

## Nitroglycerin の血管平滑筋弛緩機序

新潟大学医学部薬理学教室 (主任: 今井昭一教授)

仲 澤 幹 雄

Relaxation Mechanisms of Nitroglycerin

Mikio NAKAZAWA

*Department of Pharmacology,  
Niigata University School of Medicine  
(Director: Prof. Shoichi IMAI)*

Since 1879, nitroglycerin is used as a remedy for angina pectoris. There is no doubt as to the effectiveness of nitroglycerin in the relief from the pain. The mechanism of anti-anginal effects of nitroglycerin is exclusively thought to be dependent on its vasodilatory effects. The emerging consensus strongly favours the involvement of cyclic GMP as the mediator of vascular smooth muscle relaxation elicited by nitroglycerin. It is believed that accumulated cyclic GMP activates cyclic GMP-dependent protein kinase (G-kinase), G-kinase phosphorylates target proteins and then relaxation is occurred. Two main pathways are proposed as the relaxation mechanisms, 1) lowering intracellular free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration and 2) reducing  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity to contractile proteins. Mechanism 1) will be mainly discussed. The vasodilatory effects of nitroglycerin shows a tissue (vein vs. artery) and a region (large vs. small artery) selectivity. The precise mechanism of the selectivity is not known so far. The region selectivity of nitroglycerin on the canine coronary artery may be based upon the difference of guanylate cyclase activity.

Key words: nitroglycerin, cyclic GMP, G-kinase, smooth muscle,  $\text{Ca}^{2+}$  pump

ニトログリセリン, サイクリック GMP, G-キナーゼ, 血管平滑筋, カルシウムポンプ

Reprint requests to: Mikio NAKAZAWA,  
Department of Pharmacology, Niigata  
University School of Medicine,  
Asahimachi-dori 1, Niigata City, 951,  
JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町  
新潟大学医学部薬理学教室 仲澤幹雄

Nitroglycerin (NG) が狭心症の治療に使用され始めてから 114 年が過ぎ<sup>1)</sup>, その効果については疑う余地がなく, 未だにこれを凌駕する薬物の出現を見ない. しかしその作用機序については多くの解決すべき問題を含んでおり, 現在もおお研究者の興味を引いている. 狭心症に対する有効性は, NG の心筋細胞あるいは痛みに対する直接作用ではなく, 血管拡張作用によると考えられている. しかし Ganz の臨床実験<sup>2)</sup> での静脈系の拡張作用が重要であるとの指摘, さらに冠動脈の部位による作用の違い<sup>3)</sup> などがあきらかになったが, いずれが抗狭心症効果に重要なのかについての結論は出ていない. NG は血管平滑筋で NO に変換され guanylate cyclase の活性化→cyclic 3', 5'-guanosine monophosphate (cGMP) の増加→cGMP 依存性タンパク質リン酸化酵素 (G-kinase) の活性化→標的タンパク質のリン酸化→弛緩の道順で作用を惹起するとされているが, NO への変換機序については明確になっていない. 標的タンパク質 (弛緩機序の本体) については当薬理学教室で目下鋭意検討中である.

### 1. 抗狭心症作用について

狭心症は安静時および労作性狭心症に分類できる. それぞれ供給不全による心筋酸素供給の相対的減少により発現するけれど, 典型的な病像では, 前者が冠動脈の機能的収縮による血流の減少あるいは杜絶であるのに対し, 後者は冠動脈の基質的な変化のため血流増加による代償機構が破綻していると考えられている. 一般的な狭心症

はこの両者が混在して発現すると考えられる.

典型的な狭心症を考えた場合, NG の抗狭心症作用は, 安静時狭心症に関しては太い冠血管拡張作用による抗スパスム作用によると考えてよいが, 労作性狭心症に対しては, 静脈系の拡張 (preload の減少) による酸素消費量の減少あるいは左室拡張終期圧の減少による心筋内層への血流分配の増加と, 冠動脈の太い部位の拡張作用による虚血部位への血流の再分配などが作用機序と考えられている. 確かに動物実験でもまた人においても NG は動脈より静脈を拡張させる作用の方が強い, また冠動脈の太い部分に対し選択的な拡張作用を持つことも示されている. しかしこの選択的な拡張作用の作用機序は未だあきらかになっていない. この点に関して教室で得られた結果を後述する.

