原 著

Serotonin の代謝産物—5-hydroxykynurenamine—および その類縁体の血小板機能に及ぼす影響について

大 熊 稔* 寮 隆 吉*
安 永 幸二郎* 内 野 治 人*

Effects of 5-hydroxykynurenamine—a serotonin metabolite— and its analogues on platelet functions

Minoru OKUMA, Ryukichi RYO, Kojiro YASUNAGA
and Haruto UCHINO

Key words : platelet aggregation, ^{14}C -serotonin uptake by platelets,
LASS production, platelet microsomes, alkylamine

Effects of 5-hydroxykynurenamine (5-HK), produced from serotonin by the action of indoleamine 2,3-dioxygenase, and its analogues on platelet functions were investigated. Platelet aggregation was studied by using a dual sample aggregometer (Sienco, Model DP-247) and serotonin uptake was examined by incubating platelet-rich plasma with $1\ \mu\text{M}$ ^{14}C -serotonin at 37°C for 2 min. 5-HK showed regulatory effects on human platelet functions both by antagonizing against the promoting effect of serotonin on arachidonic acid-induced platelet aggregation as well as that on ADP-induced aggregation and by inhibiting ^{14}C -serotonin uptake by platelets. LASS production by incubation of platelet microsomes with arachidonic acid was estimated by the maximal changes in light transmission of citrated human platelet-rich plasma which was added to the incubation mixture, containing microsomes and arachidonic acid, and was found to be enhanced by 5-HK. Kynurenamine, N, N'-dimethyl-5-HK, N, N'-dimethyl-3-HK, 2-(3'-aminopropyl) aniline and 5-methoxykynurenamine inhibited both ^{14}C -serotonin uptake by platelets and serotonin-induced aggregation, while N-acetyl-5-methoxykynurenamine, kynurenine and 5-hydroxykynurenine affected neither of these platelet functions. However, the degree of inhibitory effects of these analogues on serotonin uptake was not always in parallel with that on serotonin-induced aggregation. These findings support the concept that the inhibition of the serotonin uptake by these substances is intimately, if not directly, related to their ability to inhibit serotonin-induced platelet aggregation. LASS production was enhanced by N, N'-dimethyl-5-HK, N, N'-dimethyl-3-HK, 5-methoxykynurenamine and 5-hydroxykynurenine, while kynurenamine, 2-(3'-aminopropyl) aniline, N-acetyl-5-methoxykynurenamine and kynurenine showed no effect upon it. These studies with analogues indicated that the substitutions of o-aminobenzyl moiety with hydroxy or methoxy groups were somewhat tolerated

* 京都大学医学部第一内科〔〒606 京都市左京区聖護院河原町54〕, The First Division, Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan.

for their inhibitory effects on platelet aggregation and serotonin uptake, whereas such groups were essential for their promoting effect on the LASS production by platelet microsomes. When the amine was masked by N-acetylation, both the inhibitory activities on serotonin-induced aggregation as well as on serotonin uptake and the promoting activity on LASS production were completely lost, suggesting that the alkylamine in the side chain is essential for these activities.

はじめに

serotonin は血小板中に多量存在し, monoamine oxidase (MAO) により酸化され主として 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA) となり一部は 5-hydroxytryptophol などになることは周知の事実となっている. 最近 serotonin の新しい代謝経路が見出され, indoleamine 2, 3-dioxygenase と命名された酸素添加酵素により serotonin の indole 核が開裂されて 5-hydroxykynurenamine (5-HK) となり, さらにこの物質は MAO により酸化されて 4, 6-dihydroxyquinoline になることが明らかにされた¹⁾²⁾. この酸素添加酵素はまだ血小板中には見出されていないが, 腸管や肺のみならず心臓や大動脈などの循環器系臓器にも見出されている²⁾ので, 何らかの条件下, たとえば MAO 阻害剤の投与で serotonin の 5-HIAA への分解経路がブロックされた際など, 血小板も 5-HK にさらされる可能性がある. そこでこの serotonin 代謝産物の血小板凝集に及ぼす影響を検討し, serotonin による血小板凝集を特異的に阻害することを見出しその報告はすでに行なった³⁾. 今回は 5-HK の血小板機能発現における意義を検討する目的で, その血小板凝集への影響をさらに観察するとともに, 5-HK およびその類縁体が血小板の serotonin 摂取に及ぼす影響や, 血小板の機能発現に重要な LASS (labile aggregation-stimulating substance) 産生に及ぼす影響を検討した.

