

平成24年7月27日  
第4回徳島大学  
研究者との集い

## ニトロニフェジピンの臓器保護作用

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部  
薬理学分野  
玉置 俊晃

### Nifedipineの臓器保護効果

Ca拮抗薬であるnifedipineは、確実な降圧作用を示す優れた高血圧治療薬として用いられているが、多くの大規模臨床試験において、その著しい心血管イベント抑制効果や臓器保護効果も報告されている。

冠動脈石灰化の抑制、頸動脈内膜中膜の肥厚抑制、および腎機能低下の抑制

<INTACT>1990

冠動脈疾患を合併した高血圧患者において、狭心症の発症を有意に抑制

<JMIC-B>2004

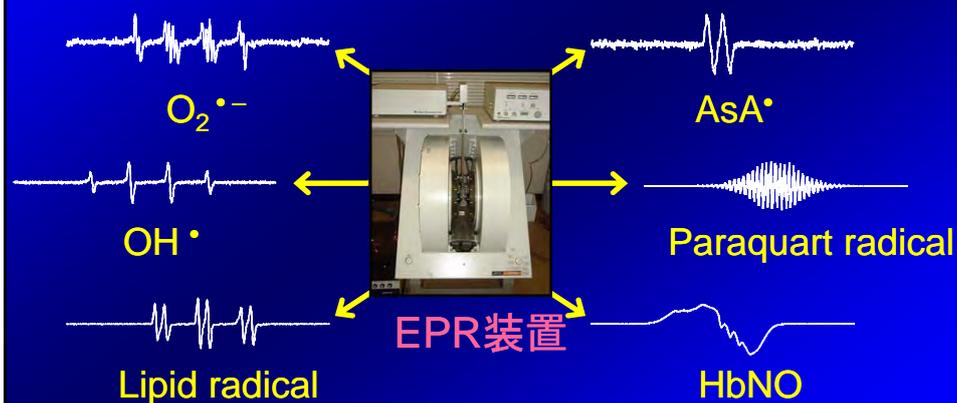
脳・心血管イベントの発現および冠動脈インターベンションの抑制

<ACTION>2004

これらの効果を有することが報告されているが、その作用機序については、不明な点が多い。

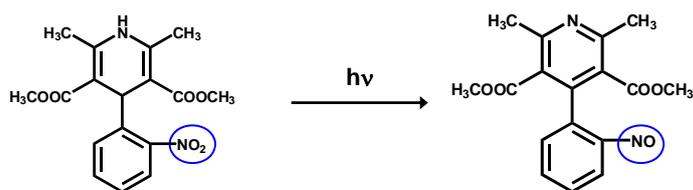
## Electron paramagnetic resonance (EPR)

EPRは、活性酸素種やNO、アスコルビン酸ラジカル(AsA<sup>•</sup>)など、生体内に存在するラジカルの同定・定量に必須のツールである。



Am J Physiol 285(2):H589-96, 2003

## Nifedipineは光照射によって nitrosonifedipineに変化する



Nifedipine



Nitrosonifedipine



Nifedipineは光に不安定な化合物であり、  
光照射によって光分解物 Nitrosonifedipineに変化する。

## Nitrosonifedipine の抗酸化活性

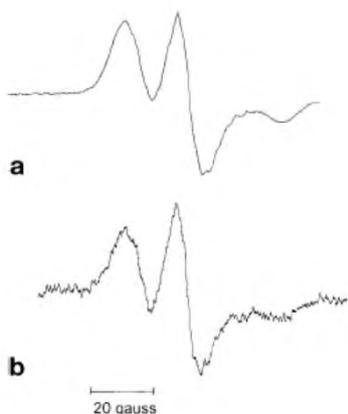
Table 1. Kinetic rate constants for the reaction between 1,4-DHP derivatives with ABAP-derived alkylperoxyl radicals in 0.04 M Britton–Robinson buffer/DMF 70/30 at pH 7.4 and 37 ° C

Compounds	$k, M^{-1} s^{-1}$	$R^2$	$E_p, mV^b$
Amlodipine	1700 ± 30	0.35	725
Isradipine	1760 ± 35	0.36	729
Nitrendipine	1260 ± 20	0.26	757
Nifedipine	1170 ± 25	0.24	766
Nisoldipine	960 ± 50	0.20	681
Furmidipine	1130 ± 20	0.23	741
Nimodipine	1840 ± 70	0.37	736
Nicardipine	1000 ± 20	0.20	770
4-Phenyl-1,4-DHP	2165 ± 57	0.4	715
4- <i>p</i> -Nitrophenyl- <i>N</i> -ethyl-1,4-DHP	340 ± 20	0.07	824
1,4-DHP	11.410 ± 390	2.3	352
4-Methyl-1,4-DHP	3350 ± 80	0.68	640
4,4-Dimethyl-1,4-DHP	<i>n.d.r.</i>	—	861
NPD	11.097	2.3	—
Trolox <sup>c</sup>	4920	1	236

**Table 1 Nitrosonifedipine (□) is 2.3 times more reactive with lipid-derived radical (ABAP) than with trolox(□).**

Yanez C et al. *Bioorg Med Chem.* 2004 May 1;12(9):2459-68.

## Nifedipineはin vivoにおいて酵素的に nitrosonifedipine radicalを生成する



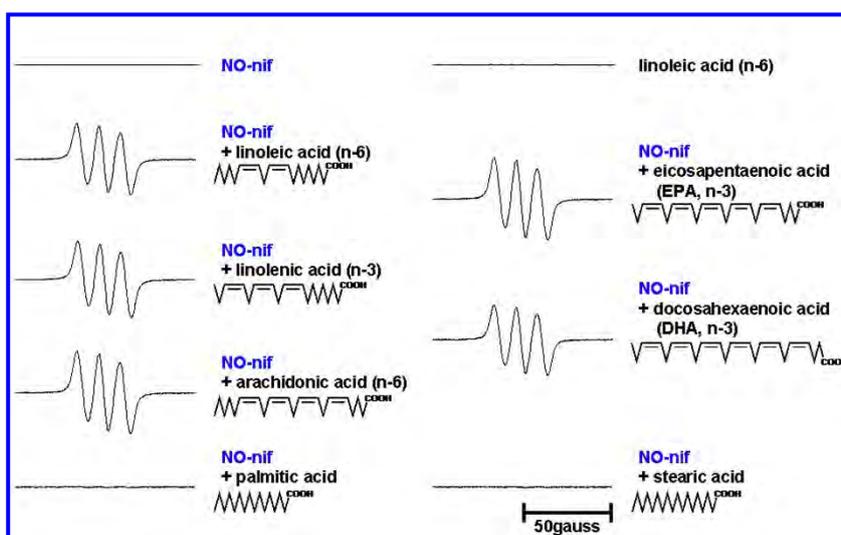
Nifedipine can be enzymatically converted in vivo to its **nitroso analog** without the requirement for illumination.

FIG. 5. X-band EPR spectra of liver tissue exposed to (a) illuminated and (b) nonilluminated nifedipine. Illuminated nifedipine was prepared as described in Fig. 1. Nonilluminated nifedipine solutions were freshly prepared and soaked with liver tissue for 5 min at room temperature in the dark.

