

〔原著〕 血管平滑筋細胞におけるチトクロム P-450
依存性アラキドン酸代謝産物の同定と
血管拡張作用に関する研究

蓮 沼 桂 司*

(平成3年12月18日受付, 平成3年12月27日受理)

要 旨

雄性ウィスターラット胸部大動脈培養血管平滑筋細胞から得たミクロゾーム画分を NADPH 存在下に37°C, 60分間, [1-¹⁴C] アラキドン酸と反応させた。代謝産物は抽出後に高速液体クロマトグラフィーで分離精製し, さらに GC/MS にて同定した。その結果, 5, 6-epoxyeicosatrienoic acid (EET) と 5, 6-EET の安定代謝産物である 5, 6-dihydroxyeicosatrienoic acid (DHET) および14, 15-DHET が同定された。これらは NADPH 依存性に産生され, チトクロム P-450阻害剤である SKF-525A および metyrapone にて産生が抑制された。大動脈螺旋血管条片を用いて, phenylephrine (PE) による収縮に及ぼす EET の作用を検討した結果, 5, 6-EET および14, 15-EET が10~40 μ M 濃度にて, 濃度依存的に PE による収縮を抑制した。内皮を剥離した条片においても, 5, 6-EET の収縮抑制効果は同様に認められ, 直接血管平滑筋を介する血管収縮抑制作用が示唆された。蛍光色素 fura-2 をラベルした培養血管平滑筋細胞を用いて, 細胞内遊離カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) に及ぼす EET の効果を検討したところ, 5, 6-EET は濃度依存的に PE および angiotensin II (AII) 刺激時の $[Ca^{2+}]_i$ 増加を抑制した。以上の結果により, ラット血管平滑筋細胞にはチトクロム P-450 依存性モノオキシゲナーゼ経路が存在し, アラキドン酸より 5, 6-EET および14, 15-EET が産生されることが明らかとなった。これらの代謝産物は, オートクリン的に血管平滑筋に直接作用して, 収縮刺激に伴う $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の抑制を介して, 収縮抑制作用を有することが示唆された。

Key words 血管平滑筋細胞, アラキドン酸, チトクロム P-450, Epoxyeicosatrienoic acid

略語一覧: EET: epoxyeicosatrienoic acid, DHET: dihydroxyeicosatrienoic acid, HETE: hydroxyeicosatetraenoic acid, HPLC: high performance liquid chromatography, GC/MS: gas chromatography/mass spectrometry, PE: phenylephrine, AII: angiotensin II, ACh: acetylcholine

I. 緒 言

細胞膜リン脂質画分に含まれる多価不飽和脂肪酸のア
ラキドン酸は, 種々の刺激によって細胞膜より遊離さ

れ, シクロオキシゲナーゼ経路により, プロスタグラン
ディンやトロンボキサンに, リポキシゲナーゼ経路によ
り, ロイコトリエンやヒドロペルオキシ脂肪酸に変換さ
れることはよく知られている。これらの代謝産物はオー

* 千葉大学医学部内科学第二講座

Keiji HASUNUMA: Synthesis of Vasodilatory Metabolites of Arachidonic Acid by Cytochrome P-450 in Vascular Smooth Muscle Cells.

The Second Department of Internal Medicine, School of Medicine, Chiba University, Chiba 260.

Received December 18, 1991, Accepted December 27, 1991.

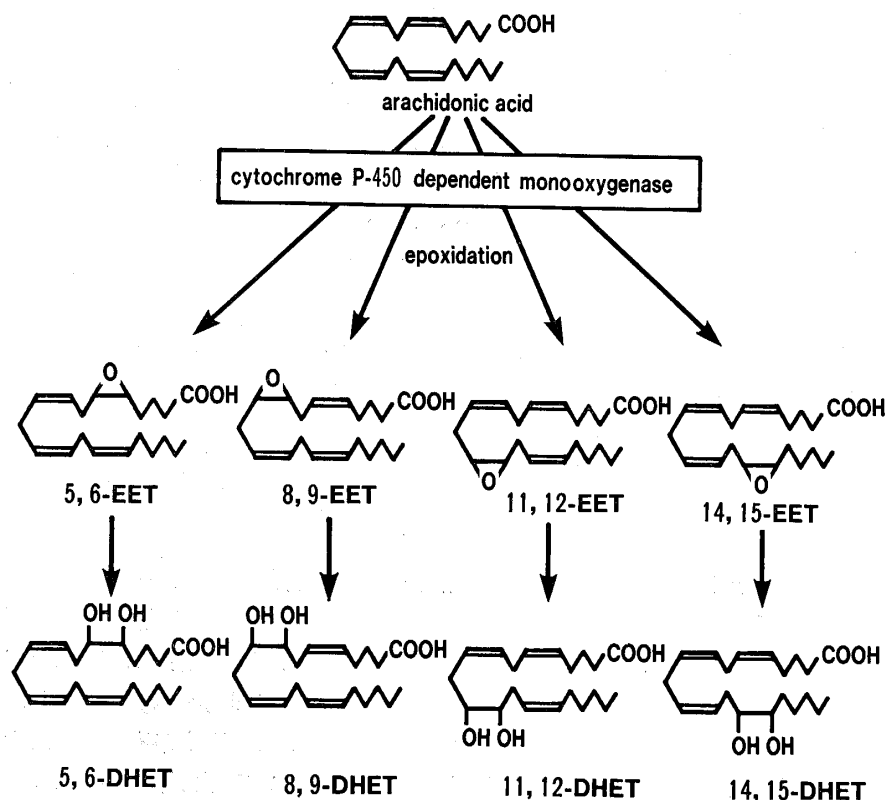


図 1. アラキドン酸のチトクロム P-450 依存性モノオキシゲナーゼ代謝経路

タコイドとして、多彩な生理活性を有するが、近年、第3の代謝経路としてチトクロム P-450 依存性モノオキシゲナーゼ経路が注目されている。チトクロム P-450 依存性モノオキシゲナーゼは、NADPH の存在下にアラキドン酸の酸化反応を行う。アラキドン酸の二重結合に酸素1原子を添加する反応、すなわち epoxydation (エポキシ化) により、4つのエポキシエイコサトリエン酸 epoxyeicosatrienoic acid (EET) が生成される。EET は加水分解により、それぞれ対応するジヒドロキシエイコサトリエン酸 dihydroxyeicosatrienoic acid (DHET) に代謝される (図1)。このチトクロム P-450 依存性モノオキシゲナーゼは、肝臓¹⁻⁵⁾、腎臓⁶⁻⁸⁾、下垂体⁹⁾、副腎¹⁰⁾などに存在することが証明され、生成された EET にはホルモン分泌作用¹⁰⁻¹⁶⁾や Na-K ATPase 抑制作用¹⁷⁾などの生理活性があることが報告されている。

