

原 著

選択的エンドセリン ET_A 受容体拮抗薬 BQ-485の冠循環への効果

— その心保護薬としての可能性に関する検討 —

佐久間 一郎*, 浅 島 弘 志*, 北 畠 顕*

要 旨

エンドセリン (ET-1 および ET-3, 10 pmol) 投与は, ラット摘出心の冠血管床を一過性に拡張させ, その後持続的に収縮させる. この作用に対する ET_A 選択的拮抗薬の効果について検討した. 本実験系において冠血管をサポニン処理すると, ET による冠拡張作用は消失し, 収縮作用が著しく増強した. 選択的 ET_A 受容体拮抗薬 BQ-485 (1 μM) は, ET-1 による拡張持続時間を有意に延長させ, 収縮作用減少させた. 同薬はサポニン処理後の ET-1 による冠血管収縮作用を抑制した. 以上より, 内皮細胞障害時に ET-1 が ET_A 受容体に介して心筋灌流を悪化させる可能性, および選択的 ET_A 拮抗薬がそれを予防する可能性が示唆された.

はじめに

エンドセリン (ET)-1 は, ヒトを含む種々の血管内皮細胞が生成・放出する21アミノ酸からなるペプチドであり, 強力な血管収縮物質として知られている¹⁾. しかるに, ET-1 を *in vitro* や *in vivo* の実験系に投与した際には, まず一過性の血管拡張作用が認められ, 次いで持続性の血管収縮が生じる場合が多い^{2,3)}. 現在のところ ET-1 の血管収縮作用は, 主に血管平滑筋の ET_A 受容体刺激を介し, 血管拡張作用は血管内皮細胞の ET_B 受容体刺激による内皮依存性弛緩物質の放

出を介すると考えられている⁴⁾.

冠血管においても ET-1 はその強力な血管収縮作用から, 臨床的に冠動脈スパズムの惹起物質となる可能性が考えられているものの⁵⁾, 実際のところ種々の動物モデルで, むしろ冠血管を拡張する場合のあることが報告されている⁶⁾. ラット単離心においても ET-1 の投与により冠血管床は持続的に収縮するが, 投与量が少量のばあいには, まず冠血管床の拡張が惹起される⁷⁾. われわれは以前, この拡張反応には内皮由来弛緩因子 (EDRF) と内皮由来過分極因子 (EDHF) が関与する可能性を報告しており⁸⁾, ラット冠血管床では, ET-1 は血管平滑筋の ET_A 受容体を介して冠血管を収縮させるが, その作用は内皮細胞の ET_B 受容体を介して放出される血管弛緩因子により緩衝されていると推察される.

臨床的に冠動脈硬化や高脂血症の存在する場合には, EDRF による血管拡張能が低下することは良く知られている. また動脈硬化巣に沈着するリゾフォスファチジルコリンは EDHF を抑制する⁹⁾. このような病態で, もし ET-1 が冠動脈に作用すれば, ET-1 の ET_B 受容体を介した冠動脈拡張作用が抑制されることにより ET_A 受容体を介した冠動脈収縮作用が増強され, 心筋は虚血状態に陥り易くなることが予想される. そしてその場合, 選択的 ET_A 受容体拮抗薬は ET-1 による冠動脈収縮を抑制し, 心保護薬として機能し得ると考えられる. 本研究では選択的 ET_A 受容体拮抗薬である BQ-485¹⁰⁾ を用い, 同薬物が心保護薬として作用する可能性を実験的に検討した.

*北海道大学医学部循環器内科

方 法

体重180-200 gの雄性 Wistar ラットを麻酔下(ペントバルビタール20 mg/kg i. p.)に開胸後、心臓を摘出し、直ちに Langendorff 法を用いて37℃にて定流灌流(10 ml/min)した。灌流液としては Krebs-Henseleit 液(KH液:(mM) NaCl 118, KCl 4.7, CaCl₂ 1.75, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 25.0, *d*-glucose 11.0)を用い、同液は95% O₂, 5% CO₂を用いて pHを7.4に維持した。冠灌流圧(coronary perfusion pressure: CPP)を大動脈カニューレの側口にて圧トランスデューサ(DT-XXAD, Spectramed, USA)を用いて計測し、レコーダ(RECTI-HORIZ-8K, 日本電気三栄)に記録した。

CPPが安定した後、KH液に溶解したアセチルコリン(ACh:10 nmol)、次いでニトロプルシド(SNP:100 nmol)を大動脈弁直上部より投与して冠動脈内皮細胞および冠血管平滑筋の弛緩反応(CPPの低下)をチェックし、いずれの機能も保たれていた心臓のみを実験に供した。一部の実験では、サポニン(30 μg/ml)を含むKH液にて心臓を灌流し(2 min×3回)、冠動脈内皮を剝離させた¹¹⁾。

