

メシル酸ガベキサートによる血管障害の発現機序 ならびに予防策に関する研究

安藝 智子

福岡大学薬学部臨床心身治療学教室, 814-0180 福岡市城南区七隈8丁目19-1

Characteristics and prophylaxis of gabexate mesilate-induced vascular injury

Tomoko Aki

Department of Psychosomatic Medicine, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University,
8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka, 814-0180, Japan

Abstract

Gabexate mesilate (GM), a serine protease inhibitor, often causes severe vascular injury, when injected in high concentration. In the present study, we investigated the mechanisms for the cytotoxicity of GM on porcine aorta endothelial cells (PAECs). GM (0.5-5.0 mM) decreased cell viability in a dose-dependent manner and caused cell injury, whilst nafamostat mesilate (NM), another serine protease inhibitor, or mesilate itself had no effect on cell viability. zVAD-fmk, a pancaspase inhibitor, or zDEVD-fmk, a caspase-3 inhibitor, did not affect the GM (1.5 mM)-induced decrease of cell viability. Apoptotic cells or DNA fragmentation were also not observed after GM treatment. Moreover, Ca²⁺ chelators, a nitric oxide (NO) synthase inhibitor, antioxidants and radical scavengers had no effect on the GM-induced cell injury. On the other hand, cellular ATP content was decreased in the GM (2.0 mM)-treated cells. Surprisingly, GM (2.0 mM) immediately increased cellular uptake of propidium iodine. These findings suggest that GM induces necrotic cell death via injury of the cell membrane.

Next, we investigated the protective effects of amino acids against this GM-induced cell injury in PAECs. L-cysteine (Cys), glycine (Gly), L-serine, L-glutamine (Gln), L-glutamate (Glu), L-proline, L-methionine, L-threonine and L-isoleucine significantly inhibited the GM-induced decrease of cell viability. Gly showed the most potent effect among these amino acids. Gly, L-Cys, L-Glu and L-Gln also inhibited the GM-induced increase in the number of necrotic cells stained by propidium iodide (PI). However, these amino acids had no effect on the GM-induced inhibition of trypsin activity. Strychnine, MK-801 or dichlorokynurenic acid did not affect the protective effect of Gly. Gly completely suppressed the GM-induced increase in PI uptake, which occurred immediately after exposure to GM. These findings suggest that Gly exerts the protection against the GM-induced cellular membrane injury and several amino acids such as Gly may be useful for prophylaxis of the GM-induced severe vascular injury.

緒言

メシル酸ガベキサートはトリプシン様セリン蛋白分解酵素阻害薬であり、蛋白分解酵素の逸脱を伴う脾臓の諸疾患や汎発性血管内血液凝固症 (DIC) に対して高い有効性を有する薬剤である (1-3)。しかし、

その一方で投与部位での血管痛、刺入した血管に沿った静脈炎や潰瘍・壊死などの血管障害が誘発されることが報告されている(4)。この血管障害が発生した場合、やむを得ず投与中止に至る例も少なくなく、さらに投与中止後も、皮下腫脹、皮膚潰瘍、組織の壊死など、血管障害が重篤化する場合があり注意深い観察を必要とする。重篤例ではデブリードマン、ポケットの切開、植皮などの外科的治療を必要とする場合もあり、メシル酸ガベキサートによる血管障害は臨床上非常に重要な問題の一つである。しかし、この血管障害への予防策は全く確立されておらず、その障害の発現機序の検討も今までに全くなされていない。

一般に、薬剤を静脈内投与した場合、第一に薬液に直接曝露されるのは血管内皮細胞である。従って、薬剤性血管障害の発症には薬剤の血管内皮細胞に対する直接障害が深く関与することが推測される(5)。しかし、メシル酸ガベキサートが血管内皮細胞に及ぼす影響を報告した論文は皆無である。

一方、近年血管内皮細胞を含む種々の細胞において、数種のアミノ酸が様々な細胞障害に対し保護効果を示すとの報告がなされている(6-10)。なかでもグリシン(Gly)は種々のネクロシスによる細胞障害を強力に抑制することが明らかとなっている(9-13)。

そこで本研究では、培養血管内皮細胞であるブタ大動脈血管内皮細胞(Porcine aortic endothelial cells; PAECs)を用いて、メシル酸ガベキサートの血管障害機序を解明し、予防策を構築することを目的として実験を行った。第1章においては、メシル酸ガベキサートによる血管内皮細胞障害の特徴および発現機序について検討を行った。また、第2章では、第1章にて得られた知見をもとに、メシル酸ガベキサート誘発の血管内皮細胞障害に対するアミノ酸の保護効果について検討を行った。

