

Pinacidil, a KATP channel opener, stimulates cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger function through the NO/cGMP/PKG signaling pathway in guinea pig cardiac ventricular myocytes

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2021-04-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 井口, 恵介 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/00003823

博士 (医学) 井口 恵介

論文題目

Pinacidil, a KATP channel opener, stimulates cardiac $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger function through the NO/cGMP/PKG signaling pathway in guinea pig cardiac ventricular myocytes

(ATP 感受性カリウムチャネル開口薬であるピナシジルはモルモット心筋において NO/ cGMP/ PKG 細胞内伝達経路を介して $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体機能を増強する)

論文の内容の要旨

[はじめに]

ピナシジルは非特異的 ATP 感受性 K^+ (KATP)チャネル開口作用を有する薬物であり、降圧作用の他に虚血再灌流障害や心室性不整脈を抑制し心保護作用を有する。先行研究により、ピナシジルは犬やウサギの心臓においてウアバイン誘発性の遅延後脱分極を抑制し (Spinelli et al, 1991; Carlsson et al, 1992)、また遅延後脱分極の発生には $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体電流 (INCX) の関与が示唆されている (Blaustein and Lederer, 1999)。近年、硝酸薬作用と KATP チャネル開口作用を有する狭心症治療薬のニコランジルが、cGMP の産生を増加させて INCX 増強作用を示す報告がされた。しかしながら、様々な KATP チャネル開口薬と INCX との関連性については未だ明らかでない。今回我々は、KATP チャネル開口薬のピナシジルが INCX に与える影響と、その細胞内伝達経路について検討した。

[材料ならびに方法]

本研究は Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health NIH Publication, revised 2011 および浜松医科大学動物実験倫理規定を遵守し、承認を得て遂行した(2017058)。雄モルモットから得た摘出心をコラゲナーゼ処理し単離心室筋細胞を採取した。細胞膜の INCX はホールセルパッチクランプのランプパルス法を用いて記録するとともに、Fura-2/ AM 分析法を用い単離心室筋細胞に Ca^{2+} 蛍光色素である Fura-2/AM (5 $\mu\text{mol}/\text{L}$) を負荷し細胞外液を $[\text{Na}] = 160 \text{ mM}$ から 0 mM に減少させ ARGUS 50 により、NCX の Ca^{2+} 流入モードを介する細胞内 Ca^{2+} 取り込みを測定した。ピナシジルの INCX 増強作用を確認した上で、この細胞内伝達経路の内、KATP チャネル開口作用、NO/ cGMP/ PKG シグナル経路、Reactive Oxygen Species (ROS) 経路に着目して検討した。Nitric oxide synthase (NOS) 阻害剤 (L-NAME: 30 $\mu\text{mol}/\text{L}$)、グアニル酸シクラーゼ阻害剤 (ODQ: 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)、PKG 阻害剤 (KT5823: 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$)、ROS スカベンジャー (MPG: 1 mmol/L)、非選択的 KATP チャネル阻害剤 (グリベンクラミド: 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)、選択的ミトコンドリア KATP チャネル阻害剤 (5-HD: 1 mmol/L) を追加投与し、パッチクランプ法にて INCX を記録するとともに NCX を介した

細胞内 Ca^{2+} 取り込みを評価した。細胞内 nitric oxide (NO) 濃度の変化は蛍光測定法によって評価し、細胞内 cGMP 濃度の変化については ELISA 法を用いて測定した。さらに、INCX の増強作用と NO/ cGMP/ PKG シグナル経路を確認するため、NO ドナーである Sodium nitroprusside (SNP: 1 mmol/L) と phosphodiesterase (PDE)5 阻害薬 (シルデナフィル: 10 $\mu\text{mol/L}$) をピナシジルに追加投与しホールセルパッチクランプ法を用いて INCX の変化を検討した。

[結果]

ピナシジルは 1 $\mu\text{mol/L}$ から 100 $\mu\text{mol/L}$ の範囲でモルモット単離心室筋の INCX を用量依存的に増強し、50% 効果濃度は外向き電流にて 23.5 $\mu\text{mol/L}$ 、内向き電流にて 23.0 $\mu\text{mol/L}$ であった。さらに、外向き INCX 電流に相当する NCX を介した細胞内 Ca^{2+} 取り込みの増強も確認した。ピナシジルによる INCX 増強作用は L-NAME、ODQ、KT5823、グリベンクラミドによって抑制され、5-HD や MPG では抑制されなかった。また、細胞内 NO 濃度はピナシジルにより増加し、その増加効果はグリベンクラミドと L-NAME の投与によりいずれも抑制された。細胞内 cGMP 濃度もまたピナシジルの投与で有意に増加し、ピナシジルによる INCX 増強作用は SNP とシルデナフィルによりさらに増強することを確認した。

[考察]

今回の我々の研究により、(1)ピナシジルが用量依存的に INCX を増強すること、(2)ピナシジルは細胞膜 KATP チャネルを開口し NO/cGMP/PKG 細胞内伝達経路を介して INCX を増強することが明らかになった。

心筋細胞における KATP チャネルは存在部位により細胞膜 KATP チャネルとミトコンドリア KATP チャネルの 2 種あることが報告されている。本研究では、ミトコンドリア KATP チャネルの選択的阻害薬である 5-HD は NCX 増強作用を抑制せず、非特異的 KATP チャネルのグリベンクラミドは抑制したことから、ピナシジルの NCX 増強作用は細胞膜 KATP チャネル開口作用を介することが示唆された。またこれまでの先行研究から、様々な細胞において NCX の増強作用は NO/ cGMP/ PKG 経路の活性化によることが示されているが、ピナシジルの単離心室筋細胞内 NO 濃度の産生や cGMP 濃度の増加は、細胞膜 KATP チャネル阻害剤であるグリベンクラミドにより抑制する事が確認された。これらの結果は、心筋細胞では細胞膜のカベオラなどに存在する KATP チャネルの開口を介して NOS が活性化され NO を産生し、NO/ cGMP/ PKG 経路を介して NCX 機能を促進する経路が存在する可能性を示唆するものであるが、その機序の解明には更なる研究が必要である。

[結論]

モルモット単離心室筋細胞においてピナシジルは細胞膜 KATP チャネルを開口することにより NO を産生し、NO/ cGMP/ PKG 細胞内伝達経路を介して NCX 機能を増強する。