

ヒト心房性ナトリウム利尿ペプチドの心筋プレコンディショニング効果への一酸化窒素の関与

Preischemic Infusion of Alpha-Human Atrial Natriuretic Peptide Elicits Myoprotection Through a Nitric Oxide-Dependent Mechanism

大川 博永
堀本 仁士
三重野繁敏
野村 幸哉
中原 健一
吉田 正隆
麻田 邦夫
佐々木進次郎

Hirohisa OKAWA, MD
Hitoshi HORIMOTO, MD
Shigetoshi MIENO, MD
Yukiya NOMURA, MD
Kenichi NAKAHARA, MD
Masataka YOSHIDA, MD
Kunio ASADA, MD
Shinjiro SASAKI, MD

Abstract

Objectives. Alpha-human atrial natriuretic peptide (α-hANP) has been used to treat patients with heart failure due to its natriuretic and vasodilatory activities. Recent reports have suggested that α-hANP generates nitric oxide (NO) that is known to be involved in myoprotective mechanisms. In this study, the effects of preischemic infusion of α-hANP against reperfusion injury were evaluated.

Methods. Isolated rat (Sprague-Dawley rat, age 8-10 weeks, weight 260-340 g) hearts were subjected to Langendorff perfusion with buffered Krebs-Henseleit solution and were divided into three groups: Six hearts were treated with 0.1 μM of α-hANP for 10 min (Group H), six hearts with 1 mM of a NO synthetase inhibitor N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) for 5 min before α-hANP (Group L), and six hearts served as the controls with no interventions (Group C). All groups were then subjected to 20 min of global ischemia followed by 120 min of reperfusion. Left ventricular pressures and coronary flow were measured throughout the experiment and infarct size was evaluated at the end of the experiments.

Results. Treatment with α-hANP significantly reduced infarct size as compared to control hearts whereas pretreatment with L-NAME almost reversed the preventive effect (Group C = 42.7 ± 2.3%, Group H = 26.1 ± 2.8%*, Group L = 39.0 ± 1.6%; *p < 0.01 vs Group C). There were no significant differences in left ventricular pressure and coronary flow between the three groups.

Conclusions. Preischemic infusion of α-hANP may provide myoprotective effects against postischemic reperfusion, possibly through a NO-dependent mechanism.

J Cardiol 2002 Jun; 39(6): 299-304

Key Words

■Natriuretic peptide, atrial ■Nitric oxide ■Ischemia, reperfusion
■Ischemia, preconditioning ■Myocardial infarction, pathophysiology

はじめに

ヒト心房性Na利尿ペプチド (α-human atrial

natriuretic peptide: α-hANP)はNa利尿作用¹⁾, 血管拡張作用^{2,3)}, レニン・アルドステロン分泌抑制作用^{4,5)}などを有し, 前負荷・後負荷を軽減する目的で心不全

大阪医科大学 胸部外科: 〒569-8686 大阪府高槻市大学町2-7

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Osaka Medical College, Osaka

Address for correspondence: OKAWA H, MD, Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Osaka Medical College, Daigakucho 2-7, Takatsuki, Osaka 569-8686

Manuscript received January 24, 2002; revised April 4, 2002; accepted April 8, 2002

治療に広く臨床応用されている。

-hANPは血管平滑筋内の膜型グアニル酸シクラーゼ受容体と結合し、細胞内サイクリックグアノシン2,3-リン酸(cyclic nucleoside 2,3-monophosphate: cGMP)濃度を上昇させる⁶⁾。また近年、-hANPが一酸化窒素(nitric acid: NO)を放出することが報告されている⁷⁾。一方、心筋虚血再灌流障害に対する心筋虚血プレコンディショニングを含む種々の心筋保護反応には、ATP感受性Kチャンネルをはじめ、さまざまな因子が関与している。cGMPもその一つで、NO供与体を投与することにより可溶性グアニル酸シクラーゼを活性化させ、細胞内cGMP濃度を上昇させることにより⁸⁾、虚血再灌流障害に対する心筋保護効果が得られることが報告されている⁹⁾。また、我々は心筋虚血プレコンディショニングにNO合成酵素阻害薬N^G-nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME)またはNO-cGMP阻害薬メチレンブルーを投与することにより心筋保護効果が消失する事実から、心筋虚血プレコンディショニングにおけるNO-cGMP経路の関与を報告している¹⁰⁾。以上より、-hANPを虚血前に投与することにより、NO-cGMP経路を介した虚血再灌流障害に対する心筋保護効果が期待される。

今回我々は、ラット摘出心Langendorff冠灌流モデルを使用し、-hANP虚血前投与における心筋プレコンディショニング効果およびその機序におけるNO関与の可能性について検討した。

対象と方法

1. 使用薬剤

-hANPは28個のアミノ酸よりなる型ANPで、サントリー生物医学研究所から提供された¹¹⁾。またNO合成酵素阻害薬L-NAMEはSigma Aldrichから購入した。

