

シルニジピンの適応拡大を指向した新規薬理作用の 機序解析

石川, 達也

<https://doi.org/10.15017/1654820>

出版情報：九州大学, 2015, 博士（創薬科学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：全文ファイル公表済



博 士 論 文

シルニジピンの適応拡大を指向した
新規薬理作用の機序解析

平成 28 年 3 月

九州大学大学院薬学府 創薬科学専攻
創薬産学官連携講座

石 川 達 也

目次

第 1 章. 略語一覧	4
第 2 章. 序論	5
2-1. 序	5
2-2. 参考文献	10
第 3 章. シルニジピンの N 型 Ca ²⁺ チャネル阻害によるアンジオテンシン II 誘発性 血管内皮障害の抑制	12
3-1. 序	12
3-2. 実験方法	14
3-3. 結果	17
3-4. 考察	23
3-5. 参考文献	25
第 4 章. シルニジピンのミトコンドリア GTP 結合タンパク質 Drp1 活性化阻害に よる心不全改善効果	30
4-1. 序	30
4-2. 方法	33
4-3. 結果	41
4-4. 考察	54
4-5. 参考文献	58
第 5 章. 総括	61
第 6 章. 論文目録	62
第 7 章. 謝辞	63

第 1 章. 略語一覽

ACh	acetylcholine
Ang	angiotensin
AT ₁ R	Ang type1 receptor
BW	body weight
DHE	dihydroethidium
DHP	dihydropyridine
Drp1	dynamain-related protein 1
EDCF	endothlium-derived constricting factor
EDHF	endothelium-derived hyperpolarizing factor
EDRF	endothelium-derived relaxing factor
HIF	hypoxia-inducible factor
4-HNE	4-hydroxy-2-nonenal
HO	heme oxygenase
HW	heart weight
KW	kidney weight
LTCCs	L-type Ca ²⁺ channels
MI	myocardial infarction
Nox	NADPH oxidase
NRCM	neonatal rat cardiomyocytes
8-OH-dG	8-hydroxy-2'-deoxyguanosine
ROS	reactive oxygen species
VDCCs	voltage-dependent Ca ²⁺ channels
WT	wild-type

第2章. 序論

2-1. 序

1950年以降の日本の出生時平均余命は、5歳以下の死亡率の低下も貢献し、年々伸びており、1950–1955年に62.2歳であった出生時平均余命は、2010–2015年に83.3歳となっている（Fig. 2-1）。また、今後も継続的に伸び、2065–2070年には、90歳を超えることが予想されている[1]。

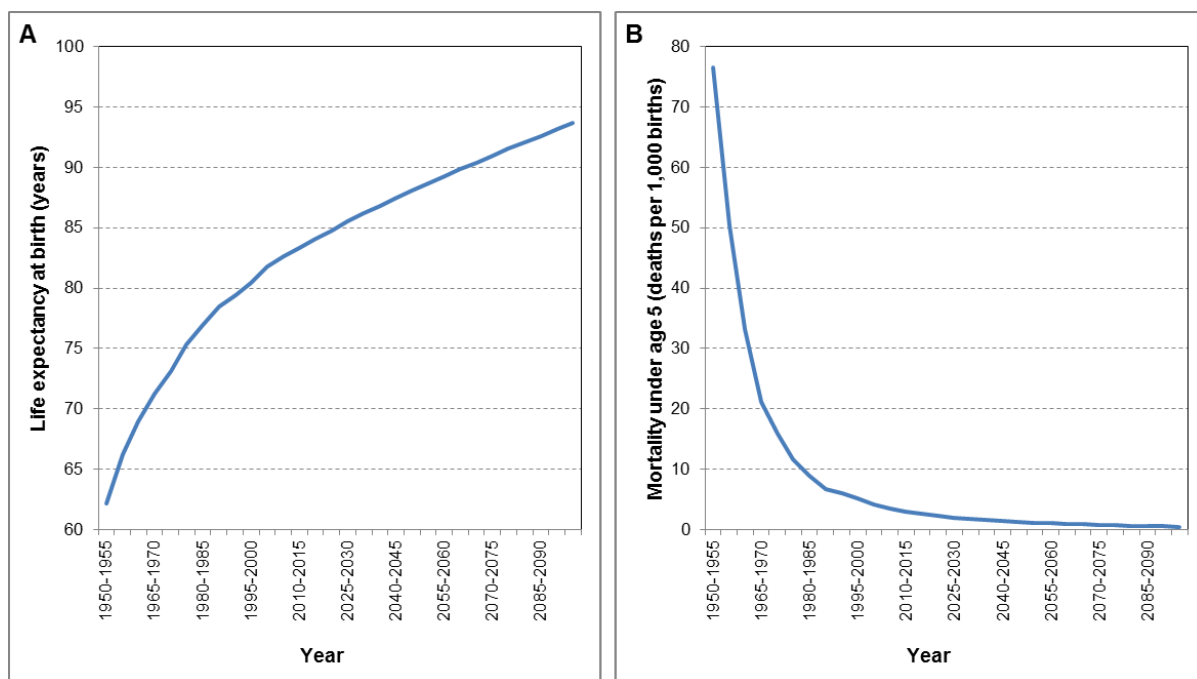


Fig. 2-1. (A) Life expectancy at birth in Japan (both sexes combined). (B) Mortality under age 5 in Japan (deaths per 1,000 births)[1]

日本における20世紀の出生時平均余命の伸びの要因は、5歳児以下の死亡率低下から50歳以上の死亡率低下に変化していったが[2]、いずれの死亡率低下に対しても新しい医薬品の登場は幾ばくかの貢献をしたと考えられる[3]。また、今後の出生時平均余命を伸長するためにも、アンメット・メディカル・ニーズに応え、継続的に新しい医薬品を創出していくことは重要である。

医薬品を新しく世の中に生み出す研究は、薬を創出することから、創薬研究と呼ばれている。この創薬研究は主に、探索研究、前臨床試験および臨床試験の3つから成る。探索研究では、標的分子の同定などの研究に始まり、ハイスループット・スクリーニングによるリード化合物の発見や最適化を通し、候補化合物が選定される。続く前臨床試験では、候補化合物の安全性が評価されるが、この段階で、物理化学的性質の確認や、製造方法の工業化研究も実施される。そして、前臨床試験を経た候補化合物は、臨床研究に進むこととなり、ヒトに投与され安全性や有効性を評価される。さらに、前臨床研究および臨床研究のデータによる承認申請に基づいて、公的機関による承認審査が行われ、安全性と有効性が確認された後、医薬品として承認され、患者に投与されることとなる。一般的に、最初の探索研究開始から承認取得まで10~20年という長い開発期間と共に、1,000億円を超える研究開発費用が必要と言われている。

しかしながら、医薬品の研究は承認取得の時点で終わるわけではない。承認取得後も実施される医薬品の研究の一つに、市販後の効果や安全性（副作用）を確認するために行われる製造販売後臨床試験がある。これは厚生労働省が定めた Good Clinical Practice (GCP) 及び Good Post Marketing Surveillance Practice (GPMSP) に従って行われ、再審査・再評価の申請添付資料として用いられることから、第IV相試験とも呼ばれている。承認取得を目的に行われる臨床試験では、投与される人数や期間も限られており、また、性別・年齢・併用薬などの条件も限定的であるため、臨床試験では顕在化しなかったリスクを評価・分析する目的で製造販売後臨床試験は実施される。この製造販売後臨床試験は、医薬品をより安全で有効なものに育てていくことから、育薬研究と呼ばれている。製造販売後臨床試験以外の育薬研究には、独占的販売権の期間延長やラインエクステンションを目的とした適応拡大や剤型追加に関わる研究、メカニズム解明などの基礎研究や市販後の臨床研究による他社製品との差別化研究があり、企業が承認薬の売上を極大化・長寿化するためのライフサイクルマネジメント (LCM) の一環として行われている[4]。

適応拡大は承認された適応症に関連した疾患に対して行われてきたが、近年、ドラッグ・リポジショニング（あるいはドラッグ・リプロファイリング）と呼ばれ、既存薬を全く別の疾患に対する治療薬として開発する取り組みが行われている。既存薬は、ヒトでの安全性や体内動態が臨床で確認されているため、他の疾患の治療薬として開発する場合、開発の期間やコストの削減が可能となることから、このような新しい医薬品の創薬のありかたは「エコファーマ」として提唱されている[5]。

シルニジピンは高血圧の治療薬として用いられているジヒドロピリジン系 Ca^{2+} 拮抗薬の一つであり、L型の Ca^{2+} チャネルだけでなくN型の Ca^{2+} チャネルを抑制する長時間作用型 Ca^{2+} 拮抗薬として知られ[6]、交感神経終末のN型の Ca^{2+} チャネルの遮断によりノルエピネフリン分泌を抑制し、交感神経活性を亢進させることなく降圧作用を発揮することが示されている[7,8]。近年、シルニジピンの分子構造（Fig. 2-2）の3D構造解析により、N型 Ca^{2+} チャネルを阻害する可能性が裏づけられている[9]。

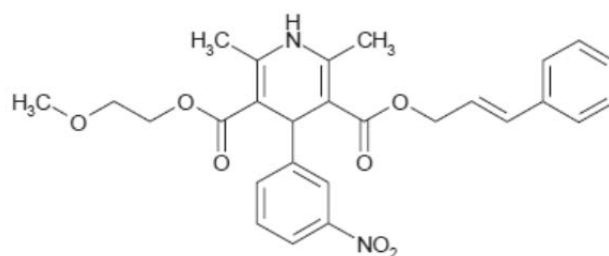


Fig. 2-2. Structure formula of Cilnidipine

また、高血圧患者に対してシルニジピンは、アンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害薬であるベナゼプリルと同等のアルブミン尿抑制作用を示すことが報告されている[10]。腎臓の交感神経は、糸球体の前後に位置する輸入細動脈および輸出細動脈に分

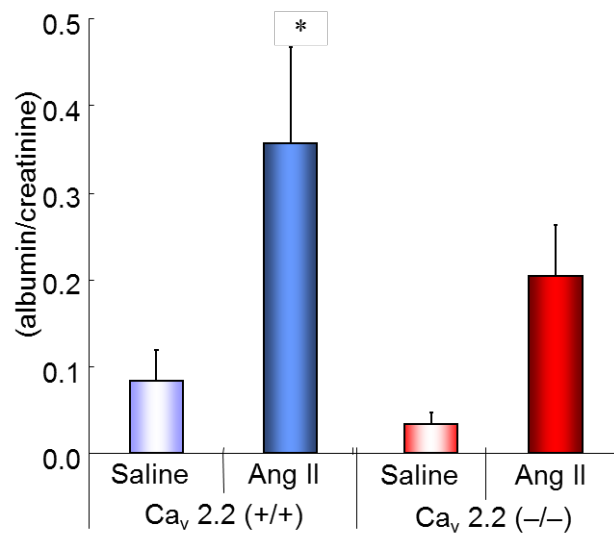


Fig. 2-3. Urinary albumin excretion in Ca_v 2.2 (+/+) mice and Ca_v 2.2 (-/-) mice treated with Saline or Ang II. * P < 0.05 versus Saline group. (2008 年高血圧学会にて報告)

布しており [11], 両細動脈の血管緊張性を制御することにより糸球体内圧を変化させ, 糸球体ろ過量を調節している. シルニジピンは, 高血圧により過剰亢進した糸球体内圧を, 交感神経系に作用することで是正し, 腎保護作用を示す可能性が考えられる. アンジオテンシン (Ang) II を野生型マウスに持続投与すると尿中のアルブミン排泄量は有意に増加するが, N 型 Ca²⁺チャネルのα_{1B}サブユニット (Ca_v 2.2) 欠損マウスに持続投与した場合には, 野生型に比べてアルブミン排泄量が抑制される (Fig. 2-3, 2008 年高血圧学会にて報告). このことは, N 型 Ca²⁺チャネルが, Ang II による腎障害に関与していることを示しているが, シルニジピンが Ang II による腎障害進展を, N 型 Ca²⁺チャネル阻害作用を介することで抑制しているかは不明である.

そこで第 3 章では, 育薬研究としてシルニジピンの臓器障害進展の抑制作用のメカニズムを解明する目的で, Ca_v 2.2 欠損マウスに対して, シルニジピンあるいは L 型 Ca²⁺チャネルのみを阻害するアムロジピンを投与することにより, 検討することとし

た。また、第 4 章では、シルニジピンが高血圧症以外の疾患への適用可能性を探る、すなわち「エコファーマ」（あるいはドラッグ・リポジショニング）を視野に入れた基礎研究を目的として、高血圧症以外の疾患モデル動物での効果やその作用メカニズムの検討を実施した。

2-2. 参考文献

- [1] United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2015). World Population Prospects: The 2015 Revision.
- [2] S. Takahashi, Causes of death and age patterns of mortality in Japan since 1950, *Jinko Mondai Kenkyu* 164 (1982) 19–36.
- [3] 医薬産業政策研究所, 「医薬品と寿命ー上市年数、疾患領域別の分析ー」政策研
ニュース NO.37 (2012年11月)
- [4] 前田英二, 「医療用医薬品マーケティングー実務者が説く理論と実践ー」メデイ
カルレビュー社
- [5] K. Inoue, Relational study of pain: activated microglia and P2X₄ in
neuropathic pain signaling, *Pain Research* 22 (2007) 163–169.
- [6] A. Takahara, Cilnidipine: a new generation Ca²⁺ channel blocker with
inhibitory action on sympathetic neurotransmitter release, *Cardiovasc. Ther.*
27 (2009) 124–139.
- [7] M. Hosono, M. Dozen, T. Hiruma, et al., Changes in heart rate and plasma
norepinephrine level of conscious spontaneously hypertensive rats treated
with cilnidipine (FRC-8653), *Jpn. Pharmacol. Ther.* 23 (1995) 3029–3040.
- [8] M. Tominaga, Y. Ohya, A. Tsukashima, et al., Ambulatory blood pressure
monitoring in patients with essential hypertension treated with a new
calcium antagonist, cilnidipine, *Cardiovasc. Drugs Ther.* 11 (1997) 43–48.
- [9] T. Ogihara, T. Kano, C. Kakinuma, Evaluation of the inhibitory effect of
dihydropyridines on N-type calcium channel by virtual three-dimensional
pharmacophore modeling, *Arzneimittelforschung* 59 (2009) 283–288.
- [10] G. W. Rose, Y. Kanno, H. Ikebukuro, et al., Cilnidipine is as effective as
benazepril for control of blood pressure and proteinuria in hypertensive
patients with benign nephrosclerosis, *Hypertens. Res.* 24 (2001) 377–383.

- [11] J. Chen, J. T. Fleming, Juxtamedullary afferent and efferent arterioles constrict to renal nerve stimulation, *Kidney Int.* 44 (1993) 684–691.

第3章. シルニジピンのN型Ca²⁺チャネル阻害によるアンジオテンシンII誘発性血管内皮障害の抑制

3-1. 序

血管拡張は、内皮由来血管弛緩因子（EDRF）、内皮由来過分極因子（EDHFs）、シクロオキシゲナーゼ代謝物や血管内皮由来収縮因子（EDCFs）などの血管作動性物質の放出による血管緊張の主な調節機構である[1,2]. これら因子の均衡のとれた放出は、高血圧や心不全などの心血管系の病態に応じて変化する. その変化の結果起こる内皮依存性血管拡張の明らかな悪化は、内皮機能不全と呼ばれている. 本態性高血圧患者における内皮機能不全は、強力なEDRFであるNOのバイオアベイラビリティーの低下として認められ、アテローム性動脈硬化や血栓形成の早期発症の主な決定要因でもある[2,3]. したがって、内皮機能不全の改善を対象とした治療方針は、高血圧患者の疾病率と死亡率を減少させる可能性がある.

内皮機能不全において血管系の酸化ストレスが極めて重要な役割を演じており、また、高いプレッシャーによる物理的・化学的ストレスが酸化ストレスの増大を引き起こすという報告は増加している[4]. 血管緊張は、主に、血管平滑筋細胞の電位依存性Ca²⁺チャネル（VDCCs）を介して、Ca²⁺が細胞膜を貫通して流入することに依存している. VDCCsのサブタイプ、いわゆるL型、N型、T型およびP/Q型の各チャネルは血管にあり、L型VDCCs阻害薬は高血圧の治療薬として広く使用されている[5,6]. したがって、L型VDCCs阻害により血圧（BP）を低下させることは、血管の酸化ストレスを減弱させることが期待される. しかしながら、L型VDCCsの阻害は、急速な血管拡張作用により、交感神経系も活性化させることとなる[6,7]. この好ましくない反射的な交感神経系の活性化を減弱する新世代のL型VDCCs阻害薬の開発は試みられているが、L型VDCCs阻害薬による交感神経の反射的活性化の回避は、今のところ達成されていない[7,8]. 一方、N型およびL型VDCCsの両方を阻害するジヒドロピリジン（DHP）誘導体であるシルニジピン[9,10]は、本態性高血圧患者に対

して L 型 VDCCs のみの阻害薬と比べると，より効果的である結果を示している [11,12]. N 型 VDCCs は主に交感神経に分布しており，交感神経終末からのノルアドレナリン放出を調節している [13,14] ことから，N 型 VDCCs 阻害による血行力学的な自律神経系の反射抑制は，シルニジピンの効果的な降圧作用の根底にあると思われる [11,15]. しかしながら，シルニジピンが交感神経系の緊張を阻害することで，酸化ストレス由来の内皮機能不全を抑制するかどうかは不明である. なお近年，N 型 VDCCs の血管での発現や，高血圧ラットにおける遺伝子発現レベルの上昇が報告されている [16].

