九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

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

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

創薬産学官連携講座　3PS13019G　石川　達也

【序論】

医薬品の研究には，これまでにない新しい薬を生み出す創薬研究と既存薬の安全性や有効性の検証やライフサイクルマネジメントの一環として行わる育薬研究がある．後者については，近年，既存薬を全く別の疾患に対する治療薬として開発するドラッグ・リポジショニングの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．

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 Ca^{2+}チャネルだけでなく交感神経終末の N 型 Ca^{2+}チャネルを抑制し，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長時間作用型 Ca^{2+}拮抗薬として知られている．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おり，高血圧以外の疾患に対する治療薬として適応拡大の可能性が示されている．しかしながら，アルブミン尿抑制を示す臓器保護作用のメカニズムは不明である．

そこで，シルニジピンの高血圧症以外の疾患への適応拡大を視野に入れ，高血圧症および高血圧症以外の疾患モデルマウスを用いて，臓器障害の進展抑制作用メカニズムの解析を行った．

【実験方法】

<u>高血圧モデルの作成および内皮機能の測定</u>

8 週齢のオスの $Ca_v2.2$ 欠損マウス，同腹の野生型(WT)マウスに，シルニジピン，アムロジピン，100% polyethylene glycol を充填した浸透圧ポンプを腹腔内に埋め込み，3 日後に Angiotensin (Ang) II を充填した浸透圧ポンプを埋め込み、4 週間持続投与し高血圧モデルを作成した．内皮機能は，2mm 長のリングに切断した下行胸部大動脈を KCl で事前に収縮させ，acetylcholine (ACh) に対する弛緩反応度により決定した．

<u>酸化ストレスマーカーの評価と ROS 産生および細胞内 Ca^{2+}濃度の測定</u>

大動脈切片標本を anti-8-OH-dG 抗体で染色し Alexa Fluor 546 anti-mouse IgG 抗体により可視化し，共焦点顕微鏡法により定量評価した．ROS 産生は，Bovine aortic endothelial cells (BAECs) に対し，受容体刺激を行う 10 分前に dihydroethidium (DHE)を加え，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て検出することで評価した．細胞内 Ca^{2+}濃度は，fura-2 蛍光法により測定した．

<u>心筋梗塞モデルの作成と心機能の測定</u>

6 週齢のオスの C57BL/6J マウス，Ca_v 2.2 欠損マウス，同腹の WT マウスに対し，冠動脈の左前下行枝を絹縫合糸にて結紮することで心筋梗塞モデルを作成した．心筋梗塞施術を実施した 1 日後に，生理食塩水またはシルニジピンを充填した浸透圧ポンプを腹腔内に埋め込み，4 週間の持続

的投与を行った．心機能は，心エコー法および左心室カテーテル法により評価した．

ミトコンドリアの形態，ROS 産生量，老化関連β-gal 活性の測定

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 を用いて染色した後，共焦点レーザ走査型顕微鏡により観察した．ミトコンドリアからの ROS 産生量は，ラット新生児心筋細胞(NRCM)に MitoSOX を添加し，10 分間インキュベートさせた後，染色された細胞を，共焦点レーザ走査型顕微鏡により観察することで評価した．細胞老化は，NRCM を Fixative Solution 処理により固定し，PBS で洗浄後，β-galactosidase staining solution を加え，37℃で一晩インキュベートした．インキュベート後の細胞を，正立顕微鏡により観察し，SA-β-gal 活性が高い青色陽性細胞数の割合を調べた．

【結果】

1. シルニジピンの N 型 Ca^{2+}チャネル阻害による Ang II 誘発性血管内皮障害の抑制

1-1. Ang II 誘発酸化ストレス由来内皮機能不全における N 型 Ca^{2+}チャネルの関与

Ang II の持続投与により血圧が上昇した WT マウスにおいて，胸部大動脈の ACh による内皮依存的血管弛緩能に低下が認められ，8-OH-dG の発現が上昇した．Ca_v 2.2 欠損マウスにおいては，Ang II 由来の内皮機能不全が有意に減弱し，8-OH-dG の蓄積も有意に減少していた(Fig. 1)．以上より、Ang II は N 型 Ca^{2+}チャネル依存的に血管の酸化ストレスの増大や内皮機能不全を誘導することが示唆された．

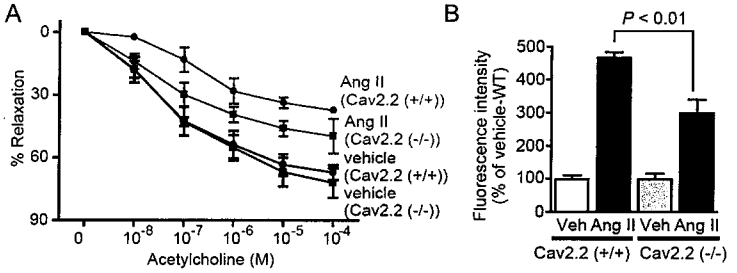


Fig. 1. (A) Dose-dependent relaxation induced by ACh in WT (Ca_v 2.2 (+/+)) and Ca_v 2.2-deficient (Ca_v 2.2 (–/–)) mice with or without Ang II. $n = 6$. (B) Average fluorescence intensities of the 8-OH-dG images.