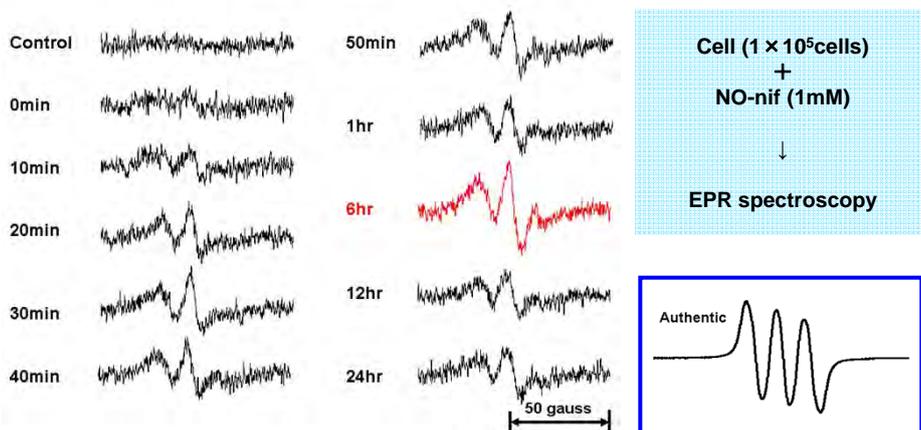
Fujii H et al. *Magnetic Resonance in Medicine.* 42,691-694,1999

Nitrosonifedipine は、  
ラジカル消去作用があるのか??

**Nitrosonifedipineは不飽和脂肪酸と反応して  
nitrosonifedipine radicalを生成する**



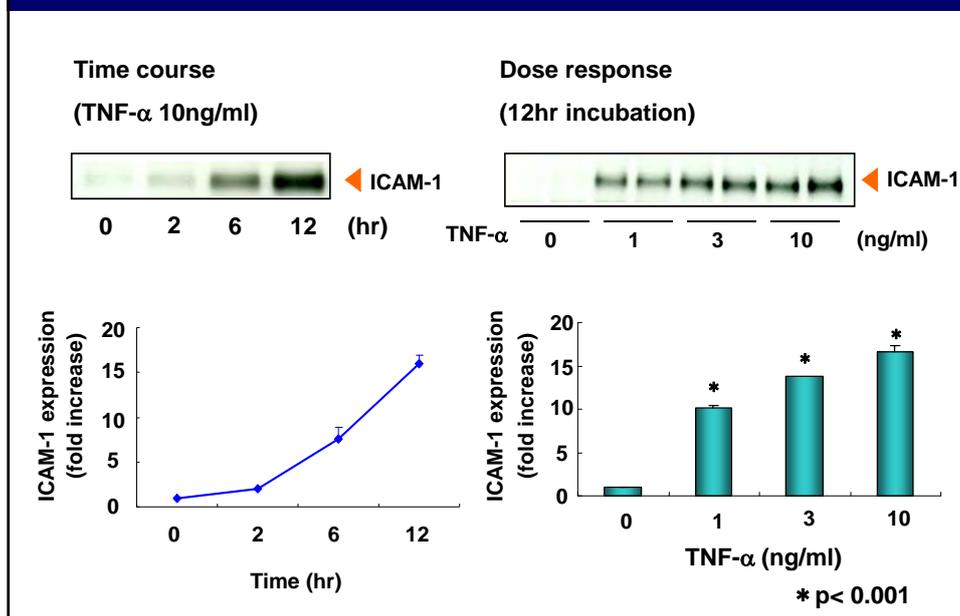
## NitrosonifedipineはHUVECsと反応して nitrosonifedipine radicalを生成する



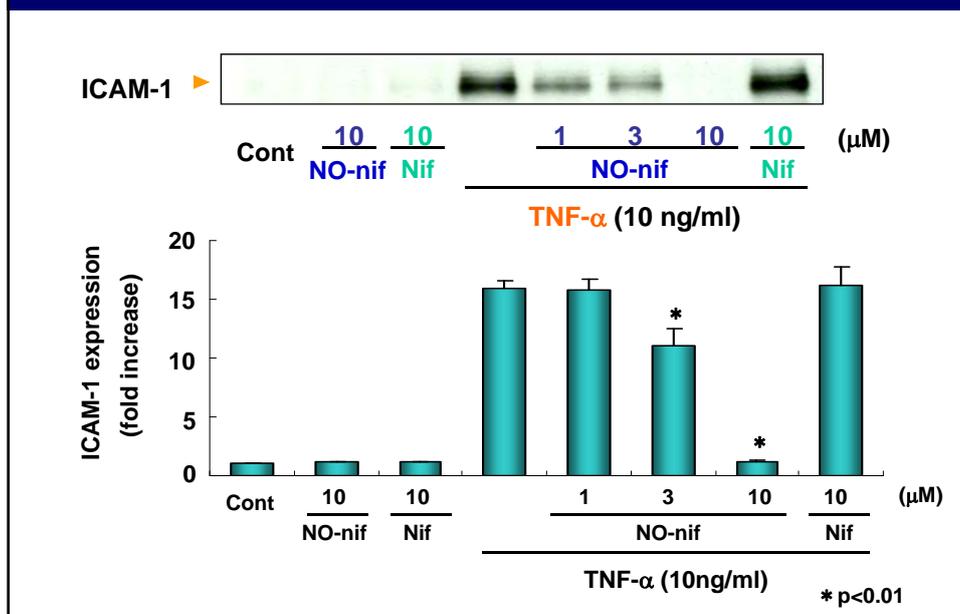
## 目的

Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )による  
腎系球体血管内皮細胞障害に対する  
**nitrosonifedipine**の作用を検討する

