モデルで説明できることを明らかにした。すなわち, この細胞での低浸透圧刺激による ATP 放出は VRAC を介するものと考えられた。血管内皮細胞の種々の生理機能に及ぼす ATP 放出の役割の解明と ATP 放出経路の修飾による内皮機能調節の可能性に向けて, 今後の検討が期待される。

キーワード: 血管内皮細胞, ATP, 機械刺激, 陰イオンチャンネル

¹⁾九州大学大学院医学研究院生体情報薬理 (〒812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1)

e-mail: moike@pharmaco.med.kyushu-u.ac.jp

²⁾Laboratorium voor Fysiologie, Katholieke Universiteit Leuven.

原稿受領日: 2004 年 2 月 27 日, 編集委員会依頼総説

1. はじめに

血管内皮細胞は, 血管の緊張と増殖の調節や血管新生の制御など, 種々の生理機能を担っており, これらの変化が高血圧, 動脈硬化, 癌の浸潤転移など多くの病態に関与すると考えられている。この内皮細胞の機能は, 自身に加わる血流や血圧などによる機械刺激によって発現が調節されることが特徴であるが¹⁾, その詳細の多くは不明のままである。

ATP は, 細胞代謝に必須のエネルギー源であると同時に, 血小板濃染顆粒内の凝集因子や自律神経の伝達物質として細胞外に放出される機能性メディエーターであることが以前から知られている。血管内皮細胞においても, トロンピンなどのアゴニスト刺激でアデニンヌクレオチドが放出されることが 1979 年に初めて報告された²⁾。ADP には血小板凝集促進作用が, その分解産物のアデノシンには凝集抑制作用があることから, 当初は内皮由来 ATP は分解される過程で作用する血小板凝集の調節因子と捉えられた。その後, 剪断力などの機械刺激によっても ATP が放出されることが示され³⁾, 内皮細胞よりの ATP 放出は機械刺激に反応して内皮が自律的に血管緊張を調節する機構のひとつとして認識されるようになった。

血管内皮より放出された ATP は放出細胞自身あるいは周囲の細胞の P_2 受容体にオートクリン/パラクリンに作用して Ca^{2+} 動員を生じ⁴⁾, 一酸化窒素 (NO) の産生⁵⁾, 血管壁構成細胞の増殖やアポトーシスへの関与⁶⁾, 初期炎症反応との関わり⁷⁾, さらにプロスタサイクリンの放出⁸⁾ などをもたらすと考えられている。また, 最近の知見によると第 3 世代 遮断薬の血管弛緩作用には内皮からの ATP 放出による NO 産生が関与していると推定されており⁹⁾, 内皮よりの内因性 ATP 放出の薬物作用への関与も注目されている。

2. ATP 放出経路の諸説

ATP が細胞破壊の結果としてではなく機械刺激やアゴ

Table 1 Reported ATP release pathways and mechanisms.

	ATP release pathway	ATP releasing stimuli	cell types	properties, etc.	reference
1	P-glycoprotein (<i>mdr-1</i> gene product)	spontaneous release	<i>mdr-1</i> -overexpressed CHO cell	conductance: 43.0pS (inward), 14.7pS (outward) (intra/extracellular: 100mM Tris-ATP)	10
2	CFTR	cAMP	CFTR-overexpressed adenocarcinoma cell line	conductance: 4.8pS (extracellular: 100mM MgATP, intracellular: 140mM NaCl)	12
3	connexin hemichannel	low Ca^{2+} solution, IP_3	Cx32-, Cx43- overexpressed C6 glioma and HeLa cells	No direct evidence for ATP permeation through the channel. Also reported in brain endothelium GP8.	16
4	vesicular release	shear stress	human umbilical cord vein endothelial cell	Release of ATP-containing intracellular vesicles. Suppressed by membrane transport inhibitors.	18
5	volume- and voltage-dependent ATP-conductive large conductance anion channel (VDACL)	hypotonic stress	C127i cell	conductance: ~400pS (100mM Na_2ATP) ATP release and currents were inhibited by Gd^{3+} .	20
6	volume regulated anion channel (VRAC)	hypotonic stress	bovine aortic endothelial cell	ATP suppressed VRAC current as a permeation-blocker. ATP release was inhibited by VRAC inhibitors.	21