### 2. 血管平滑筋弛緩作用について

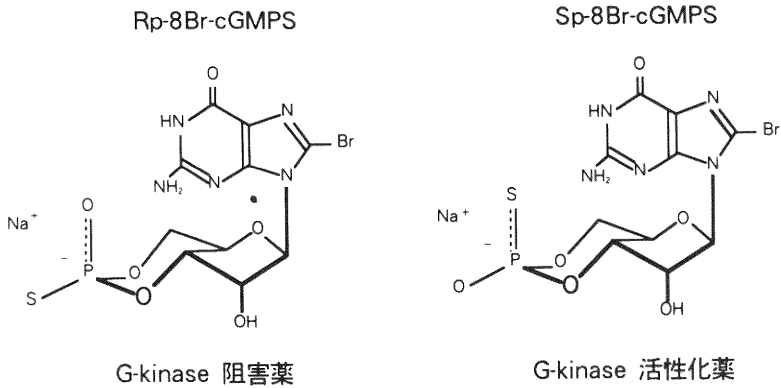
NG が血管平滑筋を弛緩させることは既に多くの研究により示されている. 表 1 に示すように, 弛緩を検討するのに使用している収縮薬によって, NG の弛緩作用の強さは異なる. すなわち, NG はカテコールアミンなどの受容体刺激による収縮の方を, 脱分極 (高濃度  $K^+$ ) 収縮に比べてより低濃度で弛緩させる. この感受性の違いはカルシウム拮抗薬のそれと丁度正反対である. これは NG の平滑筋弛緩機序を考える上でも, また冠動脈のスパスムが内因性の化合物 (受容体刺激) による冠動脈収縮であることから考えても興味深い. 狭心症治療薬として NG が優れているのもこの点にあるの

表 1 各種血管における nitroglycerin の弛緩作用

Vessel	EC <sub>50</sub> (nM)	Contractile stimuli
Bovine coronary artery	200	5-hydroxytryptamine
Bovine mesenteric artery	27	histamine
Canine coronary artery	256	high $K^+$
Canine coronary artery	2,400	high $K^+$
Canine coronary artery	10	noradrenaline
Canine mesenteric artery	64	thromboxane A <sub>2</sub>
Canine mesenteric artery	7,900	high $K^+$
Canine femoral artery	5,000	noradrenaline
Canine femoral artery	14,800	high $K^+$
Canine femoral vein	610	high $K^+$
Rabbit femoral artery	1,622	noradrenaline
Rabbit femoral artery	1,000	noradrenaline
Rabbit femoral vein	5	noradrenaline

文献14を改変

## G-kinase 阻害薬の構造



## 細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 貯蔵部位 $\text{Ca}^{2+}$ ポンプ阻害薬の構造

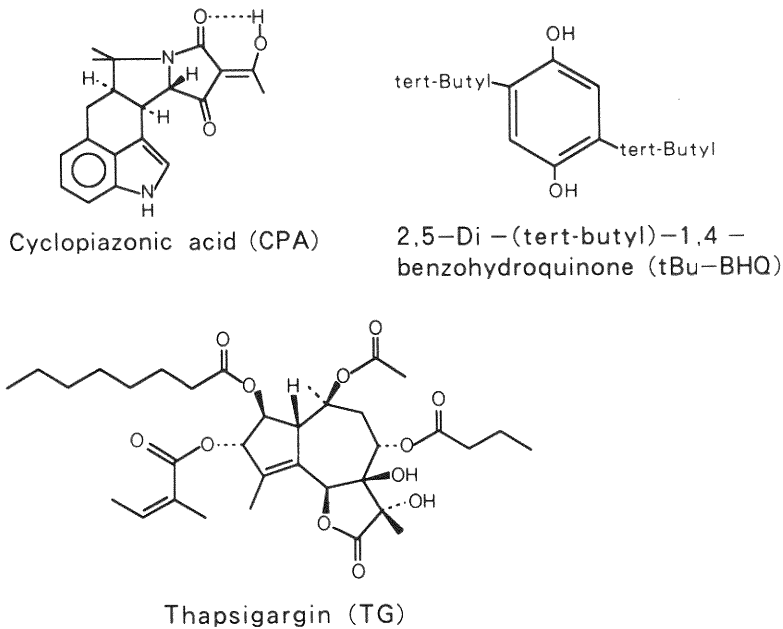


図 1 G-kinase と細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵部位  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプ阻害薬の構造

Rp-8Br-cGMPS は膜透過性の cGMP 誘導体である 8Br-cGMP 誘導体の立体異性体。

CPA: かび (*Aspergillus*, *Penicillium*) の毒素, TG: セリ科の植物 *Thapsia garganica* の毒素, tBu-BHQ: 化学合成された薬品。