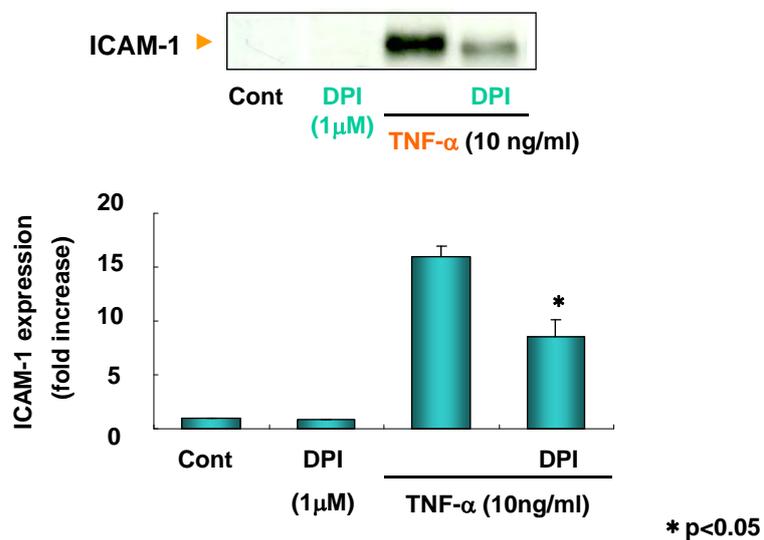
## TNF- $\alpha$ はHGECにおいてICAM-1発現を惹起する



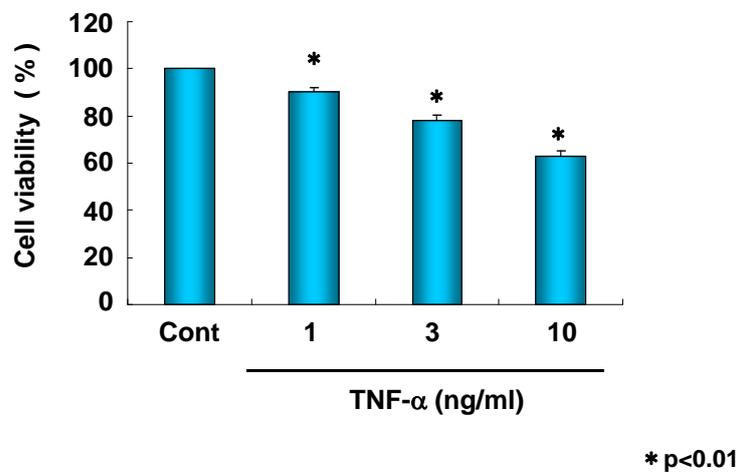
## NitrosonifedipineはTNF- $\alpha$ 刺激によるICAM-1発現の上昇を抑制する



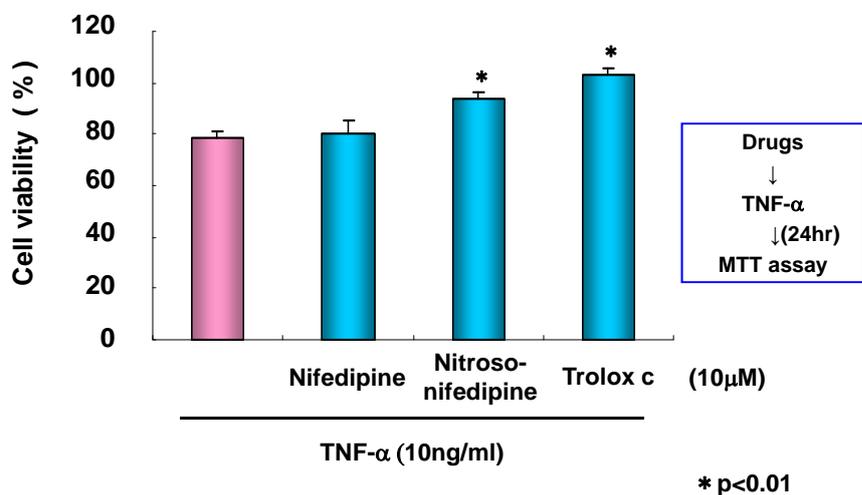
### DPIはTNF- $\alpha$ 刺激による ICAM-1発現の上昇を抑制する