血管壁においては、プロスタサイクリンがおもに血管内皮細胞より産生され、血管平滑筋の cAMP を上昇させることにより、強力な血管拡張作用を示すことが知られているが、1986年に Carrol らがウサギ肺動脈¹⁸⁾において、5,6-EET が血管拡張作用を有することを初めて示した。その後、ラット尾動脈¹⁹⁾とラット小腸漿膜細胞動脈²⁰⁾で 5,6-EET が、ヒツジ動脈管²¹⁾では 5,6-

EET および 14,15-EET が、また、イヌ冠動脈²²⁾ではすべての EET が血管拡張作用を示すことが明らかにされた。しかしながら、血管壁で産生されるチトクロム P-450 依存性モノオキシゲナーゼ代謝産物は、イヌ冠動脈²²⁾において血管細片とアラキドン酸の反応抽出液より同定されているのみであり、さらに血管拡張作用の機序に関する詳細な検討はなされていない。われわれはアラキドン酸代謝産物のオートクリンあるいはパラクリン作用に着目し、血管の収縮拡張の主体である血管平滑筋に的を絞って、チトクロム P-450 依存性モノオキシゲナーゼ代謝産物の同定を試みた。すなわち、ラット大動脈血管平滑筋細胞を用いて、アラキドン酸由来チトクロム P-450 依存性モノオキシゲナーゼ代謝産物が産生されるか否かを調べた。その後、これらの代謝産物の血管収縮に及ぼす影響を、ラット大動脈血管条片を用いて検討し、さらに、その作用機序についても検討を加えた。

II. 方 法

1. 材料

[1-¹⁴C] アラキドン酸 (56mCi/mmol) は、New England Nuclear 社 (USA) より購入した。非放射性アラキドン酸は Nu-Chek 社 (USA) より購入した。N, O-bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide, N-trimethy-

lsilyl imidazole および高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に必要な有機溶媒はすべて和光純薬より購入した。N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, metyrapone, phenylephrine および acetylcholine は Sigma 社 (USA) より購入した。NADPH はオリエンタル酵母社より購入した。SKF-525A は Smith Klein and French 社 (USA) より提供された。他の材料は以下に示すところより購入した。胎仔血清 および EDTA: Gibco 社 (USA), trypsin: 大阪大学蛋白質研究所, Dulbecco's modified Eagle's medium (DME): 日水製薬, 抗アクチンウサギ IgG および抗ラビットヒツジ IgG: Biomedical Technologies 社 (USA), fura-2-acetoxymethyl ester (fura-2-AM): 同仁化学研究所

EET の標準品は Chung と Scott の方法²³⁾により、アラキドン酸の非選択的エポキシ化により合成し、順相 HPLC で精製して得た。

2. ラット血管平滑筋細胞の培養

雄性ウィスターラット (180-200g) の胸部大動脈より、Ross らの方法²⁴⁾に従い血管平滑筋細胞を単離培養した。すなわち、無菌的に胸部大動脈を摘出し、結合組織、脂肪組織を取り除いて縦切開を加えた。濾紙を用いて内皮側を軽く擦過することにより、内皮を剝離した。つぎに、中膜を外膜より剝離してから約 5 mm² の切片にした。これらを培養フラスコ内に播き、10%胎仔血清を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DME) を加えて、インキュベーター (37°C, 5% CO₂/95% air) 内で無菌的に培養した。血管平滑筋細胞は第7~10日目に切片より増殖しているのが確認され、継代培養によって得られた4~10代の培養細胞を実験に用いた。継代は0.25% trypsin および0.02% EDTA 溶液添加により細胞を剝離し、行った。平滑筋細胞の同定は、位相差顕微鏡で平滑筋細胞に特徴的な 'hills and valleys' パターンを、電子顕微鏡でミオフィラメントを確認し、さらに蛍光抗体法を用いてアクチン分子を検出することにより行った。

マイクロゾーム画分を得るために必要な大量の血管平滑筋細胞は、microcarrier法によった。すなわち、collagen をコーティングした粒子 (Cytodex 3®, Pharmacia, Sweden) 表面に血管平滑筋細胞を付着させ、DME 中で攪拌しながら培養を行った。

3. ミクロゾーム画分の調製

マイクロゾーム画分の調製はすべて4°Cで行った。培養血管平滑筋細胞を低張である10mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, 2 mM MgCl₂ に浮遊させ、5分間放置した後、10mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, 2 mM Mg

Cl₂, 0.25M sucrose に再浮遊させて、glass to glass homogenizer で30往復してホモジネートを作成した。ホモジネートを900×g, 10分間遠沈し、得られた上清で9000×g, 10分間の遠沈を2回繰り返した。さらに、上清を105000×g で2時間遠沈してマイクロゾーム画分を沈澱として得た。沈澱は homogenize buffer で再浮遊させて、蛋白定量を牛血清アルブミン (BSA) を標準品として、Lowry 法²⁵⁾により行った。

4. 血管平滑筋細胞マイクロゾームにおけるアラキドン酸代謝

[1-¹⁴C] アラキドン酸 (2 μCi, 40 μM) と、マイクロゾーム (500 μg 蛋白量) を、50mM Tris-HCl buffer, pH 7.4中で、1 mM NADPH の存在下および非存在下に37°C, 60分間反応させた。また、非酵素反応による代謝産物の確認のため、100°C, 10分間の加熱にて不活化したマイクロゾームを用いて、同一条件で反応させた。2 M citric acid にて酸性化 (pH 3.5) することにより反応を停止させ、2倍量の ethyl acetate を加えてよく混和した。遠沈して有機溶媒相を集め、窒素ガスで乾固した後、methanol で再溶解して代謝産物の分析に用いた。

チトクロム P-450 阻害剤である SKF-525A (50~200 μM) あるいは metyrapone (500 μM) を用いた実験は、これらの阻害剤とマイクロゾームを37°C, 10分間反応させてから、[1-¹⁴C] アラキドン酸と NADPH を添加して行った。

5. 培養血管平滑筋細胞におけるアラキドン酸代謝

培養血管平滑筋細胞 (8~10×10⁶) と [1-¹⁴C] アラキドン酸 (2 μCi, 40 μM) を、0.1% BSA を含む phosphate buffered saline (PBS) 中で37°C, 60分間反応させた。2倍量の ethanol を加えて反応を停止させ、遠沈した後、上清を酸性化 (pH 3.5) し、蒸留水を加えて、10% ethanol 溶液を調製した。これを octadecyl-silica (ODS) ミニカラム (Bond Elute C₁₈®, 3 ml, Analytichem International 社) にアプライしてから、蒸留水で洗浄後、3 ml の ethyl acetate で EET を含む画分を溶出した。