レニン-アンジオテンシン系 (RAS) の活性化は，本態性高血圧進展の基礎となる主な病態生理学的機序の一つである [17]. アンジオテンシン (Ang) II による Ang II タイプ 1 受容体 (AT₁R) の刺激は，機械的ストレス由来である活性酸素種 (ROS) の生成による部分的な血管の酸化ストレスの増強により，高血圧を引き起こす [18-21]. そこで我々は，N 型 VDCCs の α_{1B} サブユニット (Ca_v 2.2) 欠損マウスを用いて，Ang II により誘発された酸化ストレスによる内皮機能不全に N 型 VDCCs が関与しているかどうかについて検討することとした.

3-2. 実験方法

3-2-1. 試薬類

Materials	Company
Val ⁵ -Ang II	Peptide Institute, Inc.
Paraform aldehyde	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.
10% formalin neutral buffer solution	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.
Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG antibody	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Heparin solution	Mochida Pharmaceutical Co., Ltd.
Mayer's Hematoxylin	Muto Chemical Co., Ltd.
Eosin	Muto Chemical Co., Ltd.
Alexa Fluor 488 anti-rat IgG	Molecular Probes, Inc.
Alexa Fluor 546 anti-mouse IgG	Molecular Probes, Inc.
Dihydroethidium (DHE)	Molecular Probes, Inc.
Amlodipine	Sigma-Aldrich Co. LLC
Cilnidipine	Ajinomoto Pharmaceutical Co., Ltd.
Mouse anti-4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE)	Japan Institute for the Control of Aging (JaICA), Nikken SEIL Co., Ltd.
Anti-8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG) antibody	Japan Institute for the Control of Aging (JaICA), Nikken SEIL Co., Ltd.
Anti-CD68 antibody	AbD Serotec Ltd.

3-2-2. 実験動物と薬物投与

Ca_v 2.2 欠損マウスは、京都大学 森泰生教授により開発されたマウスを用いた [14,22]. また、すべての実験において対照群として、同腹の野生型 (WT) マウスを用いた.

8 週齢のマウスに、シルニジピン (30 mg/kg/day), アムロジピン (10 mg/kg/day) あるいは 100% polyethylene glycol (vehicle) を充填したミニオスモティックポンプ (Alzet) を腹腔内に埋め込み、3 日後に Val⁵-Ang II (1 mg/kg/day) を充填した別のミニオスモティックポンプを埋め込み、Ang II を 4 週間、持続的に投与した。Ang II による BP の上昇は、テールカフ法 (Softron, BP-98A) により確認した。Ca_v 2.2 欠損マウスの遺伝子型決定は、ポリメラーゼ連鎖反応により実施した [14]. すべての動物は、時間制御照明システムのある空調管理された室内で飼育し実験に使用した。動物は国内で規定された指針に従い取り扱い、実験は「九州大学動物実験指針」に基づいた委員会より倫理的承認を得て行った.

3-2-3. マウスの大動脈リングの等尺性張力の測定

マウスを sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) にて麻酔後、下行胸部大動脈を付着した結合組織を剥がしながら注意深く単離し、2 mm 長のリングに切断した[23]. 等尺性張力を記録 (MC6625, Graphtec, Tokyo, Japan) するため、大動脈リングを、片方は固定されもう一方は歪みゲージ変換器に接続された三角形のステンレススチール製のフック (UL10GR, Minebea) の間に取り付けた. 大動脈リングは、37 °C に維持し、95%の酸素と 5%の二酸化炭素で持続的に通気した Krebs Henseleit (KH) 溶液を含む 20 mL のオーガンバスに浸し、1.5 g の静止張力で引っ張り、KH 溶液を随時交換しながら、30 分間以上平衡を保った. 平衡後、大動脈リングを 1.5 g の張力にセットし、10 分間培養した. 内皮機能は、KCl (60 mM) で事前に収縮させた大動脈リングの acetylcholine (ACh) に対する弛緩反応度の測定により決定した.

3-2-4. マウス大動脈における酸化ストレスレベルとマクロファージ浸潤度の測定

大動脈血管を OCT コンパウンド (Leica) で包埋し、凍結切片はマイクロトーム (Cryostat: Leica, CM1100) により作成. OCT 包埋した切片 (厚さ 5 μ m) は、anti-4-HNE (1/500), anti-8-OH-dG (1/500) および anti-CD68 (1/200) 抗体で染色した. 4-HNE 付加体および 8-OH-dG は、Alexa Fluor 546 anti-mouse IgG 抗体 (1/1,000, Molecular Probes) により可視化した. デジタル写真は、共焦点顕微鏡法 (FV10i, Olympus) により 60 倍率で撮影し、血管標本からランダムに 5 区画を選択した評価した. 平均強度は、MetaMorph Software (Molecular Devices) により解析した.

3-2-5. ROS 産生と細胞内 Ca²⁺濃度の測定

細胞内 Ca²⁺濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の測定は、fura-2 により実施した[24]. Bovine aortic endothelial cells (BAECs) の ROS 産生は DHE により測定した[25]. 35-mm ガラス製ディッシュに蒔いた細胞に対し、ATP 処理をする前に 37 °C で 10 分間、DHE

(10 μ M) を加えた。DHE 蛍光変化は、543 nm の励起光で得られた 560 nm の蛍光波長を共焦点顕微鏡により検出した。

3-2-6. 統計解析

結果は平均値 \pm 標準誤差で表し、すべての実験は少なくとも 3 回以上繰り返し行った。統計比較は、両側 Student's t-test あるいは one-way ANOVA による分散分析を行った後、Student-Newman-Keuls test を行い、P 値が 0.05 未満の場合に有意差があると判断した。

3-3. 結果

3-3-1. Ang II 誘発酸化ストレス由来内皮機能不全における N 型 VDCCs の関与

過去の報告において示されているように[22], Ca_v 2.2 欠損マウスの基底心拍数や BP は, WT のそれらとほぼ同等であった (Table 3-1). 慢性的な Ang II 投与は, WT マウスと Ca_v 2.2 欠損マウスの双方に同等な BP の上昇をもたらし, Ang II 由来のシグナル伝達は N 型 VDCCs 欠損による影響を受けないことを示した. 4 週間の Ang II 投与後, WT マウスは胸部大動脈の ACh による内皮依存性血管弛緩能に低下が認められた (Fig. 3-1A). 対照的に Ca_v 2.2 欠損マウスにおいては, この Ang II 由来の内

Table 3-1.

Hemodynamic parameters and organ weights in the WT (Ca_v 2.2 (+/+)) and Ca_v 2.2-deficient (Ca_v 2.2 (-/-)) mice.

	Vehicle (n = 6)	Ang II (n = 4)	Ang II + CIL (n = 5)	Ang II + AML (n = 4)
Ca_v 2.2 (+/+)				
HR (bpm)	581 ± 15	531 ± 22	579 ± 53	740 ± 18 ^{*#}
SBP (mmHg)	105 ± 3	143 ± 7 [*]	106 ± 3 [#]	104 ± 6 [#]
HW/BW (mg/g)	4.3 ± 0.0	5.2 ± 0.1 [*]	4.2 ± 0.1 [#]	5.3 ± 0.2 [*]
KW/BW (mg/g)	5.8 ± 0.1	7.4 ± 0.1 [*]	6.2 ± 0.3 [#]	7.2 ± 0.2 [*]
Ca_v 2.2 (-/-)				
HR (bpm)	623 ± 41	609 ± 50	655 ± 27	669 ± 24
SBP (mmHg)	103 ± 2	137 ± 5 [*]	110 ± 6 [#]	95 ± 10 [#]
HW/BW (mg/g)	3.8 ± 0.1	4.4 ± 0.1 [*]	4.0 ± 0.1	4.1 ± 0.2
KW/BW (mg/g)	5.2 ± 0.1	6.4 ± 0.2 [*]	5.4 ± 0.2	5.7 ± 0.2

Abbreviations : CIL, cilnidipine; AML, amlodipine; HR, heart rate; SBP, systolic blood pressure; HW, heart weight; BW, body weight; KW, kidney weight.

^{*} P < 0.05 versus vehicle group.

[#] P < 0.05 versus Ang II group.

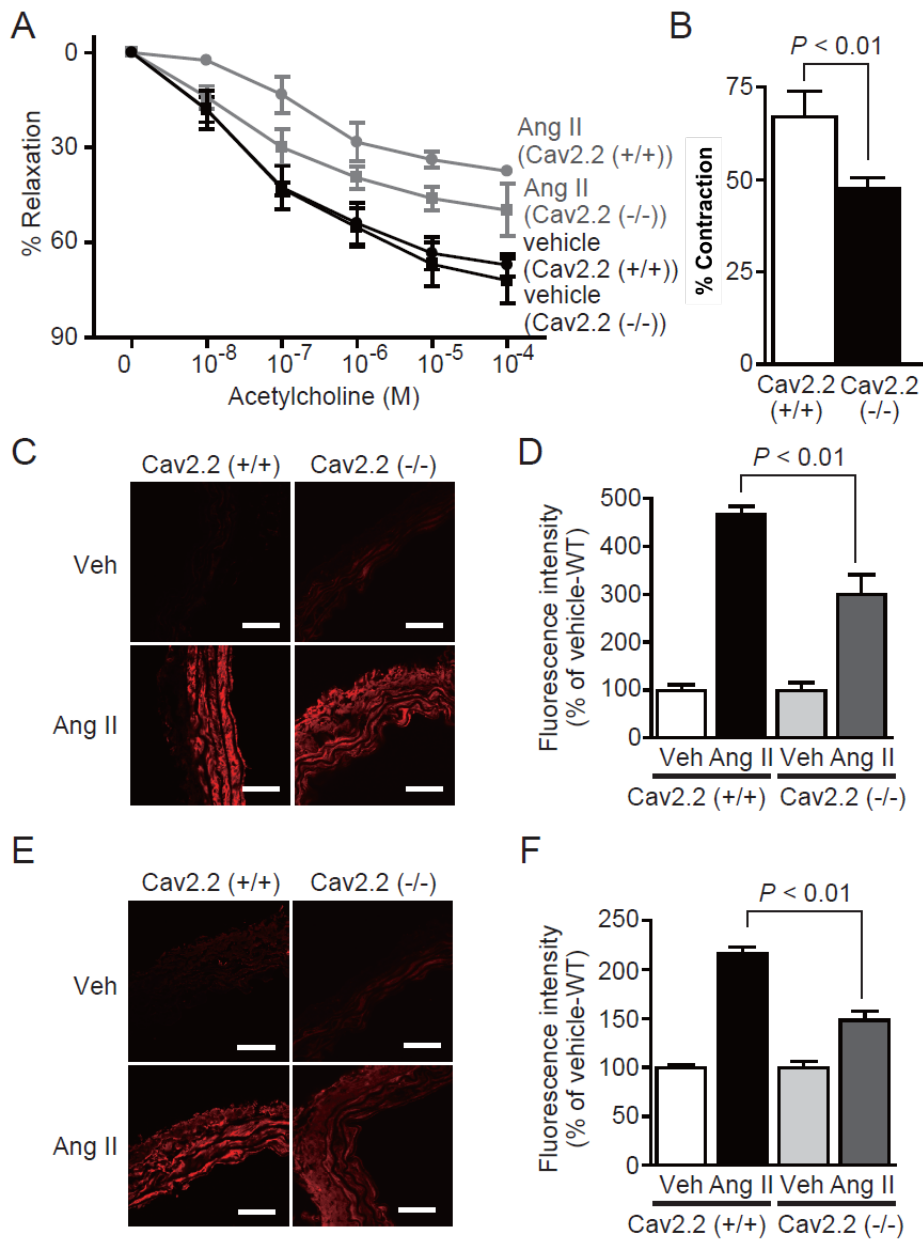


Fig. 3-1. Inhibition of N-type VDCCs attenuates Ang II-induced impairment of endothelium-dependent vascular relaxation produced by ACh in the mouse thoracic aorta. (A) Dose-dependent relaxation induced by ACh in WT ($Ca_v 2.2 (+/+)$) and $Ca_v 2.2$ -deficient ($Ca_v 2.2 (-/-)$) mice with or without Ang II. $n = 6$. (B) Peak relaxation induced by ACh ($10 \mu\text{M}$) in the thoracic aorta of Ang II-infused $Ca_v 2.2 (+/+)$ and $Ca_v 2.2 (-/-)$ mice. (C) Fluorescence images of 8-OH-dG formation in the thoracic aorta. Scale bar = $50 \mu\text{m}$. (D) Average fluorescence intensities of the 8-OH-dG images. (E) Fluorescence images of 4-HNE formation. Scale bar = $50 \mu\text{m}$. (F) Average fluorescence intensities of the 4-HNE images. $n = 3-5$.

皮機能不全は有意に減弱していた (Fig. 3-1A and B). 酸化還元 (redox) ホメオスタシスの喪失による酸化ストレスは, Ang II 誘発内皮機能不全の発生への関与が示唆されている [4, 19]. 慢性的な Ang II 投与は, WT マウスの胸部大動脈における酸化ヌクレオチド (8-OH-dG) や脂肪酸 (4-HNE) の発現増加を示し, 一方, これらの酸化ストレスマーカーの蓄積は $Ca_v 2.2$ 欠損マウスの胸部大動脈においては有意に減少していた (Fig. 3-1C–F). これらの結果は, マウスの胸部大動脈における Ang II による酸化ストレスの増大や内皮機能不全の誘発に, N 型 VDCCs が関与していることを示している.

3-3-2. Ang II 誘発内皮機能不全に対するシルニジピンの強力な阻害作用

次に我々は, マウスにおける Ang II 誘発内皮機能不全に対して, シルニジピンによる L/N 型 VDCCs 阻害が, アムロジピン (DHP 誘導体の一つ) による L 型 VDCCs 阻害と比較して有益な効果を及ぼすかどうか検討した [26]. アムロジピン投与により Ang II 由来の BP 増加は完全に抑制されたが, 優位な反射性頻脈が認められた (Table 3-1). シルニジピン投与では, Ang II 由来の BP 増加は同様に完全に抑制されたが, 反射性頻脈は認められなかった. 一方, WT マウスにおける ACh による Ang II 由来の内皮依存性血管弛緩の障害を, シルニジピンとアムロジピンはいずれも抑制したが, 保護効果の程度はシルニジピンの方が大きかった (Fig. 3-2A). しかしながら, アムロジピンと比較して強力なシルニジピンの保護効果は, $Ca_v 2.2$ 欠損マウスにおいては, 完全に消失した (Fig. 3-2B). また, シルニジピンとアムロジピンはいずれも Ang II による胸部大動脈の 4-HNE / 8-OH-dG やマクロファージ浸潤の累積を優位に抑制したが, 抑制の程度はシルニジピンの方が大きかった (Fig. 3-2C–F). Ang II による酸化ストレスやマクロファージ浸潤の増大に対するシルニジピンの強力な阻害効果は, $Ca_v 2.2$ 欠損マウスにおいて消失した. これらの結果より, シルニジピンは, N 型 VDCCs 阻害を介して, Ang II 由来の内皮機能不全に対して強力な血管保護効果を発揮していることが示された.