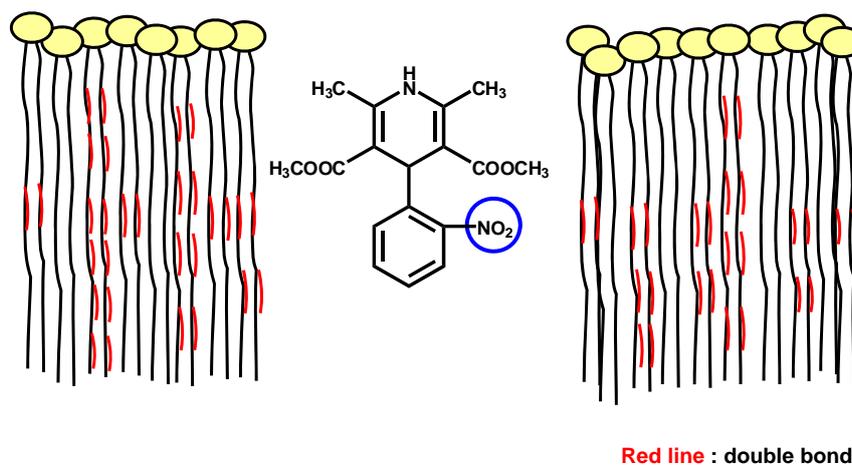
### TNF- $\alpha$ はHGECの細胞生存率を低下させる



### NitrosonifedipineはTNF- $\alpha$ 刺激による 細胞生存率の低下を抑制する

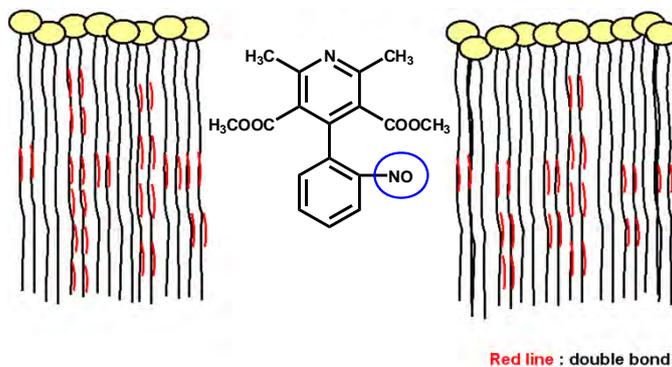


### Nifedipineは細胞膜に作用する



Mason RP et al. *Biochem Pharmacol.* 653-660,1996

## 仮説

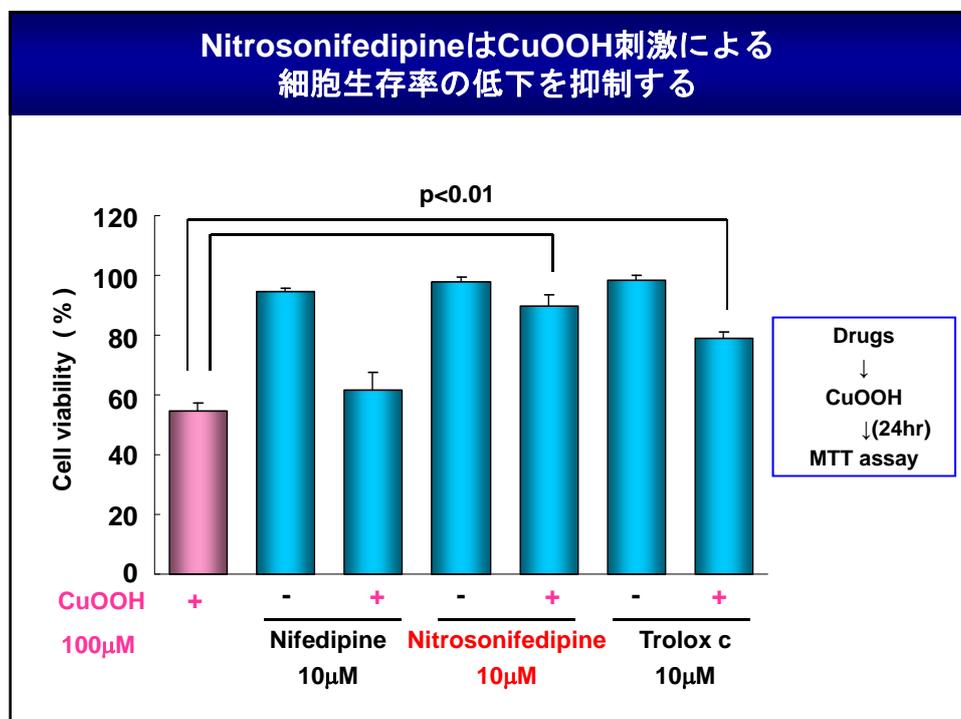
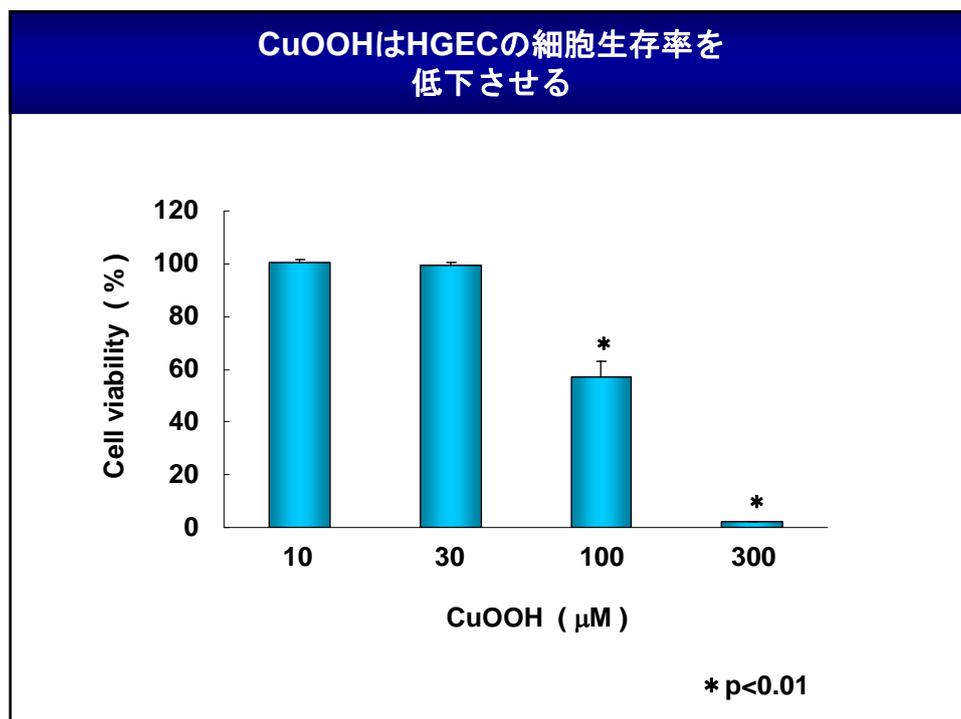


Nitrosonifedipineの細胞保護効果は、リン脂質二重膜の炭素二重結合付近に作用することによって膜の脂質過酸化を抑制し、細胞保護効果を示すのではないかと。(新しい薬のカテゴリー:細胞膜保護薬)

