

血流調整因子としての EDHF とその病態生理学的意義

服部 裕一*

はじめに

血管内皮細胞は、単に血管内側にあつて物質交換のバリアーとして作用しているのみならず、血流によって生じるズリ応力のような物理的的刺激や、アセチルコリン (ACh) やブラジキニン (BK) のような種々の神経液性物質に反応して血管作動物質を合成し放出する¹⁾。この内皮由来の血管拡張物質として、L-アルギニンのグアニジン窒素分子が一酸化窒素合成酵素 (endothelial nitric oxide synthase: eNOS) により酸化されて生成される一酸化窒素 (NO) と、cyclooxygenase によりアラキドン酸から産生されるプロスタサイクリンが同定されている²⁻⁴⁾。しかしながら、内皮依存性血管弛緩反応が全て NO あるいはプロスタサイクリン放出によってだけでは十分には説明されえない。モルモット腸間膜動脈において、ムスカリン受容体刺激が内皮依存性に平滑筋細胞を過分極させることが Bolton ら⁵⁾ によって報告され、さらにこの現象は他の多くの血管においても起こることが確認された⁶⁻⁹⁾。ACh などによる内皮依存性過分極反応は、eNOS および cyclooxygenase 阻害薬によっても影響を受けないことから、内皮細胞からは NO やプロスタサイクリンとは異なった未だ同定されていない因子、すなわち内皮由来過分極因子 (endothelium-derived hyperpolarizing factor: EDHF) が放出されていると提唱された¹⁰⁾。平滑筋細胞の過分極は、電位依存性 Ca^{2+} チャネルの開口確率を減少して細胞内 Ca^{2+} レベルを低下させることによって、平滑筋の弛緩を惹起する¹¹⁾。それ故、NO およびプロスタサイ

クリンの産生が阻害されている状況下において認められる内皮依存性血管弛緩反応のメカニズムは、EDHF を介した平滑筋細胞の過分極によるものであると考えられている¹²⁻¹⁴⁾。EDHF の存在は、ヒト血管においても数多くの報告があり¹⁵⁻¹⁸⁾、血管緊張を動的に調節している因子として生理学的にも病態生理学的にも重要な役割を果たしていると理解されるが、後述するようにその本体に関しては未だ確定的な報告はない。

本稿では、EDHF について、その本体、循環制御における意義を、これまでの報告に著者らの最近の知見を加えながら、概説してみたい。

EDHF の本体

EDHF が拡散し得る液性因子であろうという仮説は、内皮が正常に保持された血管や培養内皮細胞から放出された EDHF が、その下流に置かれた内皮のない血管の平滑筋細胞を過分極させるという、バイオアッセイ装置による実験法の結果に基づいたものである^{7,19)}。内皮のない血管とある血管を近接させて、ACh などにより内皮細胞を刺激した際に内皮のない側の血管平滑筋細胞の膜電位を測定するサンドイッチ法によってもまた、この仮説の蓋然性が裏付けられている²⁰⁾。

そのような液性因子と想定されている EDHF の候補の一つとして、チトクローム P450 mono-oxygenase 系によって生成されたアラキドン酸代謝産物ではないかという説がある。内皮細胞におけるチトクローム P450 アイソザイムは CYP 2C epoxygenase であると言われており²¹⁾、エポキシエイコサトリエン酸 (EET) が内皮細胞によって生成される唯一のアラキドン酸のチトクローム P450 代謝物だと考えられている²²⁾。EETs は、血管平滑筋細胞の Ca^{2+} -activated K^{+} チャネルの開口確

*北海道大学大学院医学研究科情報薬理学講座細胞薬理学分野

率を増加させ過分極を惹起することが示された²³⁻²⁵。実際、いくつかの血管床における EDHF を介した反応はチトクローム P450 mono-oxygenase の阻害薬によって抑制された²⁶⁻²⁹。しかしながら、著者らも含めていくつかの研究施設から、チトクローム P450 阻害薬の多くは、ACh による EDHF を介した過分極や弛緩反応のみならず、pinacidil や cromakalim のような K⁺ チャネル開口薬による反応まで抑制してしまう非特異的な K⁺ チャネル遮断作用のあることが報告された³⁰⁻³²。また、17-octadecynoic acid のような化学構造の異なったチトクローム P450 阻害薬は、EDHF を介した過分極反応や弛緩反応には全く影響を与えないことも認められた^{30,31,33}。さらに、モルモット頸動脈においては EETs は膜電位には全く影響を与えず³³、ラット腸間膜動脈においては 11, 12-EET は過分極反応を生じるものの軽微であって ACh の内皮依存性過分極反応とは異なり ATP 感受性 K⁺ チャネル拮抗薬である glibenclamide で消失することから³¹、EETs のようなチトクローム P450 mono-oxygenase 系を介したアラキドン酸代謝産物が EDHF の本体であることは考えにくいと結論される。

Randall らは、ラット摘出腸間膜あるいは冠動脈灌流実験系を用い、anandamide が EDHF であることを提唱した³⁴⁻³⁶。Anandamide はマリファナの主成分であり、生体内においてもアラキドン酸代謝産物として産生され、cannabinoid CB₁ 受容体を介して中枢作用を惹起する³⁷。Anandamide が EDHF であるかも知れないという最大の根拠は、EDHF および anandamide による灌流圧の減少が CB₁ 受容体拮抗薬である SR 14716A によってともに抑制されることと、細胞外 K⁺ の上昇が EDHF と anandamide の効果を減少させることであった³⁴。しかしながら、これを追試する目的で行われたラット腸間膜動脈および肝動脈を用いた実験では、anandamide による過分極および弛緩反応は、EDHF のそれとは異なり、iberiotoxin や charybdotoxin でブロックされる large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ (BKCa) チャネルの活性化によって起こることが示唆され³⁸⁻⁴⁰、上記仮説は支持されなかった。

