

平成 21 年 5 月 21 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007 ~ 2008
 課題番号：19590146
 研究課題名 (和文) 薬剤による血管障害の発現機序解明と予防・治療策の確立に関する研究
 研究課題名 (英文) The elucidation of the mechanisms underlying drug-induced vascular injury and its prophylaxis
 研究代表者
 伊藤 善規 (ITOH YOSHINORI)
 岐阜大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：50159927

研究成果の概要：

プロテアーゼ阻害剤のメシル酸ガベキサートは、培養ブタ大動脈血管内皮細胞 (PAEC) に対して、細胞膜を直接的に障害し、ネクローシスを引き起こすことが明らかとなった。加えて、メシル酸ガベキサートによる PAEC の障害は、抗酸化剤やラジカル消去剤、カルシウムキレーターや一酸化窒素合成酵素阻害剤等により保護されなかったが、グリシンや L-システインといった一部のアミノ酸が保護作用を示すことが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：メシル酸ガベキサート、血管障害、血管内皮細胞、ネクローシス、アミノ酸、グリシン、L-システイン

1. 研究開始当初の背景

プロテアーゼ阻害剤のメシル酸ガベキサートや、アントラサイクリン系およびビンカアルカロイド系抗がん剤といった薬剤は、投与後に血管炎や血管痛を引き起こし、血管周囲組織の発赤や腫張、重篤な場合には潰瘍や壊死等に至ることが広く知られている。しかしながら、いずれも障害発現機序の詳細は不明であり、投与濃度や投与速度の調節による予防の他には、血管障害の発現後に、患部の冷却やステロイド剤の適用といった対症療法が行われているのが現状である。

2. 研究の目的

本研究は、培養血管内皮細胞を用いて、プロテアーゼ阻害剤のメシル酸ガベキサートや、アントラサイクリン系抗がん剤ドキソルビシン等による血管障害評価モデルの作製を行い、薬剤による血管障害発現機序の解明ならびに、予防・治療策の確立を目的とした。

3. 研究の方法

(1)メシル酸ガベキサートによる in vitro 血管障害評価モデルの作製

24 ウェルプレートに播種した培養ブタ大動脈血管内皮細胞 (PAEC) に、メシル酸ガベキサートを曝露し、用量および時間依存的な細胞生存率の変化を、WST-8法により評価した。吸光度の測定には 96 ウェルマイクロプレートリーダーを使用した。

メシル酸ガベキサートの同種同効薬であるメシル酸ナファモスタットならびにメシル酸による PAEC の障害を WST-8法により評価した。

(2) メシル酸ガベキサートによる PAEC の細胞死の特徴評価

細胞死の形態学的特徴の評価は、8 チャンネルプレートに播種した PAEC を使用し、薬液を処置後に、Trypan blue 染色、TUNEL 染色を行い顕微鏡にて観察した。

DNA 断片化の評価は、25cm² 培養フラスコに播種した PAEC に薬液を処置し、アポトーシスラダー検出キットを用いて抽出した DNA を電気泳動し、評価した。

メシル酸ガベキサートによる PAEC 障害に対する非特異的カスパーゼ阻害剤 zVAD-fmk ならびにカスパーゼ-3 阻害剤 zDEVD-fmk の効果を WST-8法により評価した。

(3) メシル酸ガベキサートによる PAEC 障害における酸化ストレスの関与

抗酸化剤としてアスコルビン酸およびトコフェロールを、ヒドロキシルラジカル消去剤として、N,N'-Dimethylthiourea (DMTU)、マンニトールおよびエダラボンを使用して、細胞障害に対する効果を WST-8法により評価した。

(4) カルシウムキレート剤として BAPTA-AM およびグリコールエーテルジアミン四酢酸 (EGTA) を、一酸化窒素合成酵素阻害剤として NG-ニトロ-L-アルギニンメチルエステル (L-NAME) を使用して、メシル酸ガベキサートによる PAEC 障害に対する効果を WST-8法により評価した。