6. アラキドン酸代謝産物の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析

抽出した [1-¹⁴C] アラキドン酸代謝産物を HPLC にて分析した。Tri-Rotor V 型高速液体クロマトグラムポンプ (日本分光社) を用い、ODS カラム (Develosil® 5 μm, 4.6×150 mm, 野村化学社) に移動相 (acetonitrile/methanol/water/acetic acid: 12/58/30/0.04, v/v/v/v) を30°C 定温下に1 ml/min の流速で流した。試料をアプライ後、溶出液の放射活性を Radio-

isotope detector 171® (Beckmann 社) で測定した。14, 15-DHET, 5, 6-DHET, 14, 15-EET および 5, 6-EET の標準品の溶出時間は、それぞれ15.7分, 25.9分, 48.2分および56.8分であった。代謝産物の産生量は、1時間に1mg 蛋白相当量のマイクロゾームによって代謝されたアラキドン酸量として表現した。

逆相 HPLC によって分離された放射活性を有する代謝産物は、diazomethane と反応させてメチルエステル化してから、順相 HPLC でさらに精製を行った。順相 HPLC は Silica カラム (Unisil Q® 3 μ m, 4.6 $\times$ 150 mm, ガスクロ工業) を用い、30°C の定温下に移動相を 1 ml/min の流速で流した。移動相は0.05% acetic acid を含む n-hexane に、isopropanol を加えて使用した。14, 15-DHET 標準品の溶出時間は1.5% isopropanol で14.5分, 5, 6-DHET の溶出時間は3.5% isopropanol で11.0分であった。

7. GC/MS による分析

GC/MS 分析に先立ち、順相 HPLC にて精製されたメチルエステル化代謝産物は N, O-bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide と N-trimethylsilyl imidazole の 1:2 の混合液中で室温で 60 分間反応させて trimethylsilyl (TMS) 化した。GC/MS 分析は、M-80 GC/MS システム (日立製作所) を用い、1.5% OV (2 m) カラムを、210°C で作動させた。electron impact は 70 eV で、C value は三輪らの方法²⁶⁾に準じて、脂肪酸メチルエステル化合物の溶出時間より決定した。

8. ラット大動脈血管条片による張力測定

雄性ウィスターラット (200~250g) より、胸部大動脈を摘出し、周囲の結合組織を取り除いた後に、幅 1 mm, 長さ 20 mm の血管累旋条片を作製した。血管条片は Magnus 管内に保持して、上端は FD ピックアップ張力計 (日本光電社) に連結した。0.5g の基礎張力をかけ、95% O₂/5% CO₂ 混合ガスで飽和した Krebs Ringer bicarbonate buffer, pH 7.4, 0.2% glucose, 0.1% BSA (KRB buffer) を 37°C に加温し、60分間灌流した後に、phenylephrine (PE) による等尺性張力を測定した。EET は PE 投与の 3 分前に加えた。測定終了後、20分間 KRB buffer で血管条片を灌流して次の測定を行った。内皮細胞剝離は血管内腔に通した縫合糸で軽く擦過することにより行い、acetylcholine (ACh) による弛緩作用が消失することより確認した。

EET は溶媒の ethanol を窒素ガスで蒸散させてから、95% ethanol/5% dimethylsulfoxide で再溶解して KRB buffer を加えて目的の濃度とした。

血管条片を用いて、EET の (a) 同位体間の生物活性

特異性の比較、(b) 濃度依存性の検討、(c) 内皮細胞の関与の検討を行った。

9. 細胞内遊離カルシウム濃度 ([Ca²⁺]_i) の測定

Hanks buffer, pH 7.4 で培養血管平滑筋細胞浮遊液 (10⁶ cells/ml) を調製し、蛍光色素 fura-2-AM (2 μ M) を添加して、37°C, 30分間反応させて、細胞内に fura-2 を取り込ませた。Hanks buffer で 2 回洗浄後に細胞浮遊液を再調製した。蛍光測定装置 CAF-100 (日本分光社) を用いて、10⁻⁷M の PE あるいは angiotensin II (AII) を添加した際の蛍光強度の変化を測定した。EET は PE あるいは AII 投与の 3 分前に添加した。

10. 統計処理

結果は平均 $\pm$ 標準誤差で表し、統計学的有意差検定は Student's t 検定を用いた。

III. 結 果

1. HPLC による代謝産物の同定

[1-¹⁴C] アラキドン酸をマイクロゾームと反応させて得られた代謝産物を、逆相 HPLC で分析した結果を図 2 に示す。ピーク I, II, および VIII の溶出時間は、それぞれ 14, 15-DHET, 5, 6-DHET および 5, 6-EET の標準品の溶出時間に一致した (図 2 上段)。これらのピークは、NADPH 非存在下 (図 2 中段) や不活化したマイクロゾームとの反応 (図 2 下段) では認められなかった。ピーク II と VIII との間に溶出されたピーク群は、hydroxyeicosatetraenoic acid (HETE) の溶出時間に相当する。すなわち、ピーク III, IV, V, VI および VII の溶出時間は、それぞれ 30.3 分, 33.1 分, 35.7 分, 38.8 分および 42.3 分で、各々 15-, 11-, 12-, 9- および 5-HETE に一致する。ピーク V と VI とには、NADPH 依存性が認められた。ピーク I, II および VIII の代謝産物の生成量は、それぞれ 8.7 $\pm$ 4.4, 15.4 $\pm$ 9.0, 15.3 $\pm$ 4.3 pmol/mg protein/60min (n=4-5) であった。

SKF-525A で、マイクロゾームを前処置すると、ピーク I, II および VIII の生成は 50 μ M 濃度で 35%, 200 μ M 濃度で 54% の抑制が確認され、また、500 μ M の metyrapone では、20% の抑制が認められた。

図 3 に [1-¹⁴C] アラキドン酸と血管平滑筋細胞との反応により得られた代謝産物を、逆相 HPLC で分析した結果を示す。エポキシゲナーゼ代謝産物の中で、14, 15-DHET に一致するピークが認められた。

2. GC/MS による分析

ピーク I に相当する代謝産物の TMS 化後のマススペクトラムを図 4 に示す。C value は 12.0 で、14, 15-DHET の標準品と一致した。14, 15-DHET に特異的