1998 年末に、EDHF が内皮細胞から遊離される K⁺ であるという説が発表された⁴¹。内皮細胞よ

り流出した K⁺ イオンが細胞間隙に蓄積し、近傍の血管平滑筋細胞の Ba²⁺ 感受性の内向き整流 K⁺ チャネル (K_{IR}) を開口させると同時に、Na⁺-K⁺ ATPase を活性化して平滑筋細胞を過分極させる、という考えである。大変魅力的な説であるが、その後の報告では、これを支持する結果が得られず、否定的な見解に立つ研究者が多い。第一に、生理的な K⁺ 濃度では内皮の存在が K⁺ による弛緩反応に必要であったが⁴²、K⁺ イオンを 10 mM 程度まで上昇させても過分極反応は少数例で極めて軽度認められたのみであった⁴³。第二に、Ba²⁺ によって K_{IR} をブロックしてやっても、EDHF を介した過分極・弛緩反応は影響を受けなかった⁴²⁻⁴⁵。第三に、Na⁺-K⁺ ATPase 阻害薬である ouabain は、K⁺ による過分極および弛緩反応を消失させるのに対し^{42,43,45}、EDHF 反応に対しては全く影響を与えないか^{43,46}、部分的にのみ抑制を示した^{42,44}。

理論的に、EDHF による内皮依存性の過分極反応は、内皮細胞と平滑筋細胞との間の gap junction を介した電気的な伝搬が関与している可能性がある。実際、血管平滑筋を内皮依存性に過分極させるアゴニストは、同じ時相で、内皮細胞を過分極させる⁴⁷⁻⁵⁰。しかしながら、微細構造学的に内皮細胞と平滑筋細胞間に gap junction が存在することは疑いはないが、機能的には、血管平滑筋細胞から内皮細胞への電気的結合は認められても、その反対、すなわち内皮細胞から平滑筋細胞への電位変化の伝搬はないとされている^{51,52}。Gap junction を阻害するヘプタノールやオクタノールは、諸種血管での EDHF 反応を阻害しないと報告されてきた^{53,54}。しかし、最近になって、gap junction の構成蛋白である connexin の 2 番目の細胞外ループの一部と同じ homology をもつペプチド Gap 27 によって EDHF を介した反応が抑制されることが、ウサギ大動脈および腸間膜動脈⁵⁵⁻⁵⁷、モルモット内頸動脈⁵⁸、そしてブタ冠動脈⁵⁹において示された。さらに、特異的な gap junction 阻害作用をもつ glycyrrhetic acid によっても、ウサギ腸骨動脈⁶⁰、モルモット腸間膜動脈⁶¹、そしてラット腸間膜動脈⁶²において、EDHF 反応は抑制された。内皮細胞数に比べて平滑筋細胞数が多い径の大きな血管では、内皮細胞の過分極反応が平滑筋細胞に伝搬することは考え

にくいのであるが、EDHFが拡散性の小分子の物質であるならば、それが gap junction を経て内皮細胞から近接した平滑筋細胞へ移動するのもかも知れない。一方、相対的に平滑筋細胞が減少してくる細小血管では、異種細胞間の電気的結合によって内皮細胞の過分極が平滑筋細胞に伝搬してくる可能性は大きいであろう。

したがって、現在のところ EDHF の本体は依然不明である。可能性として、EDHF は単一の物質ではなく、血管の種類もしくは部位によって多様な EDHF が機能していることも考えられる。EDHF の本体が同定されれば、EDHF の循環調節における役割などについてもより明らかとなっていくであろう。

EDHF の標的 K⁺ チャネル

ACh などの刺激により、内皮細胞から遊離した EDHF は、血管平滑筋に作用して K⁺ チャネルを開口して膜電位を過分極させる⁶³⁾。多くの血管系において、EDHF を介した過分極・弛緩反応は、small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ (SKCa) チャネルブロッカーである apamin と BKCa チャネルブロッカーである charybdotoxin をいっしょに与えた時にはじめて完全に抑制されることが見出されている^{53, 64~66)}。それぞれの toxin を単独に与えても EDHF 反応に対する作用は小さいか殆ど認められないので、EDHF によって活性化されるのは、BKCa と SKCa の二つの Ca²⁺-activated K⁺ チャネルなのか、それともどちらか一方のチャネルなのかは未だに十分には理解されていない。しかしながら、選択的な BKCa チャネルブロッカーである iberiotoxin を単独に与えても apamin といっしょに与えても EDHF 反応には影響しないので⁵³⁾、apamin といっしょに与えた時の charybdotoxin の抑制効果に BKCa チャネルが関与していることは考え難い。Charybdotoxin はまた遅延整流性 K⁺ チャネル (K_v) を抑制するけれども、他の K_v チャネルブロッカーは apamin といっしょに与えても EDHF 反応に影響を与えないので⁶⁷⁾、K_v チャネルは EDHF の標的チャネルではなさそうである。¹²⁵I で標識した charybdotoxin の結合は apamin によって増加することから⁶⁸⁾、二つの toxin の間にはアロステリックな相互作用があると想定されている。ごく最近の報告^{69, 70)} などから推測するに、

