3T3 フィibroブラストによるエイコサペンタエン酸 由来のプロスタサイクリン様物質の生成

高畑 京也* 新村 浩一* 久米 章司*
山中 学* 荻家 利承**

Production of prostacyclin like substance from eicosapentaenoic acid in fibroblasts

Kyoya TAKAHATA*, Koichi NIIMURA*, Shoji KUME*,
Manabu YAMANAKA* and Toshitsugu KARIYA**

Key words: eicosapentaenoic acid (EPA), 3T3 fibroblasts,
prostacyclin-like substance, PGI₃, ¹⁷Δ-6-keto-
PGF_{1α}

There has been a discrepancy in several investigators whether prostacyclin-like substance (PGI₃) might be produced from eicosapentaenoic acid (EPA) in the vessel wall. Production of PGI₃ from EPA in 3T3 fibroblasts, which had an ability to produce prostacyclin (PGI₂) from arachidonic acid (AA), was studied. After various times of incubation with EPA and 3T3 fibroblasts, aliquots of the culture media were transferred to platelet-rich plasma, to which ADP was added to induce aggregation. Inhibition of platelet aggregation was observed with samples removed after short minutes incubation, but not from longer periods incubation. The addition of tranlylcypromine, an inhibitor of prostacyclin synthetase, to the culture media blocked the formation of a labile inhibitor of platelet aggregation. These data demonstrated sufficient synthesis of PGI₃ like substance to account for the inhibition of platelet aggregation. But the inhibitory effect of platelet aggregation by PGI₃ like substance from EPA was weaker than by PGI₂ like substance from AA. The formations of PGI₃ and PGI₂ produced from EPA and AA by the culture of 3T3 fibroblasts were measured as their stable metabolites ¹⁷Δ-6-keto-PGF_{1α} and 6-keto-PGF_{1α} respectively by gas chromatography-mass spectrometry. Unexpectedly, the amount of ¹⁷Δ-6-keto-

* 東京大学医学部中央検査部 [〒113 東京都文京区本郷 7-3-1], Central Clinical Laboratory, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, Japan.

** 佐賀医科大学内科, Department of Medicine, Saga Medical College, Saga, Japan.

PGF_{1α} was higher than that of 6-keto-PGF_{1α}. These observations suggest that PGI₃ is inferior to PGI₂ in the ability to inhibit platelet aggregation.

はじめに

エイコサペンタエン酸 (EPA) は、血小板において、血小板のサイクロオキシゲナーゼの良い基質とはなり得ず、したがってサイクロオキシナーゼとの反応段階でアラキドン酸 (AA) と競合することが、血小板側よりみた EPA の血小板凝集抑制のおもな原因であるといわれている¹⁾。一方、EPA は、血管壁において AA と同様に、血小板凝集阻害作用を示すプロスタサイクリン様物質を産生し得るかどうかは、まだ十分検討はなされておらず、またその結果もまちまちである²⁻⁵⁾。われわれはその点を検討するためにプロスタサイクリン産生のモデル細胞として 3T3 フィブロblast 細胞を用い、EPA 由来のプロスタサイクリン様物質産生実験を行い、AA 由来のプロスタサイクリン様物質産生の比較を行った。

I. 材料・方法

用いた EPA および AA は親水性付加のためナトリウム化を行って実験に用いた。

Dulbeccos MEM で培養した Balb/c 3T3 フィブロblast を実験直前にリン酸緩衝生理食塩液 (PBS) で 2 回洗浄後、さらに細胞 10⁶ 個当たり 2 ml の PBS を添加した。これに一定量の EPA または AA を添加し、37°C にて一定時間孵置後、その上清の一部を採取した。この上清中のプロスタサイクリン様物質を Claesson らによるバイオアッセイ法⁶⁾および PGI₃ の安定代謝物である ¹⁷Δ-6-keto-PGF_{1α} あるいは PGI₂ の安定代謝物である 6-keto-PGF_{1α} をガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー (GC・MS) 法⁷⁾にて測定した。なおこのように ¹⁷Δ-6-keto-PGF_{1α} を GC・MS 法により定量したのは、今回初めてと思われる。

II. 結果および考察

図 1 に EPA あるいは AA を基質として産

Fig. 1 Comparison of EPA with arachidonic acid with respect to production of prostacyclin-like activity.

