

学 位 論 文 要 約

Pretreatment with cilnidipine attenuates hypoxia/reoxygenation injury in HL-1 cardiomyocytes through enhanced NO production and action potential shortening
(シルニジピン前投与は、NO合成の促進及び活動電位短縮により、HL-1細胞における低酸素再酸素化障害を軽減する)

(著者：湊弘之、久留一郎、倉田康孝、野津智美、仲宗根眞恵、二宮治明、浜田紀宏、友森匠也、岡村昌宏、三明淳一朗、経遠智一、白吉安昭、遠藤涼、大槻明広、岡田太、稲垣喜三)

令和2年 Hypertension Research 43巻 380頁～388頁

虚血に陥った組織が再灌流されると、虚血再灌流障害として知られる組織障害を引き起こす。また、先行する虚血が組織に次の虚血再灌流障害に対する耐性を誘導することは、虚血プレコンディショニング作用として知られている。一酸化窒素 (NO) は、虚血プレコンディショニング作用のメディエーターとして重要な作用を有する。先行研究で、長時間作用型Caチャンネル阻害薬シルニジピンが、血管内皮細胞で内皮型NO合成酵素 (eNOS) のリン酸化を増強しNO合成を促すという報告があるが、その機序や心筋細胞での効果は不明である。本研究では、心房筋HL-1細胞を用いて、シルニジピンによる低酸素再酸素化障害 (H/R) の抑制の効果とその機序を検討した。

方 法

HL-1培養心房筋細胞並びにH9C2培養心室筋細胞を用いて、シルニジピンによるeNOSリン酸化の発現をウエスタンブロット法で、シルニジピン、NO供与体であるSNAP、NOS阻害薬であるL-NAMEによるNO合成能をNO測定キットを使用した蛍光法で、それぞれ測定した。また、シルニジピンとSNAP、L-NAME、キサンチン酸化還元酵素阻害薬topiroxostatの低酸素前投与によるH/R抑制効果 (薬理的プレコンディショニング効果) を検討するため、トリパンプルー法による細胞数カウントおよびフローサイトメトリーによるアポトーシス評価を実施した。活動電位持続時間 (ADP) は、パッチクランプ法を用いて評価された。HL-1細胞の低酸素再酸素化前後の活動電位持続時間と細胞内Ca濃度を、ヒト心房筋の数理モデルを用いてシミュレーションした。

結 果

シルニジピン (100nmol/L) によるHL-1細胞のeNOSリン酸化とNO合成の有意な増加は、eNOSノックダウンとHSP90阻害薬により抑制された。シルニジピン前投与とSNAP前投与、topiroxostat投与は、H/Rによる細胞死を有意に減少させ、シルニジピン前投与により発現した効果は、L-NAME投与で抑制された。同様の効果は、H9C2細胞でも確認された。HL-1細胞死は、フローサイトメトリーの結果からアポトーシスの抑制に関連していた。また、シルニジピン前投与で発現した効果は、H/R中のシルニジピン投与や細胞外高Ca条件下で有意な差は認められなかった。パッチクランプ法から、シルニジピン投与はAPDを短縮し、H/RはAPDをさらに短縮することが示された。L-NAME投与により、H/RでのAPD短縮は抑制された。シルニジピン投与によるNO依存的なAPDの短縮により、細胞内Ca濃度が低下することが、数理モデルから予測された。

考 察

本研究は、シルニジピン投与によるHL-1細胞のeNOSリン酸化とNO合成の増加は、eNOSノックダウンとHsp90阻害薬によって抑制されることを明らかにした。eNOSリン酸化の機序には、カベオリン1とHsp90の関与が示唆されており、今回の結果は、それを心筋細胞でも支持した。また、シルニジピン前投与やSNAP投与は、H/R後の細胞死を抑制したが、その効果はL-NAME投与によって抑制された。一方で、H/R前及び中のシルニジピン投与はH/R後の細胞死抑制を増強しないことから、シルニジピンによる薬理的プレコンディショニング作用によることが示唆された。NOは薬理的プレコンディショニングのメディエーターの一つであるため、今回のプレコンディショニング効果は、シルニジピン前投与によるNO合成の増加によって創出されていると考えられた。虚血再灌流後の細胞障害には、細胞内Ca過負荷が重要である。しかし、本研究では細胞外高Ca条件でもH/R後細胞死に差がなかったため、シルニジピンのL型Caチャネルの直接阻害作用以外の効果が推定された。シルニジピン投与やH/Rで増強したAPD短縮がL-NAME投与で相殺され、このNOに依存するL型Caチャネルの阻害が細胞内Ca増加を抑制することで、H/R後細胞死を抑制することが数理モデルで予想された。本研究は、シルニジピン投与がHsp90を活性化させて、eNOSリン酸化とNO合成を増強し、APDを短縮することで、細胞内Ca過負荷を減弱し、H/R障害から細胞を保護することを証明した最初の研究となった。

結 論

シルニジピン前投与は、Hsp90を活性化させ、eNOSリン酸化とNO合成を増強し、APDを短縮することで、細胞内Ca過負荷を減弱し、H/R障害からHL-1細胞を保護する。