I. 実験材料および実験方法

1. 血小板凝集: 既報⁴⁾の方法により作成した正常人の多血小板血漿 (PRP) を用い, dual sample aggregometer (Sienco, Model DP-247)

で検討した⁴⁾.

2. 血小板による ¹⁴C-serotonin の摂取: 血小板数 30 万/ μ l に調整した citrated PRP⁴⁾ 0.24 ml に 5 μ l の 5-HK またはその類縁体の生食水溶液 (対照は生食水) を加えて 5 分間振とうしながら 37°C に孵置したのち 50 μ M ¹⁴C-serotonin (5-hydroxytryptamine-3'-¹⁴C-creatinine sulfate, S.A. = 57 mCi/mmol, Amersham) 5 μ l (終濃度 1 μ M) を加えてさらに 2 分間同様に孵置してから直ちに氷水中で冷却し, その 50 μ l (これは遠沈せず) および残りを 0~4°C で 1,800 $\times$ g, 20 分間遠沈して得た上清の 50 μ l につきそれぞれ ¹⁴C の放射能を液体シンチレーションカウンターで計測⁵⁾し, 両者の差から血小板による ¹⁴C-serotonin の摂取を計算し, 5-HK またはその類縁体のこれに及ぼす阻害効果は対照と比較して百分率で算出した.

3. 血小板の microsome (MS) 分画による LASS 産生の検討: 既報⁴⁾に準じて行なったが上記の dual sample aggregometer を用いて, より少量の反応系で行なった. すなわち, 血小板の MS 分画 12~25 μ g と, 0.154M, Tris-HCl, pH 7.4, 15 μ l に 5-HK またはその類縁体の生食水溶液 (対照は生食水) を加えて 45 μ l とし凝集計内で 37°C で 1 分間攪拌した後に 7.6 μ g のアラキドシ酸 (AA) を加えて 50 μ l とし, さらに 30 秒間 37°C で攪拌後 0.2ml の citrated PRP を加えて惹起される光の透過度の変化の最大値 (ΔT) を測定した. 5-HK やその類縁体の LASS 産生に及ぼす影響は対照の場合の光の透過度の変化の最大値 (ΔT_c) との比較 ($\Delta T/\Delta T_c$) で表現した.

AA, serotonin, 5-HK およびその類縁体はすべて既報³⁾のものを使用した.

Fig. 1 Effect of serotonin on arachidonic acid-induced platelet aggregation. T: $1\mu\text{M}$ (final concentration) serotonin; A: 0.3mM (f.c.) arachidonic acid.

II. 実験成績および考按

5-HK は血小板凝集を惹起しないが, serotonin による血小板凝集を特異的に阻害し, ADP-凝集に対する serotonin の亢進作用も 5-HK により中和されることはすでに報告した³⁾.

今回 serotonin の AA 凝集に及ぼす影響を検討したところ, 著明な凝集亢進作用が見出された. すなわち図 1 に示すごとく, $1\mu\text{M}$ serotonin 単独では可逆性の軽微な凝集を起し, 0.3mM AA の単独では有意な凝集はみられなかったが, 両者を同時に加えると著明な不可逆的な凝集が惹起された. serotonin を添加後 30 秒, 60 秒, および 100 秒後に AA を加えると, serotonin の AA-凝集亢進作用は次第に減弱した. そこで AA-凝集に対する serotonin の亢進作用に及ぼす 5-HK の影響を観察したところ図 2 に示すごとく阻害効果が認められた. すなわち serotonin ($1\mu\text{M}$) と AA (0.3mM) を同時に加えて惹起された最も著明な血小板凝集は $1\mu\text{M}$ 5-HK をこれと同時に加えてもやや阻害され, 5-HK との preincubation time の延長とともにその阻害作用は増強し, 7 分間の preincubation では殆んど完全な阻害が認められた.

ADP-凝集や epinephrine-凝集に及ぼす

Fig. 2 Inhibitory effect of 5-hydroxykynurenamine on potentiation of serotonin in arachidonic acid-induced platelet aggregation. T: $1\mu\text{M}$ (f.c.) serotonin; A: 0.3mM (f.c.) arachidonic acid; K: $1\mu\text{M}$ (f.c.) 5-hydroxykynurenamine.