ニスト刺激などに反応した生理的メディエーターとして、内皮細胞のみならず多くの上皮系および非上皮系細胞から放出されることが明らかになるにつれ、どのような経路でこの分子量 500 を超える物質が細胞外に放出されるのか、多くの研究者の興味が引かれることとなった (Table 1). ATP が陰性荷電物質であることから、多くの検討は陰イオン透過経路という見地から行われ、また ATP を含有する細胞内小胞の開口放出という仮説も検討されてきた。

ATP 放出経路に関する検討の多くはこれまで血管内皮細胞以外の種々の細胞でなされているため、本章では他の細胞種で得られた知見も含めて考察する。

(1) P 糖タンパク

ATP 放出経路の候補として初めて報告されたのは、多剤耐性遺伝子 *mdr-1* の産物である P 糖タンパクである (10). P 糖タンパクは細胞内の抗癌剤などを ATP の加水分解エネルギーによって細胞外に能動排泄する作用を持つ

が、構造内に ATP 結合部位を持ち、またミトコンドリアの ATP/ADP 交換輸送体と類似構造を有することから、ATP 放出能が推測された。CHO 細胞等に *mdr-1* を過剰発現させると、無刺激状態でも ATP が次第に細胞外に蓄積し、さらに、ATP を唯一の陰イオンとして細胞内外液に高濃度 (100 mM) を用いて電流記録を行うと、*mdr-1* 過剰発現細胞では内向き 43.0 pS、外向き 14.7 pS の ATP 電流が観察された (10)。別のグループは同様の検討を機械刺激のひとつとしての低浸透圧刺激下に行い、*mdr-1* を過剰発現した肝細胞株で低浸透圧による ATP 放出と ATP 電流を計測した (11)。

(2) CFTR

次に、嚢胞性線維症の病因と関連する遺伝子産物 CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) が ATP の透過経路として注目された。CFTR は cAMP 依存性に開孔する陰イオンチャネルを形成し、P 糖タンパク

と同じく ATP 結合カセット (ABC) ファミリーに属して ATP の加水分解により活性が調節されることから、その ATP 透過性が検討されることとなった。CFTR を過剰発現した腺癌細胞株から①と同様に 100 mM の ATP を細胞内外液として電流記録を行うと、cAMP の投与によって 4.8 pS の ATP 電流が測定された(12)。

一方、これらの ABC ファミリータンパク特に CFTR が ATP の透過経路であるという説には反証も挙げられており(13)、またこれらは ATP を透過するチャネル孔ではなく、放出経路の調節因子であるという報告もある(14,15)。なお、P 糖タンパクや CFTR が血管内皮細胞における ATP の放出経路であるという報告はこれまでなされていない。

(3) コネキシン

細胞間のギャップ結合の構成要素であるコネキシン (connexin, Cx) 群は、細胞表面に半チャネルを形成する 6 量体として突出し、隣接細胞のコネキシン半チャネルと非共有結合して細胞間をつなぐ 12 量体構造のチャネルを形成する。このチャネルは細胞間で水をはじめ Ca^{2+} 、 IP_3 、cAMP など分子量 1,000 以下の物質を往来させる細胞間連絡路と考えられている。このような背景のもと、ATP 放出の経路もしくは調節因子としてコネキシン半チャネルが検討された。コネキシンファミリーのひとつ (Cx32 または Cx43) を C6 グリオーマ細胞および HeLa 細胞に過剰発現させると、UTP による細胞内 IP_3 上昇刺激および低 Ca^{2+} 細胞外液刺激で ATP 放出が認められた(16)。このコネキシンが関与する ATP 放出は、内皮細胞における ATP 放出経路としての可能性も報告されている。すなわち、脳血管内皮細胞株 GP8 に Cx43 を過剰発現させると、無 Ca^{2+} 液の細胞外灌流または細胞内に取り込ませた caged IP_3 からの IP_3 の光遊離によって ATP 放出が認められ、さらにこれらがコネキシン阻害ペプチドによって抑制された(17)。無 Ca^{2+} 条件が生体内でのどのような放出刺激に相当するのか、また上昇した細胞内 IP_3 によって十分な Ca^{2+} 動員が起こされた後に放出された ATP がどのような生理機能をもつのか、さらに機械刺激との関連など、今後の検討が必要と思われる。また Cx32 や Cx43 を過剰発現していない通常細胞でギャップ結合を形成するコネキシンが細胞表面からの ATP 放出にどのように関わるのかについても今後の解明が待たれる。