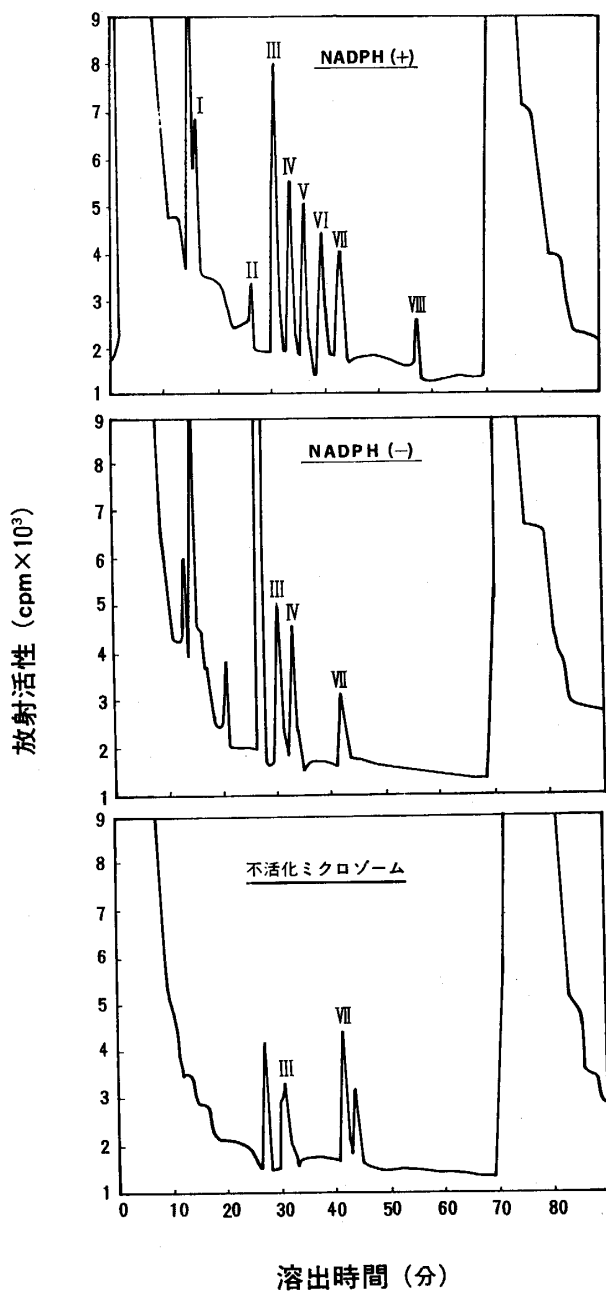


図 2. ラット培養血管平滑筋細胞ミクロゾームにおけるアラキドン酸代謝産物の逆相 HPLC による分析

(上) 1 mM NADPH (+)

(中) NADPH (-)

(下) 1 mM NADPH (+), 不活化ミクロゾーム

I : 14, 15-DHET, II : 5, 6-DHET, III : 15-HETE, IV : 12-HETE, V : 11-HETE, VI : 9-HETE, VII : 5-HETE, VIII : 5, 6-EET

なマスイオン [481 (M^+-15), 465 (M^+-31), 323, 294, 275, 173] が認められ, ピーク I に相当する物質は 14, 15-DHET と同定した。

ピーク II に含まれる代謝産物は, TMS 化後の GC/

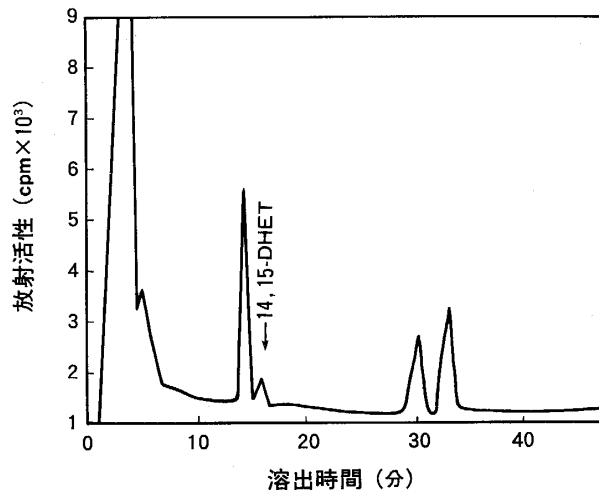


図 3. ラット培養血管平滑筋細胞におけるアラキドン酸代謝産物の逆相 HPLC による分析

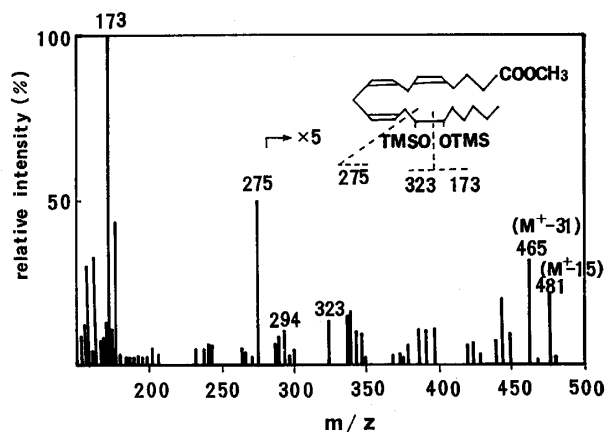


図 4. ピーク I に相当する代謝産物のメチルエステル化および TMS 化誘導体のマスペクトラム

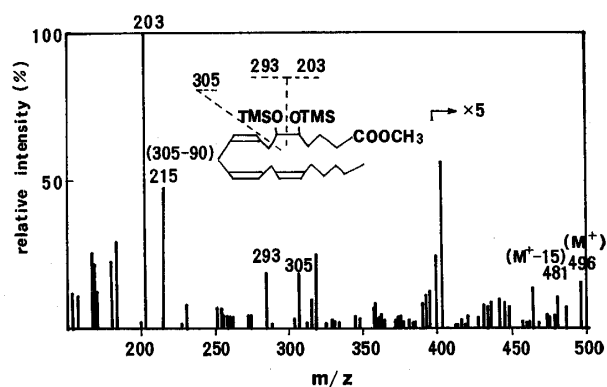


図 5. ピーク II に相当する代謝産物のメチルエステル化および TMS 化誘導体のマスペクトラム

MS 分析より, 図 5 のマスペクトラムが得られた。C value は 12.5 で, 5, 6-DHET の標準品と一致した。5, 6-DHET に特異的なマスイオン [496 (M^+), 481 (M^+-15)] が認められ,

15), 305, 293, 215, 203] が検出されたことにより, ピークⅡを 5, 6-DHET と同定した。

5, 6-EET に一致するピークⅧは, 酸性下の加水分解反応により, 5, 6-DHET に変換後に, GC/MS 分析を行った。C value, 特異的イオン分布ともにピークⅡに一致したことから, ピークⅧは 5, 6-EET と同定した。