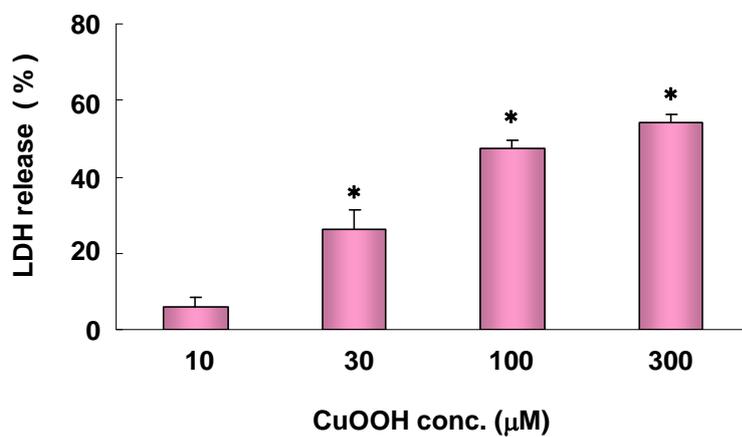
## 目的

Cumene hydroperoxide (CuOOH)による酸化ストレスに対する

**nitrosonifedipine**の血管内皮細胞保護効果を検討する

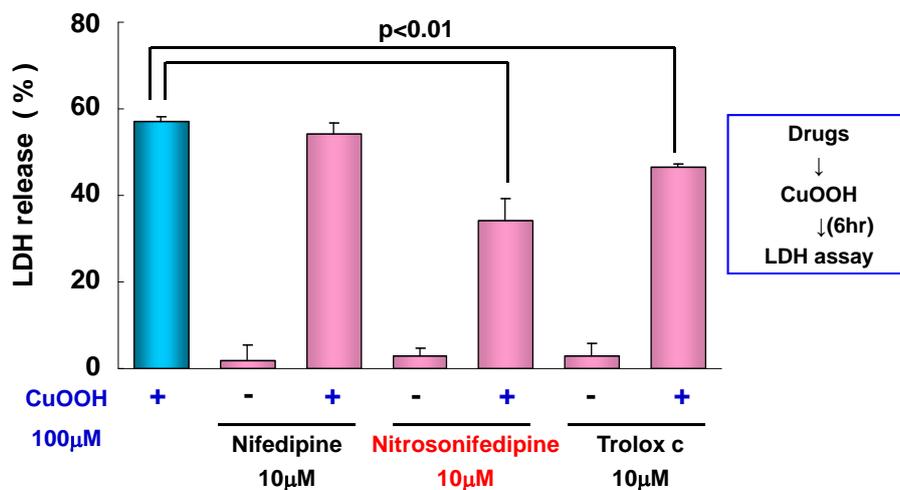


### CuOOHはHGECの細胞障害を惹起する



\* p&lt;0.01

### NitrosonifedipineはCuOOH刺激による細胞障害を抑制する



In vivo でも内皮障害を抑制できるのか？

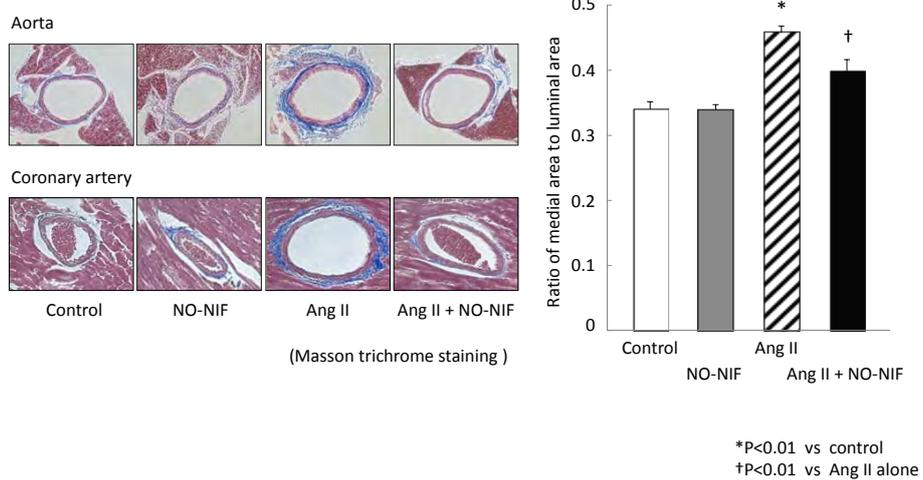
Ang II負荷モデルマウスを用いた検討

## 実験材料と方法

動物: C57BL/6Jマウス

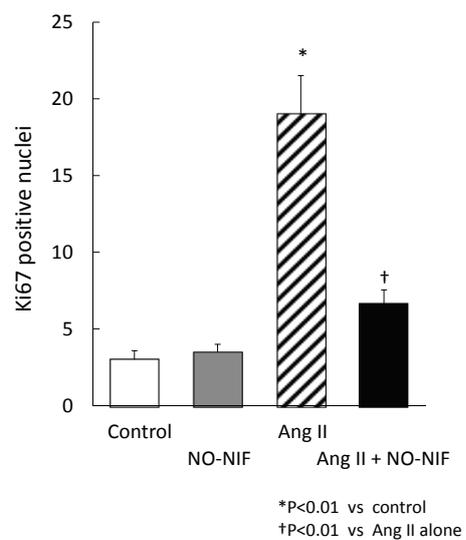
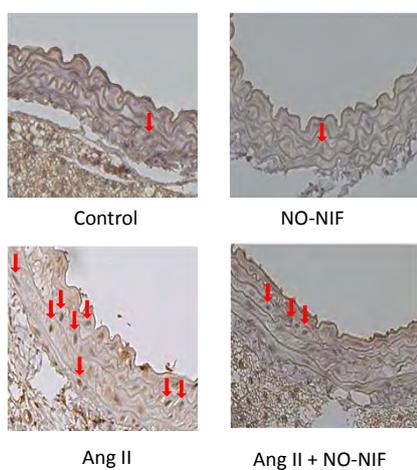
- 血管リモデリング評価 大動脈切片Masson trichrome 染色
- 細胞増殖 Ki67 immunostaining
- 血圧測定 Tail cuff法
- 活性酸素種 (ROS)測定 DHE (dihydroethidium) 染色
- 尿中8-OHdG ELISA法
- mRNA発現測定 Real-time PCR

## NO-NIFはAng IIによる血管中膜肥厚 および線維化を抑制する

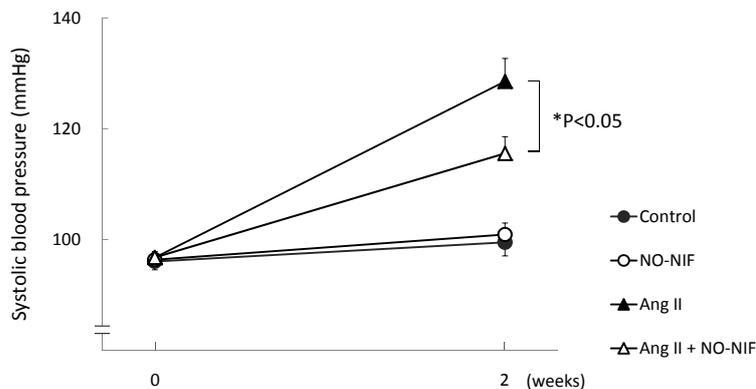


## NO-NIFは大動脈中膜において、 Ang IIによる細胞増殖を抑制する

### Ki67 immunostaining

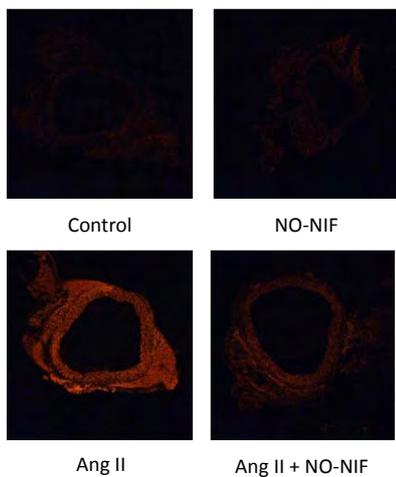


### NO-NIFはAng IIによる血圧上昇を抑制する

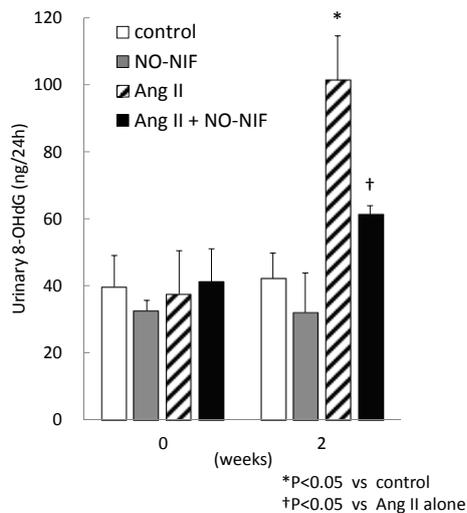


### NO-NIFはAng IIによる大動脈におけるROSおよび尿中8-OHdG排泄量増加を抑制する

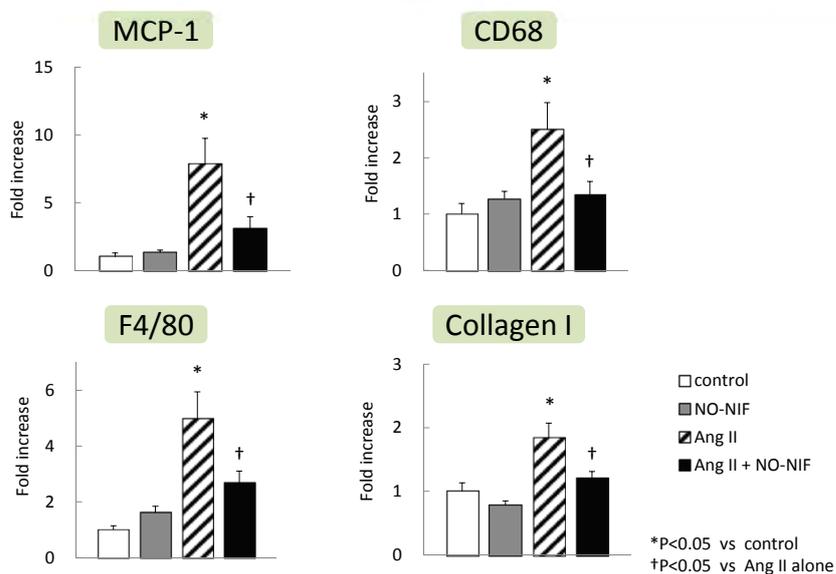
#### ROS



#### Urinary 8-OHdG



## NO-NIFは大動脈において、 血管リモデリングに関わるmRNA発現を抑制する



## 結果

NO-NIFは、Ang II 負荷モデルマウスにおいて

- 血管の線維化や中膜肥厚を抑制した。
- 大動脈中膜における細胞増殖を抑制した。
- 血圧上昇を抑制した。
- 大動脈におけるROSおよび尿中8-OHdG排泄量増加を抑制した。
- CD68, F4/80, MCP-1およびcollagen I mRNA発現上昇を抑制した。