(4) ATP 含有小胞の開口放出

自律神経終末においては、ATP はノルアドレナリンやアセチルコリンなどと共に神経伝達物質として小胞が開口放出されることが知られている。非神経細胞における ATP 放出も同様のメカニズムで生じるという可能性が最近報告されている。ヒト臍帯静脈内皮細胞において、キナクリンで細胞内の ATP を染色すると顆粒状に細胞質に分布して

おり、また剪断力による ATP 放出は細胞内小胞輸送の阻害薬 (monensin および N-ethyl-maleimide) によって抑制されたことが報告された(18)。またアフリカツメガエル卵母細胞においても、灌流液を吹きつける機械刺激で ATP 放出が生じ、これが細胞内の小胞移送を阻害する brefeldin A やアクチン重合阻害薬 cytochalasin D によって抑制された(19)。ATP 含有小胞の開口放出という概念は、基本的に細胞質中の ATP が放出されることを前提とするその他の放出機構と相容れないものではあるが、神経終末では既に確立された放出機序であり、生体内の ATP 放出機構として何らかの役割を果たしている可能性は高いと考えられる。機械的な刺激が、どのような細胞内情報によって小胞の細胞膜表面への移行と開口放出につながるのか、興味が持たれるところである。

(5) 大コンダクタンス陰イオンチャネル

機械刺激やアゴニスト刺激による ATP の放出が様々な陰イオンチャネル阻害薬で種々の程度に抑制されるという報告は以前より散見される。これが前記の P 糖タンパクや CFTR が ATP 透過経路の候補とされた理由の一つであったが、Sabirov らは培養乳腺ガン細胞株 C127i において、低浸透圧刺激を加えたときに生じる ATP 放出が新規の大コンダクタンス陰イオンチャネルを介することを報告した(20)。容積感受性陰イオンチャネル (volume-regulated anion channel, 以下 VRAC) 電流を phloretin で抑制した条件下で低浸透圧刺激を与えると、12 分程度の潜時の後に 400 pS 前後のシングルチャネルコンダクタンスをもつ新たな陰イオン電流が生じ、 Gd^{3+} によってこの電流と ATP 放出の両者が抑制されること、さらに 100 mM ATP を陰電荷としたときに ATP 電流が測定されることなどから、筆者らはこの新規陰イオンチャネルが ATP の放出経路であると結論づけた(20)。しかし現在までこのようなコンダクタンスと活性化様式の陰イオンチャネルが血管内皮細胞に存在するという報告はなく、従って血管内皮においてこのチャネルが機械刺激による ATP 放出に関与しているかどうかは不明である。

3. 大動脈内皮における VRAC を介した ATP 放出

我々はウシ大動脈内皮細胞 (BAEC) において VRAC が機械刺激による ATP 放出の経路であることを報告した(21)。本章では我々の知見についてのべる。

血管内皮が生体内で曝される機械刺激の典型は剪断力で、これによる ATP 放出もよく知られているが(3)、剪断力刺激下に電流記録を行うことの技術的困難さを避けて、我々は剪断力と同様に ATP 放出をもたらす低浸透圧刺激を用いて一連の検討を行った。

VRAC 電流は低浸透圧刺激による細胞腫脹によって活

Fig. 1 A. Luciferin chemiluminescence obtained by hypotonic stress-induced ATP release from bovine aortic endothelial cells. Cells were grown on a 96-well culture plate and exposed to isotonic or hypotonic solution for 10 min. Chemiluminescence images of a representative well for each condition are shown (unpublished data). B & C. Dose-response relationships of glibenclamide (B) and fluoxetine (C) on VRAC current at 50mV (open symbols) and HTS-induced [ATP]₀ increase (closed symbols). HTS of 20% was used for both measurements. (Reproduced from ref. 21 by copyright permission of The Rockefeller University Press)