3. 大動脈血管条片を用いた EET の血管収縮に及ぼす影響の検討

大動脈条片は, 図 6 の通り PE により濃度依存的に張力増加が認められた。 10^{-5}M で最大張力が得られ, 収縮刺激として用いた 10^{-7}M PE による張力は最大張力の約65%に相当する。ACh は内皮細胞由来血管拡張物

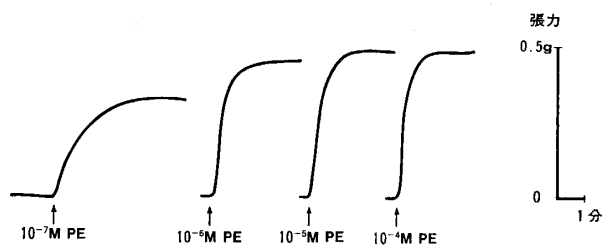


図 6. Phenylephrine (PE) 刺激によるラット大動脈血管条片の張力変化

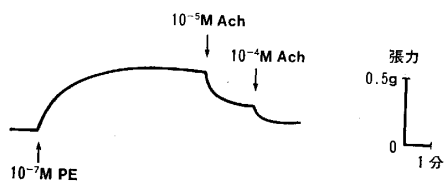


図 7. Acetylcholine (ACh)による内皮細胞依存性血管拡張作用

質を介して, 血管拡張を起こし得る²⁷⁾ので, 内皮が存在すると, 図 7 に示すように張力の減少が認められる。内皮の存在は最終的に ACh による拡張作用の有無により確認した。

(a) 同位体間生物活性特異性の検討: $40\mu\text{M}$ 濃度における EET 同位体間の PE による収縮に及ぼす影響を比較した。図 8 に示すように, 5, 6-EET は36%, 14, 15-EET は13%の収縮抑制を示したが, 8, 9-EET および11, 12-EET には抑制効果を認めなかった。

(b) 濃度依存性の検討: 図 9 は収縮抑制効果の認められた 5, 6-EET および 14, 15-EET について, 濃度依存性を検討した結果を示す。 $10\sim 40\mu\text{M}$ の範囲において, 5, 6-EET は濃度依存的に PE による収縮を抑制した。14, 15-EET にも弱いながら同様の効果が認め

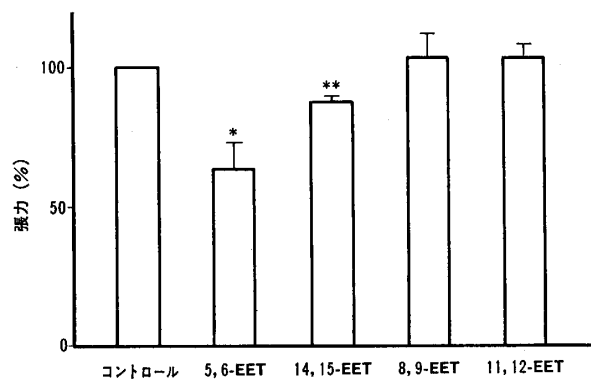


図 8. PE による血管収縮に及ぼす EET 同位体 ($40\mu\text{M}$) 間の効果比較
(*: $p < 0.05$ vs コントロール, **: $p < 0.01$ vs コントロール, $n=4-6$)

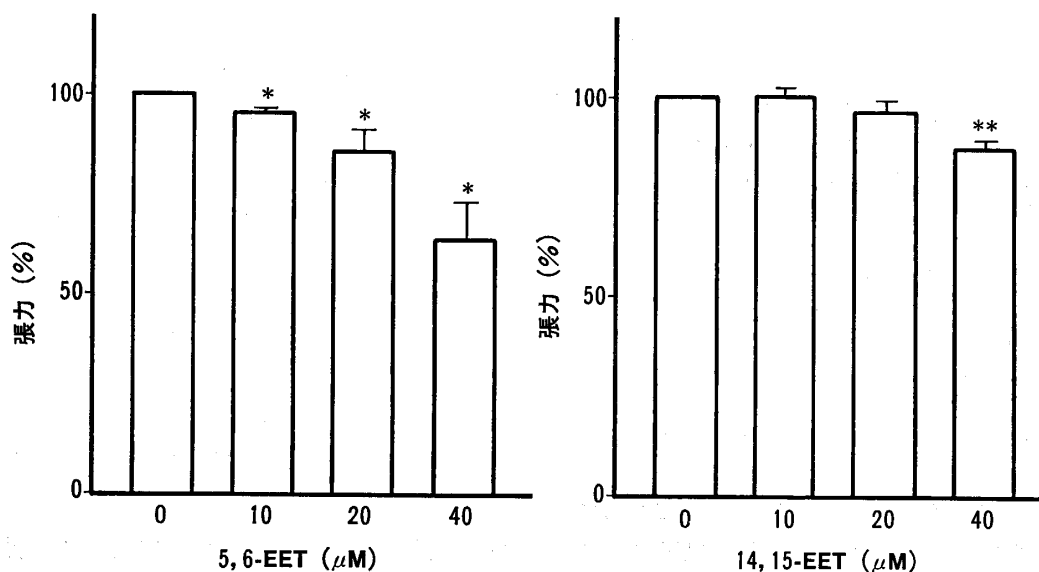


図 9. PE による血管収縮に及ぼす 5, 6-EET および 14, 15-EET の効果
(*: $p < 0.05$ vs $0\mu\text{M}$, **: $p < 0.01$ vs $0\mu\text{M}$, $n=6$)

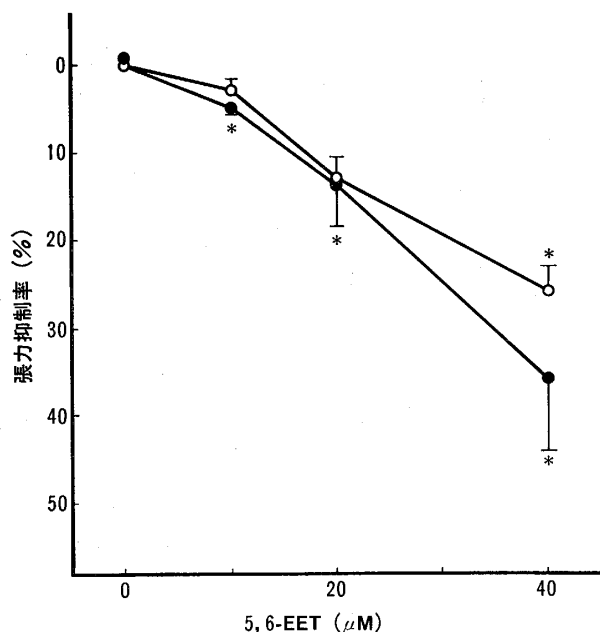


図10. PE による血管収縮に及ぼす 5, 6-EET の効果：内皮細胞存在下 (●), 非存在下 (○) の比較
(* : $p < 0.05$ vs $0 \mu\text{M}$, $n = 3-6$)