EDHF の標的 K⁺ チャネルは、その古典的タイプとは幾分性質を異にした薬理学特徴を有する SKCa チャネルの特殊なタイプであるかも知れない。

EDHF 反応発現と内皮細胞内 Ca²⁺ との関係

内皮細胞からの NO およびプロスタサイクリン産生・放出には、細胞内 Ca²⁺ 濃度 ([Ca²⁺]_i) 上昇が引き金となっていると信じられている^{71, 72)}。内皮細胞における [Ca²⁺]_i 上昇はまた、EDHF 反応の発現にも重要な役割を果たしている⁶³⁾。このことは、Ca²⁺ ionophore である A23187 によっても内皮依存性の血管平滑筋過分極反応が惹起されることから支持されている^{12, 63, 73)}。EDHF 反応を起こす ACh や BK のようなアゴニスト刺激は、内皮細胞上の受容体を介して、イノシトール 1, 4, 5-三リン酸 (IP₃) 感受性細胞内 Ca²⁺ 貯蔵部位からの Ca²⁺ 遊離とそれに引き続く細胞外からの非電位依存性チャネルを経た Ca²⁺ 流入を生じ、[Ca²⁺]_i を上昇させる⁷⁴⁾。著者らがブタ冠動脈を用いた実験からは⁷⁵⁾、IP₃ による細胞内貯蔵部位から遊離した Ca²⁺ は EDHF 反応の発現に大きく寄与するような [Ca²⁺]_i 上昇をもたらすものではなく、細胞内貯蔵部位から失われた Ca²⁺ を再充填させるために細胞外からの Ca²⁺ 流入を導くための引き金になっていると考えられた。細胞外からの Ca²⁺ 流入による内皮細胞での [Ca²⁺]_i 上昇が EDHF 反応に重要であることは、筋小胞体 Ca²⁺-pump ATPase 阻害薬である thapsigargin や cyclopiazonic acid による内皮依存性過分極反応が細胞外 Ca²⁺ に完全に依存していることから明らかである^{76, 77)}。著者らはまた、EDHF を介した過分極反応および弛緩反応が、内皮由来 NO を介した弛緩反応よりもっと密接に内皮細胞の [Ca²⁺]_i 変化と関係していることを示している⁷⁵⁾。

それでは、細胞外 Ca²⁺ は、どのような経路を介して内皮細胞内に流入してくるのであろうか？内皮細胞の細胞膜上には L 型 Ca²⁺ チャネルは存在しないと報告されている⁷⁸⁾。実際、EDHF 反応に必要な ACh によって活性化される Ca²⁺ 流入は、L 型 Ca²⁺ チャネルブロッカーである nifedipine では影響を受けない経路を介して起こっているようである⁷⁶⁾。内皮細胞においては、細胞外 Ca²⁺ は主に非選択性陽イオンチャネルを経て細

胞内に流入するとされている⁷⁹⁾。上述した thapsigargin や cyclopiazonic acid による細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位の枯渇は、ヒト臍帯静脈内皮細胞において非選択性陽イオンチャネルを活性化することが報告されており^{80,81)}、同じメカニズムで、ACh などの受容体刺激による内皮細胞内への Ca^{2+} 流入が起こると考えられている⁸²⁾。われわれは、非選択性陽イオンチャネルをブロックすることが知られている Ni^{2+} 、SK&F 96365 および mefenamic acid が、BK 刺激による内皮細胞内の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を抑え、EDHF 反応を介した過分極反応と弛緩反応を抑制することを見出している^{75,83)}。

先に述べたように EDHF の本体は明らかでないが、もし EDHF が内皮細胞内で産生・放出される液性物質であるならば、非選択性陽イオンチャネルを経た Ca^{2+} 流入によって起こる内皮細胞内の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が、十分な量の EDHF の産生あるいは放出を導く重要なステップであるかも知れない。また、EDHF による内皮依存性の過分極反応が内皮細胞と平滑筋細胞との間の gap junction を介した電氣的伝搬であって、内皮細胞における過分極に Ca^{2+} -activated K^+ チャネルが関与しているのであれば、非選択性陽イオンチャネルを経た Ca^{2+} 流入による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が内皮細胞における K^+ チャネルを活性化して過分極を惹起するのかも知れない。

EDHF の生理学的意義

内皮依存性弛緩反応に NO と EDHF がそれぞれ関与する程度は、血管径によって異なることが知られている。大動脈、肺動脈あるいは腸骨動脈のような血管径の大きな導管では、プロスタサイクリン産生を阻害した条件下での内皮依存性弛緩反応は eNOS 阻害薬によってほぼ完全に消失するので EDHF の関与はほとんどないが、これらより径が小さい腸間膜動脈、大腿動脈あるいは腎動脈では、eNOS 活性を阻害した後に残っている内皮依存性弛緩、すなわち EDHF を介した弛緩が主体となってくる⁸⁴⁾。たとえば、腸間膜動脈の主幹部では ACh による内皮依存性弛緩反応の 1/2 から 3/4 ほどが EDHF によるものであるが、さらに末梢の径が 200~400 μm の分枝ではその弛緩反応のほぼ全てが EDHF からなる⁸⁵⁾。著者がラット大動脈、腸間膜動脈主幹および腸間膜動脈第一