かもしれない。

NG は細胞内で NO に代謝され、この NO が可溶性 guanylate cyclase を活性化して cGMP を増加させ、さらに G-kinase を活性化し弛緩作用を発揮すると考えられている。NG の NO への変換経路については未だ明確になっていないが、可溶性 guanylate cyclase を活性化して弛緩が起こることは、可溶性 guanylate cyclase の阻害作用を持つ methylene blue が cGMP の増加と弛緩を抑制することからあきらかである。さらに G-kinase の特異的な阻害薬である Rp-8Br-cGMPS (図 1) により弛緩が抑制されることから、NG→NO→cGMP→G-kinase→弛緩の経路はほぼ確定したと考えてよいと思われる。しかし G-kinase から弛緩への経路、すなわち G-kinase の基質についてはあきらかになっただけではない。

Fura-2 などの蛍光色素による細胞内 Ca 濃度測定により、NG は細胞内 Ca 濃度に影響なく平滑筋を弛緩させる場合と、Ca 濃度を減少させて平滑筋を弛緩させ

る場合とが示されている<sup>4)5)</sup>。前者は収縮タンパク質の Ca 感受性減少、後者は細胞膜 (SL) Ca ポンプあるいは細胞内 Ca 貯蔵部位 (SR) Ca ポンプの活性化がその中心的機序であると推定されている。教室の吉田等は、cGMP-kinase により SL-Ca ポンプが活性化されることを生化学的に示し、活性化が SL-Ca ポンプそれ自身ではなく、240 KDa のタンパク質のリン酸化を介するものであることを見出した<sup>6)7)</sup>。一方 SR-Ca ポンプも G-kinase により活性化されることが報告されている<sup>8)</sup>。しかし血管平滑筋そのものを使用した研究で、NG の弛緩作用に対するこれらの Ca ポンプの役割についての薬理的な直接研究はなかった。

最近 thapsigargin (TG), cyclopiazonic acid (CPA), 2, 5-Di-(ter-butyl)-1, 4-benzohydroquinone (tBu-BHQ) などの化合物 (図 1) が SR-Ca ポンプを特異的に阻害することが報告された<sup>9)~11)</sup>。もしこれらの化合物が平滑筋でも特異的な SR-Ca ポンプ阻害作用を示すならば、NG の弛緩機序に SR-Ca ポンプが関与

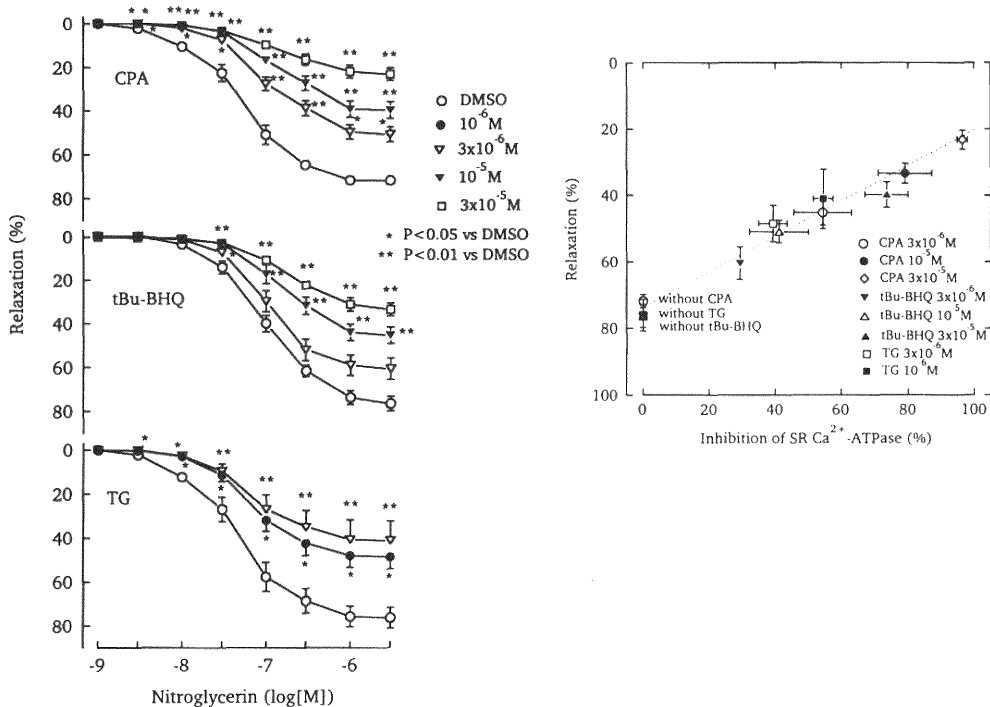


図 2 細胞内 Ca<sup>2+</sup> 貯蔵部位 Ca<sup>2+</sup> ポンプ阻害薬による nitroglycerin の弛緩作用の抑制  
左図: ウサギ摘出大動脈における nitroglycerin の弛緩作用の CPA, TG および tBu-BHQ による抑制。Phenylephrine 収縮。  
右図: ウサギ大動脈における細胞内 Ca<sup>2+</sup> 貯蔵部位 Ca<sup>2+</sup> ポンプ阻害作用と nitroglycerin の弛緩作用抑制との関係。両者には良い直線関係が認められる。