性化され、Cl⁻以外にも大分子量のグルタミン酸やタウリンなどの陰イオンも透過させ(22)、血管内皮細胞以外にも多くの細胞で観察される。その活性化にはイオン強度の変化や小分子Gタンパクなどが関与すると報告されているが(23)、多くの努力が払われてきたにもかかわらずその分子実体はなお不明であり、特異的な阻害薬も存在しない。VRAC電流であることの同定は、低浸透圧刺激によって活性化される陰イオン電流であることと、VRAC阻害作用が報告されている物性の異なるいくつかの薬物で抑制されるという薬理学的証拠より行われる。ただし、各種のVRAC阻害薬の特異性は低く、その阻害作用には細胞種ごとに特異性が大きく異なり、ある細胞で抑制効果を示し

た薬物が別の細胞種では全く無効な場合もある。

VRACは低浸透圧刺激のみでなく剪断力などの他の機械刺激でも調節されることが知られており(24)、また多くの細胞で低浸透圧刺激によってATPが放出されることもよく知られている(4)。我々は、BAECにおける低浸透圧刺激によるATP放出(Fig. 1A)とVRACの活性化にいくつかの共通点を見出した。すなわち、両者の活性化にはチロシンキナーゼとRho/Rho-キナーゼが関与し(25, 26)、また低浸透圧刺激によるVRACの活性化は細胞が腫脹する時間経過に従って1分以内に出現し、その後数分で最大となるが(27)、ATP放出の時間経過もこれに一致する(25)。さらに、血管内皮細胞でVRAC阻害作用を持つfluoxetine

Fig. 2 A. Voltage-dependent inhibition of VRAC current with extracellular ATP. B. Current inhibition at positive membrane potentials, calculated from the I-V curves (ii and iii) after correction for the current in isotonic solution (i). Note the prominent increase of inhibition by depolarization and its relief at more pronounced depolarizing potentials. The solid line represents the fits of the data points to Eq. 13. Values for $K_d(0)$ and r of the fitted curve were 2.7, 0.44 and 0.10 mM, respectively (unpublished data). C. Two-barrier, single site model for voltage-dependent ATP-block. The voltage-dependent block of VRAC by ATP^{4-} can be understood if it moves into the electric field of the pore. The ATP-binding site is represented as a free-energy well at an electrical distance δ from the outside, which corresponds to the fraction of voltage drop between the outside and the site. The depth of the well is related to the affinity $K_d(0)$ of the binding site for ATP, and r represents a parameter determined by the difference in height between the two side-barriers.

と glibenclamide の VRAC 電流抑制作用の濃度反応曲線が、これらの薬物による ATP 放出抑制の用量依存性に一致した (Fig. 1B & C) (21)。

ATP が VRAC を透過するより直接的な証拠は、これまで P 糖タンパク (10), CFTR (12) および大コンダクタンス陰イオンチャネル (20) で用いられたように、陰イオンを全て ATP に置換した条件で VRAC を活性化させていわゆる VRAC-ATP 電流を測定することであろう。しかし、

ATP には膜のスッキング作用があり、例えば心筋細胞では 6 mM の細胞外 ATP で細胞膜透過性が亢進し 6 個のアミノ酸からなるペプチドが取り込まれた結果が報告されている (28)。実際我々も BAEC において 10 mM 以上の ATP を細胞外に用いると膜のリークが増大して電流測定の継続が困難になることをしばしば経験した。従って、細胞内外の電荷をすべて ATP とした条件下で電流記録を行うと、リーク電流が ATP 電流として計測されてしまう危険があ

Fig. 3 Comparison of molecular diameter between ATP and calix[4]arene, a known permeating blocker of VRAC (31). Molecular images were depicted with RasMol. Note that molecular size of ATP is close to that of calix[4]arene.