分枝を用いて検討した結果も、これらの報告とほぼ一致するものであった⁸⁶⁾。先に述べたように、EDHF による血管弛緩反応の機序は、血管平滑筋の過分極による L 型 Ca^{2+} チャネルの脱活性化が引き起こされることが基盤となっている。したがって、L 型 Ca^{2+} チャネルの活性化が血管収縮に強く関係している血管では、EDHF による弛緩反応が大きく現れることが考えられる。摘出血管で内皮依存性血管弛緩反応を検討する際には、血管トーンヌスを収縮物質によってあらかじめ亢進させておく操作を行うが、同じ収縮物質であっても、その収縮メカニズムに L 型 Ca^{2+} チャネル活性化の関与が大動脈では低く抵抗血管になるほど高くなることから、小動脈や細動脈などの抵抗血管で EDHF が循環制御に重要な働きをする理由の一つとして、そのような血管系での収縮物質の血管収縮機序に L 型 Ca^{2+} チャネル活性化が大きな役割を果たしていることがあげられよう⁸⁶⁾。しかしながら、ラット腸間膜動脈分枝では、L 型 Ca^{2+} チャネル遮断薬である nifedipine 存在下であっても EDHF による弛緩反応は未だ十分に認められる⁸⁶⁾。ATP 感受性 K^+ チャネル開口薬が血管平滑筋を過分極することにより収縮蛋白の Ca^{2+} 感受性を低下させることが報告されているので⁸⁷⁾、L 型 Ca^{2+} チャネルの脱活性化以外にそのような機序の関与もあり得るかも知れない。

EDHF による血管弛緩反応は、NO の存在によって強く影響されるようである。Nitroprusside-Na などの NO 生成物質を与えた時、EDHF による血管弛緩反応は有意に抑制される⁸⁸⁾。また、*E. coli* lipopolysaccharide などで iNOS を誘導して過剰の NO が産生されている状況時においても、EDHF 反応は著しく減弱している⁸⁹⁾。血管系によっては、EDHF を介した内皮依存性弛緩反応は eNOS 阻害薬により NO 産生がブロックされた時にのみ観察されることから、EDHF は内皮由来の NO が機能しない時にのみ重要な役割をするという考え方もある⁸⁸⁾。すなわち、内皮依存性弛緩反応に NO と EDHF がともに関与している血管では、NO が弛緩反応の主役であって、EDHF はそのバックアップとして機能しているのかも知れない。これは、eNOS をノックアウトしたマウスにおいて、本来はその大部分が NO を介して ACh の内皮依存性拡張反応が起こる血管で、十分な

AChの拡張反応がEDHFを介して起こるようになったという最近の報告⁹⁰⁾からも支持されよう。さらに、著者らは、頭頸部悪性腫瘍のため放射線照射を受けた患者より術中に摘出した患部からの頸部動脈におけるNOとEDHFによる内皮依存性血管弛緩反応の変化を検討したところ、内皮細胞のeNOS発現低下を伴うNOを介した反応の消失を認めたが、EDHF反応は十分に温存されていることを認めた⁹¹⁾。この事実は、ヒトにおいても、EDHFによる内皮依存性血管弛緩反応がバックアップとして機能していることを示唆している。

病態時におけるEDHF

高血圧、高脂血症あるいは糖尿病の動物モデルでは、NOを介した内皮依存性血管弛緩反応が障害されていることはよく知られているが、EDHFを介した反応も高血圧や糖尿病病態において低下していることが報告されている^{92,93)}。これは、病態によって内皮機能全体が低下していることに起因しているとは限らないことは、高脂血症動物モデルではEDHF反応が十分に保たれていることから⁹⁴⁾、十分に推測可能である。糖尿病病態などでは、酸化ストレス亢進による酸化LDLの増加が病原の一つとして非常に重要視されているが、LDLの酸化過程で生じるリゾフォスファチジルコリン(LPC)がNOによる内皮依存性弛緩反応よりEDHF反応を顕著に抑制することを著者らは明らかにした^{95,96)}。EDHFが細小動脈における局所的な血管緊張調節に重要な役割を担っていると考えると、動脈硬化と関連するLPCなどの脂質異常がEDHF反応の抑制により、微小循環障害の要因となっていることが強く想定される。

心不全では、内皮依存性血管弛緩反応は一般に減弱していると考えられているが、これはNOを介した反応の低下によるものであり、EDHFを介した反応はむしろ代償的に増強していると報告されている⁹⁷⁾。逆に、実験的腎不全モデルでは、腸間膜動脈におけるAChによる内皮依存性弛緩反応はほとんどNOを介して起こるようになることから、EDHF反応が損なわれており、それはEDHFの標的K⁺チャネルの機能障害によるものであると推察されている⁹⁸⁾。

閉経期女性では、動脈硬化の進展とともに心血

管系の疾患による死亡率が増加してることが知られており、その原因の一つとして、内皮細胞機能を高める効果、とりわけ内皮細胞のNO産生を増加させるエストロゲンの低下があげられている⁹⁹⁾。McCulloch & Randallの報告⁸⁸⁾によると、興味深いことに、ラット腸間膜動脈では、雌性ではEDHFによる内皮依存性弛緩反応がNOを介した系が阻害された時にも代償機構として機能するが、雄性ではその代償機構がなくeNOSが抑制されると内皮依存性弛緩が低下してしまう。最近われわれは、雌性ラットから卵巣を摘除すると、EDHFを介した内皮依存性過分極および弛緩反応が著しく低下し、それはエストロゲンを補充することにより回復することを報告した¹⁰⁰⁾。すなわち、エストロゲンは、eNOSに対してのみならず、EDHF反応の発現機序に対して有益な作用をもたらすことが示唆される。