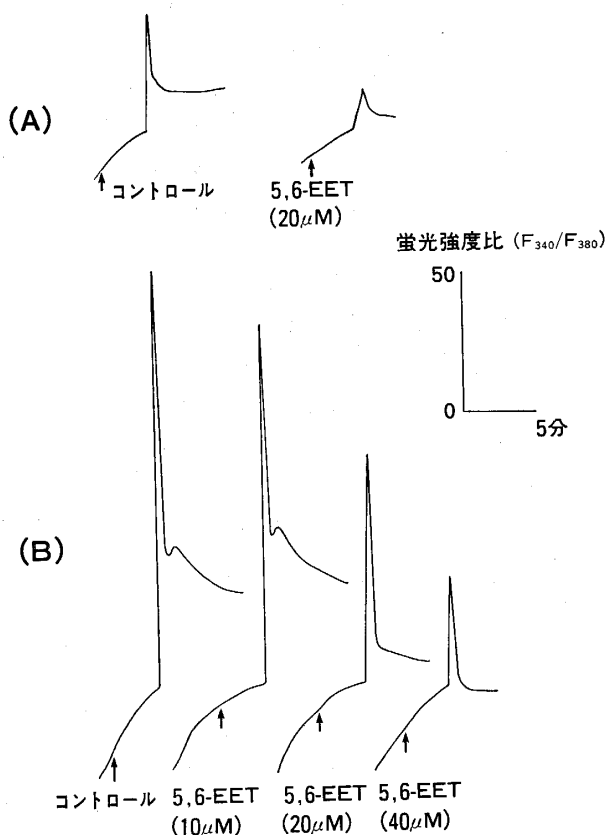


図11. ラット培養血管平滑筋細胞における PE および AII 刺激による細胞内遊離カルシウム濃度上昇に及ぼす 5, 6-EET の効果
(A) PE 刺激時
(B) AII 刺激時

られた。

(c) 内皮細胞の関与の検討：5, 6-EET の収縮抑制効果に内皮の存在が関係しているか否かを調べた。図10に示す通り、内皮を剥離した血管条片においても 5, 6-EET は同様の抑制効果を示し、内皮の有無による差は認めなかった。

4. 細胞内遊離カルシウム濃度の変化に及ぼす効果

図11に示すごとく、 10^{-7}M PE 刺激により、培養血管平滑筋細胞内遊離カルシウム濃度の変化は、初期相(刺激後30秒以内に見られる急峻なピーク)と持続相(初期相に引き続き観察される持続性の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇)からなる典型的なパターンを示した。 $20\mu\text{M}$ 5, 6-EET を前投与すると初期相および持続相、両相の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇が抑制された。AII 刺激において、5, 6-EET の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇抑制効果はより明らかであった。

IV. 考 察

血管平滑筋細胞にシクロオキシゲナーゼおよびリポキシゲナーゼ代謝経路が存在して、それぞれの代謝産物が生成されることは周知のことであるが、チトクロム P-450依存性モノオキシゲナーゼ代謝産物が存在するか否かについては明らかにされていない。本研究においては、まずラット大動脈培養血管平滑筋細胞を用いて、モノオキシゲナーゼ代謝産物、特に EET と DHET の存在を明らかにし、次にその生理作用と機序について検討を加えた。

[$1\text{-}^{14}\text{C}$] アラキドン酸と血管平滑筋細胞ミクロゾームとの反応で得られた代謝産物を、逆相および順相 HPLC で分離精製して、最終的に GC/MS で同定した結果、5, 6-EET, 5, 6-DHET および 14, 15-DHET が NADPH 依存的に産生されて、かつ、チトクロム P-450阻害剤である SKF-525A および metyrapone で産生が抑制されることが明らかとなった。これは血管平滑筋ミクロゾームにチトクロム P-450 依存性モノオキシゲナーゼが存在し、アラキドン酸より epoxides を産生しうることを示す。チトクロム P-450 阻害剤は本実験で高濃度を必要としたが、従来の報告とほぼ同様であり、細胞によるモノオキシゲナーゼの特異性が関与していると考えられた^{28,29)}。14, 15-EET に相当するピークは逆相 HPLC では明らかにできなかった。そこで、14, 15-EET が産生されているかどうかを明らかにするために、14, 15-EET 標準物質の溶出時間と同じ時間の溶出液を分取して、これを加水分解後、順相 HPLC で精製し、誘導体化後、GC/MS で分析した。その結果、順相 HPLC 上で14, 15-DHET 標準物質と同一の溶出時間

を持ち、GC/MS 上でも 14, 15-DHET と同じ C value を有し、更に特異的マスイオンの一部 [173, 275] を確認した。これより、14, 15-EET は血管平滑筋ミクロゾームで産生されるが、微量であるために今回の方法では充分に証明できなかったものと推察された。

[1-¹⁴C] アラキドン酸と培養血管平滑筋細胞との反応においては、14, 15-DHET のみが同定確認された。ミクロゾームとの反応の結果と異なり、5, 6-EET と 5, 6-DHET は検出されなかった。この理由として、平滑筋細胞との反応においては、ミクロゾームとの反応に比べて EET の産生量が少ないことが推定されるが、細胞質中の加水分解酵素が 5, 6-EET より 14, 15-EET に高い活性を有し、14, 15-EET が 14, 15-DHET に代謝されやすく、14, 15-DHET のみ存在が確認された可能性も考えられる³⁰⁾。

以上の結果より、血管平滑筋細胞でアラキドン酸を基質としてチトクロム P-450 依存性モノオキシゲナーゼ代謝産物が産生されることが明らかとなった。

EET の血管壁における役割について、合成の EET を用いて検討した報告によれば、種々の動物の異なる血管において、少なくとも 5, 6-EET は血管拡張作用を有することが示唆されるが、他の EET については報告により異なる¹⁸⁻²²⁾。一般にアラキドン酸代謝産物は局所においてオートクリンまたはパラクリン作用を有することより、われわれはラット大動脈血管平滑筋に存在を確認した EET の、血管収縮に及ぼす作用をラット大動脈血管条片を用いて検討した。その結果、5, 6-EET と 14, 15-EET にのみ収縮抑制作用が認められ、内皮細胞を介さずに直接平滑筋に作用することが強く示唆された。今回用いた EET の濃度 (10~40 μ M) は、ウサギ肺動脈 (0.01~1 μ M)¹⁸⁾ や、イヌ冠動脈 (0.1~10 μ M)²²⁾ の実験で用いられた EET の濃度に比べ、高濃度であるが、ラット尾動脈¹⁹⁾では 2~20 μ M を用いており、動物種や血管の違い、あるいは実験方法により、濃度の差が大きいと考えられる。