る．我々はこれを避けるために，低濃度の細胞外 ATP による VRAC 電流の電位依存性抑制を透過型阻害薬モデルを用いて解析した．VRAC には細胞外の ATP によって電位依存性に抑制されるという特徴があり(29)，またその結合阻害部位がチャンネル内部にあることが以前より推定されていた(30)．

ATP で P_{2Y} 受容体が刺激されても Ca^{2+} 動員が生じないように予め thapsigargin で細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位を不可逆的に枯渇させたのち，低浸透圧刺激を与えて VRAC を活性化させた．その後細胞外に 1 mM の ATP (ATP_o としは 0.15 mM) を投与すると，VRAC 電流は外向き成分がわずかに抑制を受けた(Fig. 2A)．ATP 投与前の VRAC 電流の大きさを 100% として膜電位-電流抑制率関係をプロットすると，+40 ~ +50 mV を抑制のピークとするベル型パターンを示した(Fig. 2B)．

ここで，ATP がチャンネル内に他の陰イオンと競合しない結合部位をもち，いわゆる透過型阻害薬の作用を持つと仮定した場合，VRAC と ATP との結合と解離の関係は次のモデルで表される．

VRAC はチャンネルタンパクを示し， ATP_o と ATP_i は細胞外と細胞内の ATP を， $ATP \cdot VRAC$ はチャンネル内の結

合部位に ATP が結合した状態を， $k_{01}(V)$ ， $k_{10}(V)$ ， $k_{12}(V)$ ， $k_{21}(V)$ は電位に依存する各状態間の速度定数を示す．電位 V で細胞内外の ATP 濃度がそれぞれ $[ATP]_o$ と $[ATP]_i$ のとき，ATP によって占められるチャンネルの割合は，次の式で表される(詳細は Fig. 2C および補遺参照)．

$$f([ATP]_o, [ATP]_i, V) =$$

$$\frac{1}{1 + K_d(0) \cdot \exp\left(\frac{zF\delta V}{RT}\right) \cdot \frac{1 + r \cdot \exp\left(\frac{-zFV}{2RT}\right)}{[ATP]_o + [ATP]_i \cdot r \cdot \exp\left(\frac{zFV}{2RT}\right)}}$$

このとき，電位 V における細胞外 ATP^{4-} (0.15 mM) による電流抑制率は以下の式で与えられる．

$$Inhibition = 1 - \frac{1 - f([ATP]_o = 0.15, [ATP]_i, V)}{1 - f([ATP]_o = 0, [ATP]_i, V)}$$

この式で 9 個の細胞から得られたデータをフィットさせたところ，各パラメーターの値は， $K_d(0) 1.0 \pm 0.5$ mM， 0.41 ± 0.03 ， $r (= k_{12}(0)/k_{10}(0)) 0.38 \pm 0.08$ となった．すなわち，0 mV の膜電位において，細胞内外の ATP は解離定数 1 mM で VRAC チャンネルの細胞外側より電気的距離 41% の部位に結合し，結合した ATP は $r/(1+r) = 0.28$ の確率で細胞内に移行し，0.72 の確率で細胞外へ移行すると解釈できる(Fig. 2C 参照)．この結果は VRAC チャンネルを ATP が透過しうることを意味しており，これと前記の薬理学的検討結果(Fig. 1B&C)から，少なく

とも低浸透圧刺激によって BAEC から放出される ATP は VRAC を介すると我々は結論付けた (21)。

なお、陰性荷電をもつ大環状化合物である calix [4] arene も VRAC 電流に対してベル型の透過型阻害パターンを示すことから、この物質は VRAC チャンネルを透過することが報告され、少なくともこの物質の分子径より VRAC チャンネル孔径は大きいと考えられている (31)。この両分子の構造を比較検討すると、Fig. 3 に示すように ATP の分子サイズは calix [4] arene と同程度で、分子の大きさから ATP は VRAC を透過しうるものと考えられた。

4. おわりに

本稿では血管内皮細胞を中心に ATP 放出経路について概説した。種々の仮説について述べたが、おそらく ATP

の放出経路は細胞種ごとに異なると思われる、またひとつの細胞種でも複数の経路が関与すると推定される。例えば我々が用いた各種の VRAC 阻害薬は低浸透圧刺激による ATP 放出は抑制したものの非刺激時の細胞外 ATP 濃度には影響を与えず (21)、少なくとも非刺激時の ATP 基礎放出は VRAC を通さないと思われる。従って、本稿で述べたどの説も他の報告を否定するものではないと我々は考えている。VRAC の分子実体が解明され、その特異的な阻害薬が開発されれば、VRAC を介した ATP 放出がさらに詳細に検討されると思われる。

