ヒト培養血管内皮細胞の PGI₂ 産生に及ぼす Ca 拮抗薬の影響とその作用機序

豊田 武夫* 丹波 勇* 辻 肇* 三上 欽司*
長村 吉朗* 林 謙宏* 貝増 勲彦* 木谷 輝夫*
中川 雅夫* 伊地知浜夫*

Effect of Ca antagonists on PGI₂ generation in cultured
human vascular endothelial cells with special reference
to their mode of action

Takeo TOYODA*, Isamu NIWA*, Hajime TSUJI*, Kinji MIKAMI*,
Kichiro OSAMURA*, Kenhiro RIN*, Isao KAIMASU*, Teruo KITANI*,
Masao NAKAGAWA* and Hamao IJICHI*

Key words: endothelial cell, PGI₂, Ca antagonist, c-AMP,
calcium ion

Endothelial cells were isolated from human umbilical cord and cultured by the modified method of Jaffe et al. 6-keto PGF_{1α} content in supernatant over the monolayer cells was employed as the parameter of PGI₂ generation. PGI₂ generation was increased by addition of Nifedipine ($\times 2.10$) > Diltiazem ($\times 1.78$) > Verapamil ($\times 1.59$). This effect was diminished when the cells were pretreated with each of Mepacrine or ASA, even when Arachidonic acid or PGH₂ was added. The increase of PGI₂ generation by Ca antagonist was considered to be due to activation of phospholipase A₂. The PGI₂ generation induced by A-23187, Arachidonic acid, or PGH₂ was remarkably decreased by preincubating the cells with TMB-8. The dependency of PGI₂ generation upon the intracellular Ca⁺⁺ was considered to be dominant in the early step of AA cascade. The enhanced PGI₂ generation by A-23187 or Diltiazem was almost diminished in Ca⁺⁺ free medium. While preincubation with MIX caused increase in intracellular c-AMP concentration, and decrease in PGI₂ generation, addition of Diltiazem had no

effect on c-AMP concentration. Through these experimental results, it is concluded that the enhanced PGI₂ generation via phospholipase A₂ induced by Diltiazem may be originated from intra- and extra- cellular Ca⁺⁺ mobilization and may not be dependent on c-AMP process.

はじめに

われわれは従来大動脈輪ならびに培養血管内皮細胞を用いて、これらの PGI₂ 産生におよぼす種々の薬剤の効果につき報告してきたが¹⁾、今回はヒト培養血管内皮細胞を用いてこの PGI₂ 産生におよぼす Ca 拮抗薬の影響、ならびにその作用機序を検討した。

I. 方 法

Jaffe ら²⁾の方法に準じて、ヒト臍帯静脈より血管内皮細胞を分離培養し、培養開始5～7日後の Confluent 形成した培養細胞を用いた。まず保生液に種々の濃度の Nifedipine (NDP), Diltiazem (DTZ) または Verapamil (VPM) を添加し、内皮細胞より産生される 6-Keto P GF_{1α} を RIA 法にて定量した³⁾。次にこれら諸薬剤の PGI₂ 産生におよぼす作用機序を検討するため、(1)Mepacrine 前処置後アラキドン酸 (A.A.) を添加した系、ならびにアセチルサリチル酸 (ASA) 前処置後 PGH₂ を添加した系に、DTZ または VPM をそれぞれ添加した実験系、(2)TMB-8 にて前処置後 Ca ionophore A-23187, A.A. または PGH₂ をそれぞれ別個に添加した実験系、(3)EGTA の添加により Ca⁺⁺ free とした保生液に A-23187 または D

TZ をそれぞれ添加した実験系、(4)MIX 前処置後 DTZ を添加した実験系、などについて保生液中の PGI₂ 産生量、および内皮細胞内 c-AMP 量を測定した⁴⁾。

II. 結 果

(1)培養内皮細胞の保生液への諸薬剤の添加は PGI₂ 産生を増加させ、その効果は NDP (2.1 倍)>DTZ (1.78倍)>VPM (1.59倍) の順に大であった。(2)Mepacrine による phospholipase 阻害下での A.A. の添加系、ならびに ASA による cyclooxygenase 阻害下での PGH₂ の添加系では DTZ および VPM による PGI₂ 産生増加作用は認めなかった。(3)A-23187, A.A., または PGH₂ の添加時には PGI₂ 産生は増加するが、この増加は TMB-8 前処置により著明に抑制され、この抑制効果は A-23187 添加時が最も著明であった(表1)。(4)EGTA 添加による Ca⁺⁺ free の保生系への A-23187 または DTZ の添加時には PGI₂ 産生増大作用は著減した(表2)。(5)MIX 前処置により内皮細胞内 c-AMP 量は増大し、PGI₂ 産生量は低下した(図1)。また1mM, MIX 前処置下での DTZ (10⁻⁶M) の添加時には c-AMP 量、および PGI₂ 産生量には有意の影響はなかった(図2)。

Table 1 Effect of TMB-8 on PGI₂ generation in cultured vascular endothelial cells. (6-keto PGF₁ (ng/ml/2x10⁶ cells) & % change)

	control	pretreated with TMB-8 (1 mM, 5 min)
Buffer A (CaCl ₂ 1.8mM)	21.91 ± 3.08 (100)	0.13 ± 0.08 (0.47 ± 0.22)
add Ca ionophore A 23187 (10μM)	187.91 ± 15.68 (100)	0.06 ± 0.01 (0.10 ± 0.00)
add Arachidonic acid (20μM) pretreated with Mepacrine (10 ⁻⁴ M, 15min)	263.49 ± 38.78 (100)	19.64 ± 2.48 (8.19 ± 1.17)
add PGH ₂ (5.68μM) pretreated with ASA (1mM, 30min)	202.47 ± 46.90 (100)	44.11 ± 2.05 (27.07 ± 4.97)

Table 2 Effect of extracellular Ca^{++} concentration on PGI_2 generation in cultured vascular endothelial cells (% change)

Culture medium	untreated	Ca ionophore A 23187 ($10\mu\text{M}$)	Diltiazem (10^{-6}M)
$\text{Ca}^{++}(+)$	100 ± 0	932 ± 97	178 ± 23
$\text{Ca}^{++}(-)$	105 ± 8	157 ± 12	121 ± 12

Fig. 1 Relationship between c-AMP level and 6-keto $\text{PGF}_1\alpha$ generation in cultured vascular endothelial cells.

