
血管内皮、平滑筋および支配神経機能に
及ぼす各種カルシウム拮抗薬の影響

(課題番号 08670107)

平成8年度～9年度科学研究費補助金 基盤研究(C)(2)

研究成果報告書

平成10年3月

研究代表者 岡村 富夫

(滋賀医科大学医学部助教授)



1997024118

はじめに

血管平滑筋の緊張性は内膜側からは内皮細胞により、外膜側からは支配神経により調節されている。近年、内皮由来血管弛緩因子(EDRF)の本体が、L-アルギニンを基質とする酵素により生成される一酸化窒素(NO)であることが明らかになった。一方、われわれは血管拡張神経の存在を薬理的に実証し、その伝達物資がNOであることを見出した。同神経はノルアドレナリン作動性の血管収縮神経と拮抗的に作用し、血管緊張性の神経性調節に重要な役割を果たしていると考えられる。ところで、EDRFおよび神経伝達物質の合成・遊離が細胞外液中のカルシウムに依存することや、内皮および神経細胞に存在するNO合成酵素活性が共にカルシウム依存性であることが知られている。しかし、それらの細胞のカルシウム流入機構は余りよくわかっていない。他方、血管平滑筋にはジヒドロピリジン系のカルシウム拮抗薬に感受性のあるL型のカルシウムチャネルが存在し、その活性化により引き起こされるカルシウム流入が平滑筋を収縮させることが知られている。

血管壁で産生される物質の種類や多寡は血管の部位により異なるので、血管の緊張性に与える影響は一様でない。たとえば、脳動脈ではNO作動性神経による拡張がノルアドレナリン作動性神経による収縮を上回るため総和として拡張が生じ、腸間膜動脈などの末梢度脈では逆に収縮すると考えられている。したがって、 α 受容体拮抗薬あるいはNO合成酵素阻害薬処置下で神経刺激による張力変化を観察することにより、それぞれの神経伝達物質の作用を選択的に観察できる。EDRF(NO)の作用は、刺激薬による張力変化の内皮依存性とNO合成酵素阻害薬の効果により選択的に観察できる。NOは平滑筋細胞に存在するグアニル酸シクラーゼを活性化し、

cyclic GMP の上昇を介して血管を弛緩させることが知られている。細胞内へのカルシウム流入を阻害することにより効果を発揮するカルシウム拮抗薬には、従来よりL型、N型、T型チャンネルに特異的なものや非特異的なものが知られるが、最近では従来のものとは特異性の異なるカルシウム拮抗薬も合成されている。本研究は、実験動物より摘出した動脈標本を用い、(1)血管平滑筋を直接収縮させる物質、(2)内皮細胞に作用し、EDRFの産生・遊離を介して血管を弛緩させる物質、(3)経壁電気刺激あるいは化学的に神経終末から神経伝達物質を遊離させる物質、が惹起する張力変化、標本からの窒素酸化物およびノルアドレナリンの遊離量ならびに組織サイクリックGMP量の変化などに及ぼす種々のカルシウム拮抗薬の影響を検討した。

研 究 組 織

研究代表者 岡村 富夫 (滋賀医科大学医学部助教授)

研究分担者 安屋敷和秀 (滋賀医科大学医学部助手)