血管内皮細胞よりの ATP 放出の生理的、病態生理的および薬理学的意義を考えれば、この分野の研究は今後重要性を増すものと思われる。多くの研究者の参入によってさらに解明が進むことを期待したい。

補 遺

細胞内の ATP (ATP_i) が容積感受性陰イオンチャンネル (VRAC) と結合し、さらに細胞外 (ATP_o) に透過するとした場合、チャンネル内に ATP が結合した状態を $ATP \cdot VRAC$ と表すと、これらの関係は次の反応式で示される。

各状態間の移行定数は速度反応論の定理より以下の式で表現される (ただし、 z : 電荷、 δ : 細胞外より結合部位までの距離、 F : ファラデー定数、 R : 気体定数、 T : 絶対温度、 V : 電位)。

$$k_{01}(v) = k_{01}(0) \cdot \exp(-zF\delta V/2RT) \quad (2) \quad k_{10}(v) = k_{10}(0) \cdot \exp(zF\delta V/2RT) \quad (3)$$

$$k_{12}(v) = k_{12}(0) \cdot \exp\{-zF(1-\delta)V/2RT\} \quad (4) \quad k_{21}(v) = k_{21}(0) \cdot \exp\{zF(1-\delta)V/2RT\} \quad (5)$$

また、ATP と VRAC との結合定数 ($K_d(0)$) は移行定数を用いて次の式で表される。

$$K_d(0) = \frac{k_{10}(0)}{k_{01}(0)} = \frac{k_{12}(0)}{k_{21}(0)} \quad (6)$$

さらにこれから次の関係式も導かれる。

$$k_{12}(0) = r \cdot k_{10}(0) \quad (7) \quad k_{21}(0) = r \cdot k_{01}(0) \quad (8)$$

ここで、(1) を等式で表すと次のようになる。

$$k_{01}(v) \cdot [ATP]_o \cdot [VRAC] + k_{21}(v) \cdot [ATP]_i \cdot [VRAC] = \{k_{10}(v) + k_{12}(v)\} \cdot [ATP \cdot VRAC] \quad (9)$$

また、チャンネルは ATP と結合しているかいないかのどちらかであるため、次の式が成り立つ。

$$[VRAC] + [ATP \cdot VRAC] = 1 \quad (10)$$

(2)~(8)および(10)を用いて(9)を $[ATP \cdot VRAC]$ について解くと、次のような式が得られる。なおこれは $[ATP]_o$ と $[ATP]_i$ と V についての関数となるため、 $f([ATP]_o, [ATP]_i, V)$ と表記する。

$$f([ATP]_o, [ATP]_i, V) = \frac{1}{1 + K_d(0) \cdot \exp(\frac{zF\delta V}{RT}) \cdot \frac{1 + r \cdot \exp(\frac{-zFV}{2RT})}{[ATP]_o + [ATP]_i \cdot r \cdot \exp(\frac{zFV}{2RT})}} \quad (11)$$

ここで、ATP が細胞内外に存在しないと仮定したときの仮想 VRAC 電流の大きさを $I_{ATP-free}$ とすると、実際に記録される電流の大きさ I は (10) と (11) より次の式となる。

$$I = I_{ATP-free} \cdot [VRAC] = I_{ATP-free} \cdot \{1 - f([ATP]_o, [ATP]_i, V)\} \quad (12)$$

従って、細胞外に a mol/L の ATP を加えたことによる VRAC 電流の抑制度は次の式で表される。

$$Inhibition = 1 - \frac{1 - f([ATP]_o = a, [ATP]_i, V)}{1 - f([ATP]_o = 0, [ATP]_i, V)} \quad (13)$$