1-2. Ang II 誘発内皮機能不全に対するシルニジピンの阻害作用

Ang II 慢性投与は WT マウス胸部大動脈血管において，Ach 刺激による内皮依存的弛緩能を低下させた．シルニジピンとアムロジピン処置はいずれも内皮障害を減弱させたものの，保護効果の程度はシルニジピンの方が大きかった(Fig. 2A)．このシルニジピンの強い内皮保護効果は，Ca_v 2.2 欠損マウスにおいて，完全に消失した(Fig. 2B)．シルニジピンとアムロジピンはいずれも Ang II による 8-OH-dG の発現を有意に抑制したものの，抑制の程度はシルニジピンの方が大きかった．シルニジピンの強い阻害効果は，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 Ca^{2+}チャネル阻害を介して，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．

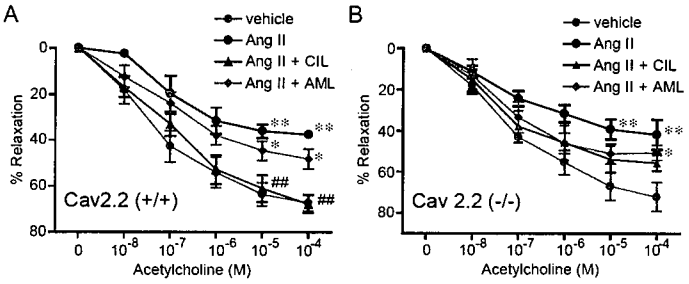


Fig. 2. (A, B) Relaxation of the thoracic aorta induced by ACh in Ca_v 2.2 (+/+) mice (A) and Ca_v 2.2 (–/–) mice (B). An osmotic pump containing cilnidipine (CIL) or amlodipine (AML) was implanted. $^{*}P < 0.05$ and $^{**}P < 0.01$ *versus* vehicle group, $^{\#\#}P < 0.01$ *versus* Ang II group.

1-3. 内皮細胞でのアゴニスト誘発性 ROS 産生における N 型 Ca^{2+}チャネルの役割

BAECs に ATP を作用させたところ，細胞内 Ca^{2+}濃度上昇と同時に，ROS 産生の顕著な増加が認められた．N 型 Ca^{2+}チャネルを選択的に阻害するω-conotoxin(ωCTx)-GVIA を作用させると，ATP 由来の ROS 産生や細胞内 Ca^{2+}濃度の持続的な上昇は抑制された(Fig. 3)．これらの結果より，N 型 Ca^{2+}チャネルは血管内皮細胞において，細胞内 Ca^{2+}濃度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．

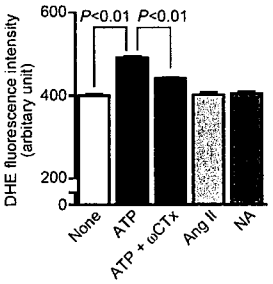


Fig. 3. Average increases in DHE fluorescence intensities.

2. シルニジピンのミトコンドリア GTP 結合タンパク質 Drp1 重合阻害による心不全改善効果

2-1. Drp1 誘導ミトコンドリア分裂を介した心筋老化

心筋梗塞モデルの心筋切片において，梗塞部だけでなく梗塞周辺領域において心筋の老化が認められ，電子顕微鏡によりミトコンドリアの過剰分裂が観測された．また，梗塞周辺領域では，GTP が結合した活性型の Drp1 が有意に増加しており(Fig. 4A)，Mfn1，Mfn2 および Opa1 タンパク発現量は変化していないことが分かった．これらから、心筋の老化誘導の前段階に Drp1 の活性化とそれによるミトコンドリア分裂が寄与していることが示唆された．さらに，NRCM を低酸素刺激に引き続き再酸素化刺激を行ったところ，低酸素によりミトコンドリア分裂，Drp1 の活性化が、再酸素化により老化の促進が認められた．この細胞老化はミトコンドリア分裂抑制作用を持つ Mdivi-1 で抑制された(Fig. 4B)．これらから，ミトコンドリア分裂を抑制，つまり Drp1 活性化を抑制することが心筋老化の予防になることが示唆された．

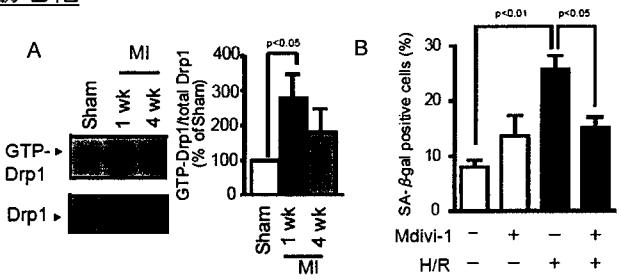


Fig. 4. (A) Activation of Drp1 in peri-infarcted myocardium 1week and 4 weeks after MI. (B) Western blotting analysis of mitofusion protein (Mfn1, Mfn2, and Opa1) (C) Activation of Drp1 induced by H and H/R. (D) Effects of Mdivi-1on H/R-induced cardiomyocyte senescence.