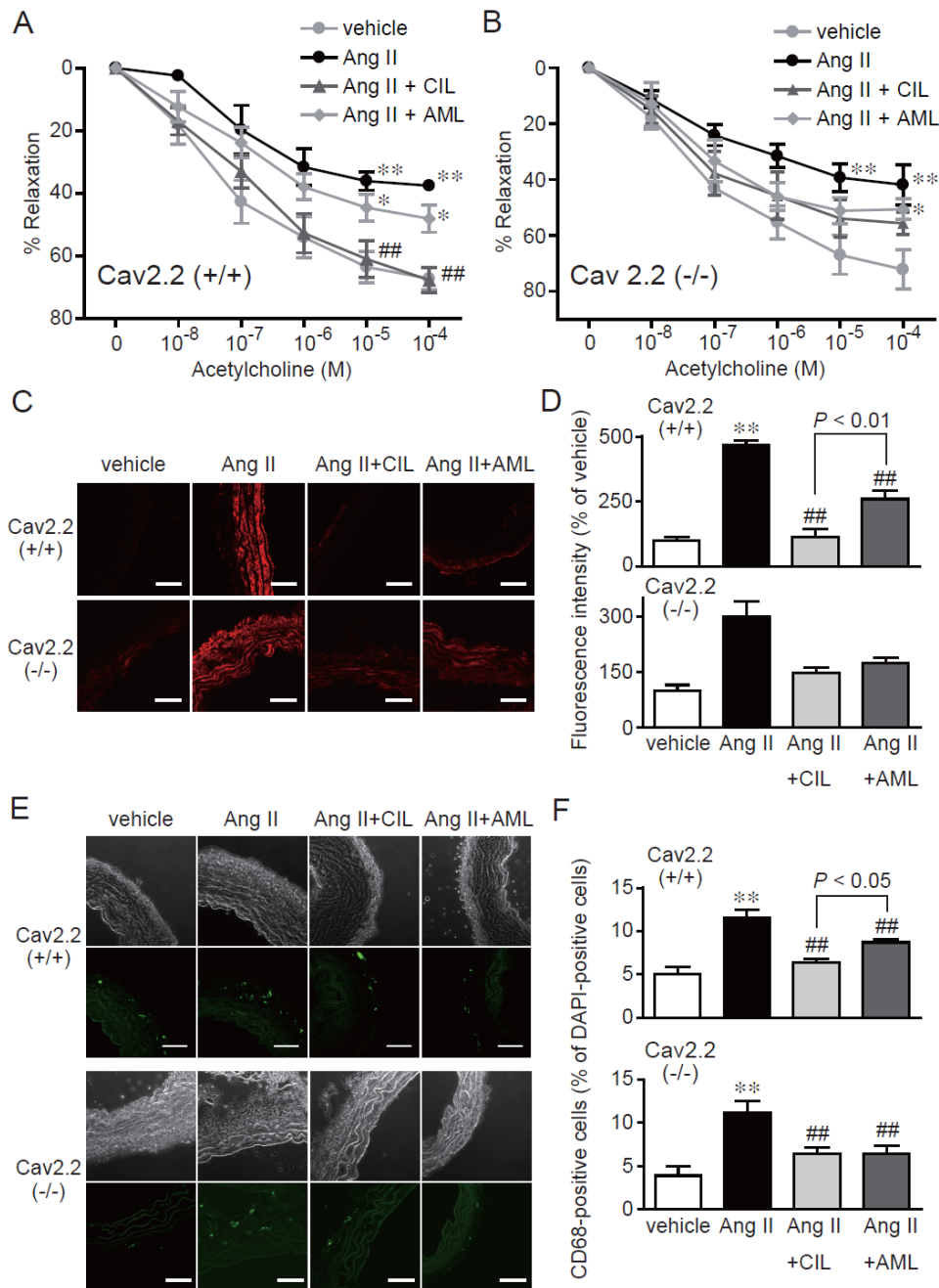


Fig. 3-2. Protection against Ang II-induced impairment of endothelial function by cilnidipine via inhibition of N-type VDCCs. (A, B) Relaxation of the thoracic aorta induced by ACh in Cav 2.2 (+/+) mice (A) and Cav 2.2 (-/-) mice (B) treated or not treated with Ang II. An osmotic pump containing cilnidipine (CIL) or amlodipine (AML) was implanted 3 days before the Ang II infusion. $n = 4-6$. (C) Fluorescence images of 8-OH-dG formation. Scale bar = 50 μ m. (D) Average fluorescence intensities of 8-OH-dG images. (E) DIC and Fluorescence images of macrophage infiltration. Scale bar = 50 μ m. (F) Average proportions of CD68-positive macrophages. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ versus vehicle group, ## $P < 0.01$ versus Ang II group.

3-3-3. 内皮細胞でのアゴニスト誘導性 ROS 産生における N 型 VDCCs の役割

Ang II による AT₁R の刺激は、NADPH オキシダーゼの活性化により血管における ROS 産生を引き起こすことが報告されているが、機械的ストレスを介した機構によっても ROS 産生は誘導される[20, 21]. そこで我々は、N 型 VDCCs が内皮細胞に発現し、Ang II 誘発 ROS 産生に寄与しているかどうか、human vascular endothelial cells (HUVECs) を用いて検討した. anti-Ca_v 2.2 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより、N 型 VDCCs が HUVECs に発現しており、ラットの血管平滑筋細胞には発現していないことを確認した (Fig. 3-3A). 我々はまた、bovine aortic endothelial cells (BAECs) に N 型 VDCCs が膜発現していることを確認した. しかしながら、HUVECs も BAECs も Ang II やノルアドレナリンに対して反応しないことが分かった (Fig. 3-3B). これは、用いた内皮細胞ラインに、AT₁Rs やアドレナリン受容体の発現が乏しいことに起因すると考えている. マウスにおいて細胞外のヌクレオチドが機械的ストレス由来の心線維化を仲介すること[27], また、種々の細胞において細胞外のヌクレオチドが細胞内 Ca²⁺シグナルを活性化する強力な内因性リガンドであること[24], を我々は報告した. そこで、プリン受容体の特異的アゴニストである ATP を作用させたところ、BAECs において細胞内 Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i) 上昇と同時に、ROS 産生の顕著な増加が認められた (Fig. 3-3B-E). N 型 VDCCs は、ω-conotoxin (ωCTx) -GVIA により選択的に阻害される高閾値活性型 Ca²⁺チャンネルであり、ωCTx-GVIA は、魚食性のイモ貝 (学名: *Conus geographus*) の毒から単離された 27 残基のアミノ酸からなるペプチドである[28]. ωCTx-GVIA を作用させると、ATP 由来の ROS 産生や[Ca²⁺]_iの持続的な上昇は抑制された. BAECs に KCl (10 mM) を作用させると、ωCTx で抑制した場合でも、DHE 蛍光強度の中等度の増強が認められた (データ未掲載). これらの結果より、N 型 VDCCs は血管内皮細胞において、[Ca²⁺]_iの持続的な上昇により ROS 産生に寄与していることが強く示唆された.

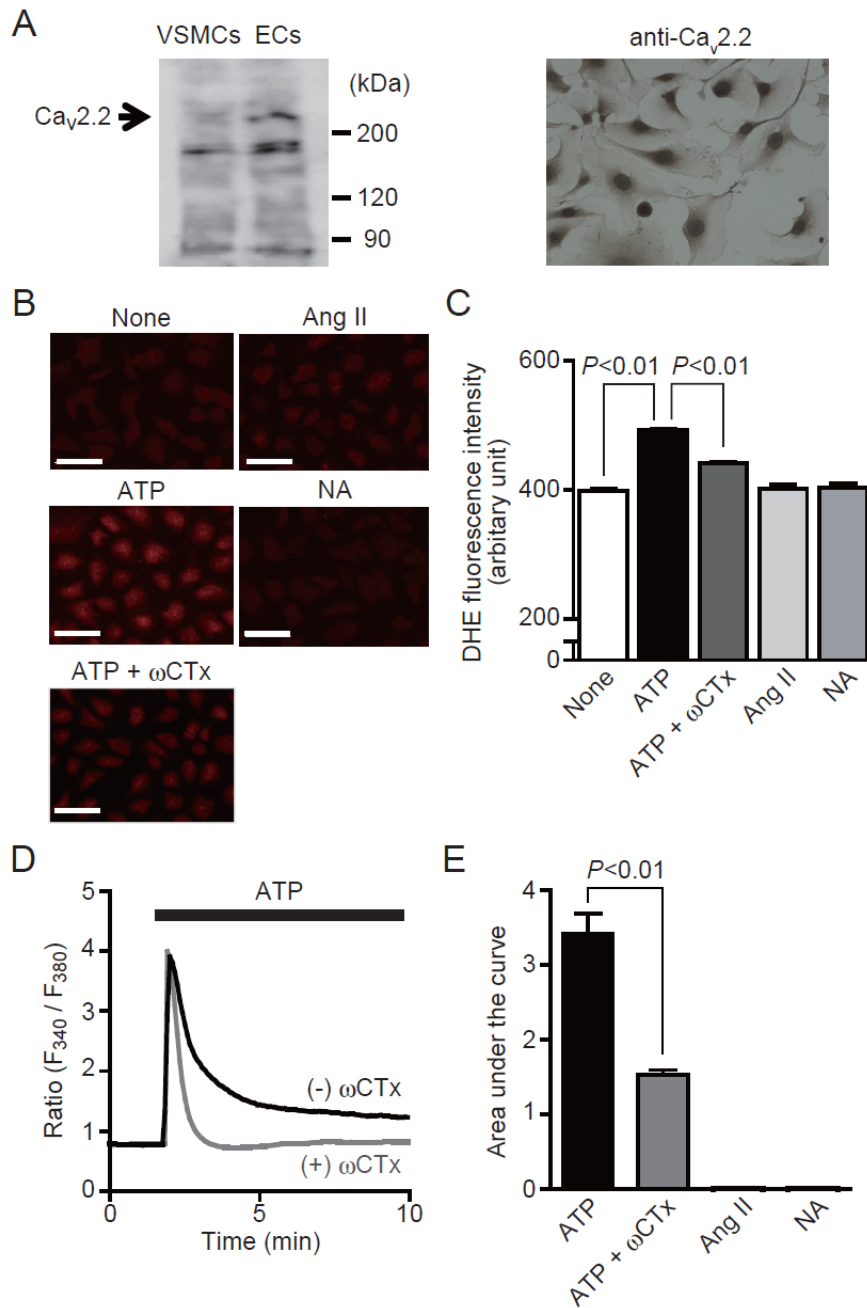


Fig. 3-3. N-type VDCCs participate in ATP-induced ROS production in endothelial cells (ECs). (A) Left, expression of Ca_v 2.2 proteins in human ECs and rat vascular smooth muscle cells (VSMCs). Right, localization of Ca_v 2.2 proteins in bovine aortic ECs (BAECs). (B) Effects of ω-conotoxin (ωCTx) on the increase in the DHE fluorescence intensity by ATP (100 μM), Ang II (1 μM) and noradrenaline (NA, 100 μM) treatment for 1 h in BAECs. Cells were pretreated with ωCTx (100 ng/mL) 30 min prior to ATP stimulation. (C) Average increases in DHE fluorescence intensities. (D) Time-courses of ATP-induced Ca²⁺ responses in BAECs treated with or without ωCTx pretreatment. (E) Cumulative increases in the [Ca²⁺]_i induced by ATP, Ang II and NA.

3-4. 考察

酸化ストレスに対する N 型 VDCCs の関与は、腎臓において既に報告がある[29,30]。また、シルニジピンは、RAS や腎臓の線維化および炎症の抑制を伴う N 型 VDCC 阻害を介して腎保護効果を示すことが報告されている[29,31]。実際に、神経終末の N 型 VDCCs は、輸入・輸出細動脈の収縮や糸球体毛細血管の圧力上昇を引き起こす神経伝達物質の放出を制御することが知られている[32]。WT マウスにおいて認められた Ang II 投与による心拍数の僅かな減少は、Cav 2.2 欠損マウスにおいては消失した (Table 3-1)。覚醒下にある犬に対する Ang II の持続投与は、腎臓におけるノルアドレナリンの過剰放出を減弱させると報告されている[33]。つまり、高血圧という悪影響に反して、N 型 VDCCs 阻害は腎保護効果を示すことを我々のデータは裏付けている。Ang II による血圧の上昇は、N 型 VDCCs 阻害では変化しないことから、N 型 VDCCs 阻害は Ang II による血圧上昇には関与していないと考えられる。

内皮細胞における N 型 VDCCs は、大動脈の内皮細胞ラインにおける $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を引き起こすだけでなく、細胞外のヌクレオチド (ATP) 誘導性の ROS 産生にも関与していることを明らかにした。プリン作動性 P2X 受容体の刺激は、VDCCs を通じた持続的な Ca^{2+} の流入につながる陽イオン流入による膜の脱分極を引き起こすことが知られている[34]。持続的な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は、心臓細胞におけるアゴニスト誘導性 ROS 産生に必須であることを我々は報告した[25]。ωCTx-GVIA が ATP 由来の ROS 産生を一部抑制することから (Fig 3-3)、N 型 VDCCs は内皮細胞におけるアゴニスト誘導性 ROS 産生の中心的な役割を担っていると考えられる。神経終末の N 型 VDCCs ではなく、内皮細胞の N 型 VDCCs が、ROS 産生に直接関与し、高血圧マウスにおける酸化ストレス由来の内皮機能不全を引き起こしていると、当初は考えていた。DHP 誘導体は脂溶性の連鎖停止型酸化防止剤として働くことが知られており[35]、また、シルニジピンが強力な抗酸化作用を示すことが報告されている[30]。The Cilnidipine versus Amlodipine Randomized Trial for Evaluation in Renal Disease (CARTER) Study では、RAS 阻害薬による治療下の高血圧患者において、シルニ

ジピンはアムロジピンに比べタンパク尿の進展を抑制したと報告している[26]。同じ研究グループは、培養ヒトメサングウム細胞においてイオノマイシン刺激によるスーパーオキシド産生に対して、シルニジピンはアムロジピンよりも優位に高い抗酸化作用を示したと報告している[30]。また、シルニジピンは Dahl 食塩感受性高血圧ラットにおいて、NADPH オキシダーゼの活性を阻害することにより、心臓リモデリングや拡張機能障害を抑制することが報告されている[36]。N 型 VDCCs を経由した ROS 産生の根底にある機構については未検討であるが、N 型 VDCCs を介した Ca^{2+} 流入が、内皮細胞における NADPH オキシダーゼを経由した ROS 産生に関与していることを、これらの報告は示唆している。

結論として、Ang II 投与による高血圧マウスにおいて、内皮細胞に発現している N 型 VDCCs はアゴニスト誘発性 ROS 産生や酸化ストレス由来の内皮機能不全に関与していることを実証することができた。また、高血圧により引き起こされる心疾患の進展に関わる機構解明に、新しい知見を提供することができた。これらの知見が、高血圧患者の疾病率と死亡率の減少につながる新しい治療戦略の開発につながることで期待される。

3-5. 参考文献

- [1] P. M. Vanhoutte, Endothelium and control of vascular function. State of the art lecture, *Hypertension* 13 (1989) 658–667.
- [2] S. Taddei, L. Ghiadoni, A. Virdis, et al., Mechanisms of endothelial dysfunction: clinical significance and preventive non-pharmacological therapeutic strategies, *Curr. Pharm. Des.* 9 (2003) 2385–2402.
- [3] H. Brunner, J. R. Cockcroft, J. Deanfield, et al., Endothelial function and dysfunction. Part II: association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the working group on endothelins and endothelial factors of the European society of hypertension, *J. Hypertens.* 23 (2005) 233–246.
- [4] C. Sunggip, N. Kitajima, M. Nishida, Redox control of cardiovascular homeostasis by angiotensin II, *Curr. Pharm. Des.* 19 (2013) 3022–3032.
- [5] E. A. Ertel, K. P. Campbell, M. M. Harpold, et al., Nomenclature of voltage-gated calcium channels, *Neuron* 25 (2000) 533–535.
- [6] F. H. Leenen, Clinical relevance of 24h blood pressure control by 1,4-dihydropyridines, *Am. J. Hypertens.* 9 (1996) 97S–104S.
- [7] A. Takahara, Cilnidipine: a new generation Ca^{2+} channel blocker with inhibitory action on sympathetic neurotransmitter release, *Cardiovasc. Ther.* 27 (2009) 124–139.
- [8] M. Lindqvist, T. Kahan, A. Melcher, et al., Long-term calcium antagonist treatment of human hypertension with mibefradil or amlodipine increases sympathetic nerve activity, *J. Hypertens.* 25 (2007) 169–175.
- [9] H. Uneyama, A. Takahara, H. Dohmoto, et al., Blockade of N-type Ca^{2+} current by cilnidipine (FRC-8653) in acutely dissociated rat sympathetic neuron, *Br. J. Pharmacol.* 122 (1997) 37–42.

- [10] S. Fujii, K. Kameyama, M. Hosono, et al., Effect of cilnidipine, a novel dihydropyridine Ca²⁺ channel antagonist, on N-type Ca²⁺ channel in rat dorsal root ganglion neurons, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 280 (1997) 1184–1191.
- [11] S. Morimoto, Y. Yano, K. Maki, et al., Renal and vascular protective effects of cilnidipine in patients with essential hypertension, *J. Hypertens.* 25 (2007) 2178–2183.
- [12] H. Toba, M. Yoshida, C. Tojo, et al., L/N-type calcium channel blocker cilnidipine ameliorates proteinuria and inhibits the renin-angiotensin-aldosterone system in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats, *Hypertens. Res.* 34 (2011) 521–529.
- [13] L. D. Hirning, A. P. Fox, E. W. McCleskey, et al., Dominant role of N-type Ca²⁺ channels in evoked release of noradrenaline from sympathetic neurons, *Science* 239 (1988) 57–61.
- [14] M. Ino, T. Yoshinaga, M. Wakamori, et al., Functional disorders of the sympathetic nervous system in mice lacking the α_{1B} subunit (Ca_v 2.2) of N-type calcium channels, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 5323–5328.
- [15] T. Takami, M. Shigemasa, Efficacy of various antihypertensive agents as evaluated by indices of vascular stiffness in elderly hypertensive patients, *Hypertens. Res.* 26 (2003) 609–614.
- [16] S. Takai, D. Jin, S. Aritomi, et al., Powerful vascular protection by combining cilnidipine with valsartan in stroke-prone, spontaneously hypertensive rats, *Hypertens. Res.* 36 (2013) 342–348.
- [17] M. J. Ryan, S. P. Didion, S. Mathur, et al., Angiotensin II-induced vascular dysfunction is mediated by the AT1A receptor in mice, *Hypertension* 43 (2004) 1074–1079.