(5) メシル酸ガベキサート誘発 PAEC 障害に対する各種アミノ酸の効果を WST-8法により評価した。アミノ酸は、L-グルタミン酸、L (+)-グルタミン、L (-)-プロリン、L (+)-アルギニン塩酸塩、L-セリン、L-システイン塩酸塩一水和物、L-アスパラギン酸、L-アスパラギン一水和物、L (+)-リシン塩酸塩、L-メチオニン、L (-)-トレオニン、L (+)-イソロイシン、L-アラニン、L-バリン、L-ロイシン、L (-)-フェニルアラニン、L-トリプトファンを使用した。

(6) 細胞膜の障害は、propidium iodide (PI) 染色法を使用し、蛍光顕微鏡ならびに蛍光プ

レートリーダーにて評価した。

(7) トリプシン酵素活性は、ウシ膵臓由来トリプシン (1 μ M) が、合成蛍光基質である Boc-Phe-Ser-Arg-AMC (5 μ M) を分解した際の AMC 量を、蛍光プレートリーダーにて測定することで評価した。

(8) 【統計解析】データは、平均値 ± 標準誤差で示した。2 群間の比較には Student's t-test を、多重の比較には一元配置分散分析 (one-way ANOVA) による解析後、Dunnnett's test により有意差検定を行なった。2 要因で分類される多群比較は、Two-way repeated measure ANOVA で解析後、Dunnnett's test を行った。いずれの場合も有意水準は 5% とした。

4. 研究成果

(1) メシル酸ガベキサート (GM, 0.5 - 5.0 mM) は PAEC に、濃度および時間依存的な細胞生存率の低下を引き起こした。1.5 mM のメシル酸ガベキサートによる障害は、処置後 6 時間より有意であった (図 1a)。

一方で、メシル酸ナファモスタット (NM) およびメシル酸は、PAEC の細胞生存率に影響しなかった (図 1b)。

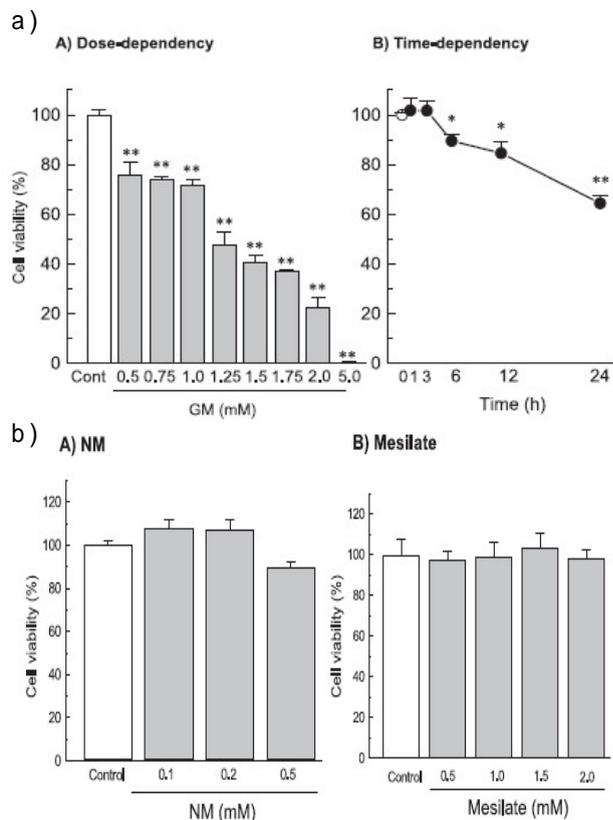


図 1 メシル酸ガベキサートによる濃度および時間依存的な腎細胞障害 (a) ならびに、メシル酸ナファモスタットおよびメシル酸の PAEC への影響 (b)