第1章 メシル酸ガベキサートによる血管内皮細胞障害の発現機序

本章では、培養ブタ大動脈血管内皮細胞(Porcine aortic endothelial cells; PAECs)を用いて、メシル酸ガベキサートが血管内皮細胞の生存率に及ぼす影響を調査し、同効薬であるメシル酸ナファモスタットと比較した。さらにその障害の特徴や発現機序について検討を行った。

【方法】

無血清培地に溶解した各濃度のメシル酸ガベキサートをPAECsに24時間曝露し、細胞障害の判定を行った。各種保護薬はメシル酸ガベキサート曝露1時間前に添加した。細胞生存率の測定はミトコンドリアの酵素活性を指標とするWST-8法を用いて行った。細胞障害の形態評価はTUNEL染色、DNA電気泳動、トリパンブルー染色を用いて行った。また、細胞膜障害は細胞内へのPI(propidium iodine)の取り込みを指標として評価した。細胞内ATP含量は高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。

【結果】

メシル酸ガベキサート(0.5mM-5mM)を曝露することにより、濃度依存的かつ時間依存的な血管内皮細胞障害が惹起された(Fig.1)。しかし、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は血管内皮細胞障害を惹起しなかった。メシル酸ガベキサートを曝露した血管内皮細胞においては細胞の膨張が観察され、トリパンブルー染色に対する陽性細胞が顕著に増加した。一方、TUNEL染色およびDNA電気泳動を用いた検討において、メシル酸ガベキサートを曝露した細胞にDNAの断片化は認められず、カスパーゼ阻害薬の前処置によっても細胞障害は影響を及ぼされなかった。細胞外Ca²⁺キレート剤EGTAおよび細胞内Ca²⁺キレート剤BAPTA-AMはメシル酸ガベキサートによる細胞障害に何ら影響を及ぼさず、NO合成酵素阻害薬であるL-NAMEも同様であった。また、抗酸化剤であるアスコルビン酸およびα-トコフェロール、さらにヒドロキシラジカルスカベンジャーであるN,N'-ジメチルチオウレア、マンニトールおよびエダラボンをを用いて酸化的ストレスの関与を検討した

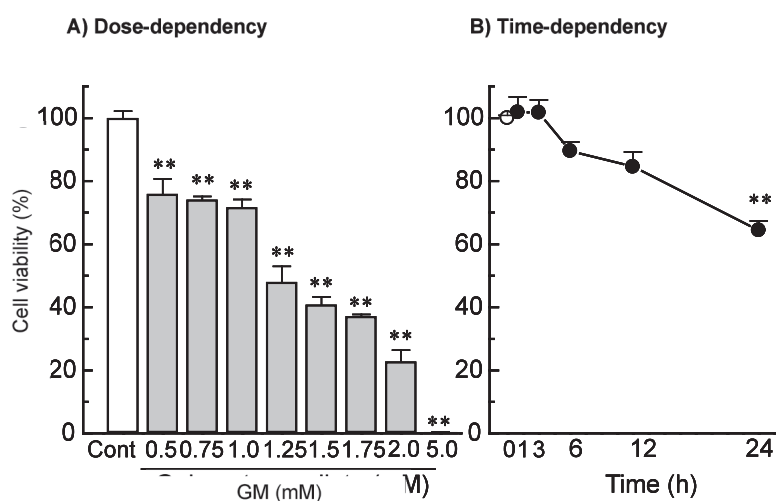


Fig. 1. Dose-dependent (A) and time-dependent (B) effects of GM on cell viability in cultured porcine aortic endothelial cells (PAECs). Cells were exposed to various concentrations (A) or 1.5 mM (B) of GM, and cell viability was assessed by WST-8 assay. Data are expressed as the mean \pm S.E.M. ($n = 3-4$). ** $P < 0.01$ vs. control.