研 究 経 費

平成8年度 1, 2 0 0千円

平成9年度 1, 1 0 0千円

合 計 2, 3 0 0千円

研究成果の要約

最初に、摘出イヌ脳動脈標本を用いて、血管平滑筋を直接収縮させる物質としてプロスタグランジンF_{2α}、経壁電気刺激ならびに化学的に神経終末から神経伝達物質を遊離させる物質としてニコチン、さらに内皮細胞に作用し、EDRFの産生・遊離を介して血管を弛緩させる物質としてサブスタンスPによる張力変化を観察し、それらに対するL型カルシウムチャネル選択的拮抗薬であるニカルジピンならびに非選択的カルシウムチャネル拮抗薬であるカドミウムの影響を検討した。プロスタグランジンF_{2α}による収縮作用はニカルジピンならびにカドミウムにより著明に抑制された。経壁電気刺激ならびにニコチンによる弛緩作用は内皮非依存性であり、一酸化窒素合成酵素（NOS）阻害薬であるL-ニトロアルギニンにより消失する。経壁電気刺激による反応がテトロドトキシンで、ニコチンの作用がヘキサメトニウムで、それぞれ消失することから、これらの刺激は共に神経終末に作用し、遊離される神経伝達物質の血管作用を観察していると考えられる。また、イヌ脳動脈には神経由来のNOSに対する特異的な抗体で染色される神経線維が密に分布し、両者の刺激で内皮除去標本からの窒素酸化物の遊離や組織中のサイクリックGMPが上昇することから、少なくともイヌ脳動脈にはNO作動性の血管拡張神経が存在すると考えられる（論文1、出版物1）。この神経由来一酸化窒素（NO）を介するニコチンおよび経壁電気刺激による弛緩反応は、カドミウムにより抑制されたが、ニカルジピンではまったく影響を受けなかった。外因性のNOによる弛緩作用はカドミウムおよびニカルジピンによる影響を共に受けないことから、血管支配神経によるNO合成にはカルシウム流入を要するが、それはL型チャネルを介する作用ではないことが明

らかになった（論文1）。このことはニコチンによる血管組織中のサイクリックGMP上昇作用が、カドミウム処置により消失するが、ニカルジピン処置では影響がないことから支持される。他方、サブスタンスPによる弛緩作用は内皮依存性であり、一酸化窒素合成酵素（NOS）阻害薬であるL-ニトロアルギニンにより消失する。この血管内皮由来一酸化窒素（NO）を介すると考えられるサブスタンスPの弛緩作用も、カドミウムにより抑制されたが、ニカルジピンではまったく影響を受けなかった。したがって、内皮細胞によるNO合成もカルシウム流入を要するが、支配神経と同様にL型チャネルを介する作用ではないことが明らかになった。

内皮細胞によるNO産生がカルシウムだけでなくカルモデュリン依存性であることは以前から良く知られているが、われわれは支配神経によるNO産生も同様にカルモデュリン依存性であることを報告した。今回は、摘出イヌ脳動脈における神経性弛緩反応を指標にして、支配神経でのNO産生におけるカルモデュリン以降の情報伝達経路について検討した。8-ブロム-サイクリックAMP、8-ブロム-サイクリックGMPおよびプロテインキナーゼCの刺激薬であるフォルボールエステルを処置しても神経性弛緩反応には影響がなかったが、カルシウム・カルモデュリン依存性プロテインキナーゼIIの阻害薬であるKN62により有意に抑制された。KN62はニコチンによる組織サイクリックGMP上昇作用を有意に抑制したが、外因性NOによる弛緩作用などには影響を与えなかった。したがって、拡張神経によるNO産生には、プロテインキナーゼA、プロテインキナーゼGやプロテインキナーゼCよりもカルシウム・カルモデュリン依存性プロテインキナーゼIIの関与が大きいことが明らかになった（論文2）。しかし、同酵素がNOS自体をリン酸化しているのか、NOS活性化に必要な別の基質をリン酸化してい

るのかは明らかに出来なかった。また、一連の実験において、この神経性弛緩反応がN型カルシウムチャンネルに特異的な阻害薬である ω -コノトキシンGVIAによりほぼ消失することが明らかになった。同阻害薬はサブスタンスPによる内皮依存性弛緩反応には影響を与えないことから、神経由来のNO産生を特異的に抑制すると考えられる。一方、T型カルシウムチャンネルに特異的な阻害薬であるテトラメスリンは、サブスタンスPによる内皮依存性弛緩反応ならびにニコチンや電気刺激による神経性弛緩反応には影響を与えなかった。したがって、T型カルシウムチャンネルは血管内皮ならびに支配神経におけるNO産生に必要なカルシウム流入機序には関与しないと考えられる。