おわりに

EDHFは、NO、プロスタサイクリンに続く第三の内皮由来弛緩因子であり、全身の細小動脈など抵抗血管での血流調節に重要な役割を担っていると考えられている。EDHFの本体は未だに特定されていないが、それが内因性のK⁺チャネル開口物質であるならば、新しい微小循環障害治療薬の開発にもつながるだろうし、さらにはヒト循環障害における病態の解明にも手掛りを与えてくれるかも知れない。今後の研究の進展が大いに期待されることである。

文 献

- 1) Furchgott RF, Vanhoutte PM: Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J* 3: 2007-2018, 1989
- 2) Moncada S, Vane JR: Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A2 and prostacyclin. *Pharmacol Rev* 30: 293-331, 1979
- 3) Furchgott RF, Zawadzki JV: The obligatory role of the endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376, 1980
- 4) Palmer RMJ, Ferridge AG, Moncada S: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526, 1987
- 5) Bolton TB, Lang RJ, Takewaki T: Mechanism of action of noradrenaline and carbachol on smooth muscle of guinea-pig anterior mesenteric artery. *J Physiol* 351: 549-572, 1984
- 6) Komori K, Suzuki H: Electrical responses of smooth

- muscle cells during cholinergic vasodilation in the rabbit saphenous artery. *Circ Res* 61 : 586-593, 1987
- 7) Félétou M, Vanhoutte PM : Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Br J Pharmacol* 93 : 515-524, 1988
 - 8) Keef KD, Bowen SM : Effect of ACh on electrical and mechanical activity in guinea pig coronary arteries. *Am J Physiol* 257 : H1096-H1103, 1989
 - 9) Brayden E : Membrane hyperpolarization is a mechanism of endothelium-dependent cerebral vasodilation. *Am J Physiol* 259 : H668-H673, 1990
 - 10) Taylor SG, Weston AH : Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a new endogenous inhibitor from the vascular endothelium. *Trends Pharmacol Sci* 9 : 272-274, 1988
 - 11) Nelson MT, Patlak JB, Worley JF, et al : Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Am J Physiol* 259 : C8-C18, 1990
 - 12) Nagao T, Vanhoutte PM : Hyperpolarization contributes to endothelium-dependent relaxations to acetylcholine in femoral veins of rats. *Am J Physiol* 261 : H1034-H1037, 1991
 - 13) Nagao T, Vanhoutte PM : Hyperpolarization as a mechanism for endothelium-dependent relaxations in the porcine coronary artery. *J Physiol* 445 : 355-367, 1992
 - 14) Garland CJ, McPherson GA : Evidence that nitric oxide does not mediate the hyperpolarization and relaxation to acetylcholine in the rat small mesentery artery. *Br J Pharmacol* 105 : 429-435, 1992
 - 15) Petersson J, Zygmunt PM, Brandt L, et al : Substance P-induced relaxation and hyperpolarization in human cerebral arteries. *Br J Pharmacol* 115 : 889-894, 1995
 - 16) Kemp BK, Cocks TM : Evidence that mechanisms dependent and independent of nitric oxide mediate endothelium-dependent relaxation to bradykinin in human small resistance-like coronary arteries. *Br J Pharmacol* 120 : 757-762, 1997
 - 17) Ohlmann P, Martínez MC, Schneider F, et al : Characterization of endothelium-derived relaxing factors released by bradykinin in human resistance arteries. *Br J Pharmacol* 121 : 657-664, 1997
 - 18) Urakami-Harasawa L, Shimokawa H, Nakashima H, et al : Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries. *J Clin Invest* 100 : 2793-2799, 1997
 - 19) Popp R, Bauersachs J, Hecker M, et al : A transferable β -naphthoflavone-inducible, hyperpolarizing factor is synthesized by native and cultured porcine coronary endothelial cells. *J Physiol* 497 : 699-706, 1996
 - 20) Chen G, Yamamoto Y, Miwa K, et al : Hyperpolarization of arterial smooth muscle induced by endothelial humoral substances. *Am J Physiol* 260 : H1888-H1892, 1991