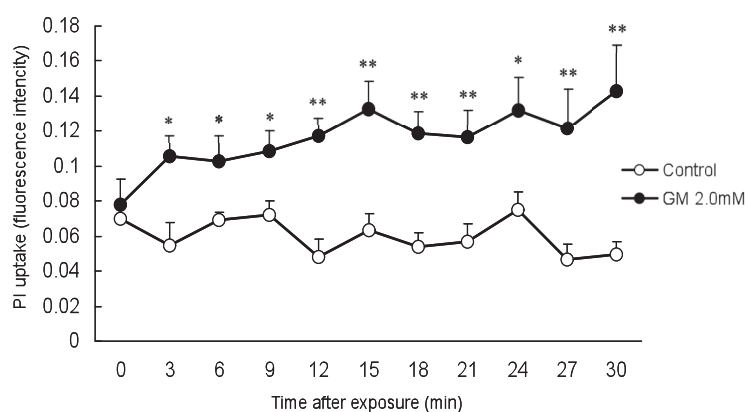


Fig. 2. Effect of GM on cellular uptake of propidium iodide (PI). Cells were pre-incubated with PI, and then treated with 2.0 mM GM. The fluorescence activity was detected at 3 min intervals with excitation and emission wavelengths of 490 and 615 nm using a fluorescence microplate reader. Data are expressed as the mean \pm S.E.M. ($n = 9$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control.

が、これらはいずれもメシル酸ガベキサートによる細胞生存率の減少を抑制しなかった。また、2mMのメシル酸ガベキサートを24時間処置することにより細胞内のATP含量は有意に低下したが、細胞生存率を有意に低下させる濃度である0.5mM、1.0mMでは細胞内ATP含量の変化は認められなかった。さらに、メシル酸ガベキサート処置後のPI取り込みを観察したところ、細胞生存率の低下に先立ってPI取り込みが観察され、さらに驚くべきことに薬物添加3分後からPI取り込みの有意な上昇が認められた (Fig.2)。

【考察】

本章の検討により、メシル酸ガベキサートにより血管内皮細胞に直接障害が誘発され、静脈炎や潰瘍・壊死などの血管障害の原因となること示唆された。さらに、この内皮細胞障害は濃度依存的かつ時間依

存的な細胞障害であったことから、メシル酸ガベキサートを静脈内投与した場合、薬剤の投与濃度が高いほど、また薬剤の総投与時間が長くなるほど血管障害が増悪することが示唆された。また、メシル酸およびメシル酸ナフアモスタットには細胞障害は示さなかったことから、メシル酸ガベキサートによる血管内皮細胞障害はメシル酸によるものではなく、また主作用である蛋白分解酵素阻害作用には依存しないことが明らかとなった。メシル酸ガベキサートにより障害が惹起された細胞において、ネクローシスの特徴である細胞の膨張が観察され、さらにアポトーシスの特徴であるDNA断片化は観察されず、カスパーゼ阻害剤によってその障害は抑制されなかった。従って、メシル酸ガベキサートによる血管内皮細胞障害はアポトーシスではなく、主にネクローシスが関与していることが明らかとなった。血管内皮細胞に障害を惹起するシグナルとして細胞内外Ca²⁺、NO、酸化的ストレスについてメシル酸ガベキサートによる細胞障害への関与を検討したが、いずれもこの障害には寄与していないことが示された。また、2.0mMのメシル酸ガベキサートは細胞内ATP含量を有意に低下させたが、細胞障害を惹起する濃度である0.5mM、1mMにおいて、ATP含量は低下しなかった。従って、細胞内ATP含量の低下は、メシル酸ガベキサートによる血管内皮細胞障害を惹起する直接の原因ではないことが示唆された。一方、メシル酸ガベキサート曝露直後より細胞内へのPI取り込みが観察され、細胞膜障害が確認されたことから、メシル酸ガベキサートは極めて早期に血管内皮細胞の細胞膜機能を崩壊し、ネクローシスを惹起すると考えられる。

第2章 メシル酸ガベキサートによる血管内皮細胞障害に対するアミノ酸の保護効果

前章にて、メシル酸ガベキサートにより血管内皮細胞に障害が起こり、これは早期の細胞膜機能障害を起因とするネクローシスであることが明らかになった。

一方、近年血管内皮細胞を含む種々の細胞において、数種のアミノ酸が様々な細胞障害に対し保護効果を示すという報告がなされている(6-10)。なかでもグリシン(Gly)は様々なタイプのネクローシスによる細胞障害を強力に抑制することが報告されている(9-13)。

さらに、培養ウシ血管内皮細胞において、グリシンはマイトトキシンによる早期の細胞膜機能障害を抑制するという報告(10)がなされており、細胞膜に早期に障害を惹起する点で、マイトトキシンとメシル酸ガベキサートによる細胞障害は類似している。そこで本章では、メシル酸ガベキサートによる血管内皮細胞障害に対するアミノ酸の保護作用について検討を行った。