- [18] K. K. Griendling, C. A. Minieri, J. D. Ollerenshaw, et al., Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells, *Circ. Res.* 74 (1994) 1141–1148.
- [19] S. Rajagopalan, S. Kurz, T. Munzel, et al., Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NAD(P)H oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone, *J. Clin. Invest.* 97 (1996) 1916–1923.
- [20] Z. Unqvari, M. S. Wolin, A. Csiszar, Mechanosensitive production of reactive oxygen species in endothelial and smooth muscle cells: role in microvascular remodeling?, *Antioxid Redox Signal.* 8 (2006) 1121–1129.
- [21] K. Grote, I. Flach, M. Luchtefeld, et al., Mechanical stretch enhances mRNA expression and proenzyme release of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) via NADPH oxidase-derived reactive oxygen species, *Circ. Res.* 92 (2003) e80–e86.
- [22] Y. Mori, M. Nishida, S. Shimizu, et al., Ca²⁺ channel α 1B subunit (Ca_v 2.2) knockout mouse reveals a predominant role of N-type channels in the sympathetic regulation of the circulatory system, *Trends Cardiovasc. Med.* 12 (2002) 270–275.
- [23] K. Nishioka, M. Nishida, M. Ariyoshi, et al., Protein kinase A-mediated phosphorylation of TRPC6 channels underlies suppression of angiotensin II-induced vasoconstriction, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31 (2011) 2278–2286.
- [24] M. Nishida, M. Ogushi, R. Suda, et al., Heterologous down-regulation of angiotensin type1 receptors by purinergic P2Y₂ receptor stimulation through S-nitrosylation of NF- κ B, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108 (2011) 6662–6627.
- [25] N. Kitajima, K. Watanabe, S. Morimoto, et al., TRPC3-mediated Ca²⁺ influx

- contributes to Rac1-mediated production of reactive oxygen species in MLP-deficient mouse hearts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 409 (2011) 108–113.
- [26] T. Fujita, K. Ando, H. Nishimura, et al., Antiproteinuric effect of the calcium channel blocker cilnidipine added to renin-angiotensin inhibition in hypertensive patients with chronic renal disease, *Kidney Int.* 72 (2007) 1543–1549.
- [27] M. Nishida, Y. Sato, A. Uemura, et al., P2Y₆ receptor-Gα_{12/13} signaling in cardiomyocytes triggers pressure overload-induced cardiac fibrosis, *EMBO J.* 27 (2008) 3104–3115.
- [28] B. M. Olivera, W. R. Gray, R. Zeikus, et al., Peptide neurotoxins from fish-hunting cone snails, *Science* 230 (1985) 1338–1343.
- [29] T. Soeki, M. Kitani, K. Kusunose, et al., Renoprotective and antioxidant effects of cilnidipine in hypertensive patients, *Hypertens. Res.* 35 (2012) 1058–1062.
- [30] K. Hishikawa, O. Takase, M. Idei, et al., Comparison of antioxidant activity of cilnidipine and amlodipine, *Kidney Int.* 76 (2009) 230–231.
- [31] S. Aritomi, K. Niinuma, T. Ogawa, et al., Additive effects of cilnidipine and angiotensin II receptor blocker in preventing the progression of diabetic nephropathy in diabetic spontaneously hypertensive rats, *Clin. Exp. Nephrol.* 17 (2013) 41–50.
- [32] K. Hayashi, S. Wakino, N. Sugano, et al., Ca²⁺ channel subtypes and pharmacology in the kidney, *Circ. Res.* 100 (2007) 342–353.
- [33] R.G. Carroll, T. E. Lohmeier, A. J. Brown, Chronic angiotensin II infusion decreases renal norepinephrine overflow in conscious dogs, *Hypertension* 6 (1984) 675–681.

- [34] M. Bräter, S. N. Li, I. J. Gorodezkaya, et al., Voltage-sensitive Ca^{2+} channels, intracellular Ca^{2+} stores and Ca^{2+} -release-activated Ca^{2+} channels contribute to the ATP-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase in differentiated neuroblastoma x glioma NG 108-15 cells, *Neurosci. Lett.* 264 (1999) 97–100.
- [35] I. T. Mak, W. B. Weglicki, Comparative antioxidant activities of propranolol, nifedipine, verapamil, and diltiazem against sarcolemmal membrane lipid peroxidation, *Circ. Res.* 66 (1990) 1449–1452.
- [36] M. Takatsu, T. Hattori, T. Murase, et al., Comparison of the effects of cilnidipine and amlodipine on cardiac remodeling and diastolic dysfunction in Dahl salt-sensitive rats, *J. Hypertens.* 30 (2012) 1845–1855.

第4章. シルニジピンのミトコンドリア GTP 結合タンパク質 Drp1 活性化阻害による心不全改善効果

4-1. 序

心疾患は癌につぐ死亡率の高い危険な病気であり、その画期的な予防・治療法の開発が望まれている。これまで冠動脈の閉塞により生じる心筋梗塞（MI）が心疾患の最も高い死因だとされてきたが、近年のコホート解析から、心筋梗塞よりもむしろ慢性心不全のほうが死亡率の高い病気であることが明らかになり、その原因が注目されている。高血圧や圧負荷、虚血、高血糖などのストレスが慢性心不全を誘発するリスク要因となることが指摘されており、特に高血圧に有効な β アドレナリン受容体遮断薬、アンジオテンシン受容体拮抗薬、アンジオテンシン変換酵素阻害薬、抗アルドステロン拮抗薬などが慢性心不全の治療に用いられている。一方、高血圧治療薬の中でも Ca^{2+} 拮抗薬は心臓の電位依存性L型 Ca^{2+} チャネル活性を抑制するため、心不全治療の第一選択薬として使われることはまずない。また、高血糖も心不全を悪化させる主な原因の一つであるものの、糖尿病治療薬の多くは浮腫を起こすことがあるため、心不全の予後をかえって悪くする危険性が指摘されている。このような背景から、心不全の原因となる複数のリスク因子を一つでも多く軽減し、かつ心臓への負担がほとんどない安全性の確立された薬を探し出すことが出来れば、実に画期的な慢性心不全治療薬になりうると期待される。

慢性心不全は生活習慣病（高血圧・脂質異常症・糖尿病・肥満）に起因する部分が大きく、過去50年間の治療ストラテジーの変遷を見返しても、心不全を心筋のポンプ機能不全と考えるよりむしろ、交感神経系やレニン-アンジオテンシン系の過活動による内分泌機能異常が原因と考えられるようになってきている。すなわち、心筋だけでなく、様々な組織の細胞に共通する普遍的な恒常性維持に働くメカニズムを解明し、これを基盤とする創薬ストラテジーを提案することが重要だと考えられる。そこで私は、細胞のエネルギー産生を司る細胞内小器官ミトコンドリアに着目した。ミ

トコンドリアは、分裂と融合を繰り返すことにより、その形態を環境にあわせて変化させることが可能な、動的な細胞小器官であり、大きく2つ（細長く相互接続した管状のものと、断片的でバラバラの粒状のもの）に分類できる。この2つの相反するプロセスの微妙なバランスは、ミトコンドリアの大きさ、分布、均一性、遺伝的形質の維持に重要であることが明らかにされている。増殖性の細胞においては、細胞増殖に伴ってミトコンドリア新生が起これ、これが融合することで管状のミトコンドリアが形成される。しかし、常にポンプ機能を維持し続けなければならない非増殖性の心筋細胞では、ミトコンドリア新生にエネルギーを費やすことが難しく、成熟した管状のミトコンドリアが分裂と融合を繰り返すことで自身のオルガネラ恒常性を維持している。実際、ミトコンドリア形態を制御するタンパク質の異常により生じる分裂・融合バランス（ミトコンドリアダイナミクス）の破綻が、アルツハイマー、ハンチントン病、パーキンソン病などの神経変性疾患や心血管疾患、骨格筋疾患を引き起こす原因となることが、マウスレベルで明らかにされている[1]。

ミトコンドリアの分裂は、細胞質・ミトコンドリア外膜に存在するダイナミン様のGTP結合型タンパク質 **dynamamin-related protein 1 (Drp1)** とその結合相手（受容体）である **Mff** との結合により制御されている[2]。一方、ミトコンドリアの融合は **OPA1** や **Mfn1/Mfn2** といった別のGTP結合タンパク質によって制御されている[3,4]。Drp1は約80kDaのタンパク質であり、N末端側に分裂に必要なGTPase活性ドメインが、C末端側にエフェクタードメインが存在する。Drp1はプロテインキナーゼA (PKA) やカルモジュリンキナーゼ (CaMKII)、グリコーゲン合成酵素キナーゼ 3β (GSK3β) により **Ser616** と **Ser656** がリン酸化されることで活性化される。その一方で、Drp1の **Ser637** がリン酸化されることで活性が負に調節されることも報告されており、この抑制はプロテインフォスファターゼ 2A (カルシニューリン) により脱リン酸化されることで解除されることがわかっている。さらに、高血糖状態においては、Drp1の **Thr585/586** にアセチルグルコサミン (GlcNAc) が1分子結合した **O-GlcNAc** (O-結合型 アセチルグルコサミン) とよばれる糖が結合 (O-GluNAc 修飾) することで

Ser637 のリン酸化を抑制し、Drp1 を活性化することも報告されている[5]。Drp1 は一酸化窒素などの活性酸素／窒素種によっても活性化されることが知られており、この機序として C 端の Cys644 の S-ニトロソ化修飾が関与する可能性が報告されている[6]。このように、Drp1 は様々な細胞内環境変化をいち早く感知し、ミトコンドリア形態を分裂側にシフトさせるセンサータンパク質として機能することが明らかになってきている。実際、Drp1 変異体マウスが心不全を呈することが示され[7]、ミトコンドリア分裂の阻害が虚血性心疾患を改善することもマウスレベルで明らかにされている[8]。

心筋梗塞後の非梗塞領域で起こる心筋細胞の早期老化は、慢性心不全の主要因として考えられている[9]。西田らは以前、8-ニトロ-cGMP などの内因性の親電子物質の生成が、心筋梗塞 4 週間後における H-Ras の S-グアニル化修飾および活性化の上昇、および心筋細胞老化を仲介することを報告した[10]。しかし、何が引き金となって心筋細胞が 8-ニトロ-cGMP を形成するかについては良くわかっていなかった。そこで本研究では、心筋細胞の早期老化の前段階において、ミトコンドリア分裂が起こるかどうかについて検討した。また、心筋梗塞後の心筋ミトコンドリアの分裂誘導が心機能に与える影響について検証すると共に、シルニジピンを含む既承認薬の中からミトコンドリア分裂を阻害する新たな薬を同定し、その薬が心不全を改善させるかどうか検討を行った。

4-2. 方法

4-2-1. 試薬類

Materials	Company
w-conotoxin	Peptide Institute, Inc.
Amlodipine	Tokyo Chemical Industry Co. Ltd.
Mdivi-1	Sigma-Aldrich Co. LLC
Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.
diltiazem	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.
nifedipine	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.
verapamil	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.
Collagenase II	Worthington Biochemical Corp.
Bovine serum albumin (BSA)	Nacalai Tesque, Inc.
Anti-Drp1	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Anti-GAPDH	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Anti-MnSOD	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Anti-Mfn1	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Horseshoe peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG antibody	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Horseshoe peroxidase-conjugated anti-mouse IgG antibody	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Anti-phospho-Drp1 (Ser637)	Cell Signaling technology, Inc.
Anti-taffazin	Abcam plc
anti-Mfn2	Abcam plc
Anti-HO-1	Enzo Life Sciences, Inc.
Anti-HIF1 α	Novus Biologicals, LLC
Ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA)	Dojindo Molecular Technologies, Inc.
4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)	Dojindo Molecular Technologies, Inc.
2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCF-DA)	Molecular Probes, Inc
Cilnidipine	Ajinomoto Pharmaceutical Co., Ltd.

4-2-2. 実験動物

マウスを用いたすべての実験は、「自然科学研究機構指針」に基づいた承認を得て行った。C57BL/6J マウスは、Japan SLC, Inc.より購入した。Ca_v 2.2 欠損マウスは、京都大学 森泰生教授により開発されたマウスを用いた[11,12]。また、すべての実験において対照群として、同腹の野生型 (WT) マウスを用いた。マウスは、12 時間明暗周期の specific pathogen free (SPF) 室内で飼育し実験に使用した。

4-2-3. マウス心筋梗塞モデルの作成と薬物投与

心筋梗塞施術は、既報を参考に[10]、6 週齢のオスの C57BL/6J マウス、WT マウス、Ca_v 2.2 欠損マウスに対して実施。すべての外科的処置は、ドミトール (0.75 mg/kg, Nihon Zenyaku Kogyo), ミダゾラム (4 mg/kg, Sandoz), ベトルファール (5 mg/kg,

Meiji Seika Pharm, Japan) の三種混合麻酔薬でマウスを麻酔後に実施した。6 週齢のオスの C57BL/6J マウスに心筋梗塞施術を実施した 1 日後に, saline (vehicle), シルニジピン (30 mg/kg/day or 100 mg/kg/day) を充填したミニオスモティックポンプ (Alzet) を腹腔内に埋め込み持続的に投与した。

4-2-4. 経胸壁心エコー検査と心臓カテーテル

エコー検査と心臓カテーテルは, ドミツール, ミダゾラム, ベトルフェールの三種混合麻酔薬でマウスを麻酔後に実施した。エコー検査は, 心筋梗塞施術を実施した 4 週間後に, Nemio-XG echocardiography (TOSHIBA) を用いて, 14 MHz のトランスデューサーにて実施した。心機能は, 心筋梗塞施術を実施した 4 週間後に, micronanometer カテーテル (Millar 1.4F, SPR 671, Millar Instruments) を用いて測定した。

4-2-5. 形態学的分析

マウスの心臓は, 摘出後に PBS で血液を洗浄し, 10%中性緩衝ホルマリンにより固定した。心筋細胞のコラーゲンの定量的評価には, ホルマリン固定した心臓をパラフィンにより包埋した後, 3 μm の厚さに薄切し, ピクリン酸飽和溶液を用いて調製した 0.1% Direct Red 80 溶液に浸漬させた標本を用いた。心筋細胞の横断総面積 (CSA) の評価には, ヘマトキシリンとエオジン (H&E) 染色した標本を用いた。各左室部位の標本より 3 部位をランダムに選択し, 顕微鏡 BZ-II Analyzer (Keyence) により観察した。コラーゲン含量の比率は, 染色されて染まった面積を心臓横断総面積で除したものを百分率で表示したものととして算出した。

4-2-6. ラット新生児心筋細胞 (NRCM) 培養

まず, 哺乳一日目の SD ラットの胎児を冷温麻酔後, 心臓を取り出し, 0.05%トリプシン-EDTA にて 4°C で 16 時間インキュベートした。その後, トリプシンを除去し,

1 mg/mL となるように PBS (リン酸生理食塩水) にて希釈したコラゲナーゼ II 溶液にて 37°C で 15 分間インキュベートした。残渣はさらにコラゲナーゼ II にて 37°C で 15 分間インキュベートした後, 70mm nyloncell strainer (BD-Falcon Biosciences 社製) を通過させた後, 遠心分離 (1,000 rpm, 2 分間) してコラゲナーゼを除去した。得られた細胞は, FBS (ウシ胎児血清) 含有 DMEM (10 容量% FBS, 100 unit/mL ペニシリン, および 100 µg/mL ストレプトマイシンを含有する DMEM) に懸濁した後, non-coat ディッシュに播種し, 5 容量%二酸化炭素 (95 容量%空気), 加湿雰囲気下で 37°C, 1 時間培養した。次いで, ディッシュに接着しなかった細胞を NRCM 細胞として回収し, ゼラチンコートしたディッシュ又はプレートに播種した。播種した NRCM 細胞を, 5 容量%二酸化炭素 (95 容量%空気), 加湿雰囲気下で 37°C, 24 時間培養した後, タウリン含有 DMEM (5mM タウリン, 100 unit/mL ペニシリン, 及び 100 µg/mL ストレプトマイシンを含有する DMEM) に培地交換して 48 時間培養したものを, 各実験に用いた。

4-2-7. ウェスタンブロッティング

マウスの心筋を, Physcotron (MICROTEC) を用いて, プロテアーゼ阻害剤カクテルを含む lysis buffer (20 mM Hepes(pH7.4), 100 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 1% NP-40, 50 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄ and 20 mM β-glycerophosphate) 中, 4°C でホモジナイズした。透明な溶解産物は, サンプルバッファーと混合した。タンパク質は, SDS-PAGE により分離した後, 1 時間, 2 mA/cm² で PVDF 膜に電氣的に転写した。Drp1 のリン酸化状態は, 6% Phos-tag-SDS-PAGE (Funakoshi, Japan) により解析した。1% BSA 溶液にて 1 時間ブロッキングした後, 膜に結合したタンパク質は一次抗体でインキュベートした。次いで二次抗体として, 抗西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 抗体でインキュベートした後, ECL システム (Nacalai Tesque) を用いて, Drp1 及び GAPDH のバンドを検出した。

4-2-8. GTP-pulldown アッセイ

GTP-agarose pulldown アッセイは、Gawlowli らの方法[13]に従い実施した。組織サンプルは、氷冷した GTP-binding buffer (50 mM HEPES (pH 7.4), 1% Triton X-100, 10% glycerol, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA and 1% protease inhibitor cocktail) 中でホモジナイズした。ラット新生児心筋細胞は、氷冷した PBS で洗浄, GTP-binding buffer で回収し, 15 秒間 (QSonica, WAKEN B TECH) 超音波処理しながらホモジナイズした後, 遠心分離処理 (9,000 x g, 30 分間, 4°C) し, 上清を回収した。上清 (100 µg) は, 20 µL の GTP-agarose beads (GTP-binding buffer にて平衡化済み) と混合し, 1 時間室温でローテーターにてインキュベートした。インキュベート後のビーズは, 遠心分離処理 (10,000 x g, 3 分間, 4°C) により回収した後, GTP-binding buffer にて 2 回洗浄した。GTP-bound タンパク質は, 2-メルカプトエタノールを含む 2x Laemmli buffer で希釈し, SDS-PAGE により分離した。