## L-NAME投与モデルラットを用いた NO-NIFの血管内皮機能への影響

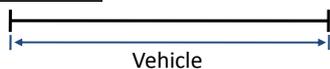
### 実験方法

動物: Sprague-Dawley ラット

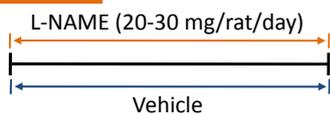
評価項目と方法

Day 0 21

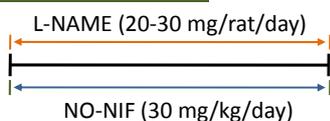
**Control**



**L-NAME**



**L-NAME + NO-NIF**



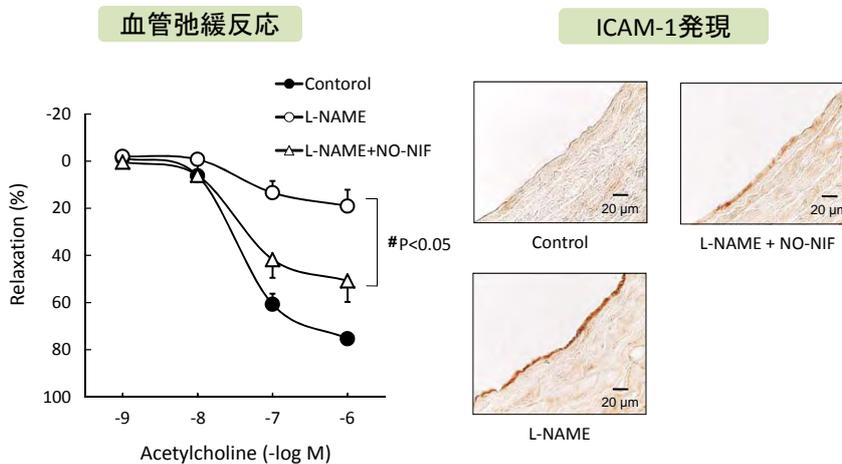
■ **血管弛緩反応**

胸部大動脈標本を用いたマグヌス法

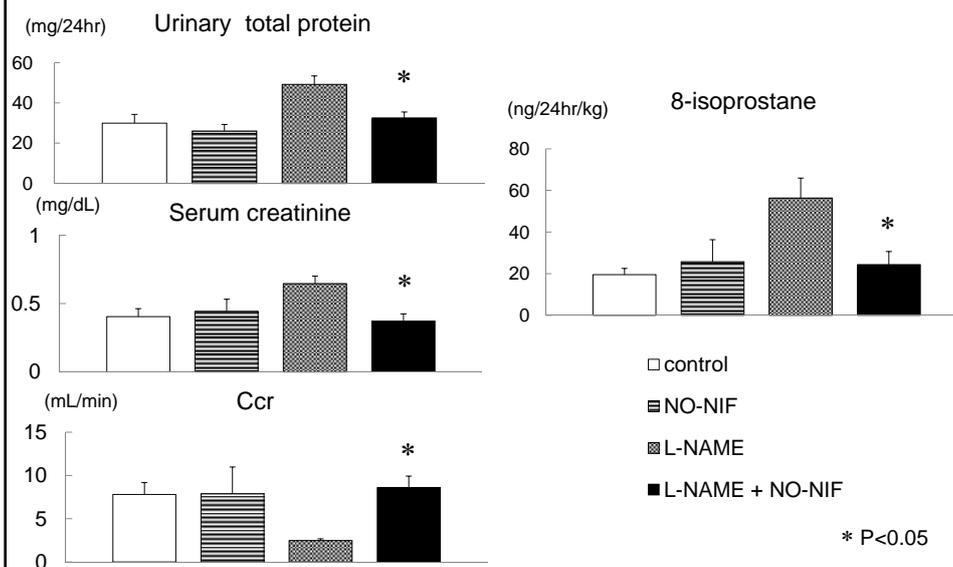
■ **ICAM-1発現**

大動脈切片の組織染色

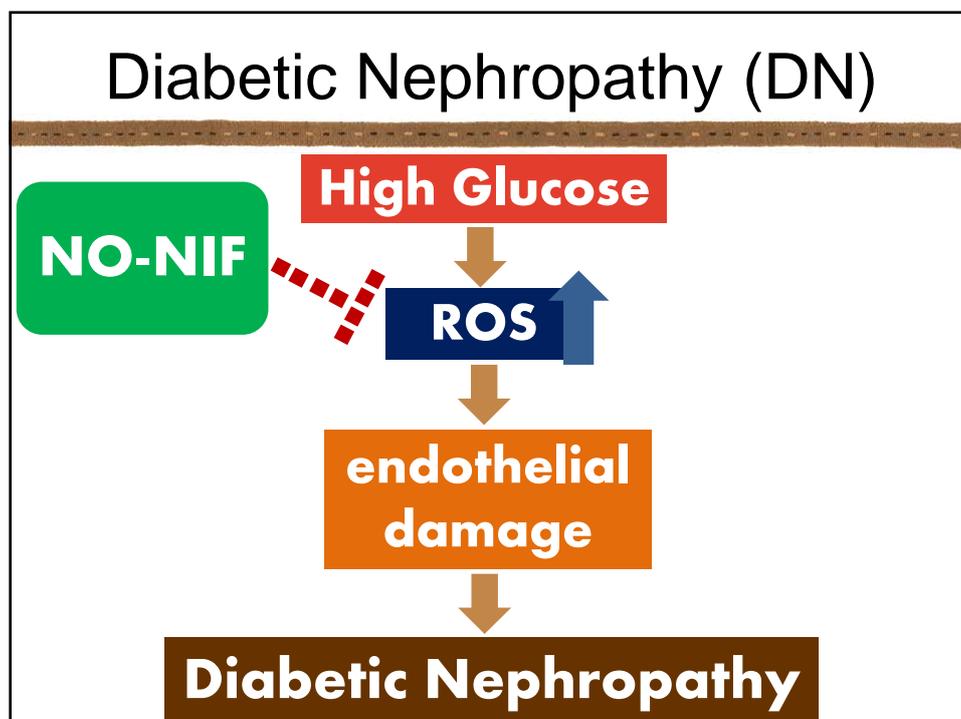
## NO-NIFはL-NAMEによる血管内皮機能障害を改善する



## NO-NIFはL-NAMEモデルラットにおける腎障害・酸化ストレス亢進を抑制する



2型糖尿病モデルマウスにおける  
腎症進展への効果



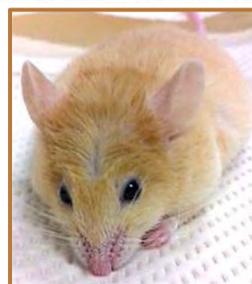
## Material & Methods

- 動物
  - C57BL/6 マウス
  - KKAy マウス
- 血圧測定
  - tail cuff法
- 血糖値測定
  - 自己検査用グルコース測定器
- 糸球体係蹄直径・面積測定
  - PAS染色
- 脂肪細胞肥大評価
  - HE染色
- 尿中タンパク排泄量測定
  - Bradford法
- 尿中アルブミン排泄量測定
- 尿中8-OHdG量測定
- 尿中BUN量測定
- 血清・尿中クレアチニン量測定
- 血清インスリン値測定
  - ELISA法
- 活性酸素種(ROS)測定
  - DHE染色
- mRNA発現測定
  - real time PCR 法

## DM Model Mice

### KKAy mice

- 2型糖尿病モデル
- KK mice × Ay(肥満遺伝子)
- 高血糖、肥満、インスリン抵抗性
- 糖尿病性腎症



KKAy mice developed hyperglycemia, hyperinsulinemia and obesity after 16 weeks, with proteinuria, mesangial matrix accumulation, GBM thickening and tubular dilation. It was considered a good animal model for the early pathology changes of DN.

Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao. 2002 Feb;24(1):71-5.

## Methods

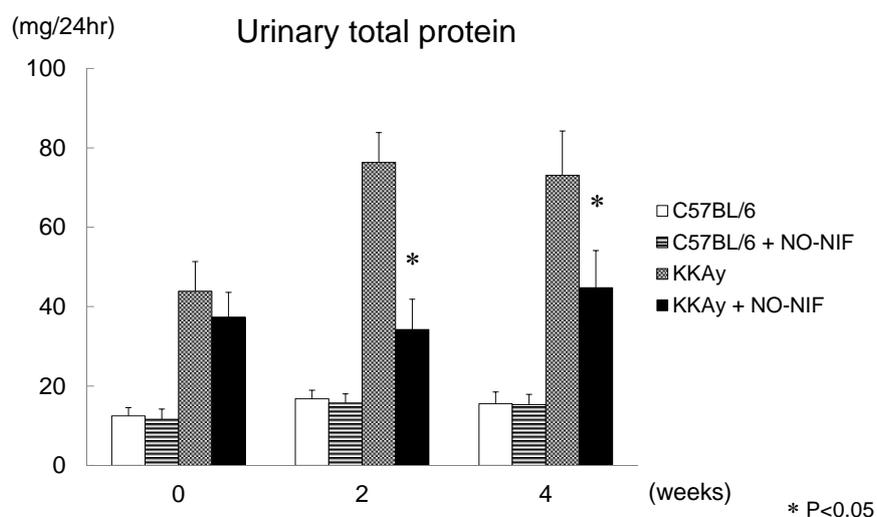
◆ NO-NIF 30 mg/kg/day (4 weeks) i.p.