【方法】

第1章と同様に、無血清培地に溶解した各濃度のメシル酸ガベキサートをPAECsに24時間曝露し、細胞障害の判定を行った。アミノ酸はメシル酸ガベキサート曝露1時間前に添加した。細胞生存率の測定はミトコンドリアの酵素活性を指標とするWST-8法を用いて行った。細胞膜障害は細胞内へのPI(propidium iodine)の取り込みを指標として評価した。トリプシン活性はウシ膵臓製トリプシンが合成基質Boc-Phe-Ser-Arg-AMCを分解して蛍光基質AMCを遊離することを利用して測定した。

【結果】

メシル酸ガベキサートによる細胞生存率の減少に対し、L-システイン、グリシン、L-セリン、L-グルタミン酸、L-グルタミン、L-プロリン、L-メチオニン、L-スレオニン及びL-イソロイシンは有意な保護効果を示した(Fig.3)。特に、グリシンはこれらのアミノ酸の中で最も強力な保護作用を示し、メシル酸ガベキサートによる細胞障害を完璧に抑制した。また、L-システイン、グリシン、L-グルタミン酸、L-グルタミンはメシル酸ガベキサートによるPI陽性細胞の増加を抑制した。一方、細胞保護効果を示したこれらのアミノ酸はメシル酸ガベキサートによるトリプシン活性阻害作用に影響を及ぼさなかった

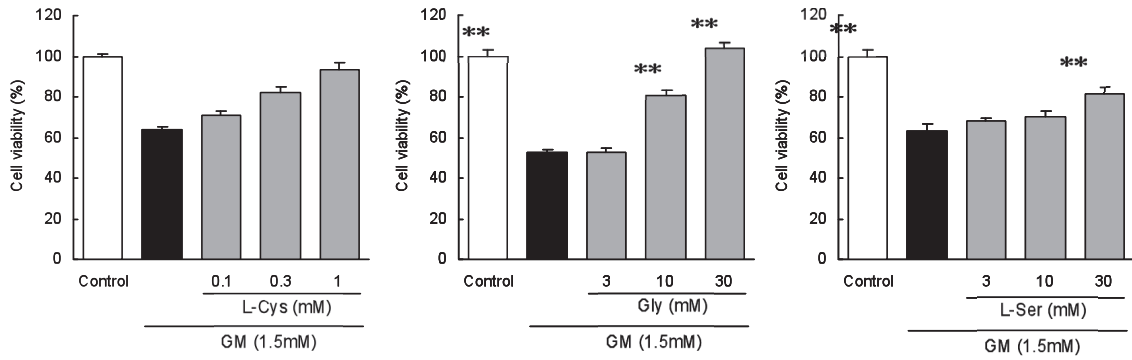


Fig. 3. Effects of serine family of amino acids on GM-induced decrease of cell viability. Cells were pretreated with each amino acid at 1 h before exposure to 1.5 mM GM. Cell viability was assessed by WST-8 assay at 24 h after treatment with GM. Values are expressed as the mean \pm S.E.M. ($n = 4$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with GM alone.

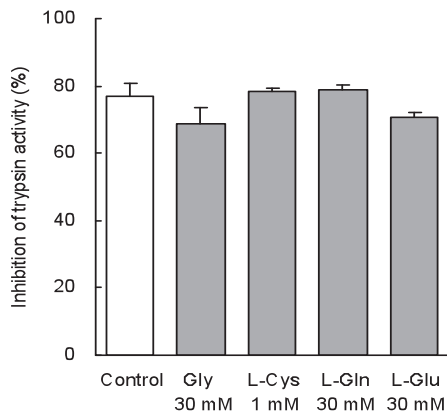


Fig. 4. Effects of amino acids on GM-induced inhibition of trypsin activity. Trypsin activity was assessed by the degradation of the substrate peptide Boc-Phe-Ser-Arg-AMC. Values are expressed as the mean \pm S.E.M. ($n = 6$).