4-2-9. 細胞内 ATP 量の測定

細胞内 ATP 量は, Luciferase assay (Wako Pure Chemical Industries, Ltd) を用いて測定した。96 ウェルプレートに播種したラット新生児心筋細胞を, 低酸素刺激した後, 又は低酸素刺激後に再酸素化した後, PBS で 1 回洗浄した。対照として, 無刺激のラット新生児心筋細胞も, PBS で 1 回洗浄した。また, 培養培地に DMSO に溶解させた Mdivi-1 (Sigma 社製) を最終濃度が 10 µM となるように添加した以外は同様にして, 無刺激のラット新生児心筋細胞, 低酸素刺激したラット新生児心筋細胞, および低酸素刺激後に再酸素化したラット新生児心筋細胞も調製した。

次いで, 培地を除去してフレッシュな DMEM (100 µL) に交換した後, ただちに Luciferase reagent を 20 µL 添加し, 10 分間室温でインキュベートした。インキュベート後の細胞の発光を, SpectraMax i3 (Molecular devices 社製) で測定し, 発光強度からウェルあたりの ATP 濃度を求めた。発光強度からの ATP 濃度の算出には, ATP を最終濃度 0, 0.01, 0.1, 1, または 10 µM となるように含有する DMEM の発

光強度を同様にして求め、得られた発光強度と ATP 濃度の関係から求めた検量線を用いた。ウェルあたりの ATP 消費量は、細胞に 10 μ M の carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazine (CCCP) を添加して 5 分間室温でインキュベートすることにより、ミトコンドリアからの ATP 合成を阻害する処理を行った後、Luciferase assay に供し、細胞内の残存 ATP 量を測定した。

4-2-10. ミトコンドリア膜電位の測定

ミトコンドリアの膜電位の測定は、5', 6, 6'-tetrachloro-1, 1', 3, 3'-tetraethylbenzimidazolyl carbocyanine iodide (JC-1) により分析した。ラット新生児心筋細胞は、JC-1 (2.5 μ g/mL) で 10 分間、インキュベートした。媒体を Phenol-red free DMEM に交換した後、励起光 488 nm で 529 nm の蛍光波長、および励起光 488 nm で 590 nm の蛍光波長を SpectraMax i3 (Molecular devices, Sunnyvale, CA) にて測定した。ミトコンドリアの膜電位は、蛍光波長 529 nm と 590 nm の強度比として表した。

4-2-11. ミトコンドリアの形態

ミトコンドリアの形態は、各細胞のミトコンドリアを Mito Tracker Green FM reagent (Life technologies 社製) を用いて染色した後、共焦点レーザ走査型顕微鏡 FV10i (Olympus) により観察して解析した。ミトコンドリア染色は、35 mm ガラスボトムディッシュに播種した細胞を、MitoTracker Green (0.5 μ M) で、37°C、10 分間インキュベートして反応させた。反応後、PBS で 2 回洗浄して MitoTracker を除去した後、Phenol-red free DMEM を加え測定した。

4-2-12. ミトコンドリアからの ROS 産生量の測定

ミトコンドリアからの ROS 産生量の測定は、MitoSOX Red (Life technologies) を用いて測定した。ラット新生児心筋細胞に、MitoSOX (5 μ M) を添加し、37°C、10 分間インキュベートして反応させた。反応後、PBS で 2 回洗浄して MitoSOX を

除去した後、Phenol-red free DMEM に交換した。染色された細胞を、共焦点レーザー走査型顕微鏡 FV10i (Olympus) により観察した。

4-2-13. 老化関連 β -gal 活性の測定

老化に係る酸性の β -ガラクトシダーゼ (SA- β -gal) 活性は、senescence β -Galactosidase Staining Kit (Cell signaling technology) を用いて測定した。ラット新生児心筋細胞を、キットに含まれている Fixative Solution にて室温で 15 分間処理して固定した。固定された細胞を、PBS で 1 回洗浄後、キットに含まれている β -galactosidase staining solution を加え、37°C で一晩インキュベートした。インキュベート後の細胞を、カラー CCD カメラ (Nikon digital camera DXM1200F) 付きの正立顕微鏡 Eclipse 80i (Nikon) により観察し、SA- β -gal 活性が陽性な細胞 (染色された細胞) の割合を調べた。

4-2-14. リアルタイム PT-PCR 法

RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (QIAGEN) を用いて、凍結したマウスの心臓細胞から total RNA を抽出した。相補 DNA (cDNA) は、Prime Script RT (Takara Bio) により合成した。リアルタイム PCR は、Power SYBR Green PCR Master mix (Life technologies) あるいは QuantiTect Probe RT-PCR Kit (Qiagen) と TaqMan probes with the ABI PRISM 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用いて測定した。プライマーおよび TaqMan プロブの配列を下に示す。

【mouse probes】

Mouse alpha-skeletal actin (α -SKA)

5'-GTGCGCGACATCAAAGAGAAG-3' (Forward primer)

5'-GCAACGGAAACGCTCATTG-3' (Reverse primer)

5'-FAM-CTATGTGGCCCTGGACTTCGAGAATGAGAT-TAMRA-3' (Taqman probe)

Mouse beta-myosin heavy chain (β -MHC)

5'-TTTCTACCAAATCCTGTCTAATAAAAAGC-3' (Forward primer)
5'-GTCATCAATGGAGGCCACAGT-3' (Reverse primer)
5'-FAM-ACCCCTACGATTATGCGTTCATCTCCCAA-TAMRA-3' (Taqman probe)

Mouse atrial natriuretic peptide (ANP)

5'-CATCACCCCTGGGCTTCTTCCT-3' (Forward primer)
5'-TGGGCTCCAATCCTGTCAATC-3' (Reverse primer)
5'-FAM-ATTTCAAGAACCTGCTAGACCACCTGGA-TAMRA-3' (Taqman probe)

Mouse procollagen type 1 α 1 (Collagen 1 α 1)

5'-GAGAGAGCATGACCGATGGATT-3' (Forward primer)
5'-GCTACGCTGTTCTTGCAGTGAT-3' (Reverse primer)
5'-FAM-CTATCCAGCTGACCTTCCTGCGCCTAAT-TAMRA-3' (Taqman probe)

Mouse procollagen type 3 α 1 (Collagen 3 α 1)

5'-CAGCAGTCCAACGTAGATGAATTG-3' (Forward primer)
5'-CATGGTTCTGGCTTCCAGACA-3' (Reverse primer)
5'-FAM-CCACCTTGGTCAGTCCTATGAGTCT-TAMRA-3' (Taqman probe)

Mouse connective tissue growth factor (CTGF)

5'-CTGCACCAGTGTGAAGACATACAG-3' (Forward primer)
5'-TCCCCAGGACAGTTGTAATGG-3' (Reverse primer)
5'-FAM-TCAAATGCCCGATGGCGAGAT-TAMRA-3' (Taqman probe)

Mouse periostin

5'-GAATGCCTTACACAGCCACATG-3' (Forward primer)
5'-GCCCCAGATTGTTGTACATTGA-3' (Reverse primer)
5'-FAM-TAACCAAGGACCTGAAACACGGCATGG-3' (Taqman probe)

Mouse angiotensin-converting enzyme (ACE)

5'-TGAGAAAAGCACGACGGAGGTATCC -3' (Forward primer)
5'-CCGCTTGATGGAAGAGTTTTG -3' (Reverse primer)
5'-FAM-ATCACACCCTGAAATATGGCACCCGG-3' (Taqman probe)

TGF- β 1: Mm00441724_m1

TGF- β 2: Mm00436952_m1

TGF- β 3: Mm00436960_m1

mouse 18S

5'-ATTAATCAAGAACGAAAGTCGGAGGT-3' (Forward primer)

5'-TTTAAGTTTCAGCTTTGCAACCATACT-3' (Reverse primer)

4-2-15. 統計解析

結果は平均値±標準誤差で表し、すべての実験は少なくとも3回以上繰り返し行った。経時変化の実験における代表データは、20細胞以上用いて実施した3回の同様の実験結果の一つをプロットした。統計比較は、両側 Student's t-test, one-way ANOVA, あるいは two-way ANOVA による分散分析を行った後、Student-Newman-Keuls test を行い、P 値が 0.05 未満の場合に有意差があると判断した。

4-3. 結果

4-3-1. Drp-1 誘導ミトコンドリア分裂を介した心筋梗塞後マウス心臓の梗塞周辺領域における心筋細胞早期老化の誘発

まず、心筋梗塞後のマウス左室において、どの領域に心臓細胞老化が発生しているか確認を行った。心筋梗塞後 4 週間で、左室心筋の梗塞領域および梗塞周辺領域で老化に関連した酸性の β -ガラクトシダーゼ (SA- β -gal) 活性が陽性の細胞数は有意に増加していることが観察された (Fig. 4-1A)。心筋構造と形態が著しく破壊されていることから、老化細胞の大部分は、梗塞領域の心線維芽細胞と考えられた (Fig. 4-1B)。それとは対照的に、心筋細胞の早期老化 (細胞毒性により老化が短期間のうちに誘導される現象) は、左室心筋の梗塞周辺領域に顕著に観察された。次に、梗塞周辺領域では正常な血液循環が行われているにもかかわらず、なぜ心筋の老化が起こるのかを検討した。電子顕微鏡での分析により、梗塞周辺領域の心筋細胞では、偽手術群の心筋細胞と比較して、断片化したミトコンドリアの数が顕著に増加していることが明らかとなった (Fig. 4-1B)。さらには、低酸素誘導因子-1 α (HIF-1 α) やヘム・オキシゲナーゼ-1 (HO-1) などの低酸素応答タンパク質が梗塞周辺領域の心筋において増加していることが認められ、また、Mn-SOD や Taffazin などのミトコンドリア機能に関連したタンパクの発現は、変化を認めなかった (Fig. 4-1C)。明白な血流回復にも関わらず梗塞周辺領域の心筋では、低酸素刺激が誘導されていると考えられた。ミトコンドリア動態の大部分は、Drp1 や Fis1 などの分裂促進因子と Mfn1, Mfn2 および Opa1 などの融合促進因子により維持されており、ミトコンドリアの分裂は、Drp1 の活性化、あるいは、ミトコンドリア融合タンパクの発現レベル低下により起こることが報告されている [4, 14]。心筋梗塞後 1 週間のマウス心臓において、GTP が結合した活性型の Drp1 は、有意に増加していることが分かった (Fig. 4-1D)。また、心筋梗塞後 4 週間では、Drp1 の発現量が有意に増加していた (Fig. 4-1E)。対照的に、Mfn1, Mfn2 および Opa1 タンパク発現量は、偽手術群の心臓と比較しても有意な減少は認められなかった (Fig. 4-1F)。これらの結果より、低酸素により誘導され

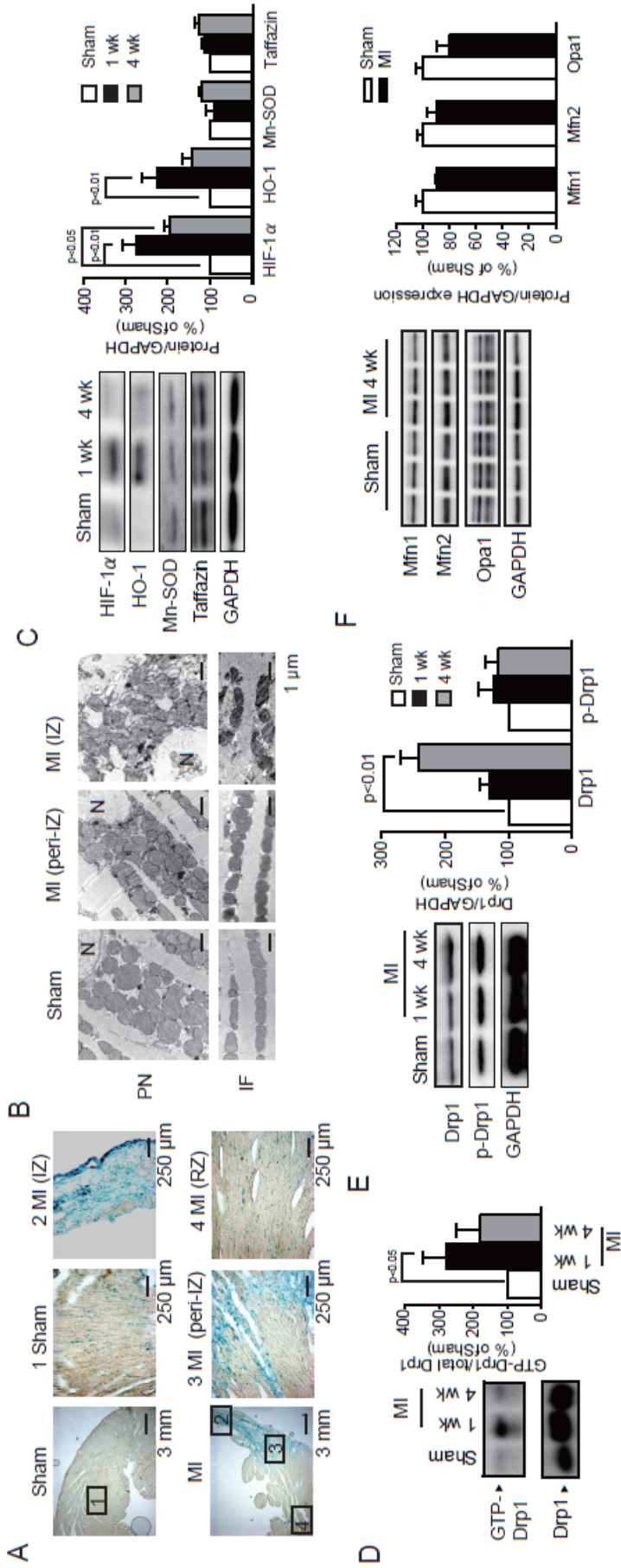


Fig. 4-1. Induction of myocardial senescence in the peri-infarct regions via hypoxia-induced activation of Drp1. (A) Senescence of left ventricular myocardium determined by SA- β -gal staining in mice 4 weeks after MI. Sham, Infarct Zone (IZ), peri-Infarct Zone (peri-IZ), and remote zone (RZ). (B) Representative electron micrograph of sham, peri-infarct (peri-IZ) and infarct zone (IZ) myocardium 1 week after MI depicting two subpopulations of mitochondria: inter-fibrillar (IF) and perinuclear (PN) mitochondria. (C) Changes in expression levels of hypoxia-inducible (HIF-1 α and HO-1) and mitochondria-expressing (Mn-SOD and Tafazzin) proteins in the peri-infarcted myocardium (left). And the quantification of the western blots (right) ($n = 3$ per groups). (D) Activation of Drp1 in peri-infarcted myocardium 1 week and 4 weeks after MI ($n = 3$ per groups). (E) Western blotting analysis of Drp1 and phosphorylation of Drp1 at Ser-622 ($n = 3$ per groups). (F) Western blotting analysis of mitofusion protein (Mfn1, Mfn2, and Opa1) ($n = 3$ per groups).

る Drp1 の活性化は、心筋梗塞後の梗塞周辺領域の心筋細胞におけるミトコンドリアの分裂と同様、心筋の早期老化の発生にも関与していることが推察された。

4-3-2. 低酸素刺激後の再酸素化は Drp1 による心筋老化と類似の症状を呈する

低酸素刺激が、*in vivo* マウスの心臓において、Drp1 の活性化の引き金であること

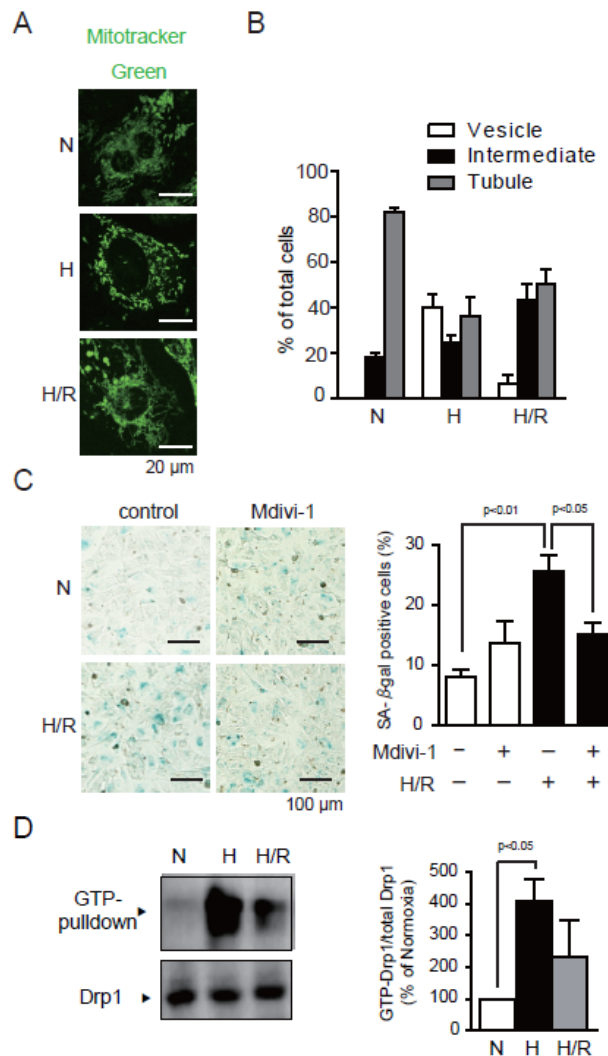


Fig. 4-2. Hypoxia/ reoxygenation-induced activation of Drp1. (A) Images of mitochondrial morphology in normoxia NRCMs (N), and NRCMs treated with 16 h hypoxia (H) or hypoxia followed by 12 h reoxygenation (H/R). (B) Proportion of the number of fission-positive (vesicle), -negative (tubule), and intermediate NRCMs ($n = 3$ experiments). (C) Effects of Mdivi-1 (10 μ M) on H/R-induced cardiomyocyte senescence ($n = 3$ per groups). (D) Activation of Drp1 induced by H and H/R ($n = 3$ per groups).