 - 21) Lin JH-C, Kobari Y, Stemberman MB, et al : Human umbilical vein endothelial cells express P450 2C8 mRNA: cloning of endothelial P450 epoxygenase. *Endothelium* 4 : 219-229, 1996
 - 22) Rosolowsky M, Campbell WB : Synthesis of hydroxyicosatetraenoic acids (HETEs) and epoxyicosatrienoic acids (EETs) by cultured bovine coronary artery endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1299 : 267-277, 1996
 - 23) Gebremedhin D, Ma YH, Falck JR, et al : Mechanism of action of cerebral epoxyicosatrienoic acids on cerebral arterial smooth muscle. *Am J Physiol* 263 : H519-H525, 1992
 - 24) Hu S, Kim HS : Activation of K⁺ channel in vascular smooth muscles by cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid. *Eur J Pharmacol* 230 : 215-221, 1993
 - 25) Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, et al : Identification of epoxyicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing. *Circ Res* 78 : 415-423, 1996
 - 26) Fulton D, McGiff JC, Quilley J : Contribution of NO and cytochrome P450 to the vasodilator effect of bradykinin in the rat kidney. *Br J Pharmacol* 107 : 722-725, 1992
 - 27) Bauersachs J, Hecker M, Busse R : Display of the characteristics of endothelium-derived hyperpolarizing factor by a cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolite in the coronary microcirculation. *Br J Pharmacol* 113 : 1548-1553, 1994
 - 28) Hecker M, Bara AT, Bauersachs J, et al : Characterization of endothelium-derived hyperpolarizing factor as a cytochrome P₄₅₀-derived arachidonic acid metabolite in mammals. *J Physiol* 481 : 407-414
 - 29) Fulton D, Mahboudi K, McGiff JC, et al : Cytochrome 450-dependent effects of bradykinin in the rat kidney. *Br J Pharmacol* 114 : 99-102, 1995
 - 30) Zygmunt PM, Edwards G, Weston AH, et al : Effects of cytochrome P450 inhibitors on EDHF-mediated relaxation in the rat hepatic artery. *Br J Pharmacol* 118 : 1147-1152, 1996
 - 31) Fukao M, Hattori Y, Kanno M, et al : Evidence against a role of cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolites in endothelium-dependent hyperpolarization by acetylcholine in rat isolated mesenteric artery. *Br J Pharmacol* 120 : 439-446, 1997
 - 32) Vanheel B, Van de Voorde J : Evidence against the involvement of cytochrome P450 metabolites in endothelium-dependent hyperpolarization of the rat main mesenteric artery. *J Physiol* 501 : 331-341, 1997
 - 33) Chataigneau T, Félétou M, Duhault J, et al : Epoxyicosatrienoic acid, potassium channel blockers and endothelium-dependent hyperpolarization in the guinea-pig carotid artery. *Br J Pharmacol* 123 : 574-580, 1998
 - 34) Randall MD, Alexander SPH, Bennett T, et al : An endogenous cannabinoid as an endothelium-derived vasorelaxant. *Biochem Biophys Res Commun* 229 : 114-120, 1996
 - 35) Randall MD, McCulloch AI, Kendall DA : Comparative pharmacology of endothelium-derived hyperpolarizing factor and anandamide in rat isolated mesentery. *Eur J Pharmacol* 333 : 191-197, 1997
 - 36) Randall MD, Kendall DA : Involvement of a cannabinoid in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated coronary vasorelaxation. *Eur J Pharmacol* 335 : 205-209, 1997
 - 37) Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, et al : Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* 372 : 686-691, 1994
 - 38) Plane F, Holland M, Waldron GJ, et al : Evidence that anandamide and EDHF act via different mechanisms in rat isolated mesenteric arteries. *Br J Pharmacol* 121 : 1509-1511, 1997
 - 39) White R, Hiley CR : A comparison of EDHF-mediated and