しているか否かをあきらかに出来る。そこでウサギ大動脈平滑筋を使用して検討したところ、上記の阻害薬は他の組織の SR と同様に血管平滑筋の SR-Ca ポンプも特異的に阻害することがわかった。さらにこれらの薬物は、phenylephrine 収縮の NG による弛緩作用も、cGMP の増加作用に影響なく用量依存的に抑制する事が示された (図 2)。阻害薬の SR-Ca ポンプ阻害作用と NG の弛緩抑制作用とはの間には直線関係が認められたので (図 2)、NG の弛緩作用に SR-Ca ポンプが重要な役割を担っている可能性が示唆された<sup>12)</sup>。残念ながら、現在のところ、SL-Ca ポンプの特異的阻害薬は無いのでこのポンプの役割を薬理的に検討することは出来ない。SL-Ca ポンプの抗体などを使用してこの面での研究を進めて行きたいと考えている。

一方、ウサギ大動脈の高濃度  $K^+$  による収縮の NG による弛緩は SR-Ca ポンプ阻害薬で影響されなかった。これは収縮の手段により NG の弛緩機序が異なる事および、弛緩機序が 1 つではないことを示唆する。すなわち細胞内 Ca 濃度測定の結果を勘案すると、収縮タンパク質の Ca 感受性減少が、ウサギ大動脈においても高濃度  $K$  収縮における NG の弛緩作用の主因であると思われる。

### 3. 弛緩作用の部位特異性

NG の血管平滑筋弛緩作用には、静脈と動脈との差、

同じ血管床内での差、特に冠動脈における太い部位と細い部位との差がよく知られている。しかし、弛緩反応のこのような差がいかなる機序で発現するかについてはあきらかではなかった。可能性としては、NG の NO への変換、guanylate cyclase の違い、G-kinase およびそれ以降の違い等が考えられる。教室の北川<sup>13)</sup> はイヌ摘出冠動脈を使用し、NG、NO および cGMP の膜透過性誘導体である 8Br-cGMP の太い部位 (直径約 2mm) および細い部位 (直径約 0.6 mm) での弛緩反応を比較検討した (図 3)。NG と NO はともに同程度太いほうに選択的であったが、8Br-cGMP は細い方に選択性を示した。これは cGMP→G-kinase 以降は選択性に関係なく、guanylate cyclase による cGMP の合成に部位差がある事を示す結果である。これと同様なことが静脈と動脈での感受性の違いにも当てはまるかどうかは今後の問題である。

### ま と め

NG の血管拡張作用の作用機序を SR-Ca ポンプを中心に紹介した。前述したように、SL-Ca ポンプの役割についても今後検討していきたいと考えている。収縮タンパク質の Ca 感受性の低下、あるいはイノシトールリン酸代謝に対する作用も重要な点である。また NG の作用が NO→cGMP 系で全て説明できるのかに