(2) メシル酸ガベキサート(1.5mM, 24 時間)の処置により、PAEC には形態学的な変化ならびに、Trypan blue 染色陽性細胞の顕著な増加が認められた。一方、メシル酸ナファモスタット(0.2mM, 24 時間)は影響しなかった(図 2a)。TUNEL 染色法による検討において、ポジティブコントロールであるアクチノマイシン D(5 μ g/mL)処置群ではTUNEL陽性細胞が顕著に増加した一方で、メシル酸ガベキサートおよびメシル酸ナファモスタット群ではTUNEL陽性細胞は認められなかった(図 2b)。

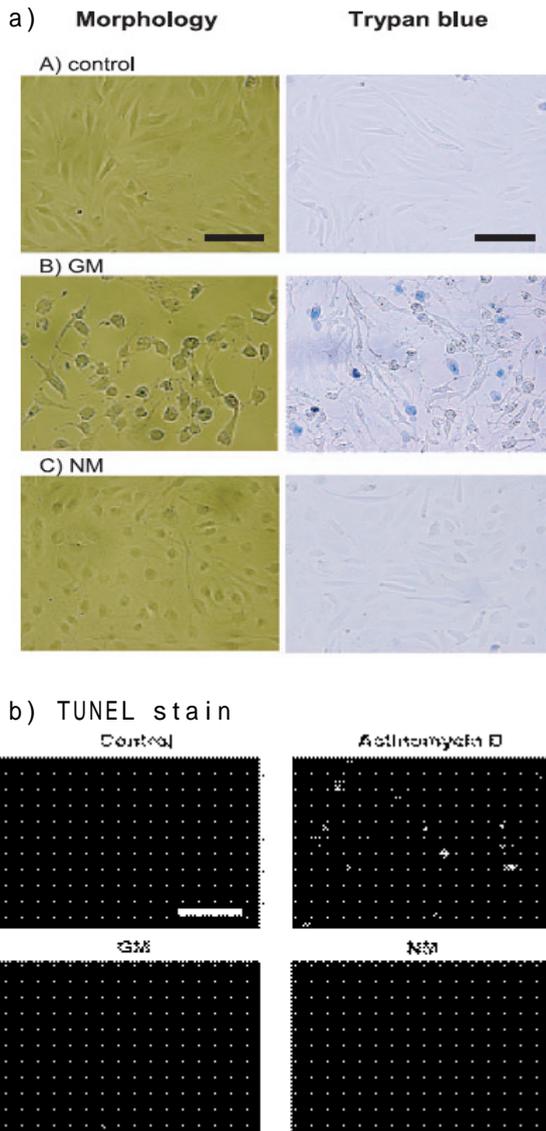


図 2 メシル酸ガベキサート(GM)およびメシル酸ナファモスタット(NM)による形態学的変化

メシル酸ガベキサート(1.5mM, 24 時間)およびメシル酸ナファモスタット(0.2mM, 24 時間)の処置によって、PAEC の DNA 断片化は認められなかった(図 3a)。加えて、メシル酸ガベキサート(1.5mM, 24 時間)による PAEC 障害は、zDEVD-fmk(50 μ M)および zVAD-fmk(50 μ M)の併用により影響されなかった(図 3b)。

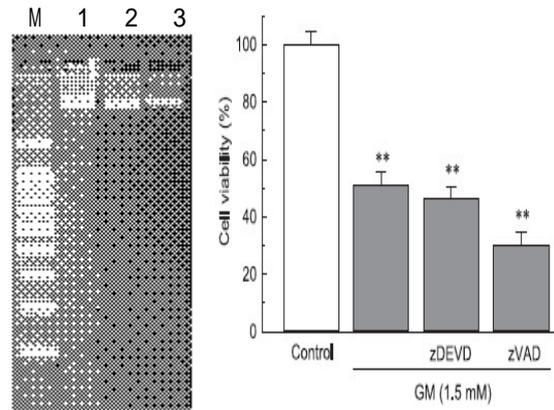


図 3 (a)メシル酸ガベキサートおよびメシル酸ナファモスタットによる断片化 DNA の評価[M:marker, 1:Control, 2:GM(1.5mM, 24h), 3:NM(0.2mM, 24h)] (b)メシル酸ガベキサートによる PAEC 障害に対するカスパーゼ阻害剤の効果