つぎにわれわれは、EET の収縮抑制効果の機序を検討するために、血管の収縮拡張に主要な役割を果たす細胞内遊離カルシウム濃度に及ぼす影響を検討した。5, 6-EET は濃度依存的に収縮刺激に伴う $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を抑制した。EET 単独では $[Ca^{2+}]_i$ に変化を及ぼさないことから、EET は収縮刺激に伴う $[Ca^{2+}]_i$ の上昇抑制を介して、収縮作用を減弱させるものと考えられた。EET がシクロオキシゲナーゼにより代謝されてプロスタグランジンがつくられ、拡張作用を現わす可能性も指摘されている³¹⁾が、われわれは、10 μ M indometha-

cine 処理によっても同様の収縮抑制効果を認めており、収縮抑制効果は EET 自身の作用と考えられた。肝細胞膜においては、EET が再アシル化されて phosphatidylinositol 画分に存在することが明らかにされており³²⁾、EET が細胞膜機能や phosphatidylinositol 代謝回転に影響を及ぼす可能性が示唆される。血管平滑筋細胞における Ca メッセンジャー系を介する血管拡張作用の機序については、今後さらに詳細な検討が必要とされる。ハムスター頬袋細動脈において熱傷時の血流増加にチトクロム P-450 依存性モノオキシゲナーゼ代謝産物が関与するとの報告³³⁾、イヌ冠動脈に狭窄をつくると EET 産生量が 5~10 倍に増加するとの報告²²⁾は、EET が、in vivo で、血管拡張物質として作用することを示唆するものであるが、まだ、生理的な意義に関しては明らかでない点が多い。

また、[1-¹⁴C] アラキドン酸と血管平滑筋ミクロゾームとの反応で得られた代謝産物の逆相 HPLC 分析で、HETE に一致するピークが認められ、12-HETE および 9-HETE はチトクロム P-450 依存的に産生されることが考えられた。すでに、Capdevila らは肝ミクロゾームを用いて、アラキドン酸よりチトクロム P-450 依存性に HETE が生成されることを報告している³⁴⁾。HETE には 2 種の立体異性体、(R) と (S) があるが、12 (R)-HETE が 12 (S)-HETE に比べ優位に産生され (R:S=81:19)、チトクロム P-450 依存性に産生される HETE は 12 (R)-HETE が中心であることを明らかにしている。12 (R)-HETE が EET より強力な血管拡張作用を有するとの報告³⁵⁾もあり、今回検体量の関係で GC/MS で同定できなかった HETE についても今後、同定および作用の検討を試みたい。

以上の結果より、われわれはラット大動脈血管平滑筋においてチトクロム P-450 依存性モノオキシゲナーゼ代謝産物の 5, 6-EET および 14, 15-EET が産生されることを初めて示し、これらは血管平滑筋に直接作用して収縮刺激に伴う $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を抑制することにより、血管収縮抑制作用を有することを明らかにした。

謝辞

本研究の遂行にあたり御指導を賜りました恩師、千葉大学医学部第二内科学教室吉田 尚教授に深甚の謝意を表します。また終始、直接御指導、御援助を賜った、千葉大学医学部第二内科助教授田村 泰博士、千葉大学医学部第二内科助手寺野 隆博士に深く感謝致します。さらに GC/MS によるアラキドン酸代謝産物の同定にあたり、多くの助言と協力を戴いた東京薬科大学中央分析

センター志田保夫博士に心より御礼申し上げます。

なお本論文は審査学位論文である。

SUMMARY

The vasodilatory effect of epoxyeicosatrienoic acids (EET), especially 5, 6-EET, has been recently reported and an important role of P-450 dependent arachidonic acid (AA) monooxygenase metabolites is proposed in vasodilatation. Accordingly, the presence of P-450 dependent AA monooxygenase was investigated in rat cultured aortic smooth muscle cells (SMC). Incubation of the microsomes of rat cultured aortic SMC with [$1\text{-}^{14}\text{C}$] AA in the presence of 1 mM NADPH resulted in the formation of oxygenated metabolites. The metabolites were separated and purified by reverse phase and straight phase high performance liquid chromatography and identified by gas chromatography-mass spectrometry. Identified metabolites were 5, 6-EET, 5, 6-dihydroxy-eicosatrienoic acid (DHET) and 14, 15-DHET. The formation of these metabolites was totally dependent on the presence of NADPH and inhibitors of cytochrome P-450 dependent enzymes, SKF-525 A and metyrapone, reduced the formation of these metabolites.

The effect of EET on phenylephrine (PE) induced vasoconstriction was investigated using herical strip of rat aorta. 5, 6-and 14, 15-EET inhibited the PE-induced vasoconstriction dose-dependently, but 8, 9-and 11, 12-EET were inactive. Inhibitory effect of 5, 6-EET was also recognized in the absence of endothelium. Pretreatment of 5, 6-EET inhibited an increase in cytosolic free calcium ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) of fura-2 labeled SMC stimulated by PE or angiotensin II (AII).

This is the first report that cytochrome P-450 dependent AA metabolites, especially 5, 6-and 14, 15-EET, can be produced in the microsomes of vascular SMC. These metabolites have vasodilatory effects in an autocrine manner through the inhibition of an increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ of SMC.