2-2. シルニジピンは NRCM における Drp1 を介したエネルギー代謝異常を阻害する

Drp1 が活性化しミトコンドリア分裂が起こることで、ATP 消費量が低下し、細胞へ ATP が蓄積することから，ATP 蓄積を指標として既承認薬のスクリーニングを行ったところ，シルニジピンのみ低酸素刺激後の再酸素化における ATP 蓄積を抑制した．この作用を NRCM にて検証したところ，低酸素刺激後の再酸素化によるミトコンドリア分裂および心筋細胞老化をシルニジピンは抑制することが分かった(Fig.5)．これらの結果より，Drp1 介したミトコンドリア分裂阻害は，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強く示唆された．

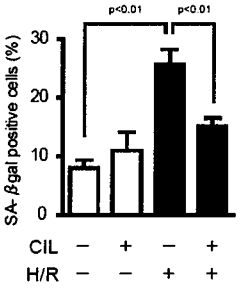


Fig. 5. Effect of cilnidipine on H/R-induced and senescence in NRCMs.

2-3. 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

シルニジピンが Drp1 の活性化を阻害し，心筋梗塞後の心不全に有効か確認した．心筋梗塞モデルに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．WT マウスと $Ca_v2.2$ 欠損マウスでは，心筋梗塞後の生存率は同等であったことから，シルニジピンによる心不全の改善効果は，N 型 Ca^{2+}チャネル阻害を介さないことが示唆された．また，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．これらの結果は，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．

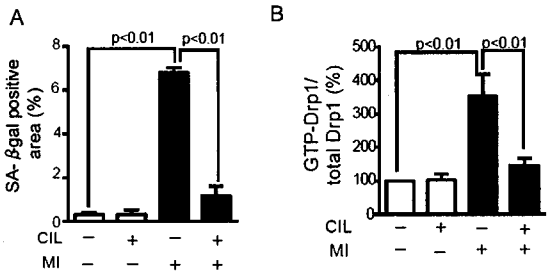
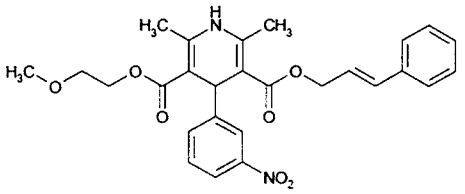


Fig. 6. (A) The quantification of SA-β-gal positive area. (B) Effect of cilnidipine on activation of Drp1 in the peri-infarcted myocardium 1 week after MI.

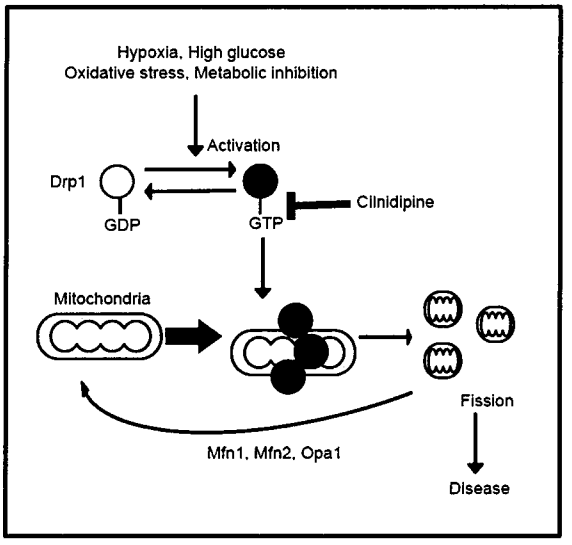
【考察】

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+} チャネルが 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した．また，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作用を示すことも明らかにした．



Cilnidipine

一方，心筋梗塞後の慢性心不全モデルでは，梗塞周辺領域において低酸素シグナルに伴って Drp1 が活性化しミトコンドリア分裂に依存した心筋細胞老化が誘導されていた．さらに，シルニジピンはジヒドロピリジン骨格に由来する L/N 型 Ca^{2+}チャネル阻害作用とは全く異なる機序で Drp1 の活性化を抑制し，心筋梗塞後の心筋早期老化および心機能不全を抑制することを見出した．



ミトコンドリア品質管理異常は高血圧や糖尿病といった生活習慣病だけでなく，糖尿病性心筋症やミトコンドンドリア心筋症など，様々な難治性疾患の標的になることから，今後，シルニジピンの適応拡大を見据えた研究の益々の推進が期待される．

【発表論文】

1. M. Nishida, T. Ishikawa, et al., Biochem Biophys Res Commun. 434(2013) 210-216
2. 西田基宏，石川達也，特願 2014-236941，国際出願 PCT/JP2015/08268