ET-1およびET-3は10 pmolを10 μlのKH液に溶解し、大動脈弁直上部より投与した(本容量のET-1およびET-3は、最大のCPP低下を惹起する⁸⁾)。BQ-485投与時はBQ-485を含むKH溶液で15分以上灌流し、その場合、およびサポニン処理後にETを再投与する際には、30分以上の間隔を経てから投与した。本実験系においてET投与前のCPPは約100 mmHgであり、BQ-485存在下やサポニン処理後も有意の変化はきたさなかった。CPPの変化は、ET投与後CPPが低下した場合は、ET投与前値からの最大低下率(%), および最大低下時点からET投与前のCPP値へCPPが半分だけ戻るに要した時間(T_{1/2})を計測した。また、ET投与後CPPが上昇した場合は、前値からの上昇率(%)を計測した。

ET-1およびET-3はペプチド研究所(大阪)より入手し、BQ-485は万有製薬筑波研究所の矢野光夫博士より提供を受けた。その他の試薬はSigma(St. Louis, USA)より購入した。結果はmean±SEMで表し、検定にはoneway ANOVA

の後、pairedもしくはunpaired *t*-testを用いた。

結 果

内皮細胞が保存されたラット単離心に10 pmolのET-1およびET-3を投与すると、CPPは直ちに低下した後、投与前値にまで復し、次いで徐々に上昇した(図1)。ET-1およびET-3によるCPPの最大低下率は、それぞれ31.8±2.0%(n=31)および32.2±2.5%(n=31)であり、有意差は認めなかった。しかし、T_{1/2}はET-1で0.49±0.03 min(n=31)となり、ET-3の0.74±0.04 min(n=31)と比較して有意(P<0.001)に短かった。また、選択的ET_B受容体刺激薬であるサラフォトキシンS6c(10 pmol)を投与すると、CPPにはET-3と同様な低下反応が惹起された(最大低下率:38.0±3.3%, T_{1/2}:0.65±0.09 min, n=4)。一方、サポニン処理による内皮細胞を剝離させた心臓にET-1およびET-3を投与すると、CPPの低下は消失し、著明な上昇が出現した(図1)。

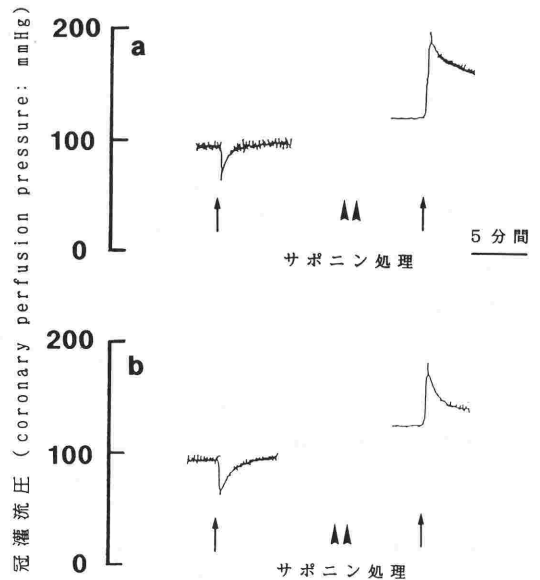


図1 サポニン処理前および処理後においてエンドセリンがラット単離心冠灌流圧におよぼす効果。エンドセリン-1(a)およびエンドセリン-3(b)10 pmolは大動脈弁直上で灌流液内に bolus 投与(↑)された。

BQ-485 (1 μM) は、ET-1 による CPP の最大低下率は変化させなかったものの (30.0±2.0 % から 29.0±3.3 %, n=4), T_{1/2} を有意に増加させ (0.57±0.07 min から 1.23±0.08 min, n=4) (図 2), BQ-485 存在下では ET-1 の CPP への作用は ET-3 による作用 (最大低下率: 32.7±0.9 %, T_{1/2}: 0.90±0.18 min, n=4) と同様となった. また BQ-485 は、内皮細胞が保存された心臓およびサポニン処理後の心臓にいずれにおいても、ET-1 による CPP の上昇を有意に抑制した (図 3).

考 案

本研究ではラット単離心において、低容量の ET-1 は、まず CPP の急峻な低下を惹起し、次いで CPP の持続的上昇をもたらした. これは ET-1 が冠血管床に対して早期に弛緩反応を引き起こし、次いでその強力な収縮作用が徐々に出現することを示す. 後者の冠血管床収縮作用は、BQ-485 で抑制されたことより、血管平滑筋の ET_A 受容体を介したものと考えられる. 前者の弛緩作用については、サラフォトキシシン S6c, ET-3, さらに BQ-485 存在下の ET-1 が同様の反応を惹起したことより、血管内皮細胞の ET_B 受容体を介した血管弛緩物質の作用によるものと考えられる. ラット単離心における ET-1 の冠血管に対する作用については、Wang ら¹²⁾ が定圧 (100 cm H₂O) 灌流心において、ET-1 および選択的 ET_B 受容体刺激薬 IRL 1620 を用い、選択的 ET_A 受容体拮抗薬 BQ-123 および選択的 ET_B 受容体拮抗薬 IRL 1038 の効果をもとに検討しているが、本研究と同様な結論に達している.