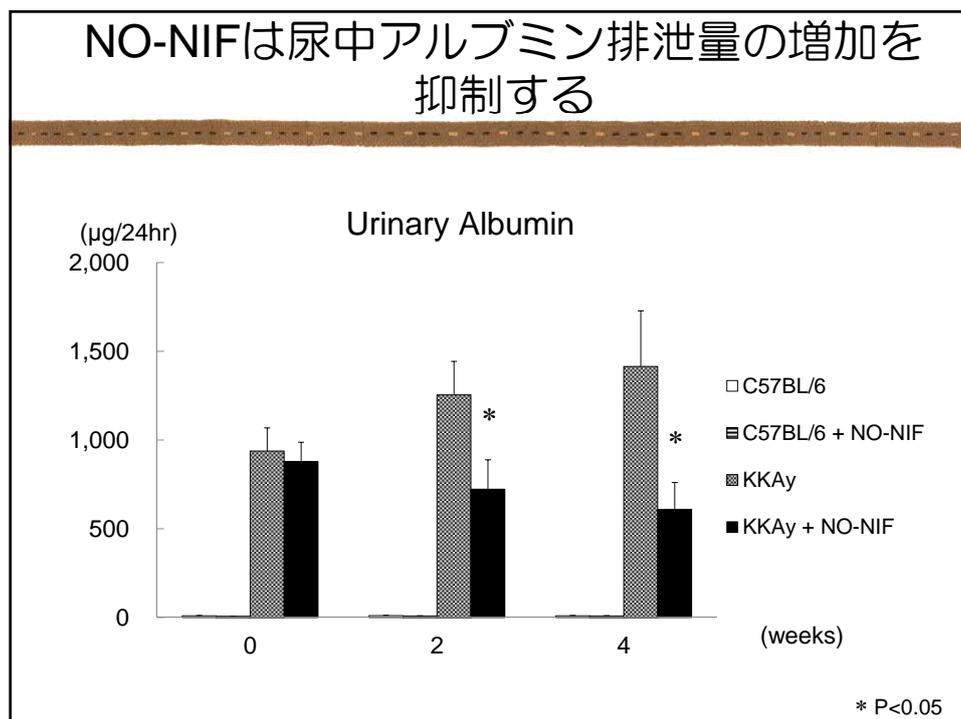
age 12  16 weeks  
 4 weeks

- ① C57BL/6 + Vehicle
- ② C57BL/6 + NO-NIF
- ③ KKAY + Vehicle
- ④ KKAY + NO-NIF

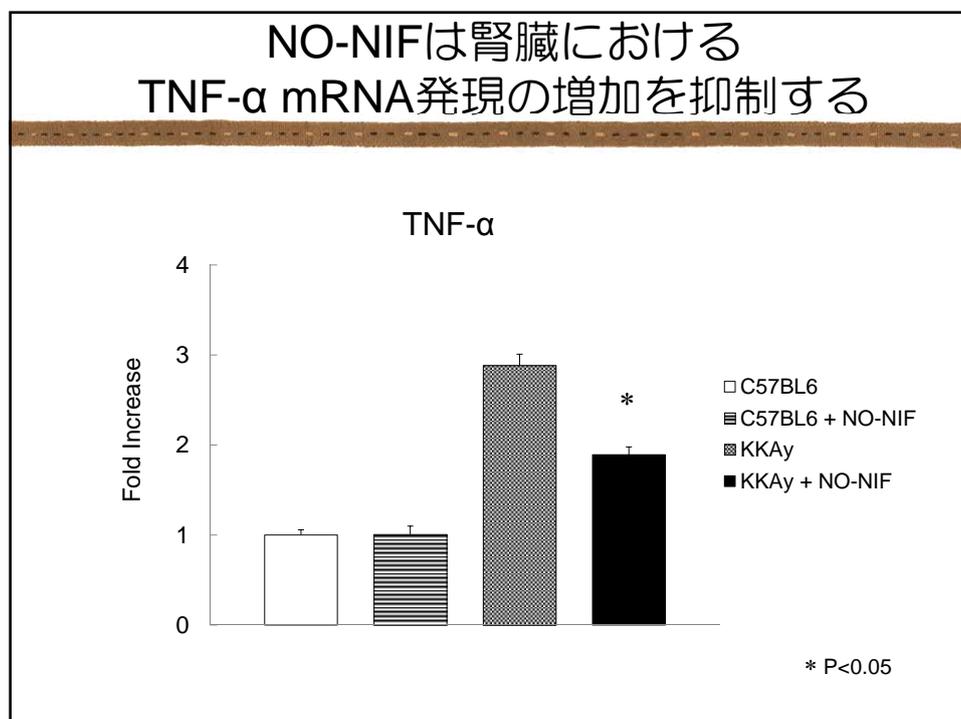
## NO-NIFは尿中タンパク排泄量の増加を抑制する



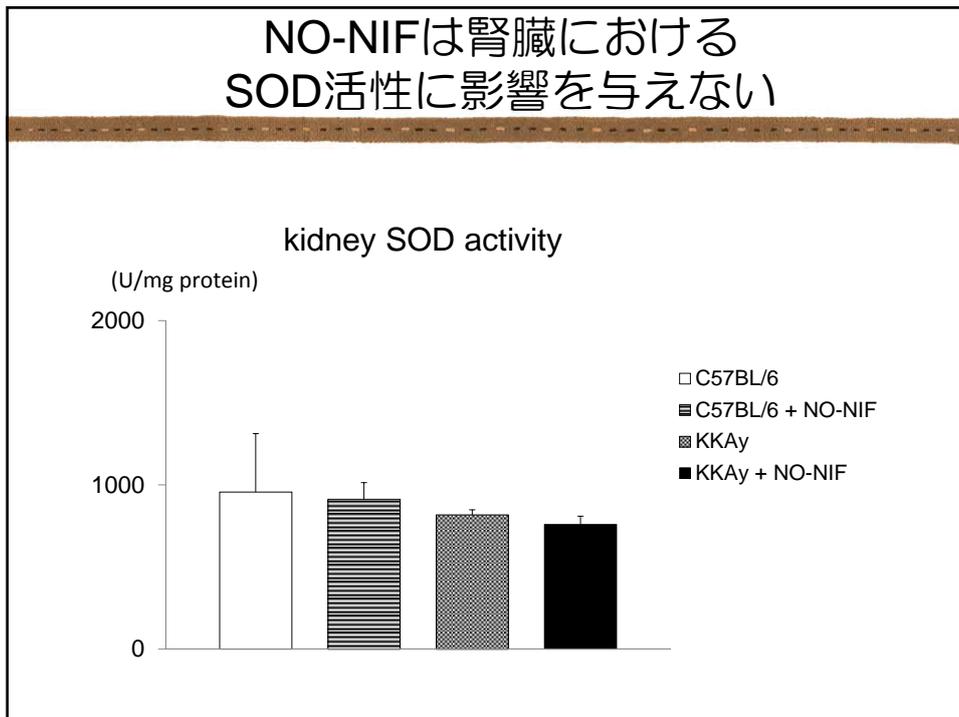
## NO-NIFは尿中アルブミン排泄量の増加を抑制する



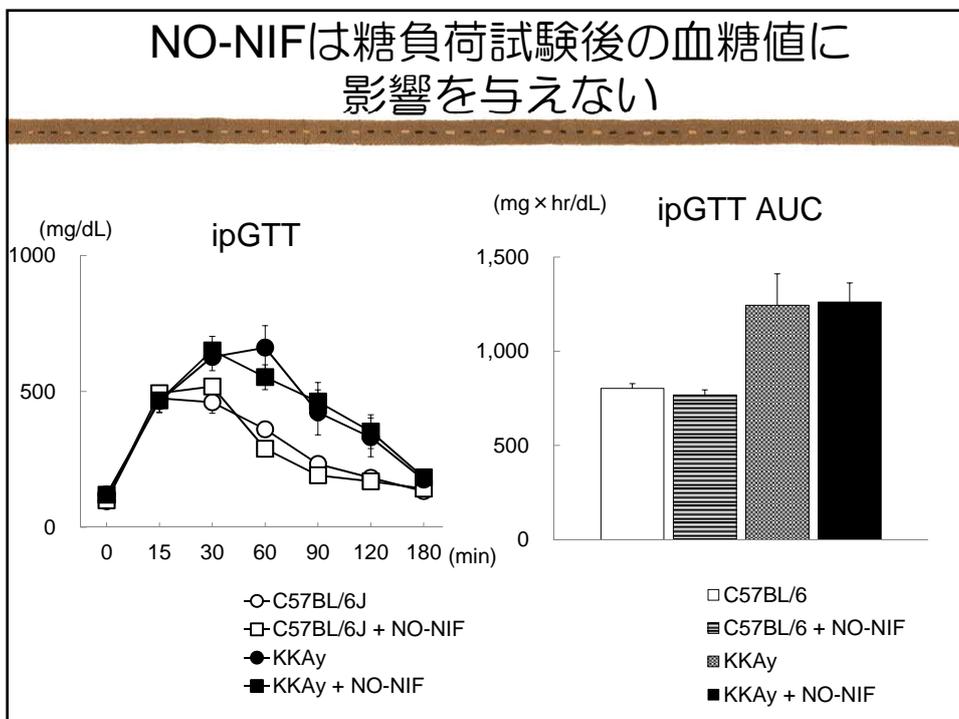
## NO-NIFは腎臓におけるTNF- $\alpha$ mRNA発現の増加を抑制する



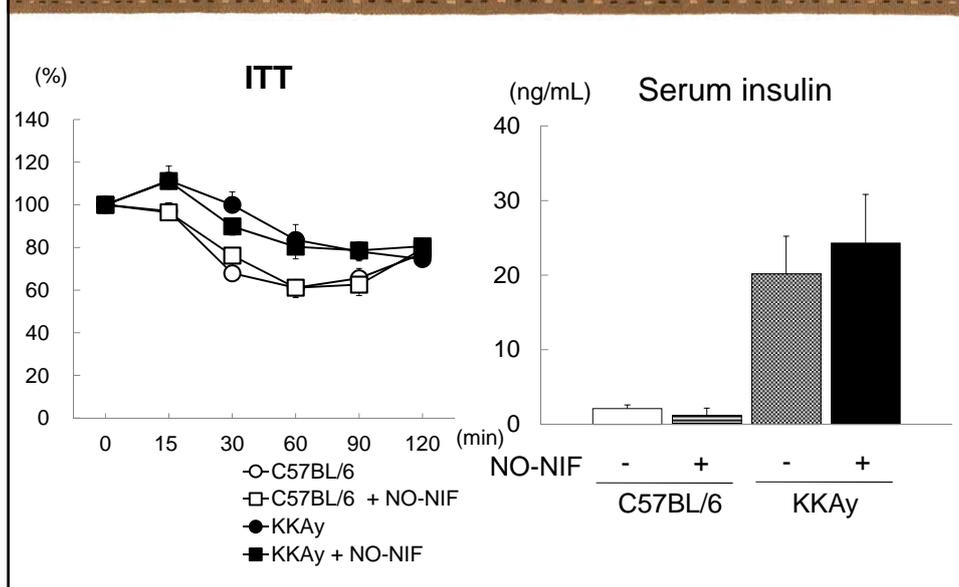
### NO-NIFは腎臓における SOD活性に影響を与えない



### NO-NIFは糖負荷試験後の血糖値に 影響を与えない



## NO-NIFはインスリン抵抗性に 影響を与えない



## NO-NIFは脂肪細胞の大きさに 影響を与えない