Fig. 2 Effect of Diltiazem on PGI_2 generation and c-AMP level in cultured vascular endothelial cells

III. 考 案

従来より血管内皮細胞での PGI_2 産生は諸因子により変動することが報告されており⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾ われわれは前回、本学会においてヒト培養血管内皮細胞の PGI_2 産生がニトログリセリンによ

り増加することを報告した。今回は NDP, DTZ, VPM 等の Ca 拮抗薬がヒト培養血管内皮細胞において PGI_2 産生を増加せしめることを確認し、この作用点は phospholipase A_2 またはこれ以前の段階と推定された。AA cascade における PGI_2 産生は細胞内 Ca^{++} の動員に依存し、その依存度は AA cascade の上位の段階ほど強度であった。また、これらの薬剤の PGI_2 産生増大作用の発現は主に細胞外 Ca^{++} の移動に起因し、Adenylate cyclase の不活性化、ならびに、c-AMP の低下による Ca^{++} storage site からの Ca^{++} 遊離の促進⁹⁾ に起因する過程は否定的であると推定された。

文 献

- 1) Takeo Toyoda, Ryo Okano, Kiniji Mikami, Shunyo Kanayama, Hajime Tsuji, Kichiro Osamura, Kenhiro Rin, Isao Kaimasu, Masao Nakagawa, and Hamao Ijichi: Effect of vasodilators on prostacyclin synthesis of cultured human umbilical endothelial cells. *Blood & Vessel*, **14**; 488~490, 1983.
- 2) Eric A. Jaffe, Ralph L. Nachman, Carl G. Becker, and Richard C. Minick: Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. *J. Clin. Invest.*, **52**; 2745~2756, 1973.
- 3) Instruction Manual For The Measurement of 6-keto-Prostaglandin F_1 Levels in Tissue and Biological Fluids, Catalog No. NEK-008, New England Nuclear, 1-14, June 1982.
- 4) YAMASA Cyclic AMP Assay Kit, Cyclic GMP Assay kit Technical Guide.
- 5) Babette B. Weksler, Christopher W. Ley, and Eric A. Jaffe: Stimulation of endothelial cell prostacyclin production by thrombin, trypsin, and the ionophore A 23187. *J. Clin. Invest.*, **62**; 923~930, 1978.
- 6) Jay M. Sullivan, Darrell R. Patrick, B.S.: Release of prostaglandin I_2 -like activity from the rat aorta. Effect of captopril, furocymide, and sodium. *Prostaglandins*, **22**; 575~585, 1981.
- 7) Vittorio Tomasi, Cristina Meringolo, Gio-

- Vanna Bartolini and Marina Orlandi: Biosynthesis of Prostacyclin in rat liver endothelial cells and its control by prostaglandin E₂. *Nature*, **273**; 670~671, 1978.
- 8) Richard L. Levin, Eric A. Jaffe, Babette B. Weksler and Karen Tack-Goldman: Nitroglycerin stimulates synthesis of prostacyclin by cultured human endothelial cells. *J. Clin. Invest.*, **67**; 762~769, 1981.
- 9) Abigail F. Adams, Brotherton and John C. Hoak: Role of Ca²⁺ and cyclic AMP in the regulation of the production of prostacyclin by the vascular endothelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**; 495~499, 1982.

●わが国唯一のビタミンB₁₂研究の完全な集大成!

ビタミンB₁₂ —基礎と臨床—

編集 京都大学内科教授 内野治人 専門医24氏分担執筆

A 5 判 367頁 図157 表73 定価7,800円(〒200円)

ビタミンB₁₂は最も新しく発見されたものであるが、その構造の特異性や作用の独自性から、その研究の進歩は著しいものがある。最近では、その同族体の臨床応用が広がってきたものの、生化学、酵素学などの基盤にたった合理的な使用法はまだほど遠い所にある。本書はわが国でのB₁₂研究を現時点で集大成し、関係各方面の研究者に便ならしめた。

●内容: 第1章 ビタミンB₁₂研究の進歩と問題点, 第2章 ビタミンB₁₂の吸収, 第3章 ビタミンB₁₂の腸管吸収機構, 第4章 Whole body counterのビタミンB₁₂吸収試験ならびにB₁₂代謝への応用, 第5章 悪性貧血と胃の自己免疫, 第6章 悪性貧血の成因に関する自己免疫の考察, 第7章 ビタミンB₁₂の生体内転換利用, 第8章 ビタミンB₁₂結合蛋白, 第9章 Acid-resistant binding capacity と "granulocyte related" binding proteinについて, 第10章 トランスコバラミンII欠乏症, 第11章 ビタミンB₁₂のradioassay, 第12章 ビタミンB₁₂と葉酸代謝, 第13章 ビタミンB₁₂と中毒, 第14章 巨赤芽球性貧血, 第15章 尿中メチルマロン酸排泄とビタミンB₁₂代謝, 第16章 高ビタミンB₁₂血症, 第17章 ビタミンB₁₂代謝と神経系, 第18章 ビタミンB₁₂と神経疾患。