最近 Kurihara らは、ET-1 ノックアウトマウスでは対照マウスと比較し、血圧がむしろ高目となることを報告した¹³⁾. ET-1 は強力な内皮細胞由来血管収縮物質であり、血圧を維持し、血流を制限するように作用すると考えられている. しかし、彼らの結果は生理的状态で内皮機能が保持され、かつ ET-1 の濃度が正常域の場合には、ET-1 の ET_A 受容体を介した血管収縮作用は、ET_B 受容体を介した内皮由来弛緩物質による血管拡張作用に凌駕されることを示したとも考えられる. 実際生理的状态における ET-1 の血中濃度は、実験で収縮作用を出現させるために用いられる濃度と比較して低いことが知られており、冠血管床においても内皮細胞が正常な場合には ET-1 はむしろ拡張作用を惹起しているとしても不思議ではない. さらに、もし冠血管床において血管内皮が傷害されていたり、EDRF を初めとする内皮由来弛緩物質の機能が低下した場合には、ET-1 の強力な血管収縮作用が前面に出される可能性がある. その場合、ET-1 は冠血管床を収縮して心筋への血液灌流を減少させ、心筋虚血を惹起することが予想される. 本研究において、ET-1 は内皮細胞が保持された状態では冠血管床を一過性に拡張

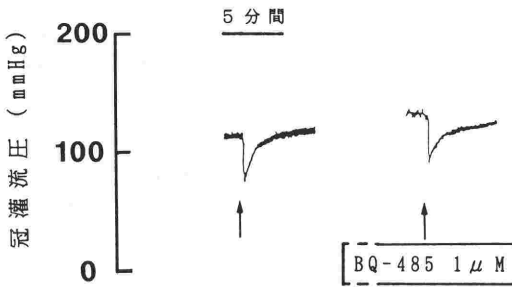


図 2 エンドセリン-1 のラット単離心灌流圧低下作用に対する BQ-485 の影響
 エンドセリン-1 (10 pmol) は大動脈弁直上で灌流液内に bolus 投与(↑)された.

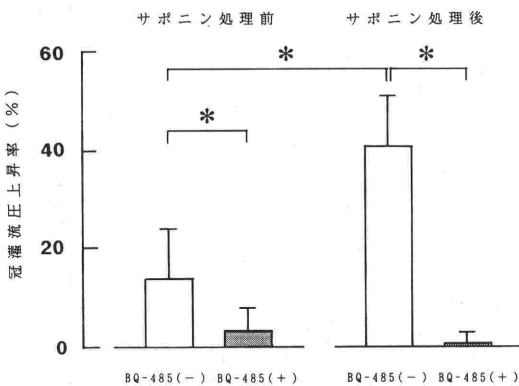


図 3 エンドセリン-1 のラット単離心灌流圧上昇作用に対する BQ-485 の効果
 (+): BQ-485 非存在下, (-): BQ-485 存在下. 棒グラフは平均値±SEM を示す (n=6-12). *: P<0.001.

張させたものの、内皮細胞を傷害した状態では冠血管床を非常に強く収縮させたが、この結果はその可能性を示唆するものと考えられる。

さらに本研究において、選択的 ET_A 受容体拮抗薬 BQ-485は ET-1 による冠血管床収縮作用を、血管内皮保存下および非保存下のいずれの場合においても強力に抑制した。BQ-485は in vitro の実験系において、以前より研究開発が進められている選択的 ET_A 受容体阻害薬 BQ-123と同様な選択性と力価を有するが、BQ-123より容易に大量製造が可能であり、生体への応用が期待されている¹⁰⁾。Itohらはイヌのくも膜下出血モデルにおいて BQ-485を一週間皮下投与し、重大な副作用なしに脳底動脈の攣縮を抑制できたと報告している¹⁰⁾。心臓においても、BQ-485は ET-1 による冠攣縮とそれに引き続く心筋虚血の予防と解除に有用な治療薬となる可能性があると考えられる。

結 論

エンドセリン (ET) のラット摘出冠血管床に対する収縮・拡張作用に対する選択的 ET_A 受容体拮抗薬 BQ-485の効果について検討した。

① BQ-485 (1 μM) は、内皮機能が保持された心臓において ET-1 による拡張持続時間を有意に延長させ、収縮作用を減少させた。

② BQ-485は、saponin 処理により内皮細胞を剝離した心臓において、ET-1 による冠血管床収縮作用を抑制した。

以上より、内皮細胞障害時に ET-1 が ET_A 受容体を介して冠攣縮を惹起し、心筋灌流を悪化させる可能性が示された。さらに選択的 ET_A 受容体拮抗薬がそれを予防・解除し、治療薬として有用となる可能性が考えられた。

