リジンナフタレンスルフォナマイド誘導体の thrombin による血小板凝集・放出反応に及ぼす影響

中 充子* 伊藤 宏雄* 田中 利男* 日高 弘義*

Effects of lysine-naphthalene sulfonamide derivatives on the thrombin induced human platelet aggregation and the release reaction

Michiko NAKA*, Hiroo ITO*, Toshio TANAKA*
and Hiroyoshi HIDAHA*

Key words: stimulation, thrombin esterase activity, platelet
aggregation, release reaction, lysine-naphthalene-
sulfonamide derivatives

Lysine-naphthalene-sulfonamide derivatives activated TAME (tosyl-L-arginine methyl ester) esterase activity of thrombin. These compounds stimulated also thrombin-induced aggregation, ATP release and serotonin secretion from human platelet. On the other hand, analogues of these compounds which contain arginine residue in stead of lysine residue inhibited not only TAME esterase of thrombin but also thrombin-induced platelet aggregation. Lysine-naphthalene-sulfonamide and arginine-naphthalene-sulfonamide were the opposite actions each other against thrombin. The structure and activity relationship in these naphthalene-sulfonamide suggest that lysine and arginin residues play a very important role in the function of thrombin.

はじめに

トロンビンは血小板に対して強力な凝集惹起物質であるがその作用機序はいまなお不明な点が多い。しかし、その作用機序にトロンビンの蛋白分解活性が重要な役割を果していることは

DIP-トロンビンが血小板の凝集や放出を起さないことなどから推定されている¹⁾。一方エステル分解活性を持つアセチル化トロンビンがフィブリノーゲンおよび血小板にほとんど作用しないという例もあり詳細は明らかではない。われわれは以前よりリジン残基を持つ誘導体を数

* 三重大学医学部薬理学教室 (〒514 津市江戸橋2-174), Department of Pharmacology, Mie University School of Medicine, Mie, Japan.

Fig. 1 Effects of NCM106, No. 258 and No. 213 on human platelet aggregation.

多く独自に合成し、その生物活性を検討^{2~5)}、その誘導体のうち一部が TAME (tosyl-L-arginine methyl ester) を基質としたトロンビンのエステラーゼ活性を高めることを明らかにした。本論文ではこれら薬物のトロンビンエステラーゼ活性に対する影響およびヒト血小板のトロンビン凝集、ATP およびセロトニン放出に対する影響についても検討したので報告する。一方アルギニン残基を有する一連の化合物が岡本らによってトロンビンの強力な阻害剤であることが報告されているので⁶⁾⁷⁾ われわれの合成したリジン残基を持つ化合物とアルギニン残基を持つ化合物の構造とトロンビンに対する作用の特徴についても考察する。

I. 材料と方法

1. トロンビンのエステラーゼ活性の測定：TAME を基質として Hummel の方法⁸⁾ で分

解物を 256nm の吸光度の変化で測定した。

2. 血小板の調製：血小板はクエン酸加血 (0.38% trisodium citrate : 人全血 = 1 : 9) より作成した多血小板血漿 (PRP) より Timmons⁹⁾ らの方法にしたがい Sepharose 2B カラムを用いて分離調製した。

3. 血小板凝集、ATP 放出およびセロトニン放出の測定：血小板 (30万/cmm) 凝集と ATP 放出は CHRONO LOG 社のルミ・アグリコメーターを使用し測定した。セロトニン放出は予め血小板に ¹⁴C ラベルのセロトニンを取り込ませておき、血小板惹起物質による刺激により放出されたセロトニン放射活性を Scintillation spectrometer にて測定した。

4. 使用薬物：NCM106*, NCM107 (4-Iso-propyl-1-(N²-5-Chloro-1-naphthalenesulfonyl-homolysyl-) piperidine, No. 258*, No. 213*。

* 構造式は図に示した。

Fig. 2 Effects of NCM106 and No. 213 on platelet ATP release reaction.
A: Thrombin induced ATP release
B: Collagen induced ATP release

II. 結 果

1. われわれの合成したリジン残基を持つ NCM106, NCM107はトロンビンの TAME 分解活性を上昇させ、Lineweaver Burk plot を用いた分析により V_{max} を上昇させた結果であることが判明した。構造がよく似たアルギニン残基を持つ No. 258, No. 213 はトロンビンの TAME 分解活性を阻害した。