- anandamide-induced relaxations in the rat isolated mesenteric artery. *Br J Pharmacol* 122 : 1573-1584, 1997
- 40) Zygmunt PM, Högestätt ED, Waldeck K, et al : Studies on the effects of anandamide in rat hepatic artery. *Br J Pharmacol* 122 : 1679-1686, 1997
- 41) Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, et al : K^+ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature* 396 : 269-272, 1998
- 42) Lacy PS, Pilkington G, Hanvesakul R, et al : Evidence against potassium as an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat mesenteric small arteries. *Br J Pharmacol* 129 : 605-611, 2000
- 43) Quignard J-F, Félétou M, Thollon C, et al : Potassium ions and endothelium-derived hyperpolarizing factor in guinea-pig carotid and porcine coronary arteries. *Br J Pharmacol* 127 : 27-34, 1999
- 44) Drummond GR, Selemidis S, Cocks TM : Apamin-sensitive, non-nitric oxide (NO) endothelium-dependent relaxations to bradykinin in the bovine isolated coronary artery: no role for cytochrome P_{450} and K^+ . *Br J Pharmacol* 129 : 811-819, 2000
- 45) Doughty JM, Boyle JP, Langton PD : Potassium does not mimic EDHF in rat mesenteric arteries. *Br J Pharmacol* 130 : 1174-1182, 2000
- 46) Zygmunt PM, Sörgard M, Petersson J, et al : Differential actions of anandamide, potassium ions and endothelium-derived hyperpolarizing factor in guinea-pig basilar artery. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 361 : 535-542, 2000
- 47) Busse R, Fichtner H, Luckhoff A, et al : Hyperpolarization and increased free calcium in acetylcholine-stimulated endothelial cells. *Am J Physiol* 255 : H965-H969, 1988
- 48) Davies PF, Oleson SP, Clapham DE, et al : Endothelial communication: state of the art lecture. *Hypertension* 11 : 563-572, 1988
- 49) Brunet PC, Bény J-L : Substance P and bradykinin hyperpolarize pig coronary artery endothelial cells in primary culture. *Blood Vessels* 26 : 228-234, 1989
- 50) Chen G, Cheung DW : Characterization of acetylcholine-induced membrane hyperpolarization in endothelial cells. *Circ Res* 70 : 257-263, 1992
- 51) Marchenko SM, Sage SO : Electrical properties of resting and acetylcholine-stimulated endothelium in intact rat aorta. *J Physiol* 462 : 735-751, 1993
- 52) Bény J-L, Paccica C : Bidirectional electrical communication between smooth muscle and endothelial cells in the pig coronary artery. *Am J Physiol* 266 : H1465-H1472, 1994
- 53) Zygmunt PM, Högestätt ED : Role of potassium channels in endothelium-dependent relaxation to nitroarginine in the rat hepatic artery. *Br J Pharmacol* 117 : 1600-1606, 1996
- 54) Hashitani H, Suzuki H : K^+ channels which contribute to the acetylcholine-induced hyperpolarization in smooth muscle of the guinea-pig submucosal arteriole. *J Physiol* 501 : 319-329, 1997
- 55) Chaytor AT, Evans WH, Griffith TM : Central role of heterocellular gap junctional communication in endothelium-dependent relaxations of rabbit arteries. *J Physiol* 508 : 561-573, 1998
- 56) Dora KA, Martin PEM, Chaytor AT, et al : Role of heterocellular gap junctional communication in endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization: Inhibition by a connexin-mimetic peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 254 : 27-31, 1999
- 57) Hutcheson IR, Chaytor AT, Evans WH, et al : Nitric oxide-independent relaxations to acetylcholine and A23187 involve different routes of heterocellular communication. Role of gap junctions and phospholipase A_2 . *Circ Res* 84 : 53-63, 1999
- 58) Edwards G, Félétou M, Gardener MJ, et al : Role of gap junctions in the responses to EDHF in rat and guinea-pig small arteries. *Br J Pharmacol* 128 : 1788-17894, 1999
- 59) Edwards G, Thollon C, Gardener MJ, et al : Role of gap junctions and EETs in endothelium-dependent hyperpolarization of porcine coronary artery. *Br J Pharmacol* 129 : 1145-1154, 2000
- 60) Taylor HJ, Chaytor AT, Evans WH, et al : Inhibition of the gap junctional component of endothelium-dependent relaxations in rabbit iliac artery by 18- α glycyrrhetic acid. *Br J Pharmacol* 125 : 1-3, 1998
- 61) Yamamoto Y, Fukuta H, Nakahira Y, et al : Blockade by 18- β -glycyrrhetic acid of intercellular electrical coupling in guinea-pig arterioles. *J Physiol* 511 : 501-508, 1998
- 62) Harris D, Martin PEM, Evans WH, et al : Role of gap junctions in endothelium-derived hyperpolarizing factor responses and mechanisms of K^+ -relaxation. *Eur J Pharmacol* 402 : 119-128, 2000
- 63) Chen G, Suzuki H : Calcium dependency of the endothelium-dependent hyperpolarization in smooth muscle cells of the rabbit carotid artery. *J Physiol* 421 : 521-534, 1990
- 64) Waldron RE, Garland CJ : Contribution of both nitric oxide and a change in membrane potential to acetylcholine-induced relaxation in the rat small mesenteric artery. *Br J Pharmacol* 112 : 831-836, 1994
- 65) Corriu C, Félétou M, Canet E, et al : Endothelium-derived factors and hyperpolarization of the carotid artery of the guinea-pig. *Br J Pharmacol* 119 : 959-964, 1996
- 66) Chen G, Cheung DW : Effect of K^+ -channel blockers on Ach-induced hyperpolarization and relaxation in mesenteric arteries. *Am J Physiol* 272 : H2306-H2312, 1997
- 67) Zygmunt PM, Edwards G, Weston AH, et al : Involvement of voltage-dependent potassium channels in the EDHF-mediated relaxation of rat hepatic artery. *Br J Pharmacol* 121 : 141-149, 1997
- 68) Vazquez J, Feigenbaum P, King VF, et al : Characterization of high affinity binding sites for charybdotoxin in synaptic plasma membranes from rat brain. *J Biol Chem* 265 : 15564-15571, 1990
- 69) Frieden M, Sollini M, Bény J-L : Substance P and bradykinin activate different types of K_{Ca} currents to hyperpolarize cultured porcine coronary artery endothelial cells. *J Physiol* 519 : 361-371, 1999
- 70) Andersson DA, Zygmunt PM, Movahed P, et al : Effects of inhibitors of small- and intermediate-conductance calcium-activated potassium channels, inwardly-rectifying potassium channels and Na^+/K^+ ATPase on EDHF relaxations in the rat hepatic artery. *Br J Pharmacol* 129 : 1490-1496, 2000
- 71) Long CJ, Stone TW : The release of endothelium-derived relaxing factor is calcium dependent. *Blood Vessels* 22 : 205-208, 1985