文 献

- 1) Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 322: 411-415, 1988
- 2) Yanagisawa M, Masaki T: Endothelin, a novel endothelium-derived peptide: Pharmacological activities, regulation and possible roles in cardiovascular control. *Biochem Pharmacol* 38: 1877-1883, 1989
- 3) De Nucci G, Thomas R, D'Orleans-Juste P, et al: Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 9797-9800, 1988
- 4) Masaki T, Kimura S, Yanagisawa M, Goto K: Molecular and cellular mechanism of endothelin regulation: implications for vascular function. *Circulation* 84: 1457-1468, 1991
- 5) Yoyo-oka T, Aizawa T, Suzuki N, et al: Increased plasma level of endothelin-1 and coronary spasm induction in patients with vasospastic angina pectoris. *Circulation* 83: 476-483, 1991
- 6) Wright CE, Fozard JR: Regional vasodilation is a prominent feature of the haemodynamic response to endothelin in anaesthetized, spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 155: 199-203, 1988
- 7) Baydoun AR, Peers SH, Cirino G, et al: Vasodilator action of endothelin-1 in the perfused rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 15: 759-763, 1990
- 8) Sakuma I, Asajima H, Fukao M, et al: Possible contribution of potassium channels to the endothelin-induced dilatation of rat coronary vascular beds. *J Cardiovasc Pharmacol* 22 (Suppl. 8): S232-S234, 1993
- 9) Fukao M, Hattori Y, Kanno M, et al: Evidence for selective inhibition by lysophosphatidylcholine of acetylcholine-induced endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation in rat mesenteric artery. *Br J Pharmacol* 115: (in press), 1995
- 10) Itoh S, Sasaki T, Ide K, et al: A novel endothelin ET_A receptor antagonist, BQ-485, and its preventive effect on experimental cerebral vasospasm in dogs. *Biochem Biophys Res Commun* 195: 969-975, 1993
- 11) Moore PK, Al-Swayeh OA, Chong NW, et al: L-N^G-nitro arginine (L-NOSRG), a novel L-arginine-reversible inhibitor of endothelium-dependent vasorelaxation in vitro. *Br J Pharmacol* 99: 408-412, 1990
- 12) Wang Q-D, Li X-S, Pernow J: Characterization of endothelin-1-induced vascular effects in the rat heart by using endothelin receptor antagonists. *Eur J Pharmacol* 271: 25-30, 1994
- 13) Kurihara Y, Kurihara H, Suzuki, et al: Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. *Nature* 368: 703-710, 1994

Possible Role of the Selective Endothelin ET_A Receptor Antagonist BQ-485 on Cardioprotection

Ichiro Sakuma*, Hiroshi Asajima*, Akira Kitabatake*

*Department of Cardiovascular Medicine, Hokkaido University School of Medicine, Sapporo, Japan

We aimed to assess the effects of BQ-485, a selective endothelin (ET) A (ET_A) receptor antagonist, on the vasomotion induced by a low dose of ET. In the isolated rat heart perfused at a constant flow with Krebs-Henseleit solution the intracoronary bolus injection of ET-1 or ET-3 (10 pmol) elicited a rapid transient decrease, followed by a sustained increase, in the coronary perfusion pressure (CPP). The decrease in CPP induced by ET-1 was shorter than that by ET-3. Pretreatment of the heart with saponin (30 mg/ml) to denude the coronary endothelium abolished the decrease and markedly enhanced the increase in CPP induced by ETs. The selective ET_A receptor antagonist BQ-485 (1 mM) significantly prolonged the ET-1-induced decrease in CPP, and eliminated the subsequent increase in CPP. In

the saponin treated heart, BQ-485 potentially inhibited the ET-1-mediated increase in CPP. It is thus suggested that in the rat coronary vascular beds the low dose ET-1 induces a vasoconstriction and an endothelium-dependent vasodilatation through ET_A receptors on the vascular smooth muscle and ET_B receptors on the endothelium, respectively. Furthermore, it would be expected that selective ET_A receptor antagonists including BQ-485 are able to protect heart against the ET-1-induced coronary vasospasm in the diseased conditions such as atherosclerosis, diabetes melitus or hyperlipidemia in which the release and/or function of endothelium-derived relaxing factors have been reported to be impaired.

Key Words : Endothelin, BQ-485, Endothelium-derived relaxing factor (EDRF) Rat, Coronary vascular beds

(Circ Cont 16 : 377~381, 1995)