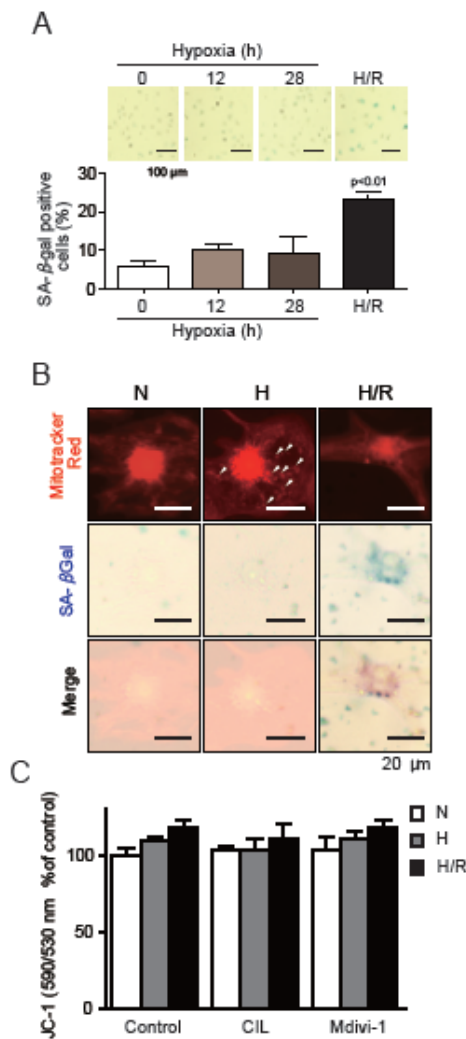


Fig. 4-3. Cardiac senescence induced by H/R is independent of ROS production and mitochondrial membrane potential in NRCMs. (A) Proportion of the number of β -gal positive cells after normoxia (N), hypoxia (H), or hypoxia-reoxygenation (H/R) in NRCMs, $n = 3$ experiments. (B) Representative imaging of mitochondrial ROS production and senescence after hypoxia and H/R in NRCMs. (C) Effects of Mdivi-1 (10 μ M) and cilnidipine (1 μ M) on the mitochondrial membrane potential in NRCMs after hypoxia and H/R, analyzed with JC-1.

から、低酸素刺激後の再酸素化 (H/R) が、*in vitro* において Drp1 を介した心筋の老化と類似の症状を示すかどうか検討を行った。ラット新生児心筋細胞 (NRCM) に低酸素刺激を施すと、ミトコンドリアが断片化したラット新生児心筋細胞数が有意に増加し、ミトコンドリアは小胞状や小胞状と小管状の中間的な構造を呈していた (Fig.

4-2A and B). ラット新生児心筋細胞において、低酸素刺激のみでは心筋細胞の老化を誘導するには不十分であるが、低酸素刺激後に再酸素化を行うと、ミトコンドリア分裂と同様、SA- β -gal 活性が陽性の心筋細胞数の有意な増加が観察された (Fig. 4-2C, 4-3A and B). また、低酸素刺激後の再酸素化により誘導される細胞老化は、Drp1 の選択的阻害薬である Mdivi-1 により有意に抑制された (Fig. 4-2C). 低酸素刺激は実際、Drp1 を活性化させることから (Fig. 4-2D), 低酸素刺激後の再酸素化により誘導されるラット新生児心筋細胞の早期老化には Drp1 が関与していると推察された. 低酸素刺激により, Drp1 上の Ser-637 の Ca²⁺/カルシニューリン依存型の脱リン酸化を通じて, ミトコンドリア転移, 多量体の形成や Drp1 の活性化が誘導されると報告されているが, Drp1 上の Ser-637 (マウスでは Ser-622 に相当) のリン酸化レベルは, 心筋梗塞後のマウス心臓では変化していなかった (Fig. 4-1E). 対照的に, プロテインキナーゼ A あるいは C による Drp1 のリン酸化は, Drp1 を活性化すると報告がある [15]. しかしながら, 低酸素刺激は, Drp1 上の Ser-637 のリン酸化同様, Drp1 の全リン酸化レベルに影響を及ぼさなかったことから (Fig. 4-4F), 低酸素刺激はリン酸化とは独立した経路で, Drp1 を活性化することが示唆された.

4-3-3. シルニジピンはラット新生児心筋細胞における Drp1 を介したエネルギー代謝異常を阻害する

重度のエネルギー代謝異常は, 心筋梗塞後, 左室心筋の梗塞周辺領域で起こることが報告されている [9]. ラット新生児心筋細胞において, 低酸素刺激後に再酸素化を行うことで, ミトコンドリアの呼吸速度や膜電位は変化しないことから (Fig. 4-3C), 低酸素刺激後の再酸素化は, ミトコンドリアによる ATP 産生に影響を及ぼさないと考えられる. ATP などのポリリン酸種の蛍光性ケモセンサーである 1-2Zn(II) (キサテン型亜鉛錯体) を用いることで [16], 心筋梗塞後 1 週間の左室心筋細胞の梗塞周辺領域でヌクレオシドポリリン酸塩量が増加していることが明らかとなった (Fig. 4-4G). 実際に, 亜鉛錯体の蛍光強度と細胞内の ATP 濃度 ($[ATP]_i$) は, 低酸素刺激

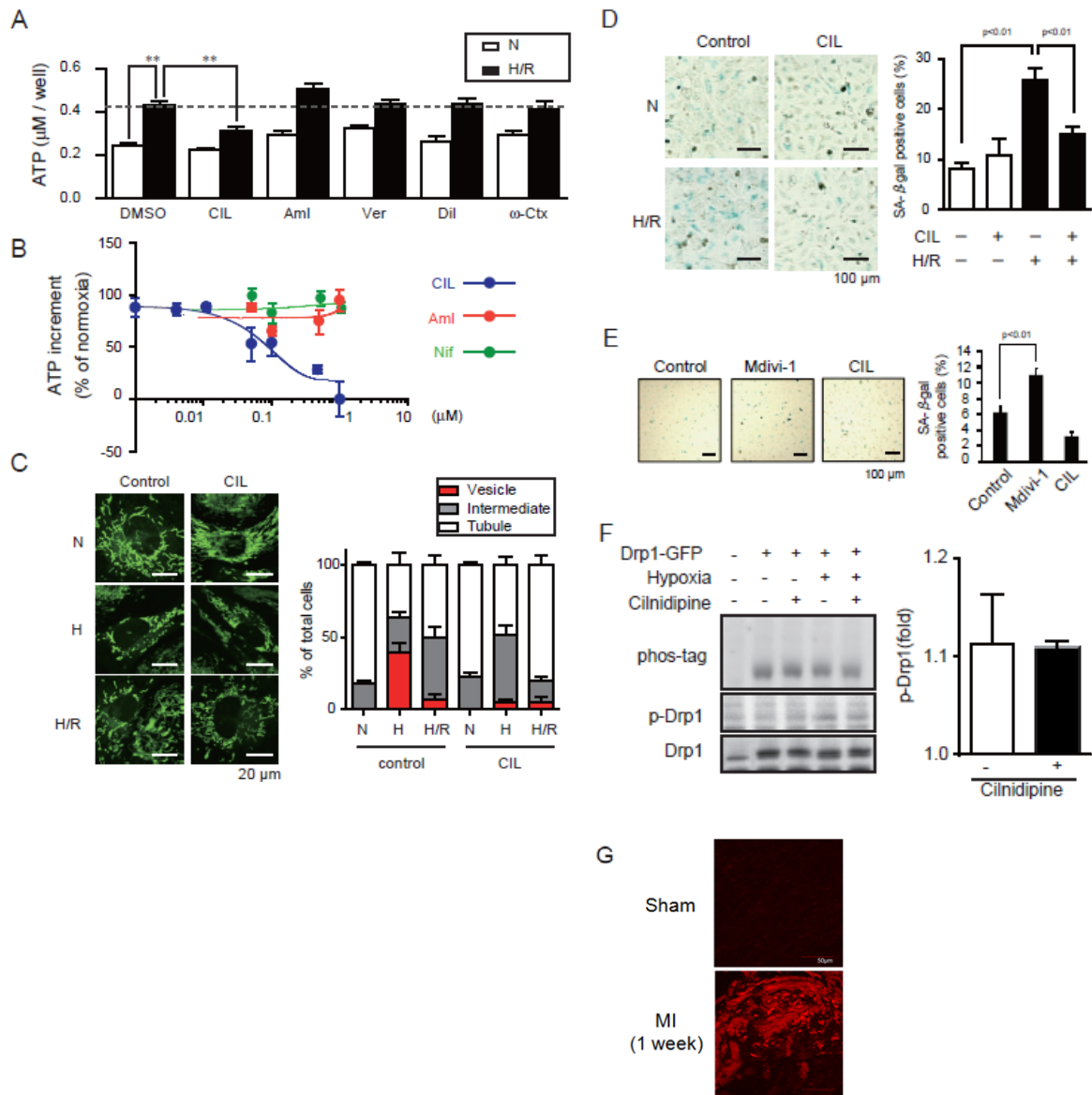


Fig. 4-4. Mitochondrial fission-mediated energy imbalance induced by H/R in NRCMs. (A) Effect of cilnidipine (1 μM), amlodipine (1 μM), verapamil (1 μM), diltiazem (1 μM) and ω -conotoxin GVIA (ωCtx) (100 ng/mL) on ATP accumulation after H/R. $**P < 0.01$. (B) Dose dependency of cilnidipine on ATP accumulation after H/R. (C) Effect of cilnidipine (1 μM) on mitochondrial fission after hypoxia and reoxygenation in NRCMs ($n = 3$ experiments). (D) Effect of cilnidipine on H/R-induced and senescence in NRCMs ($n = 3$ experiments). (E) Effect of Mdivi-1 and cilnidipine on cellular senescence. NRCM were incubated for 48 h in the presence or absence of Mdivi-1 (10 μM) or cilnidipine (1 μM) ($n = 3$ experiments). (F) Phosphorylation of Drp1 analyzed by phos-tag assay in the presence or absence of cilnidipine (1 μM) ($n = 3$ experiments). (G) ATP accumulation of sham, peri-infarct zone.

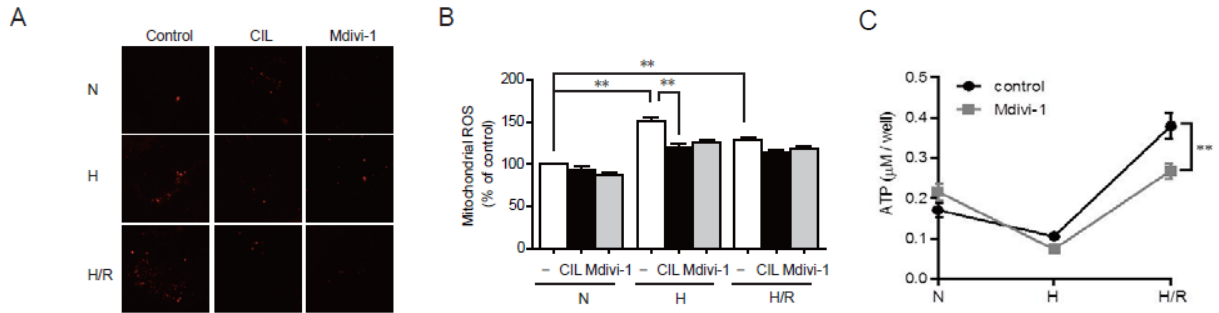


Fig. 4-5. Cilnidipine (1 μM) and Mdivi-1 (10 μM) decrease mitochondrial ROS after hypoxia and hypoxia-reoxygenation. (A, B) Effect of cilnidipine and Mdivi-1 on mitochondrial ROS production after normoxia (N), hypoxia (H) or hypoxia-reoxygenation (H/R). Representative confocal imaging (A) and quantitative analysis (B). (C) Effect of Mdivi-1 on ATP accumulation after H and H/R. $**P < 0.01$.

後に再酸素化を行ったラット新生児心筋細胞において増加していた (Fig. 4-4A). 低酸素刺激は、筋収縮の障害を特徴とする冬眠心筋を引き起こすことが知られている [17]. また、老化した心筋細胞では、エネルギー代謝異常が発生することが報告されている [18]. 低酸素刺激後の再酸素化による $[\text{ATP}]_i$ の上昇が Mdivi-1 により抑制されたことから (Fig.4-5C), Drp1 は、低酸素刺激後の再酸素化により引き起こされる冬眠心筋に関与していると考えられた. 低酸素刺激後に再酸素化を行ったラット新生児心筋細胞において、未刺激 (酸素正常状態) の場合と比較すると、エネルギー産生が欠乏した状態における $[\text{ATP}]_i$ の低下は早かったことから、低酸素刺激後の再酸素化による $[\text{ATP}]_i$ の上昇は、ラット新生児心筋細胞での ATP 消費能の低下により引き起こされたと考えられる. ミトコンドリアでの活性酸素種 (ROS) 産生は、低酸素刺激後の再酸素化により増加し、Mdivi-1 によりこの増加した ROS 産生は抑制されたことから (Fig. 4-5A and B), Drp1 を介したミトコンドリア分裂は、ラット新生児心筋細胞において、低酸素刺激後の再酸素化による冬眠心筋や ROS 産生を誘発すると考えられた.

次に、Drp1 を介した低酸素刺激後の再酸素化による心筋細胞の老化を抑制する可能性を有する既承認薬のスクリーニングを実施した. その結果、250 あまりの既承認

薬のから、1,4-ジヒドロピリジン (DHP) 骨格を有し、L/N 型電位依存性 Ca^{2+} チャネルを選択的に阻害する高血圧治療薬のシルニジピンが、濃度依存的に低酸素刺激後の再酸素化によるラット新生児心筋細胞での $[\text{ATP}]_i$ の上昇を有意に抑制し、 IC_{50} 値が 85 nM (95%CI;0.032-0.224) であることが明らかとなった (Fig. 4-4B). 一方、ニフェジピンやアムロジピンなど DHP 系 Ca^{2+} チャネル拮抗薬、ベンゾチアゼピン誘導体であるジルチアゼムやフェニルアルキルアミン誘導体であるベラパミルなどの L 型 Ca^{2+} チャネルの阻害薬、N 型 Ca^{2+} チャネルを阻害するペプチドである ω -conotoxin GVIA は、低酸素刺激後の再酸素化による $[\text{ATP}]_i$ の増加に何ら影響を与えなかったことから、L/N 型 Ca^{2+} チャネルは低酸素刺激後の再酸素化による $[\text{ATP}]_i$ の減少に影響を与えていないと考えられた. 実際に、ラット新生児心筋細胞をシルニジピンで処置すると、低酸素刺激後の再酸素化によるミトコンドリア分裂や心筋細胞の老化が有意に抑制された (Fig.4-4C and D). これらの結果より、Drp1 を介したミトコンドリア分裂を阻害することは、シルニジピンが低酸素刺激後の再酸素化による心筋の老化を抑制する作用の根底をなしているとして強く示唆された.