生されるプロスタサイクリン様活性をバイオアッセイ法で比較した。EPA あるいは AA を 50 μl/ml 3T3 フィブロblast に添加し、1 分後の培養上清を PRP に加えると血小板凝集の抑制効果が認められた。しかしこの抑制効果は孵置時間が長くなるにつれ消失し、10 分間孵置上清ではこの効果は認められなかった。またプロスタサイクリン合成酵素阻害剤であるトラニルサイプロミンを添加したものでは、血小板凝集抑制効果の発現は認められなかった。以上より、培養上清中の血小板凝集抑制物質は不安定であり、またプロスタサイクリン合成酵素阻害剤で産生が阻害されることにより、EPA を基質として 3T3 フィブロblast によりプロスタサイクリン様物質が産生されることがバイオアッセイ的に証明された。しかし、EPA 由来

Table 1 The amount of prostacyclin-like substances produced by 3T3 fibroblasts

AA added to 3T3 Fibroblasts ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	6-keto-PGF _{1α} (ng/mL)	EPA added to 3T3 Fibroblasts ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Δ^{17} -6-keto-PGF _{1α} (ng/mL)
10	90.5	10	137.5
50	164.5	50	178.0
500	202.8	500	550.0

*determined by GC-MS method

のものはAA由来のものに比べプロスタサイクリン様活性は弱いことが判明した。これは、産生量の差であるのか、生理活性の質的な差に由来するのかを明らかにするため、GC-MS法により定量を行った。表1に示すように、培養上清中に産生されたプロスタサイクリン様物質の安定代謝物、すなわちEPA由来の Δ^{17} -6-keto-PGF_{1 α} およびAA由来の6-keto-PGF_{1 α} の量を各種添加濃度で検討した。その結果AA由来およびEPA由来いずれも、産生量に濃度依存性が認められたが、EPA由来のものはAA由来のものに比べむしろ産生量が多いことが判明した。すなわちEPA由来のものに比べ多いにもかかわらず、血小板凝集阻止効果は弱いことが判明し、このことはPGI₂の血小板凝集阻止能に関する生理活性がPGI₂に比べ劣っていることを示していると思われる。

文 献

- 1) Needleman, P., Raz, A., Minkes, M.S., Ferrendelli, J.A. and Sprecher, H.: Triene prostaglandins: prostacyclin and thromboxane biosynthesis and unique biological properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**; 944~948, 1979.
- 2) Hornstra, G., Christ-Hazelhof, E., Haddeman, E., Ten. Hoor, F. and Nugteren, D.H.: Fish oil feeding lowers thromboxane and prostacyclin production by rat platelets and aorta and does not result in the formation of prostaglandin I₃. *Prostaglandins*, **21**; 727~738, 1981.
- 3) Dyerberg, J. and Jørgensen, K.A.: The effect of arachidonic and eicosapentaenoic acid on the synthesis of prostacyclin-like material in human umbilical vasculature. *Artery*, **8**; 12~17, 1980.
- 4) Dyerberg, J., Jørgensen, K.A. and Arnfred, T.: Human umbilical blood vessel converts all cis-5, 8, 11, 14, 17 eicosapentaenoic acid to prostaglandin I₃. *Prostaglandins*, **22**; 857~862, 1981.
- 5) Hamaguchi, T., Hirai A., Terano, T., Sajiki, J., Kondo, S., Fujita, T., Tamura, Y. and Kumagai, A.: Effect of orally administered ethyl ester of eicosapentaenoic acid (EPA; C20: 5, ω 3) on PGI₂-like substance production by rat aorta. *Prostaglandins*, **23**; 557~568, 1982.
- 6) Claesson, H.E., Lindgren, J.A. and hammarström, S.: Elevation of adenosine 3', 5'-monophosphate levels in 3T3 fibroblasts by arachidonic acid: Evidence for mediation by prostaglandin I₂. *FEBS Letters*, **81**; 415~418, 1977.
- 7) Nidy, E.G. and Johnson, R.A.: Synthesis of Prostaglandin I₃ (PGI₃). *Tetrahedron Letters*, **27**; 2375~2378, 1978.