新規に合成されたジヒドロピリジン化合物の中には、従来のものとは異なり、平滑筋に存在するL-型カルシウムチャンネルを抑制し直接平滑筋を拡張させる作用に加えて、内皮細胞や支配神経におけるカルシウム流入を抑制する可能性があるものもみられる。AE 0047は摘出イヌ腸間膜動脈において血管平滑筋を直接収縮させるプロスタグランジン $F_{2\alpha}$ やセロトニン収縮を抑制するだけでなく、サブスタンスPによる内皮依存性弛緩反応や支配神経刺激による収縮反応を抑制した。同動脈では経壁電気刺激やニコチンにより収縮反応が生じ、それらが α_1 遮断薬で消失することから、最も強く血管緊張性を調節している支配神経はノルアドレナリン作動性神経と考えられる。しかし、 α_1 遮断薬処置下で前収縮させた標本に対し、神経刺激を加えると軽度の弛緩作用が観察されることから、拡張神経が存在しないということではない。AE 0047は神経収縮反応を強く抑制するが、同程度に抑制するニカルジピンと比較すると、外因性のノルアドレナリン収縮を抑制する作用は両者で差はなかったが、神経刺激によるノルアドレナリン遊離はAE 0047でのみ抑制された。

したがって、A E 0047を含む新規ジヒドロピリジン化合物には、L型だけでなく、N型のカルシウムチャネルを抑制し、前接合部にアドレナリン作動性神経を抑制することにより降圧作用を生じる機序も存在すると考えられる。

フルナリジンは以前より非選択的なピペラジンタイプのカルシウムチャネル拮抗薬として知られ、偏頭痛の予防に有効な薬物として知られている。一方、ニカルジピンのような純粋なジヒドロピリジン化合物には脳血管拡張作用はあるが、偏頭痛の予防作用はない。したがって、フルナリジンにはジヒドロピリジン化合物にはない独自の機序で偏頭痛を予防すると考えられてきた。今回の実験で、フルナリジンは摘出イヌ脳動脈における神経性弛緩反応を有意に抑制した。外因性のNOやニトロプルシッドによる弛緩反応には影響がないことから、フルナリジンは支配神経におけるNO産生を有意に抑制したと考えられる。このことはフルナリジンが生体内で脳動脈を支配するNO作動性、血管拡張神経機能を抑制することを示唆している。前述したように、ニカルジピンにはこのような作用が観察されないことから、フルナリジンの偏頭痛の予防作用機序の一つに、強力な血管拡張と発痛作用を有するNOの支配神経からの産生・遊離を抑制する機序が関与する可能性が示唆された（論文3）。

内因性NO産生を中心に血管内皮、血管平滑筋ならびに支配神経機能におよぼすカルシウム拮抗薬の影響をまとめた（論文4）。平滑筋細胞にはL型カルシウムチャネルが、神経終末にはN型カルシウムチャネルが主として機能し、それぞれ収縮作用ならびに神経伝達物質の遊離に重要な役割を果たしている。しかし、EDRFの産生・遊離をはじめ循環制御に重要な役割を果たしている内皮細胞におけるカルシウム流入はL型、N型、T型に選択的な既知の拮抗薬では抑制されなかった。同機序の解明は、今後の研究に委ねること

にする。また、臨床応用されているカルシウム拮抗薬あるいは現在開発中の同拮抗薬のなかには、単に平滑筋細胞のL型カルシウムチャネルだけを抑制するのではなく、支配神経などに作用するものも存在することから、同薬物の適用の拡大に繋がる可能性が得られたものとする。

研究発表

(1) 学会誌等

- 1) Toda, N. and Okamura, T.
Nitroxidergic nerve: regulation of vascular tone and blood flow in the brain.
Journal of Hypertension, 14 : 423-434, 1996
- 2) Toda, N., Ayajiki K. and Okamura, T.
Effect of Ca^{2+} / calmodulin-dependent protein kinase II inhibitors on the neurogenic cerebroarterial relaxation.
European Journal of Pharmacology, 340 : 59-65, 1997
- 3) Ayajiki K., Okamura T. and Toda, N.
Flunarizine, an anti-migraine agent, impairs nitroxidergic nerve function in cerebral arteries.
European Journal of Pharmacology, 329 : 49-53, 1997
- 4) 戸田 昇、安屋敷和秀、岡村 富夫
NO産生とカルシウム拮抗薬
血管と内皮、8: 34-39, 1998

(2) 出版物

- 1) Toda, N. and Okamura, T.
Nerve-derived nitric oxide (NO) in the regulation of cerebrovascular function.
In : *Molecular and Cellular Mechanisms of Cardiovascular Regulation*, edited by M. Endoh, M. Morad, H. Scholz and T. Iijima
Springer-Verlag, Tokyo, 1996, pp 211-218