4-3-4. マウスにおけるシルニジピンによる心筋梗塞後死亡率の改善効果

Ca^{2+} 阻害薬、特に心筋特異的な非 DHP 系 Ca^{2+} 阻害薬は、慢性心不全の患者の心機能を増悪させることが一般的に知られている. そこで、シルニジピンによる Drp1 の活性化阻害作用が、マウスの心筋梗塞後の心不全に対して、効果的な作用を示すかどうか検討を実施した. 心筋梗塞の手術後 24 時間後よりシルニジピンを持続投与した群は、シルニジピン非投与群に比べ生存率は改善し、心筋梗塞後の突然死は有意に抑制された (Fig. 4-6A). また、心筋梗塞後の左室肥大は、シルニジピン投与群において、有意に抑制された (Fig. 4-6B). そこで、シルニジピンによる生存率や左室肥大の改善が N 型 Ca^{2+} チャネル阻害によるものか検証するため、 $\text{Ca}_v 2.2$ 欠損マウスを用いて検討を行った. その結果、WT マウスと $\text{Ca}_v 2.2$ 欠損マウスにおいて、心筋梗塞後の生存率と左室肥大の程度は同等であった (Fig. 4-6C and D). また、心筋梗塞後

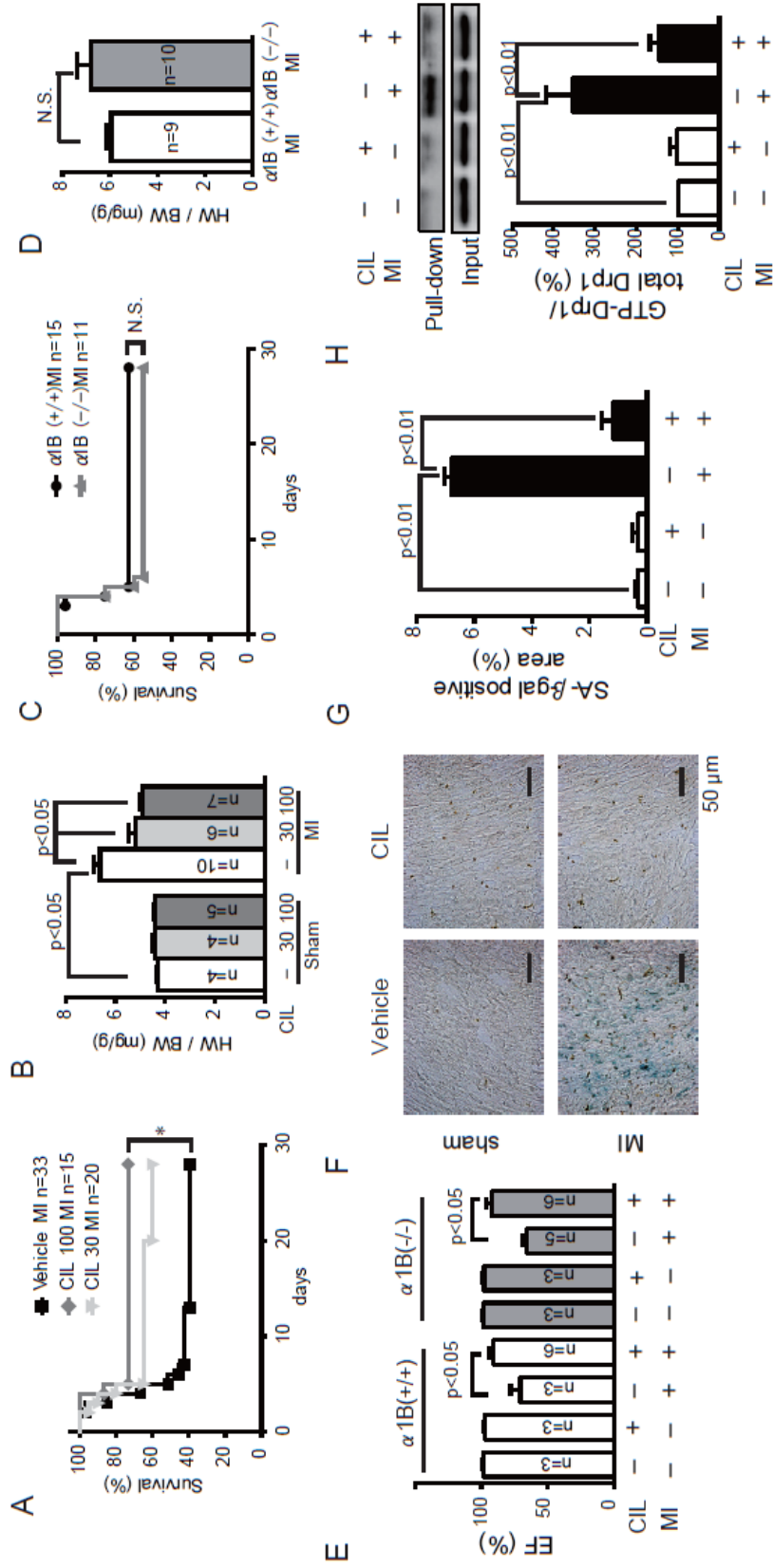


Fig. 4-6. Improvement of chronic heart failure after MI via suppression of Drp1-mediated myocardial senescence by cilindipine independently of voltage-dependent L/N-type Ca^{2+} channel blockade. (A) Effects of cilindipine on mortality after MI. Vehicle, 100 mg/kg/day cilindipine and 30 mg/kg/day cilindipine administration. Cilindipine was administered 1 day after MI. * $p < 0.05$ vs Vehicle MI. (B) Analysis of heart weight after MI with or without cilindipine. (C) Mortality of $\alpha1B$ (+/+) mice and $\alpha1B$ (-/-) mice after MI. (D) Analysis of heart weight of $\alpha1B$ (+/+) mice and $\alpha1B$ (-/-) mice after MI. (E) Analysis of ejection fraction of $\alpha1B$ (+/+) mice and $\alpha1B$ (-/-) mice heart, with or without cilindipine administration 4 weeks after MI. (F, G) Effect of cilindipine on myocardial senescence 4 weeks after MI. Images of SA-beta-gal staining of peri-infarcted myocardium (F) and the quantification of SA-beta-gal positive area (G) ($n = 3$ per groups). (H) Effect of cilindipine on activation of Drp1 in the peri-infarcted myocardium 1 week after MI ($n = 3$ per groups).

Table 4-1.

	vehicle sham	CIL 30 sham	CIL 100 sham	vehicle MI	CIL 30 MI	CIL 100 MI
Echocardiographic parameters						
	(n = 6)	(n = 4)	(n = 9)	(n = 11)	(n = 6)	(n = 7)
HR (bpm)	502.00 ± 2.00	503.00 ± 3.00	501.00 ± 1.00	501.00 ± 1.00	503.00 ± 2.00	500.00 ± 3.00
IVSd (mm)	0.93 ± 0.04	0.98 ± 0.03	0.89 ± 0.02	0.42 ± 0.02 ^{**}	0.67 ± 0.05 ^{##}	0.64 ± 0.05 ^{##}
LVPWd (mm)	1.02 ± 0.03	1.05 ± 0.03	0.99 ± 0.03	1.17 ± 0.05	1.20 ± 0.06	1.03 ± 0.07
LVIDd (mm)	2.65 ± 0.06	2.73 ± 0.09	2.78 ± 0.10	4.89 ± 0.15 ^{**}	3.62 ± 0.22 ^{##}	3.40 ± 0.13 ^{##}
LVIDs (mm)	1.02 ± 0.05	0.93 ± 0.05	1.10 ± 0.02	4.11 ± 0.14 ^{**}	2.42 ± 0.23 ^{##}	2.21 ± 0.11 ^{##}
EF (%)	94.0 ± 0.4	96.0 ± 0.8	92.4 ± 0.4	38.5 ± 2.2 ^{**}	63.3 ± 2.8 ^{##}	69.0 ± 2.9 ^{##}
FS (%)	63.0 ± 1.0	67.0 ± 2.0	59.0 ± 1.0	16.0 ± 1.0	33.0 ± 2.0	33.0 ± 3.0
Cardiac parameters measured by Millar Catheter						
	(n = 6)	(n = 4)	(n = 6)	(n = 11)	(n = 6)	(n = 6)
Heart Rate (bpm)	500 ± 2	497 ± 1	496 ± 1	498 ± 1	496 ± 2	499 ± 1
LVP (mmHg)	129 ± 3	130 ± 5	133 ± 3	100 ± 3 ^{**}	119 ± 4 ^{##}	123 ± 1 ^{##}
LVEDP (mmHg)	3.1 ± 0.2	3.1 ± 0.4	3.1 ± 0.1	10.0 ± 1.5 ^{**}	4.4 ± 0.9 ^{##}	3.4 ± 0.4 ^{##}
dP/dt max (mmHg/sec)	12582 ± 477	12576 ± 187	13242 ± 340	6269 ± 278 ^{**}	9829 ± 912 ^{##}	10501 ± 638 ^{##}
dP/dt min (mmHg/sec)	7273 ± 431	7319 ± 664	7590 ± 360	4404 ± 226 ^{**}	6982 ± 624 ^{##}	7021 ± 265 ^{##}
tau (msec)	10.8 ± 0.8	10.6 ± 0.5	10.4 ± 0.8	26.6 ± 2.6 ^{**}	13.3 ± 2.8 ^{##}	11.4 ± 1.2 ^{##}

HR, heart rate; IVSd, interventricular septum diastolic diameter; LVPWd, left ventricular posterior wall diastolic diameter; LVIDd, left ventricular internal at end-diastole; LVIDs, left ventricular internal diameters at end-systole; EF, ejection fraction; FS, Fractional shortening; LVP, left ventricular pressure; LVEDP, left ventricular end diastolic pressure; dP/dt max, maximal rate of pressure development; dP/dt min, maximal rate of decay of pressure; tau, monoexponential time constant of relaxation.

^{**}P < 0.01 vs vehicle sham, and ^{##}P < 0.01 vs vehicle MI

Table 4-2.

	WT MI	α 1B (-/-) MI
Echocardiographic parameters		
	(n = 10)	(n = 9)
HR (bpm)	500 \pm 3	500 \pm 3
IVSd (mm)	0.52 \pm 0.03	0.60 \pm 0.06
LVPWd (mm)	1.21 \pm 0.06	1.30 \pm 0.12
LVIDd (mm)	4.75 \pm 0.21	5.09 \pm 0.33
LVIDs (mm)	4.02 \pm 0.22	4.22 \pm 0.38
EF (%)	38.9 \pm 2.5	42.3 \pm 4.5
FS (%)	16.1 \pm 1.3	18.1 \pm 2.3
Cardiac parameters measured by Millar Catheter		
	(n = 9)	(n = 7)
Heart Rate (bpm)	498 \pm 2	498 \pm 2
LVP (mmHg)	109 \pm 3	115 \pm 4
LVEDP (mmHg)	5.0 \pm 0.9	12.2 \pm 2.7*
dP/dt max (mmHg/sec)	8790 \pm 497	8055 \pm 656
dP/dt min (mmHg/sec)	5329 \pm 210	5231 \pm 462
tau (msec)	15.4 \pm 0.8	17.3 \pm 2.0

HR, heart rate; IVSd, interventricular septum diastolic diameter; LVPWd, left ventricular posterior wall diastolic diameter; LVIDd, left ventricular internal at end-diastole; LVIDs, left ventricular internal diameters at end-systole; EF, ejection fraction; FS, Fractional shortening; LVP, left ventricular pressure; LVEDP, left ventricular end diastolic pressure; dP/dt max, maximal rate of pressure development; dP/dt min, maximal rate of decay of pressure; tau, monoexponential time constant of relaxation.

*P < 0.05 vs WT MI

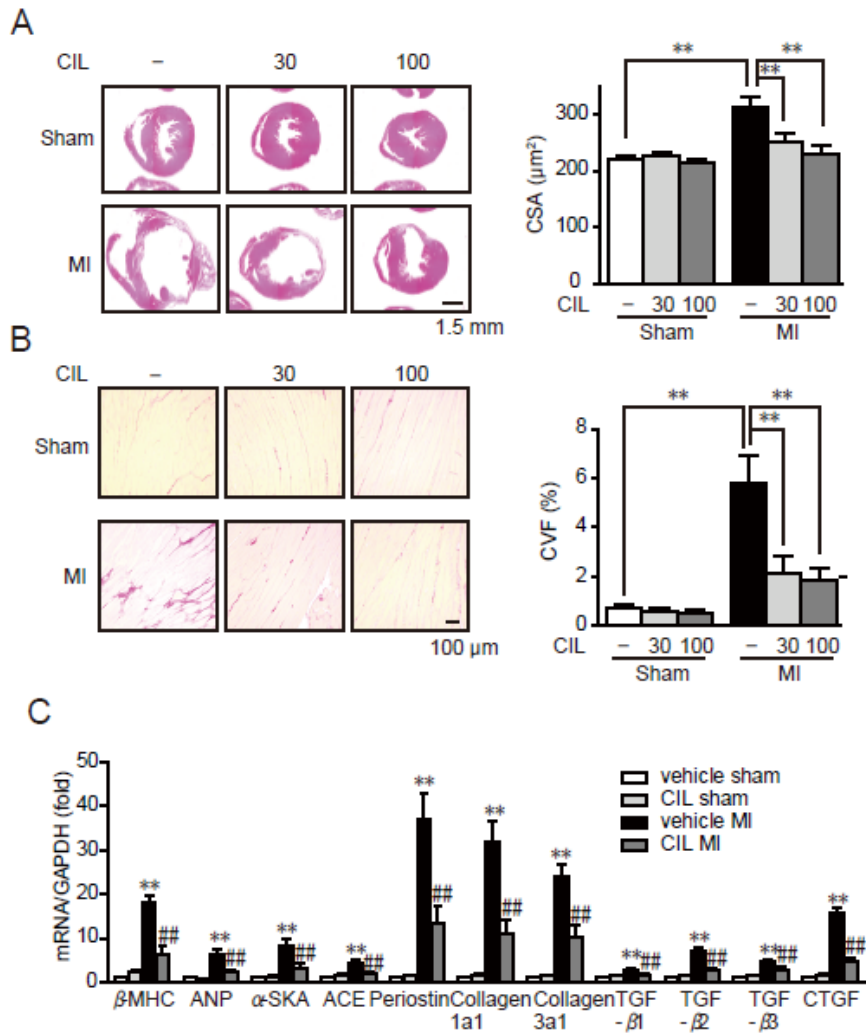


Fig. 4-7. Effects of cilnidipine on the development of cardiac remodeling after MI. (A, B) Cell surface area (CSA) of cardiomyocytes (A) and collagen volume fraction (CVF) (B) in the peri-infarcted myocardial regions 4weeks after MI. Cilnidipine (30 mg/kg/day and 100 mg/kg/day) was administered 1day after MI. (C) mRNA expression levels of fibrosis-related genes in the peri-infarcted myocardium 1week after MI with or without cilnidipine administration (30 mg/kg/day).

に障害を受けた左室機能は、シルニジピンの投与により、WT マウスと Cav 2.2 欠損マウスのいずれの群においても有意な改善が認められた (Fig. 4-6E and Table 4-1 and 4-2). このことは、シルニジピンによる心不全の改善効果は、N 型 Ca²⁺チャネル阻害によるものではないことを示している. シルニジピンは、梗塞周辺領域の左室心筋細胞の SA-β-gal 陽性の面積を有意に減少させ、かつ, Drp1 の活性を抑制した (Fig. 4-6G and H). また、左室リモデリングや心筋細胞サイズの増大、間質の線維化、肥大や線維化関連の遺伝子発現も抑制した (Fig. 4-7A-C). これらの結果は、全ての Ca²⁺拮抗薬が心不全治療に対して使用すべきでないと考えられていたにも関わらず、シルニジピンが Drp1 の活性化による心筋細胞の老化を抑制することで、心筋梗塞後の心不全を改善することを強く示唆している.

4-4. 考察

心筋梗塞後のマウス左室では、壁厚が薄くなった梗塞領域だけでなく、正常な循環が行われ、壁厚が保たれている梗塞周辺領域においても、細胞老化が認められた (Fig. 4-1A)。梗塞領域における老化細胞の多くが心線維芽細胞であったのに対し、梗塞周辺領域では大部分が心筋細胞であった。梗塞周辺領域では、特に心筋細胞においてミトコンドリア過剰分裂が観察された。この際、ミトコンドリア機能に関連したタンパクの発現量は変化しておらず、低酸素応答タンパク質の増加が認められた (Fig. 4-1C)。これらの結果から、心筋梗塞後はリモデリングにより左室の壁厚が薄くなるものの、梗塞周辺領域の心筋細胞は低酸素環境に曝露されることにより低酸素誘導因子の発現が誘導され、ミトコンドリア分裂が起こる可能性が示された。

ミトコンドリアの恒常性は、分裂と融合のバランスが保たれることで維持されている。心筋梗塞後に認められたミトコンドリアの断片化は、分裂の亢進か融合の減弱のどちらに起因するか確認したところ、梗塞周辺領域の心筋組織では、融合促進タンパク質の発現量に変化は認められず、分裂促進に働く G タンパク質 Drp1 の活性が上昇していることが明らかとなった (Fig. 4-1D)。したがって、心筋梗塞後の梗塞周辺領域では、低酸素による Drp1 の活性化がミトコンドリア分裂を促進し、心筋細胞の早期老化を引き起こしていると考えられた。ラット新生児心筋細胞を用いた *in vitro* の実験でも、低酸素刺激によりミトコンドリアの分裂および Drp1 の活性化が認められ、再酸素化することにより老化も確認された (Fig. 4-2C)。さらに、ミトコンドリア分裂抑制作用を有する Mdivi-1 により、低酸素刺激後の再酸素化による細胞老化が抑制されたことから、ミトコンドリア分裂を促進する Drp1 の活性化を抑制することが、心筋老化の予防につながることを示唆された。

心筋梗塞後、マウス左室心筋細胞の梗塞周辺領域では、ATP などのヌクレオシドポリリン酸塩量が増加していた (Fig. 4-4G)。ラット新生児心筋細胞においても、低酸素刺激後の再酸素化により、ATP 消費能の低下に伴い、細胞内 ATP 量が増加してい

た (Fig. 4-4A). この細胞内 ATP 量の上昇は Mdivi-1 処置によって抑制されたことから (Fig. 4-5C), Drp1 が活性化し, ミトコンドリア分裂が起こることで, 細胞内に ATP が蓄積することが示唆された. 低酸素刺激後の再酸素化による ATP 蓄積が心筋細胞の早期老化を反映する指標になると考え, 主に循環器疾患治療に使われる既承認薬を用いてスクリーニングを行った結果, シルニジピンだけが低酸素刺激後の再酸素化による ATP の蓄積を抑制することが明らかとなった (Fig. 4-4A). 興味深いことにシルニジピンと同じジヒドロピリジン (DHP) 系 Ca^{2+} 拮抗薬であるニフェジピンやアムロジピンでは心筋細胞内 ATP 増加の抑制は観察されなかった. DHP 系 Ca^{2+} 拮抗薬の DHP 骨格は L 型 Ca^{2+} チャンネル阻害の発現に関与していることが知られている. このことから ATP 蓄積抑制に, L 型 Ca^{2+} チャンネルは関与していないことが示唆された. 加えて, N 型 Ca^{2+} チャンネル阻害ペプチドである ω -conotoxin-GVIA 処置によっても ATP 増加は抑制されなかった. これらの結果は, これまで知られていたシルニジピンの L/N 型 Ca^{2+} チャンネル阻害とは異なる機序を介してミトコンドリア分裂を阻害することを示唆するとともに, その薬理作用がジヒドロピリジン骨格に依存しないことも強く示唆している.