(3)メシル酸ガベキサートによる PAEC の生存率低下に対して、抗酸化剤のアスコルビン酸および α -トコフェロール、ラジカル消去剤のDMTUおよびマンニトール、エダラポンは、いずれも保護効果を示さなかった(図 4)。

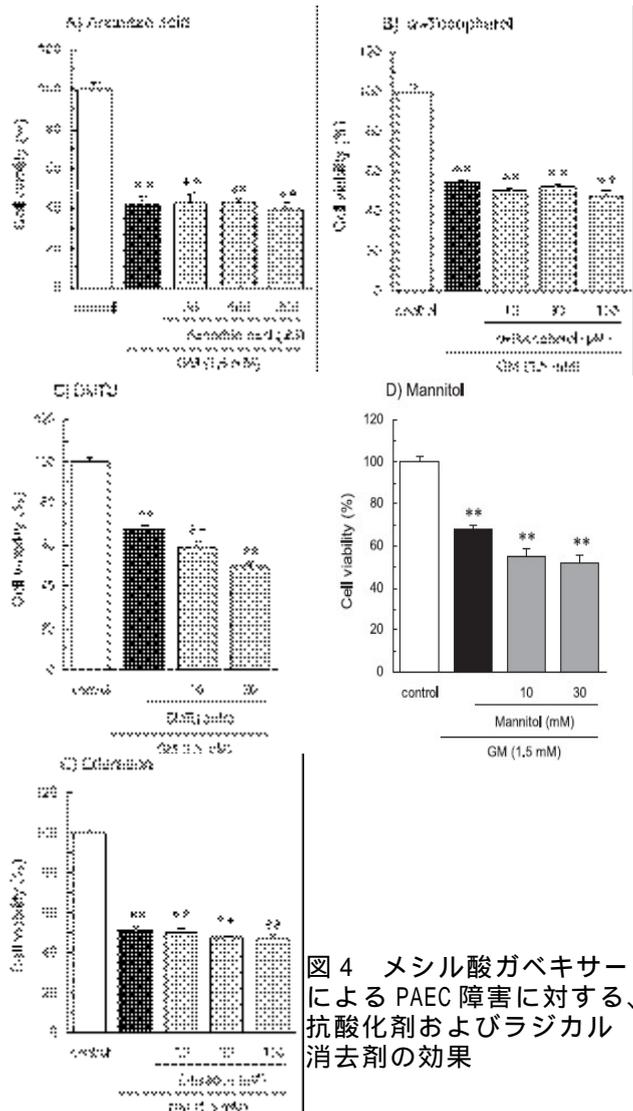


図 4 メシル酸ガベキサートによる PAEC 障害に対する、抗酸化剤およびラジカル消去剤の効果

(4)メシル酸ガベキサートによる PAEC の生存率低下に対して、カルシウムキレート剤の BAPTA-AM および EGTA、一酸化窒素合成酵素阻害剤の L-NAME はいずれも保護効果を示さなかった(図 5)。

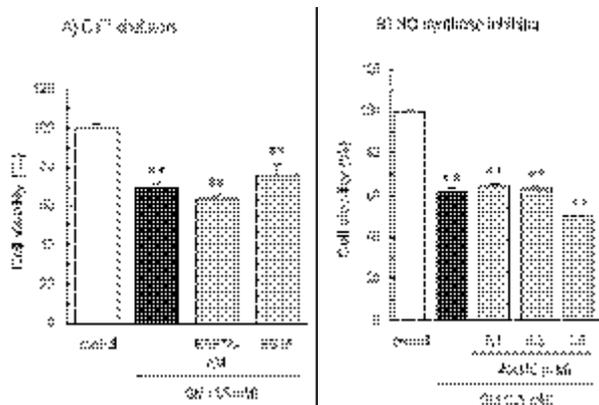


図 5 メシル酸ガベキサートによる PAEC 障害に対する、カルシウムキレート剤および一酸化窒素合成酵素阻害剤の効果

(5)メシル酸ガベキサートによる PAEC の細胞生存率低下に対して、L-システイン (1.0 mM)、グリシン (30 mM)、L-リシン(30 mM)は、ほぼ完全な保護作用を示した(図 6 a-c)。