2. 血小板凝集に対するこれら薬物の反応は図1に示すごとく、トロンビン凝集、コラーゲン凝集に対して NCM106 は低濃度で活性化、高濃度で阻害を示した。No. 213, No. 258 はいずれの惹起物による凝集をも阻害したがトロンビン凝集ではより低濃度で作用し、No. 213 ではその特異性が高かった。

3. ATP 放出に対する薬物の効果は図2に示すごとく NCM106 では control に比して活性化、No. 213 は阻害を示したがコラーゲン、トロンビンによる差はあまりみられなかった。

4. セロトニン放出反応に対する薬物の効果

Fig. 3 Stimulation and inhibition of serotonin secretion on human platelet by NCM106 and No. 213

A: Thrombin induced ¹⁴C-5HT release
B: Collagen induced ¹⁴C-5HT release

は図3に示すごとく ATP 放出と同様 NCM106 で活性化、No. 213 で阻害を示し、NCM106 のセロトニン放出活性化作用はトロンビンで惹起した放出に対してやや強い効果を示した。

III. 考 察

リジン残基を持つ NCM106, NCM107 は TAME を基質とした場合トロンビンのエステラーゼ活性を活性化し、その作用はこれら薬物がトロンビンに直接作用していることが示唆された。一方血小板に対するトロンビンの作用に対しては、確かに有意に活性化したがその作用は血小板のトロンビン凝集に対してのみならず

コラーゲン凝集に対しても同様であり、したがって NCM106, NCM107 はトロンビンに作用しているというより血小板に直接作用している機序もあることが推定できた。アルギニン残基を持つ No. 213, No. 258 も軽度ではあるがコラーゲン凝集を阻害することを合わせて考えるとリジン残基, アルギニン残基を持つこれら薬物の血小板凝集, 放出の活性化, 阻害のメカニズムには血小板自身に直接作用している機序もかかわっていることが示唆された。

文 献

- 1) Davey, M. G. et. al.: Action of the thrombin and other coagulants and proteolytic enzymes on blood platelets. *Nature(London)* 216, 857, 1967.
- 2) Hidaka, H., Yamaki, T., Totsuka, T. and Asano, M.: Selective inhibitors of Ca^{2+} -binding modulator of phosphodiesterase produce vascular relaxation and inhibit actin-myosin interaction. *Mol. pharmacol.* 15, 49~59, 1979.
- 3) Hidaka, H., Naka, M., and Yamaki, T.: Effect of novel specific myosin light chain Kinase inhibitors on Ca^{2+} -activated Mg^{2+} -ATPase of chicken gizzard actomyosin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 90, 694~699, 1979.
- 4) Kobayashi, R., Tawata, M. and Hidaka, H.: Ca^{2+} -regulated modulator protein interacting agents: inhibition of Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase of human erythrocyte ghost. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 88, 1037~1045, 1979.
- 5) Hidaka, H., Yamaki, T., Naka, T., Hayashi, H. and Kobayashi, R.: Calciumregulated modulator protein interacting agents inhibit smooth muscle calciumstimulated protein Kinase and ATPase. *Mol. Pharmacol.* 17, 66~72, 1980.
- 6) Okamoto, S., Hijikata, A., Kinjo, K., Kikumoto, R., Ohkubo, K., Tonomura, S. and Tamao, Y.: A novel series of synthetic thrombin-inhibitors having extremely Potent and highly selective action. *Kobe J. Med. Sci.* 21, 48~51, 1975.
- 7) Okamoto, S., Hijikata, A., Ikezawa, K., Kinjo, K., Kikumoto, R., Tonomura, S. and Tamao, Y.: A new series of synthetic thrombin inhibitors (OM-inhibitors) having extremely potent and selective action. *Thromb. Res., Suppl.* 2, 8, 77~82, 1976.
- 8) Hummel, B. C. W.: A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin, and thrombin. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 1393, 1959.
- 9) Timmons, s. and Hawiger, J.: Separation of human platelets from plasma proteins including factor VIII by a combined albumin gradient-gel filtration method using HEPES buffer. *Thromb. Res.* 12, 297~306 1978.

●白血病治療の理論と実際！

白血病の化学療法—基礎と臨床

編集 滋賀医科大学学長 脇坂行一 専門医28名分担執筆

A 5 判 292頁 図60 表42 定価5,800円(千200円)

〒101 東京都千代田区神田多町2-11

科学評論社

振替口座東京 7-102026
電話 03-252-7768