シルニジピンは, 低酸素刺激や, その後の再酸素化によって起こるラット新生児心筋細胞のミトコンドリア分裂を抑制し, かつ, 低酸素刺激後の再酸素化の心筋細胞老化を抑制した. そこで, マウス心筋梗塞モデルにシルニジピンを持続投与したところ, 生存率や左室肥大の改善, さらには Drp1 の活性化と心筋老化の抑制が認められた. これらの効果は, $\text{Ca}_v 2.2$ 欠損マウスを用いた検討により, N 型 Ca^{2+} チャンネル阻害によるものではないことが示された (Fig. 4-6C and D).

しかし, *in vivo* および *in vitro* 両方の系で, シルニジピンが Drp1 の GTP 結合活性を阻害することは明らかにしたものの, シルニジピンの作用点の特定には至っていない. 実際, Drp1 を直接阻害する Mdivi-1 を長期間心筋細胞に処置すると, それだけでミトコンドリア融合促進に伴う心筋細胞老化が誘導された (Fig. 4-4E). 一方, シルニジピンを処置した細胞では Mdivi-1 と同じ時間処置してもミトコンドリアの

形態および老化細胞数に変化は見られなかった。この結果は、シルニジピンとは Mdivi-1 とは異なるメカニズムで Drp1 活性化を抑制し、ミトコンドリア分裂を抑制していることを示唆している。実際、もう一つの Drp1 阻害薬である Dynasore を含め、それぞれの化合構造の類似性は低いことから、タンパクの同一部位が相互作用の標的となっている可能性は低いことが予測される。したがって、シルニジピンの Drp1 活性抑制作用は、DHP 骨格に由来する L 型 Ca^{2+} チャンネル阻害作用や N 型 Ca^{2+} チャンネル阻害作用とは独立しており、また、従来の Drp1 阻害薬とは異なる新規のメカニズムを有していることが示唆される。

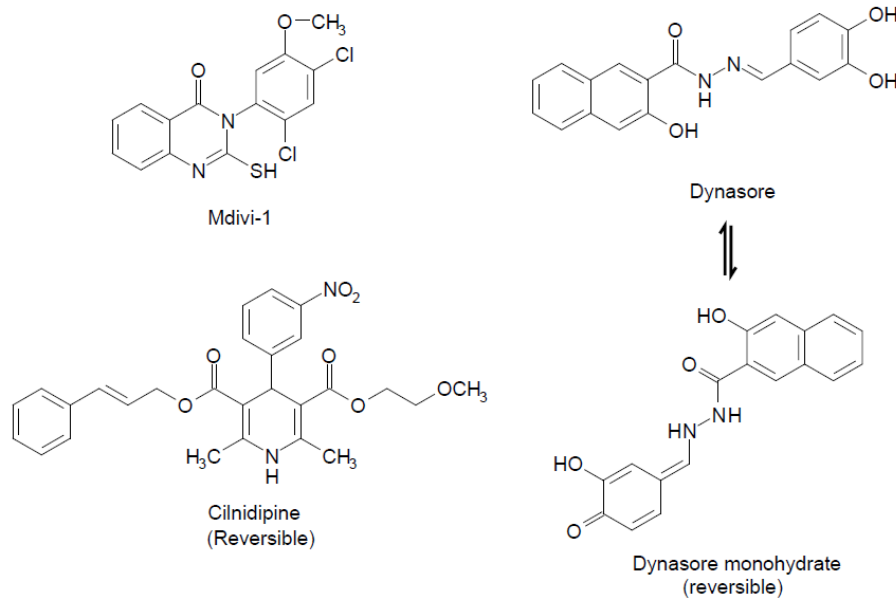


Fig. 4-8. Structure formula of Mdivi-1, cilnidipine, Dynasore

我々は、Drp1 が活性化する過程に必要な結合タンパク質との相互作用に対してシルニジピンが抑制的に働くのではないかと考え、Drp1 の受容体である Mff との結合を BRET アッセイにより観察した。しかし、Drp1 と Mff との結合親和性に対してシルニジピンは抑制効果を示さなかった。現在、flag タグをつけた Drp1 を細胞に過剰発現させ、低酸素刺激依存的に結合するタンパク質の同定を試みている。今後、低酸素や高血糖などの負荷依存的に Drp1 と結合増加するタンパク質を同定し、そのタン

パク質が Drp1 の活性制御に関わることを示すことができれば、慢性心不全治療の新たな標的タンパク分子の特定にもつながるだろう。

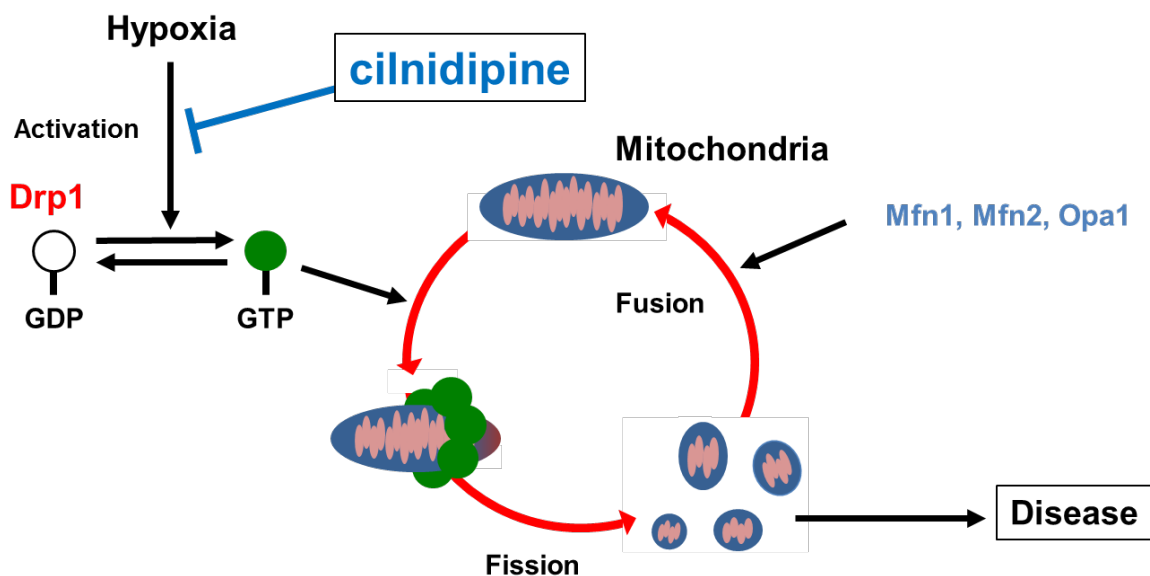


Fig. 4-9. Suppression mechanism of Drp1 activation by cilnidipine

私は本研究により、シルニジピンが Drp1 の活性化によるミトコンドリアの過剰分裂や心筋細胞の老化を抑制するというこれまで知られていなかった新しい作用を有することを明らかにした。また、シルニジピンは、Ca²⁺チャネル阻害作用とは独立したメカニズムを介して心筋梗塞後のマウス心不全を改善することが示唆された。ミトコンドリア分裂制御の異常はアルツハイマーや筋萎縮症などの神経変性疾患、代謝性疾患の一因となることも報告されている。病態時特異的に生じる Drp1 の活性化やミトコンドリア分裂を阻害するシルニジピンは、神経変性疾患や代謝性疾患の治療および予防にも有効である可能性があり、心血管疾患以外の病的への適応拡大を視野に入れた今後の研究展開が強く期待される。

4-5. 参考文献

- [1] D. C. Wallace, Mitochondrial Diseases in man and mouse, *Science* 283 (1999) 1482–1488.
- [2] H. Otera, C. Wang, M. C. Megan, et al, Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells, *J. Cell Biol.*, 191 (2010) 1141–1158.
- [3] A. Olichon, L. Baricault, N. Gas, E. Guillou, et al., Loss of OPA1 perturbs mitochondrial innermembrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 7743–7746.
- [4] H. Chen, S.A. Detmer, A.J. Ewald, et al., Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development, *J. Cell Biol.*, 160 (2003) 189–200.
- [5] T. Gawłowski, J. Suarez, B. Scott, et al., Modulation of dynamin-related protein 1 (DRP1) function by increased O-linked- β -N-acetylglucosamine modification (O-GlcNAc) in cardiac myocytes, *J. Biol. Chem.*, 287 (2012) 30024–30034.
- [6] D.H. Cho, T. Nakamura, J. Fang, et al., S-Nitrosylation of Drp1 mediates β -amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury, *Science* 324 (2009) 102–105.
- [7] H. Ashrafian, L. Docherty, V. Leo, et al., Mutation in the mitochondrial Fission Gene Dnm1l leads to cardiomyopathy, *PLoS Genetics*, 6 (2010) e1001000.
- [8] S. B. Ong, S. Subrayan, S. Y. Lim, et al., Inhibiting mitochondrial fission protects the heart against ischemia/reperfusion injury, *Circulation* 121 (2010) 2012–2022.
- [9] Q. Hu, X. Wang, J. Lee, et al., Profound bioenergetic abnormalities in

- peri-infarct myocardial regions, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 291 (2006) H648–H657
- [10] M. Nishida, T. Sawa, N. Kitajima, et al., Hydrogen sulfide anion regulates redox signaling via electrophile sulfhydration. *Nature Chem. Biol.* 8 (2012) 714–724.
- [11] M. Ino, T. Yoshinaga, M. Wakamori, et al., Functional disorders of the sympathetic nervous system in mice lacking the $\alpha 1B$ subunit ($Ca_v 2.2$) of N-type calcium channels, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 5323–5328.
- [12] Y. Mori, M. Nishida, S. Shimizu, et al., Ca^{2+} channel $\alpha 1B$ subunit ($Ca_v 2.2$) knockout mouse reveals a predominant role of N-type channels in the sympathetic regulation of the circulatory system, *Trends Cardiovasc. Med.* 12 (2002) 270–275.
- [13] T. Gawlowski, J. Suarez, B Scott, et al., Modulation of dynamin-related protein 1 (DRP1) function by increased O-linked- β -N-acetylglucosamine modification (O-GlcNAc) in cardiac myocytes, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 30024–30034.
- [14] N. Taguchi, N. Ishihara, A. Jofuku, et al., Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 11521–11529.
- [15] J. T. Cribbs, S. Strack, Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death, *EMBO Rep.* 8 (2007) 939–944.
- [16] Y. Kurishita, T. Kohira, A. Ojida, et al., Organelle-localizable fluorescent chemosensors for site-specific multicolor imaging of nucleoside polyphosphate dynamics in living cells, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 18779–18789.

- [17] G. R. Budinger, J. Duranteau, N.S. Chandel, et al., Hibernation during hypoxia in cardiomyocytes. Role of mitochondria as the O₂ sensor, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 3320–3326.
- [18] F. Di Lisa, P. Bemardi, Mitochondrial function and myocardial aging. A critical analysis of the role of permeability transition, *Cardiovasc. Res.* 66 (2005) 222–232.

第5章. 総括

本研究により, Ang II の持続投与による高血圧マウスにおいて, 血管内皮細胞に発現している N 型 Ca^{2+} チャネルは, ATP などのアゴニストによる ROS 産生や酸化ストレス由来の内皮機能不全に直接関与していることを明らかにすることができた. そして, Ang II により誘発される内皮機能不全に対して, シルニジピンが N 型 Ca^{2+} チャネル阻害作用を介して, 血管内皮保護効果をもつことが示された.

また, 心筋梗塞後の梗塞周辺領域におけるマウス心筋細胞の早期老化は, Drp1 の活性化とその後のミトコンドリア分裂が寄与しており, ミトコンドリア分裂を促進する Drp1 の活性化抑制が, 心筋老化の予防につながる可能性が示された. そして, シルニジピンが Drp1 の活性化抑制を介して心筋の老化を抑制し, 心筋梗塞後の心不全を改善する可能性が示された.

さらには, 高血圧治療薬であるシルニジピンが, 従来作用である L 型 Ca^{2+} チャネル阻害とは異なる作用機序により, 高血圧症以外, 心不全や神経変性疾患の治療薬となり得る可能性が示された.

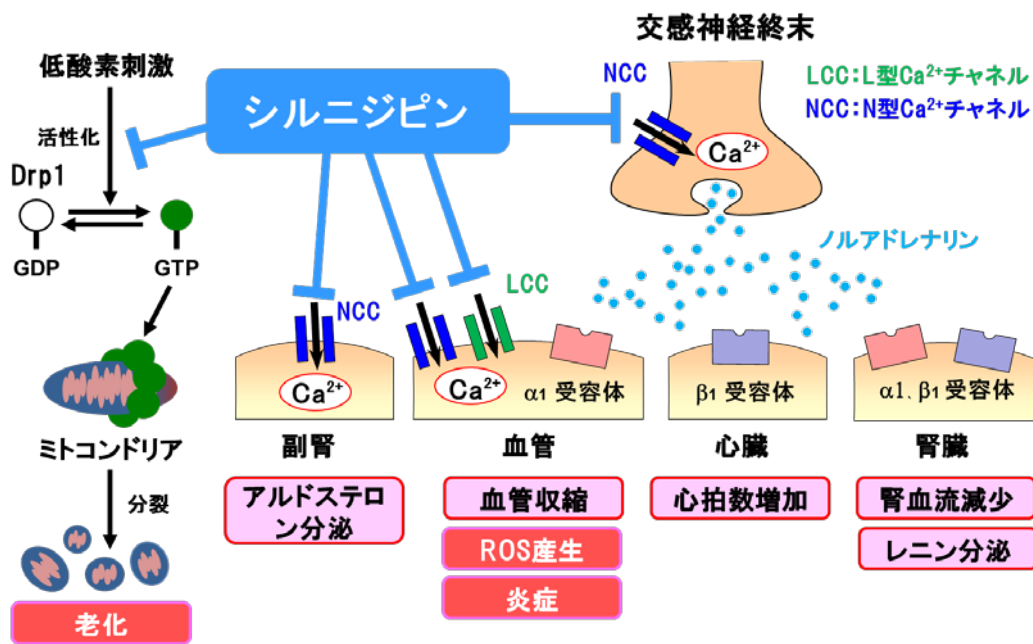


Fig. 5-1. Effect of cilnidipine

第6章. 論文目録

1. Voltage-dependent N-type Ca^{2+} channels in endothelial cells contribute to oxidative stress-related endothelial dysfunction induced by angiotensin II in mice

(内皮細胞電位依存性 N 型 Ca^{2+} チャネルのマウスにおけるアンジオテンシン II 誘発酸化ストレス由来内皮機能不全に対する影響について)

Motohiro Nishida*, Tatsuya Ishikawa*, Shota Saiki, Caroline Sunggip, Shizuka Aritomi, Eri Harada, Koichiro Kuwahara, Katsuya Hirano, Yasuo Mori and Shokei Kim-Mitsuyama

(* Contributed equally to this work)

Biochemical and Biophysical Research Communications, 434 (2013) 210–216

2. Drp1 阻害剤

西田基宏, 石川達也

特願 2014-236941 (出願日: 平成 26 年 11 月 21 日)

西田基宏, 石川達也

国際出願 PCT/JP2015/082688 (出願日: 平成 27 年 11 月 20 日)

第7章. 謝辞

本研究を遂行し論文をまとめるにあたり、終始多くのご指導とご支援を賜り、また、博士課程進学への機会と導きを賜りました、九州大学大学院 薬学研究院 創薬育薬研究施設統括室、自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター（生理学研究所） 心循環シグナル研究部門 西田基宏教授に深く感謝し、厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、実験動物の御提供と有益な御助言を賜りました京都大学大学院 工学研究科 合成・生物化学専攻 生物科学講座 分子生物科学分野 森泰生教授に深く感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、多大なご支援を頂きました岡崎統合バイオサイエンスセンター心循環シグナル研究部門の皆様にご心から感謝申し上げます。

本研究に対し、ご協力とご助言を頂きました味の素株式会社 我妻広貴博士、有冨静博士、原田英里修士、杉野多美氏、川上麻衣氏に感謝申し上げます。

本研究の機会を与えて下さいました味の素株式会社、味の素製薬株式会社の方々に感謝申し上げます。