文 献

- 1) Davies PF. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev.* 1995;75:519-560.
- 2) Pearson JD, Gordon JL. Vascular endothelial and smooth muscle cells in culture selectively release adenine nucleotides. *Nature.* 1979;281:384-386.
- 3) Bodin P, Bailey D, Burnstock G. Increased flow-induced ATP release from isolated vascular endothelial cells but not smooth muscle cells. *Br J Pharmacol.* 1991;103:1203-1205.
- 4) Oike M, Kimura C, Koyama T, et al. Hypotonic stress-induced dual Ca^{2+} responses in bovine aortic endothelial cells. *Am J Physiol.* 2000;279:H630-H638.
- 5) Kimura C, Koyama T, Oike M, et al. Hypotonic stress-induced NO production in endothelium depends on endogenous ATP. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;274:736-740.
- 6) Burnstock G. Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:364-373.
- 7) Bodin P, Burnstock G. Increased release of ATP from endothelial cells during acute inflammation. *Inflamm Res.* 1998;47:351-354.
- 8) Hammer LW, Overstreet CR, Choi J, et al. ATP stimulates the release of prostacyclin from perfused veins isolated from the hamster hindlimb. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003;285:R193-199. Epub 2003 Mar 2020.
- 9) Kalinowski L, Dobrucki LW, Szczepanska-Konkel M, et al. Third-generation beta-blockers stimulate nitric oxide release from endothelial cells through ATP efflux: a novel mechanism for antihypertensive action. *Circulation.* 2003;107:2747-2752.
- 10) Abraham EH, Prat AG, Gerweck L, et al. The multidrug resistance (mdr1) gene product functions as an ATP channel. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90:312-316.
- 11) Roman RM, Wang Y, Lidofsky SD, et al. Hepatocellular ATP-binding cassette protein expression enhances ATP release and autocrine regulation of cell volume. *J Biol Chem.* 1997;272:21970-21976.
- 12) Reisin IL, Prat AG, Abraham EH, et al. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a dual ATP and chloride channel. *J Biol Chem.* 1994;269:20584-20591.
- 13) Reddy MM, Quinton PM, Haws C, et al. Failure of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to conduct ATP. *Science.* 1996;271:1876-1879.
- 14) Braunstein GM, Roman RM, Clancy JP, et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator facilitates ATP release by stimulating a separate ATP release channel for autocrine control of cell volume regulation. *J Biol Chem.* 2001;276:6621-6630.
- 15) Roman RM, Lomri N, Braunstein G, et al. Evidence for multidrug resistance-1 P-glycoprotein-dependent regulation of cellular ATP permeability. *J Membr Biol.* 2001;183:165-173.
- 16) Cotrina ML, Lin JH, Alves-Rodrigues A, et al. Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:15735-15740.
- 17) Braet K, Aspeslagh S, Vandamme W, et al. Pharmacological sensitivity of ATP release triggered by photoliberation of inositol-1,4,5-trisphosphate and zero extracellular calcium in brain endothelial cells. *J Cell Physiol.* 2003;197:205-213.
- 18) Bodin P, Burnstock G. Evidence that release of adenosine triphosphate from endothelial cells during increased shear stress is vesicular. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2001;38:900-908.
- 19) Maroto R, Hamill OP, Brefeldin A block of integrin-dependent mechanosensitive ATP release from *Xenopus* oocytes reveals a novel mechanism of mechanotransduction. *J Biol Chem.* 2001;276:23867-23872.
- 20) Sabirov RZ, Dutta AK, Okada Y. Volume-dependent ATP-conductive large-conductance anion channel as a pathway for swelling-induced ATP release. *J Gen Physiol.* 2001;118:251-266.
- 21) Hisadome K, Koyama T, Kimura C, et al. Volume-regulated anion channels serve as an auto/paracrine nucleotide release pathway in aortic endothelial cells. *J Gen Physiol.* 2002;119:511-520.
- 22) Manolopoulos VG, Voets T, Declercq PE, et al. Swelling-activated efflux of taurine and other organic osmolytes in endothelial cells. *Am J Physiol.* 1997;273:C214-222.
- 23) Nilius B, Eggermont J, Droogmans G. The endothelial volume-regulated anion channel, VRAC. *Cell Physiol Biochem.* 2000;10:313-320.
- 24) Romanenko VG, Davies PF, Levitan I. Dual effect of fluid shear stress on volume-regulated anion current in bovine aortic endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002;282:C708-718.
- 25) Koyama T, Oike M, Ito Y. Involvement of Rho-kinase and tyrosine kinase in hypotonic stress-induced ATP release in bovine aortic endothelial cells. *J Physiol.* 2001;532:759-769.
- 26) Voets T, Manolopoulos V, Eggermont J, et al. Regulation of a swelling-activated chloride current in bovine endothelium by protein tyrosine phosphorylation and G proteins. *J Physiol.* 1998;506:341-352.
- 27) Voets T, Droogmans G, Raskin G, et al. Reduced intracellular ionic strength as the initial trigger for activation of endothelial volume-regulated anion channels. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96:5298-5303.
- 28) Johnson JA, Gray MO, Karliner JS, et al. An improved permeabilization protocol for the introduction of peptides into cardiac myocytes. Application to protein kinase C research. *Circ Res.* 1996;79:1086-1099.
- 29) Nilius B, Sehrer J, Droogmans G. Permeation properties and modulation of volume-activated Cl^- currents in human endothelial cells. *Br J Pharmacol.* 1994;112:1049-1056.
- 30) Tsumura T, Oiki S, Ueda S, et al. Sensitivity of volume-sensitive Cl^- conductance in human epithelial cells to extracellular nucleotides. *Am J Physiol.* 1996;271:C1872-1878.