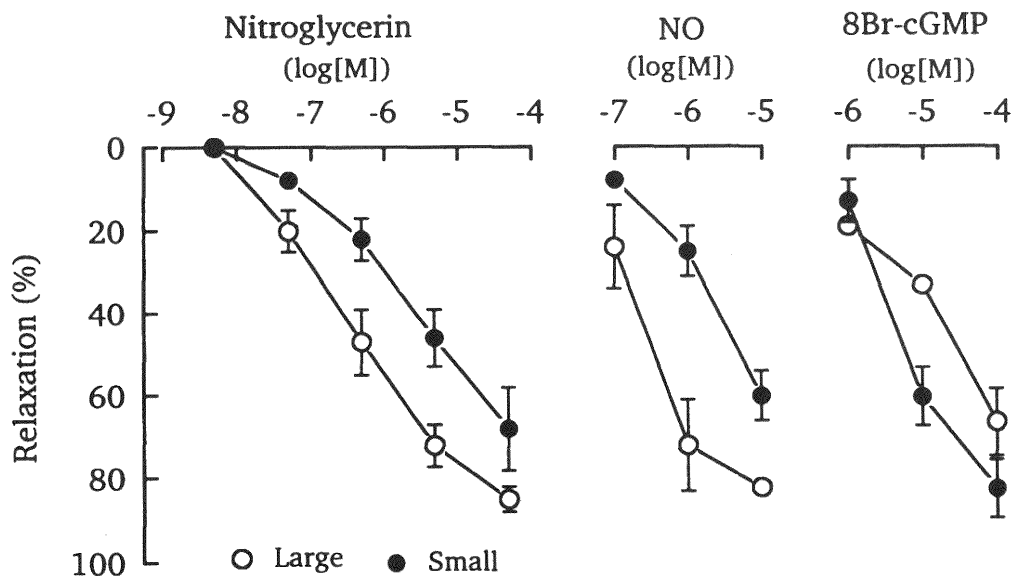


図 3 イヌ摘出冠動脈の部位による弛緩作用の違い

Large: 外径約 2 mm, small: 外径約 0.6 mm. 高濃度  $K^+$  収縮に対する弛緩作用.

についても疑問の残るところであり今後の問題と思われる。

### 参 考 文 献

- 1) Murrel, W.: Nitro-glycerine as a remedy for angina pectoris. *Lancet*, **1**: 80~81, 1879.
- 2) Ganz, W. and Marcus, H.S.: Failure of intracoronary nitroglycerin to alleviate pacing-induced angina. *Circulation*, **46**: 880~889, 1973.
- 3) Takeda, K., Nakagawa, Y., Katano, Y. and Imai, S.: Effects of coronary vasodilators on large and small coronary arteries of dogs. *Japan. Heart J.*, **18**: 92~101, 1977.
- 4) Abe, S., Kanaide, H. and Nakamura, M.: Front-surface fluorometry with fura-2 and effects of nitroglycerin on cytosolic calcium concentrations and on tension in the coronary artery of the pig. *Br. J. Pharmacol.*, **101**: 545~552, 1990.
- 5) Yanagisawa, T., Kawada, M. and Taira, N.: Nitroglycerin relaxes canine coronary arterial smooth muscle without reducing intracellular  $Ca^{2+}$  concentrations measured with fura-2. *Br. J. Pharmacol.*, **98**: 469~482, 1989.
- 6) Yoshida, Y., Sun, H.-T., Cai, J.-Q. and Imai, S.: Cyclic GMP-dependent protein kinase stimulates the plasma membrane  $Ca^{2+}$ -pump ATPase of vascular smooth muscle via phosphorylation of a 240 kDa protein. *J. Biol. Chem.*, **266**: 19891~19825, 1991.
- 7) Yoshida, Y., Gai, J.-Q. and Imai, S.: Plasma membrane  $Ca^{2+}$ -pump ATPase is not a substrate for cGMP-dependent protein kinase. *J. Biochem.*, **111**: 559~562, 1992.
- 8) Twort, C.H.C. and van Breemen, C.: Cyclic guanosine monophosphate-enhanced sequestration of  $Ca^{2+}$  by sarcoplasmic reticulum in vascular smooth muscle. *Circ. Res.*, **62**: 961~964, 1988.
- 9) Lytton, J., Westlin, M. and Hanley, M.R.: Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase family of calcium pumps. *J. Biol. Chem.*, **266**: 17067~17071, 1991.
- 10) Goeger, D.E., Riley, R.T., Dorner, J.W. and Cole, R.J.: Cyclopiazonic acid inhibition of the  $Ca^{2+}$ -transport ATPase in rat skeletal muscle sarcoplasmic reticulum vesicles. *Biochem Pharmacol.*, **37**: 978~981, 1988.
- 11) Moore, G.A., McConkey, D.J., Kass, G.E.N., O'Brien, P.J. and Orrenius, S.: 2, 5-Di-(tert-butyl)-1, 4-benzohydroquinone—a novel inhibitor of liver microsomal  $Ca^{2+}$  sequestration. *FEBS Lett.*, **224**: 331~336, 1987.
- 12) Luo, D.-L., Nakazawa, M., Ishibashi, T., Kato, K. and Imai, S.: Putative, selective inhibitors of sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -pump ATPase inhibit relaxation by nitroglycerin and atrial natriuretic factor of the rabbit aorta contracted by phenylephrine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **265**: 1187~1192, 1993.
- 13) 北川敏一: 各種摘出イヌ動脈標本におけるニトログリセリン, 一酸化窒素および 8-Bromo-cyclic GMP の弛緩作用について. *新潟医学会雑誌*, **106**: 1026~1035, 1992.
- 14) Ahlner, J., Andersson, R.G.G., Torfgard, K. and Axelsson, K.L.: organic nitrate esters: Clinical use and mechanisms of actions. *Pharmacol. Rev.*, **43**: 351~423, 1991.