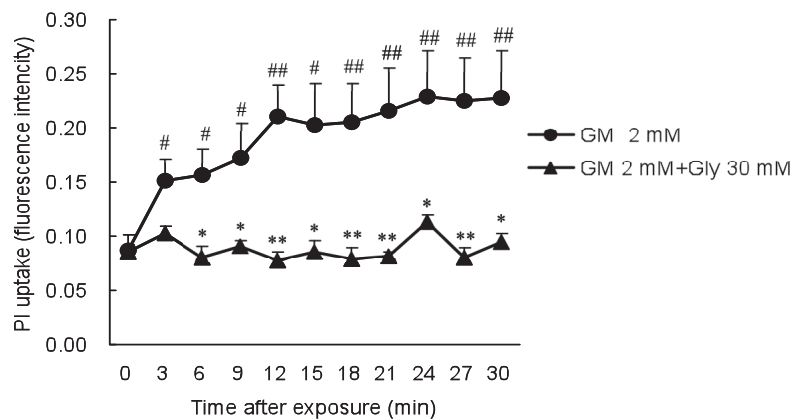


Fig. 5. Effect of Gly on GM-induced increase of PI uptake. Cells were pre-incubated with PI, and then treated with 2.0 mM GM or 2.0 mM GM + 30 mM Gly. The fluorescence activity was detected at 3 min intervals with excitation and emission wavelengths of 490 and 615 nm by a fluorescence microplate reader. Values are expressed as the mean \pm S.E.M. ($n = 7-8$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with GM alone. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ compared with GM 0 min.

(Fig.4)。

グリシンはメシル酸ガベキサートにより誘発される血管内皮細胞障害を強力に抑制するが、このグリシンによる細胞保護作用はグリシン受容体拮抗薬であるストリキニーネでは消失しなかった。また、同様にグリシンの細胞保護作用はNMDA受容体グリシン結合部位拮抗薬である Dichlorokynurenic acid (DCKA)、NMDA受容体拮抗薬である MK-801 によっても消失しなかった。

メシル酸ガベキサートは、添加直後から PI の細胞内取り込みを増加させるが、グリシンはこの早期の PI 取り込みを初期から有意に抑制した (Fig.5)。また、グリシンは、メシル酸ガベキサートと同時に処置した場合には細胞生存率の低下をほぼ完全に抑制し、3時間後に添加した場合も有意な保護効果が観察されたが、メシル酸ガベキサート処置から6時間、12時間での添加では細胞保護効果は観察されなかった。

【考察】

本章では、メシル酸ガベキサート誘発血管内皮細胞障害に対するアミノ酸の作用について検討した。数種のアミノ酸は、メシル酸ガベキサートによる血管内皮細胞の生存率減少を有意に抑制し、PI陽性細胞の増加を抑制した。なかでもグリシンは強力な保護作用を示した。また、グリシンによる細胞保護作用は、グリシン受容体を介するものではなく、メシル酸ガベキサートにより誘発される早期の細胞膜障害を抑制することよることが示唆された。グリシンはメシル酸ガベキサートによる血管内皮細胞障害に対し、処置時間が早いほど強力な保護作用を示した。さらに、グリシンをはじめとするアミノ酸はメシル酸ガベキサートの蛋白分解酵素阻害作用に影響を与えることなく保護作用を発現した。以上の知見より、グリシンをはじめとするアミノ酸はメシル酸ガベキサートによる血管障害に対し有用な予防策となりうる可能性が示唆された。

総括

本研究によりメシル酸ガベキサートは細胞膜に障害を与え、血管内皮細胞にネクローシスを起こすことで血管障害を誘発している可能性が示唆された。また、このメシル酸ガベキサートによる血管内皮細胞障害はグリシンをはじめとするアミノ酸により抑制されることが明らかとなり、これらのアミノ酸がメシル酸ガベキサート誘発血管障害の有用な予防策となりうる可能性が示唆された。本研究は、メシル酸ガベキサートによる血管障害の発現機序及び予防策について詳細に検討した初めての報告である。

参考文献

- 1 Menegatti E, Bolognesi M, Scalia S, Bortolotti F, Guarneri M, Ascenzi P. Gabexate mesilate inhibition of serine proteases: thermodynamic and computer-graphics analysis. *J Pharm Sci.* 1986;75:1171-1174.
- 2 Tamura Y, Hirano M, Okamura K, Minato Y, Fujii S. Synthetic inhibitors of trypsin, plasmin, kallikrein, thrombin, C1r-, and C1 esterase. *Biochim Biophys Acta.* 1977;484:417-422.
- 3 Taenaka N, Shimada Y, Hirata T, Nishijima MK, Takezawa J, Yoshiya I, et al. Gabexate mesilate (FOY) therapy of disseminated intravascular coagulation due to sepsis. *Crit Care Med.* 1983;11:735-738.
- 4 Yuasa T, Taniguchi Y, Yamada E, Inachi S, Shimizu M. Severe cutaneous and venous damage after DIC therapy. *J Dermatol.* 1997;24:466-470.
- 5 Tesfamariam B, DeFelice AF. Endothelial injury in the initiation and progression of vascular disorders. *Vascul Pharmacol.* 2007;46:229-237.
- 6 Yata T, Endo Y, Sone M, Ogawara K, Higaki K, Kimura T. Amino acids protect epithelial cells from local