- 72) Hallam TJ, Pearson JD, Needham LA : Thrombin-stimulated elevation of human endothelial-cell cytoplasmic free calcium concentration causes prostacyclin production. *Biochem J* 251 : 243-249, 1988
- 73) Nakashima M, Vanhoutte PM : Endothelin-1 and -3 cause endothelium-dependent hyperpolarization in the rat mesenteric artery. *Am J Physiol* 265 : H2137-H2141, 1993
- 74) Newby AC, Henderson AH : Stimulus-secretion coupling in vascular endothelial cells. *Ann Rev Physiol* 52 : 661-674, 1990
- 75) Tomioka H, Hattori Y, Fukao M, et al : Role of endothelial Ni²⁺-sensitive Ca²⁺ entry pathway in regulation of EDHF in porcine coronary artery. *Am J Physiol* 280 : H730-H737, 2001
- 76) Fukao M, Hattori Y, Kanno M, et al : Thapsigargin- and cyclopiazonic acid-induced endothelium-dependent hyperpolarization in rat mesenteric artery. *Br J Pharmacol* 115 : 987-992, 1995
- 77) Fukao M, Hattori Y, Sato A, et al : Relationship between NaF- and thapsigargin-induced endothelium-dependent hyperpolarization in rat mesenteric artery. *Br J Pharmacol* 126 : 1567-1574, 1999
- 78) Himmel HM, Whorton AR, Strauss HC : Intracellular calcium, currents, and stimulus-response coupling in endothelial cells. *Hypertension* 21 : 112-127, 1993
- 79) Nilius B : Permeation properties of a non-selective cation channel in human vascular endothelial cells. *Pflügers Arch* 416 : 609-611, 1990
- 80) Gericke M, Droogmans G, Nilius B : Thapsigargin discharges intracellular calcium stores and induces transmembrane currents in human endothelial cells. *Pflügers Arch* 422 : 552-557, 1993
- 81) Zhang H, Inazu M, Weir B, et al : Cyclopiazonic acid stimulates Ca²⁺ influx through non-specific cation channels in endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 251 : 119-125, 1994
- 82) Dolor RJ, Strauss HC, Whorton AR : Mechanism of calcium influx in endothelial cells: role of intracellular calcium. *Trans Assoc Am Physicians* 103 : 38-47, 1990
- 83) Fukao M, Watanabe H, Takeuchi K, et al : Effects of SK&F 96365 and mefenamic acid on Ca²⁺ influx in stimulated endothelial cells and on endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated arterial hyperpolarization and relaxation. *J Cardiovasc Pharmacol* (in press) 2001
- 84) Nagao T, Illiano S, Vanhoutte PM : Heterogenous distribution of endothelium-dependent relaxations resistant to N^G-nitro-L-arginine in rats. *Am J Physiol* 263 : H1090-H1094, 1992
- 85) Shimokawa H, Yasutake H, Fujii K, et al : The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation. *J Cardiovasc Pharmacol* 28 : 703-711, 1996
- 86) Tomioka H, Hattori Y, Fukao M, et al : Relaxation in different-sized rat blood vessels mediated by endothelium-derived hyperpolarizing factor: Importance of processes mediating precontractions. *J Vasc Res* 36 : 311-320, 1999
- 87) Okada Y, Yanagisawa T, Taira N : BRL 38227 (levromakalim)-induced hyperpolarization reduces the sensitivity to Ca²⁺ of contractile elements in canine coronary artery. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 347 : 438-444, 1993
- 88) McCulloch AI, Randall MD : Sex differences in the relative contributions of nitric oxide and EDHF to agonist-stimulated endothelium-dependent relaxations in the rat isolated mesenteric arterial bed. *Br J Pharmacol* 123 : 1700-1706, 1998
- 89) Kristof AS, Noorhosseini H, Hussain SNA : Attenuation of endothelium-dependent hyperpolarizing factor by bacterial lipopolysaccharides. *Eur J Pharmacol* 328 : 69-73, 1997
- 90) Huang A, Sun D, Smith CJ, et al : In eNOS knockout mice skeletal muscle arteriolar dilation to acetylcholine is mediated by EDHF. *Am J Physiol* 278 : H762-H768, 2000
- 91) Sugihara T, Hattori Y, Yamamoto Y, et al : Preferential impairment of nitric oxide-mediated endothelium-dependent relaxation in human cervical arteries after irradiation. *Circulation* 100 : 635-641, 1999
- 92) Fujii K, Tominaga M, Ohmori S, et al : Decreased endothelium-dependent hyperpolarization to acetylcholine in smooth muscle of the mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* 70 : 660-669, 1992
- 93) Fukao M, Hattori Y, Kanno M, et al : Alterations in endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation in mesenteric arteries from streptozotocin-induced diabetic rats. *Br J Pharmacol* 121 : 1383-1391, 1997
- 94) Najibi S, Cowan CL, Palacino JJ, et al : Enhanced role of potassium channels in relaxations to acetylcholine in hypercholesterolemic rabbit carotid artery. *Am J Physiol* 266 : H2061-H2067, 1994
- 95) 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* 116 : 1541-1544, 1995
- 96) Fukao M, Hattori Y, Kanno M, et al : Structural differences in the ability of lysophospholipids to inhibit endothelium-dependent hyperpolarization by acetylcholine in rat mesenteric arteries. *Biochem Biophys Res Commun* 227 : 479-483, 1996
- 97) Malmjö M, Bergdahl A, Zhao X-H, et al : Enhanced acetylcholine and P2Y-receptor stimulated vascular EDHF-dilatation in congestive heart failure. *Cardiovasc Res* 43 : 200-209, 1999
- 98) Kalliovalkama J, Jolma P, Tolvanen J-P, et al : Potassium channel-mediated vasorelaxation is impaired in experimental renal failure. *Am J Physiol* 277 : H1622-H1629, 1999
- 99) Barton M : Sex and NO — beyond regulation of vasomotor tone. *Cardiovasc Res* 46 : 20-23, 2000
- 100) Liu M-Y, Hattori Y, Fukao M, et al : Alterations in EDHF-mediated hyperpolarization and relaxation in mesenteric arteries of female rats in long-term deficiency of oestrogen and during oestrus cycle. *Br J Pharmacol* 132 : 1035-1046, 2001