serotonin の作用は血小板膜上の serotonin 受容体を介することが示唆されている⁶⁾が, serotonin 凝集と serotonin の摂取に関する血小板上の受容体が同一のものであるか否かは未解決の興味ある問題である. そこで 5-HK およびその類縁体が血小板の serotonin 摂取に及ぼす影響を観察し, serotonin-凝集に及ぼす影響と比較検討した. まず各種濃度 ($10\sim 100\mu\text{M}$) の 5-HK およびその類縁体について血小板の ^{14}C -serotonin 摂取に及ぼす影響を検討したところ, 5-HK, kynurenamine, N, N'-dimethyl-5-HK, N, N'-dimethyl-3-HK, 2-(3'-aminopropyl) aniline および 5-methoxykynurenamine は濃度の増加とともに増強する阻害効果を呈したが, N-acetyl-5-methoxykynurenamine, kynurenine および 5-hydroxykynurenine は有意な影響を示さなかった (図略). 図 3 は $50\mu\text{M}$ の 5-HK およびその類縁体の ^{14}C -serotonin 摂取に及ぼす影響を, 既報²⁾の serotonin-凝集に及ぼす影響とともに一括したものである. 図から明らかなごとく serotonin 摂取を阻害する 5-HK およびその類縁体は serotonin-凝集をも阻害するに反し, serotonin 摂取を阻害しない類縁体は serotonin-凝集をも阻害しないことから, これらの物質による serotonin 摂取の阻害は serotonin-凝集の阻害と密接な関係にあるこ

とが示唆された。しかしこれら血小板機能の両者を阻害する物質でも両機能の阻害の程度は必ずしも平行せず、たとえば 5-methoxykynurenamine と amino-propylamine では、serotonin 摂取は後者により強く阻害されたが serotonin 凝集は前者により強く阻害されるごとくで serotonin 凝集の阻害には serotonin 摂取の阻害以外の因子の介在することも示唆された。類縁体についての実験で 5-methoxykynurenamine および kynurenamine も serotonin 摂取を阻害したことから、5-HK の hydroxy 基はその阻害作用に必須ではないが、N-acetylation で阻害効果は消失し、アミノ酸の kynurenine や 5-hydroxykynurenine でも活性の失なわれたことから側鎖の alkylamine は serotonin 摂取の阻害作用に必須であることが示唆された。

serotonin は血小板 MS 分画の cyclo-oxygenase を活性化し、血小板の機能発現に重要な LASS 産生を亢進する⁴⁾ので、serotonin の代謝産物である 5-HK とその類縁体が LASS 産生に及ぼす影響を検討した。図 4 に示したごとく、20 μ g の MS と AA の反応で産生される LASS は、5-HK の添加により著明に増大され、これにより惹起された血小板凝集は前者では可逆的であるに反し、後者では不可逆的で著明なものとなった。図 5 に、5-HK およびその類縁体 (50 μ M, 1mM) が血小板 MS による LASS 産生に及ぼす影響を検討して得られた成績を示した。N,N'-dimethyl-5-HK と N,N'-dimethyl-3-HK は 5-HK とほとんど同程度に LASS 産生を亢進したことから N,N'-dimethylation や o-aminobenzyl 核上の hydroxy 基の位置の変化は LASS 産生の亢進作用に影響

Fig. 3 Effect of 5-hydroxykynurenamine and its analogues on serotonin-induced aggregation as compared with that on 14 C-serotonin uptake by platelets. □: serotonin-induced aggregation; ■: 14 C-serotonin uptake.

Fig. 4 Effect of 5-hydroxykynurenamine on LASS production by platelet microsomes. MS: 20 μ g microsomes; Buffer: 15 μ l of 0.154 M Tris-HCl, pH 7.4; AA: 7.6 μ g arachidonic acid; 5-HK: 0.1mM 5-hydroxykynurenamine.

Fig. 5 Effect of 5-hydroxykynurenamine and its analogues on LASS production by platelet microsomes and arachidonic acid. □: 50μM (f.c.); ■: 1mM (f.c.); ΔT: maximal changes in light transmission; ΔTc: ΔT of control.

響を与えないが, kynurenamine では活性が認められないことから LASS 産生の亢進には *o*-aminobenzyl 核上に hydroxy 基は必須であると考えられる。また 5-methoxykynurenamine および 5-hydroxykynurenine も LASS 産生を亢進したがその程度は比較的弱く, methoxy 基よりも hydroxy 基が, またアミノ酸よりアミンの方がそれぞれ強い活性を示すことが考えられ, とくに N-acetylation によりアミンの構造が変化するとともに hydroxy 基が methoxy 基で置換されるとその活性は完全に消失することが明らかとなった。

III. 結 論

5-HK は血小板凝集に及ぼす serotonin の作用を中和し, 血小板の serotonin 摂取を阻害するのみならず, 血小板 microsome による LASS 産生を亢進することから, この serotonin の代謝産物は血小板の機能発現に際し, それを調節ないし修飾し得る可能性を明らかにした。また