一方、L-グルタミン (図 6d)をはじめ、L-グルタミン酸や、L-セリン、L-メチオニン、L-イソロイシン、L-トレオニン、L-プロリン等の一部のアミノ酸も、10~30mMの高濃度条件下において、メシル酸ガベキサート誘発 PAEC 障害に対し、僅かではあるものの有意な保護作用を示した。

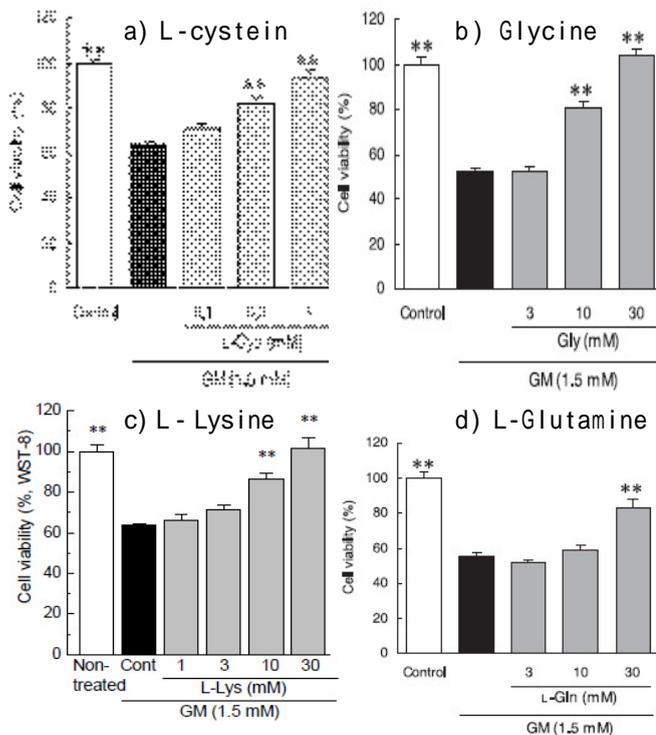


図 6 メシル酸ガベキサートによる PAEC 障害に対する、アミノ酸の保護効果

(6)メシル酸ガベキサートは、PAEC に処置後数分より、細胞膜を障害し、PI の細胞内取り込みを増加させた。一方、30mMのグリシンは、メシル酸ガベキサートによる PI 取り込みを顕著に抑制した(図 7)。

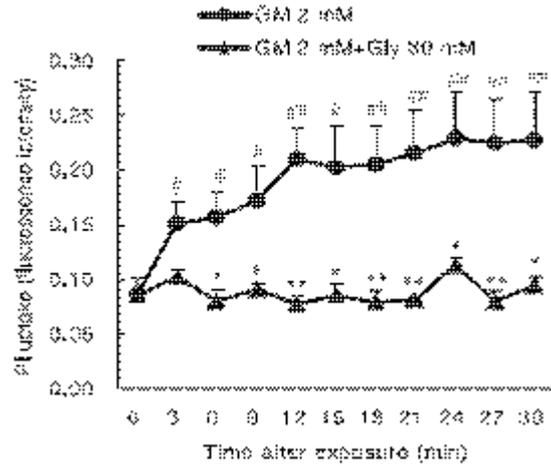


図 7 メシル酸ガベキサートによる細胞内への PI 取り込み量の変化と、グリシンの保護効果

(7)メシル酸ガベキサートによる PAEC 障害に対するグリシンの保護効果は、メシル酸ガベキサートと同時処置を行った場合、ならびにメシル酸ガベキサート曝露から3時間後に処置した場合において有意であったが、グリシンの添加開始が遅れるにつれて、その効果は減少した(図 8)。