- toxicity by absorption enhancer, sodium laurate. *J Pharm Sci.* 2001;90:1456-1465.
- 7 Weinberg JM, Varani J, Johnson KJ, Roeser NF, Dame MK, Davis JA, Venkatachalam MA. Protection of human umbilical vein endothelial cells by glycine and structurally similar amino acids against calcium and hydrogen peroxide-induced lethal cell injury. *Am J Pathol.* 1992;140:457-471.
 - 8 Fuller TF, Rose F, Singleton KD, Linde Y, Hoff U, Freise CE, Dragun D, Niemann CU. Glutamine donor pretreatment in rat kidney transplants with severe preservation reperfusion injury. *J Surg Res.* 2007;14:77-83.
 - 9 Nishimura Y, Lemasters JJ. Glycine blocks opening of a death channel in cultured hepatic sinusoidal endothelial cells during chemical hypoxia. *Cell Death Differ.* 2001;8:850-858.
 - 10 Estacion M, Weinberg JS, Sinkins WG, Schilling WP. Blockade of maitotoxin-induced endothelial cell lysis by glycine and L-alanine. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003;284:C1006-C1020.
 - 11 Ruiz-Meana M, Pina P, Garcia-Dorado D, Rodríguez-Sinovas A, Barba I, Miró-Casas E, Mirabet M, Soler-Soler J. Glycine protects cardiomyocytes against lethal reoxygenation injury by inhibiting mitochondrial permeability transition. *J Physiol.* 2004;558:873-882.
 - 12 Miller GW, Lock EA, Schnellmann RG. Strychnine and glycine protect renal proximal tubules from various nephrotoxicants and act in the late phase of necrotic cell injury. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1994;125:192-197.
 - 13 Gundersen RY, Vaagenes P, Breivik T, Fonnum F, Opstad PK. Glycine--an important neurotransmitter and cytoprotective agent. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2005;49:1108-1116.

投稿論文

Protective effects of amino acids against gabexate mesilate-induced cell injury in porcine aorta endothelial cells.

Aki T, Egashira N, Yamauchi Y, Hama M, Yano T, Itoh Y, Yamada T, Oishi R.

J Pharmacol Sci. 2008;107(3):238-45.

Characteristics of gabexate mesilate-induced cell injury in porcine aorta endothelial cells.

Aki T, Egashira N, Hama M, Yamauchi Y, Yano T, Itoh Y, Oishi R.

J Pharmacol Sci. 2008;106(3):415-22.

謝辞

本論文の執筆にあたり、終始懇切な御指導、御校閲を賜りました福岡大学薬学部臨床心身治療学教室 美根和典 教授に心より感謝の意を表します。

本論文を査読していただき、貴重な御意見と御校閲を賜りました福岡大学薬学部片岡泰文 教授、山内淳史 准教授、小山進 准教授に深く感謝いたします。

本研究に際し、終始御懇篤な御指導、御鞭撻、御校閲を賜りました九州大学病院薬剤部長 大石了三 教授、同副薬剤部長 江頭伸昭 准教授ならびに岐阜大学医学部附属病院薬剤部長 伊藤善規 教授に謹んで感謝いたします。

本研究の遂行に際し、多大なる御助力を賜りました 窪田敏夫 先生、野中敏治 先生、矢野貴久 先生をはじめとする九州大学病院薬剤部の諸先生方に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、共同研究者として多大なる御協力と御助言をいただきました 濱美香 修

士，山内結衣 修士をはじめとする九州大学大学院薬学府医薬品情報解析学講座の皆様方に心より感謝いたします。

本論文執筆に際し，数々の御助言，激励をいただきました 村田雄介 助教 をはじめとする福岡大学薬学部臨床心身治療学教室の皆様に深く感謝いたします。

最後に，本研究の遂行と論文執筆を陰ながらささえてくれた夫 安藝敬生，娘 安藝遥，両親，義両親，義兄に感謝いたします。