31) Droogmans G, Prenen J, Eggermont J, et al.
Voltage-dependent block of endothelial volume-

regulated anion channels by calix[4]arenes. *Am J Physiol.* 1998;275:C646-652.

Abstract - ATP release pathways in vascular endothelial cells. Masahiro OIKE¹⁾, Guy DROOGMANS²⁾, and Yushi ITO¹⁾ (¹⁾Department of Pharmacology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University. Fukuoka 812-8582, Japan, and ²⁾Laboratorium voor Fysiologie, Katholieke Universiteit Leuven, Campus Gasthuisberg. B-3000 Leuven, Belgium)

Folia Pharmacol. Jpn. (Nippon Yakurigaku Zasshi) **123**, 403 ~ 411 (2004)

Vascular endothelial cells regulate vascular tonus, growth, and angiogenesis in response to mechanical stresses. ATP release is one of well-known mechanosensitive responses in endothelial cells. Released ATP induces Ca^{2+} responses and nitric oxide production in neighboring cells in an auto/paracrine manner. Mechanosensitive and agonist-induced ATP releases are also observed in other cell types, but the cellular mechanisms and pathways of ATP release are largely unknown. Reported candidates for ATP release pathways are ABC proteins including P-glycoprotein and CFTR, exocytosis of ATP-containing vesicles, and ATP-permeable anion channels. In vascular endothelium, vesicular exocytosis, volume-regulated anion channels (VRAC), and connexin hemichannels have been reported as candidates for ATP release pathways. We found that VRAC inhibitors suppressed hypotonic stress-induced ATP release in bovine aortic endothelial cells. Furthermore, extracellular ATP suppressed VRAC current in a voltage dependent manner, which could be fitted to the permeation-blocker model with a K_d of 1 mM and α value of 0.41. However, it should be noted that VRAC is probably not the only pathway for ATP release in the endothelium, because basal ATP release was not inhibited by VRAC inhibitors. Further investigations are definitely warranted to clarify the details and therapeutic significance of mechanosensitive ATP release in the endothelium.

Keywords: vascular endothelium; ATP release; anion channel; mechanical stress

著者プロフィール

大池 正宏 (おおいけ まさひろ)

九州大学大学院医学研究院生体情報薬理学, 講師, 医学博士.

1985年九州大学医学部医学科卒業, '91年九州大学大学院医学系研究科内科系修了, '94年より現職.

主な研究テーマ: 血管内皮細胞及び平滑筋の細胞内情報伝達機構.

Guy Droogmans

ルーベンカトリック大学医学部生理学教室, 教授, Ph. D (biomedical sciences).

1960年ルーベンカトリック大学理学部卒業, '95年より現職.

主な研究テーマ: イオンチャネル, 生物物理.

伊東 祐之 (いとう ゆうし)

九州大学大学院医学研究院生体情報薬理学, 教授.

略歴その他: 120 巻 3 号 28A (2002) 理事紹介記事参照