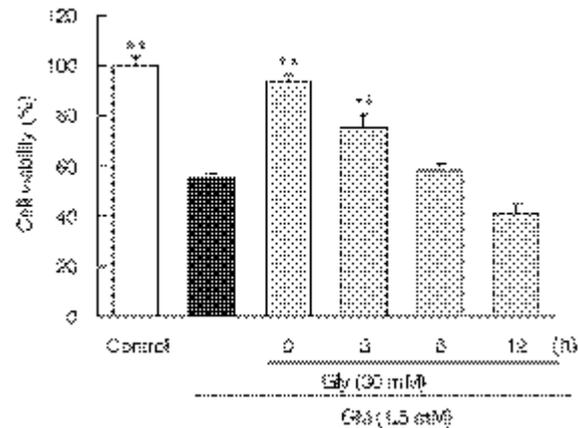


図 8 メシル酸ガベキサートによる PAEC 障害に対するグリシンの保護効果と、至適処置タイミング

(8)1.5 mM のメシル酸ガベキサートは、トリプシン活性を約 80%阻害した。一方で、グリシン (30 mM)、L-システイン(1 mM)、L-グルタミン (30 mM)および L-グルタミン酸 (30 mM)は、メシル酸ガベキサートのトリプシン活性阻害作用に影響しなかった(図 9)。

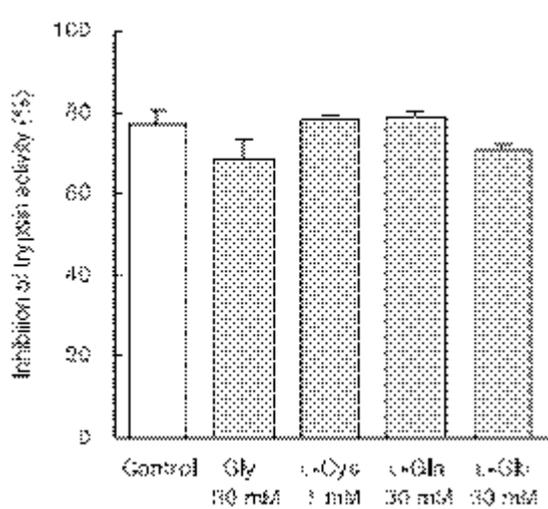


図 9 メシル酸ガベキサートのトリプシン活性阻害作用に対する各種アミノ酸の影響

(2)研究分担者
なし

研究者番号：

(3)連携研究者
大石 了三 (OISHI RYOZO)
九州大学・大学病院・教授
研究者番号：90112325

江頭 伸昭 (EGASHIRA NOBUAKI)
九州大学・大学病院・准教授
研究者番号：80352269

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Aki T, Egashira N, Yamauchi Y, Hama M, Yano T, Itoh Y, Yamada T, Oishi R. Protective effects of amino acids against gabexate mesilate-induced cell injury in porcine aorta endothelial cells. J Pharmacol Sci. 査読有,107,2008, 238-245.

Aki T, Egashira N, Hama M, Yamauchi Y, Yano T, Itoh Y, Oishi R. Characteristics of gabexate mesilate-induced cell injury in porcine aorta endothelial cells. J Pharmacol Sci. 査読有, 106, 2008, 415-422.

[学会発表](計 1 件)

山内結衣, 安藝智子, 江頭伸昭, 矢野貴久, 伊藤善規, 大石了三. メシル酸ガベキサートによる血管内皮細胞障害の特性及びアミノ酸の保護作用に関する検討. 第 81 回日本薬理学会年会, 2008 年 3 月 19 日(発表日), 横浜

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 善規 (ITOH YOSHINORI)
岐阜大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：50159927