5-HK およびその類縁体の serotonin 凝集と serotonin 摂取に及ぼす影響を比較検討し, これらの物質による serotonin 凝集の阻害には serotonin 摂取の阻害の関与が考えられたが, それ以外の機序も介在することが示唆された。さらに 5-HK の類縁体を用いての検討により血小板の凝集および serotonin 摂取に対する上記の作用は, *o*-aminobenzyl 核に hydroxy 基または methoxy 基を置換しても保持されているが, N-acetylation により完全に消失し, その活性には側鎖に alkylamine が必須であった。LASS 産生の亢進には, *o*-aminobenzyl 核上に hydroxy 基または methoxy 基が必須であり, methoxy 基よりも hydroxy 基の方が, またアミノ酸よりアミンの構造を有する方がより強い活性を示し, N-acetylation に加えて, hydroxy 基が methoxy 基に置換されるとその活性は完全に消失することが明らかとなった。

謝辞: 5-hydroxykynurenamine とその類縁体を恵与された京大医化学早石修教授ならびに平田扶桑生博士に深謝します。

文 献

- 1) Hirata, F. and Hayaishi, O.: New degradative routes of 5-hydroxytryptophan and serotonin by intestinal tryptophan 2,3-dioxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47**; 1112~1119, 1972.
- 2) Hayaishi, O., Hirata, F., Fujiwara, M., Ohnishi, T. and Nukiwa, T.: Catalytic properties and reaction mechanism of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Proc. 10th FEBS Meeting*, p. 131~144, 1975.
- 3) Okuma, M., Tokuyama, T., Senoh, S., Hirata, F. and Hayaishi, O.: Antagonism of 5-hydroxykynurenamine against serotonin action on platelet aggregation. *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.* **73**; 643~645, 1976.
- 4) 大熊 稔: 血小板の脂質代謝と血小板機能. *日血会誌*, **39**; 682~693, 1976.
- 5) Okuma, M., Ichikawa, Y., Yamashita, S., Kitajima, K. and Numa, S.: Studies on some lipogenic enzymes of cultured myeloid leukemic cells. *Blood*, **47**; 439~446, 1976.

- 6) Baumgartner, H. R. and Born, G. V. R.:
Effects of 5-hydroxytryptamine on platelet
aggregation. *Nature*, 218; 137~141, 1968.

<DISCUSSION>

和多田光朗（京都府立医科大学第二内科）

Preincubation の問題ですが，PRP は，37℃
で incubation しますと血小板凝集能は強く低下
いたします。PRP に対する薬剤の影響を検討す
るばあい，この点がいつも問題になりますが，ど
うお考えでしょうか。

大熊 稔（京都大学医学部第一内科）

われわれの実験条件では対照実験として溶媒
（生食水）のみを PRP に加えて preincubate し
その影響がないことを（そのみで凝集性が落ち
ないことを）みている。一般的には 37℃ での
preincubation を出来るだけ短くし，厳密に対照
実験を行なえばよいと思う。

山崎博男（東京都臨床医学研究所）

種族差はどうでしょうか。ラット，ウサギで検
討されたことはありますか。

大熊 血小板凝集の態度には種族差が大きいで
すが，この実験ではラットやウサギについてはまだ
検討していません。

蔵本 淳（広島大学原医研内科）

①血小板 endogenous 5-HT からの 5-hydro-
xykynurenamine 産生経路の生理学的意義は。

②in vitro の実験で exogenous metabolites
の効果を示されたが，かかる metabolites が増加
するような病態疾患についてご教示下さい。例え
ば糖尿病でも tryptophan 代謝中間のインスリン
調節さらに血管病変との関連が活用されているの
で，興味ある成績と考える。

大熊 ①現在までには血小板中に indoleamine 2,
3-dioxygenase が証明されていないので，血小板
の 5-hydroxykynurenamine 産生経路の意義は不
明である。しかし何らかの条件下では血小板が
exogenous の 5-hydroxykynurenamine に expose
される可能性がある。

②疾患とセロトニンの代謝産物の関係について
は検討していない。ただ発表中に述べたように，
例えば MAO 阻害剤の投与された場合にはセロ
トニンから 5-HIAA への代謝経路が block され，
5-hydroxykynurenamine (5-HK) の方への代謝
がすすむことが speculate される。このような状
態では in vivo においても血小板機能が 5-HK
により調節ないし修飾される可能性がある。

●自分で実際にやれる手術書！

植田小児外科

大阪市立保健センター外科 植田 隆著

B 5 判 364頁 図207 表18 定価9,800円(〒240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