文 献

- 1) Capdevila J, Chacos N, Werringloer J, Prough RA and Estabrook RW: Liver microsomal cytochrome P-450 and the oxidative metabolism of arachidonic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 5362-5366, 1981.
- 2) Oliw EH and Moldeus P: Metabolism of arachidonic acid by isolated rat hepatocytes, renal cells and by some rabbit tissues. *Biochim Biophys Acta* **721**: 135-143, 1982.
- 3) Oliw EH, Guengerich FP and Oates JA: Oxygenation of arachidonic acid by hepatic monooxygenases. *J Biol Chem* **257**: 3771-3781, 1982.
- 4) Chacos N, Falck JR, Wixtron C and Capdevila J: Novel epoxides formed during the liver cytochrome P-450 oxidation of arachidonic acid. *Biochem Biophys Res Commun* **104**: 916-922, 1982.
- 5) Schwartzmann ML, Devis KL, McGiff JG, Levere RD and Abraham NG: Purification and characterization of cytochrome P-450-dependent arachidonic acid epoxidase from human liver. *J Biol Chem* **263**: 2536-2542, 1988.
- 6) Oliw EH, Lawson JA, Brash AR and Oates JA: Arachidonic acid metabolism in rabbit renal cortex. *J Biol Chem* **256**: 9924-9931, 1981.
- 7) Morrison AR and Pascoe N: Metabolism of arachidonate through NADPH-dependent oxygenase of renal cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 7375-7378, 1981.
- 8) Schwartzman ML, Abraham NG, Carroll MA, Levere RD and McGiff JC: Regulation of arachidonic acid metabolism by cytochrome P-450 in rabbit kidney. *Biochem J* **238**: 283-290, 1986.
- 9) Capdevila J, Snyder GD and Falck JR: Epoxidation of arachidonic acid by rat anterior pituitary microsomal fractions. *FEBS* **178**: 119-322, 1984.
- 10) Nishimura M, Hirai A, Omura M, Tamura Y and Yoshida S: Arachidonic acid metabolites by cytochrome P-450 dependent monooxygenase pathway in bovine adrenal fasticulated cells. *Prostaglandins* **38**: 413-430, 1989.
- 11) Capdevila J, Chacos N, Falck JR, Manna S, Negro-Vilar A and Ojeda SR: Novel hypothalamic arachidonate products stimulate somatostatin release from the median eminence. *Endocrinology* **113**: 421-423, 1983.
- 12) Negro-Vilar A, Snyder GD, Falck JR, Manna S, Chacos N and Capdevila J: Involvement of eicosanoids in release of oxytocin and vasopressin from the neural lobe of the rat pituitary. *Endocrinology* **116**: 2663-2668, 1985.
- 13) Snyder G, Lattanzio F, Yadagiri P, Falck JR and Capdevila J: 5, 6-Epoxyeicosatrienoic acid mobilizes Ca^{2+} in anterior pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* **139**: 1188-1194, 1986.
- 14) Luini AG and Axelrod J: Inhibitors of the cytochrome P-450 enzymes block the secereagogue-induced release of corticotropin in

- mouse pituitary tumour cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **82** : 1012-1014, 1985.
- 15) Cashmann JR, Hanks D and Weiner RI: Epoxy derivatives of arachidonic acid are potent stimulators of prolactin secretion. *Neuroendocrinology* **46** : 246-251, 1987.
- 16) Falck JR, Manna S, Moltz J, Chacos N and Capdevila J: Epoxyeicosatrienoic acids stimulate glucagon and insulin release from isolated rat pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun* **114** : 743-749, 1983.
- 17) Schwartzman ML, Ferreri NR, Carroll MA, Sougu-Mize E and McGiff JC: Renal cytochrome P 450-related arachidonate metabolite inhibits ($\text{Na}^+\text{-K}^+$) ATPase. *Nature* **314** : 620-622, 1985.
- 18) Carroll MA, Schwartzman M, Abraham NG, Pinto A and McGiff JC: Cytochrome P-450-dependent arachidonate metabolism in renomedullary cells: Formation of Na^+K^+ -ATPase inhibitor. *J Hypertension* **4** (suppl 4) : S33-S42, 1986.
- 19) Carroll MA, Schwartzman M, Capdevila J, Falck JR and McGiff JC: Vasoactivity of arachidonic acid epoxides. *Eur J Pharmacol* **138** : 281-283, 1987.
- 20) Proctor KG, Falck JR and Capdevila J: Intestinal vasodilatation by epoxyeicosatrienoic acids: arachidonic acid metabolites produced by a cytochrome P-450 monooxygenase. *Circ Res* **60** : 50-59, 1987.
- 21) Coceani F, Breen CA, Lees JG, Falck JR and Olley PM: Further evidence implicating a cytochrome P-450 mediated reaction in the contractile tension of the lamb ductus arteriosus. *Circ Res* **62** : 471-477, 1988.
- 22) Rosolowsky M, Falck JR, Willerson JT and Campbell WB: Synthesis of lipoxygenase and epoxigenase products of arachidonic acid by normal and stenosed canine coronary arteries. *Circ Res* **66** : 608-621, 1990.
- 23) Chung SK and Scott AI: Synthesis of ($\pm$)-eicosa-cis-8, 9-(11, 12-and 14, 15-epoxy-cis-11, 14(8, 14-and 8, 11-) dienoic acids and attempted bioconversion to prostaglandins. *Tetrahedron Lett* **35** : 3023-3024, 1974.
- 24) Ross R: The smooth muscle cell. Part 2 (Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fiber). *J Cell Biol* **50** : 172-186, 1971.
- 25) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193** : 265-275, 1951.
- 26) Miwa JK, Mikolajczak KL, Earle FR and Wolff IA: Gas chromatographic characterization of fatty acids identification constant for mono-and dicarboxylic methyl esters. *Analytical Chem* **32** : 1739-1742, 1960.
- 27) Furchgott R and Zawadzki D: The obligatory role of endothelial cells in relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288** : 373-376, 1980.
- 28) Abraham NG, Pinto A, Mullane KM, Lever RD and Spokas E: Presence of cytochrome P-450 dependent monooxygenase in intimal cells of the hog aorta. *Hypertension* **7** : 899-904, 1985.
- 29) Singer HA, Saye JA and Peach MJ: Effects of cytochrome P-450 inhibitors on endothelium-dependent relaxation in rabbit aorta. *Blood Vessels* **21** : 223-230, 1984.
- 30) Chacos N, Capdevila J, Falck JR, Manna S, Martin-Wixtrom C, Gill SS, Hammock BD and Estabrook RW: The reaction of arachidonic acid epoxides (epoxyeicosatrienoic acids) with a cytosolic epoxide hydrolase. *Arch Biochem Biophys* **223** : 639-648, 1983.
- 31) Fitzpatrick FA and Murphy RC: Cytochrome P-450 metabolism of arachidonic acid: Formation and biological actions of "epoxigenase"-derived eicosanoids. *Pharmacological Reviews* **40** : 229-241, 1989.
- 32) Capdevila JH, Kishore V, Dishman E and Blair IA: A novel pool of rat liver inositol and ethanolamine phospholipids contains epoxyeicosatrienoic acids (EETs). *Biochem Biophys Res Commun* **146** : 638-644, 1987.
- 33) Proctor KG, Shatkin S, Kaminski PM, Falck JR and Capdevila JH: Modulation of arteriolar blood flow by inhibitors of arachidonic acid oxidation after thermal injury: possible role for a novel class of vasodilator metabolites. *Circulation* **77** : 1185-1196, 1988.
- 34) Capdevila J, Yadagiri P, Manna S and Falck JR: Absolute configuration of the hydroxy-eicosatetraenoic acids (HETEs) formed during catalytic oxygenation of arachidonic acids by microsomal cytochrome P-450. *Biochem Biophys Res Commun* **141** : 1007-1011, 1986.