2. 実験動物

日本SLCで生産された雄性Sprague-Dawleyラット(8-10週齢, 260-340g)を使用した。

動物実験に関しては、すべて「動物実験に関する指針」¹²⁾に従った。

3. 摘出心の作製

ジエチルエーテル麻酔後、ペントバルビタールナト

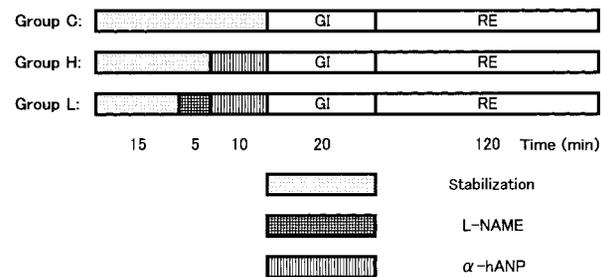


Fig. 1 Langendorff perfusion protocol

Isolated rat hearts were subjected to Langendorff perfusion with buffered Krebs-Henseleit solution. Group H was treated with 0.1 μ M of -hANP for 10 min, and Group L with 1 mM of L-NAME for 5 min followed by 0.1 μ M of -hANP for 10 min. Group C (control hearts) received no drug infusion. All groups were then subjected to 20 min of global ischemia followed by 120 min of reperfusion.

-hANP = alpha-human atrial natriuretic peptide; L-NAME = N^G-nitro-L-arginine methyl ester; GI = global ischemia; RE = reperfusion.

リウム(40 mg/kg)を腹腔内投与し、大腿静脈よりヘパリンナトリウム(1,000 U/kg)を静注した後、迅速に心臓を摘出した。摘出心をただちに局所冷却し、心停止させた後、摘出心の大動脈にカニューレを挿入してLangendorff灌流装置に装着した。ただちに肺動脈ペントを作製し、左心耳を切除後、経左房的に左室圧計測用バルーンを挿入した。

4. Langendorff灌流プロトコル

95% O₂, 5% CO₂により平衡化された Krebs-Henseleit 灌流液(NaCl 115 mM, NaHCO₃ 25 mM, KCl 4.7 mM, MgSO₄ 1.2 mM, KH₂PO₄ 1.1 mM, CaCl₂ 1.7 mM, グルコース 11.5 mM, ピルビン酸 4.9 mM, フマル酸 5.4 mM)を 37 °C, 75 mmHg の定圧 Langendorff 灌流を行った。

摘出心はLangendorff灌流開始後、30分間安定化させた。その間に摘出心の左心耳を切除し、経左房的に挿入したバルーンに生理食塩水を注入し、左室拡張末期圧が5-10 mmHgとなるようにバルーン容量を設定し、等量バルーンとして実験終了時まで左室圧および冠灌流量を測定した。

5. 実験群 (Fig. 1)

実験は無処置のC群(6例)、全虚血前の10分間 -hANP(0.1 μ M)を投与したH群(6例)、-hANP投与前

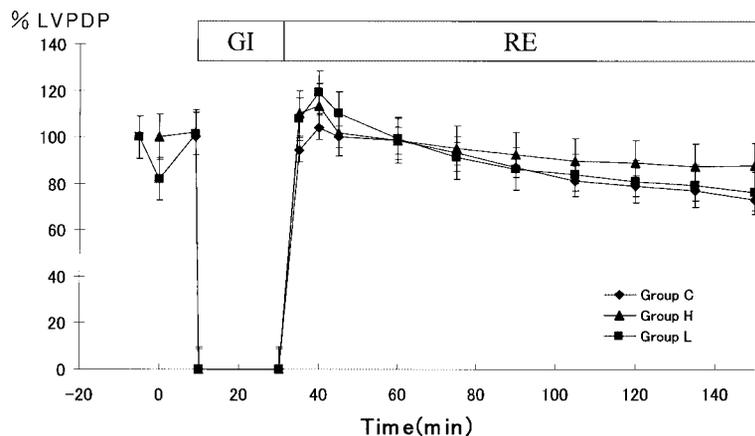


Fig. 2 Normalized left ventricular peak developed pressure with time

The time course of events is shown in Fig. 1. There was no significant difference between the three groups throughout the experiment. %LVPDP = percentage left ventricular peak developed pressure. Explanation of the groups and other abbreviations as in Fig. 1.

にL-NAME(1 mM)を5分間投与したL群(6例)の3群に分けて行った。

-hANPおよびL-NAMEの投与濃度は諸家の報告^{13,16)}に準じた。各群, 20分間の大動脈遮断による全虚血と120分間の再灌流を行った。

6. 測定項目

左室圧および摘出心より流出する1分間当たりの灌流流量(冠灌流量)を経時的に計測した。また実験終了後, ただちに摘出心の左室部分のみを残し, その他の領域は切除した。左室心筋を左室横断面で2mm厚にスライスし, 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride(37°C, pH 7.4, Sigma Chemical Co.)と15分間反応させ, 白色部分を梗塞領域としてトレースした。この方法で判明した心筋梗塞領域の面積を計測(Sigma Scan Pro, SPSS Inc.)し, 総面積(表面+裏面)に対する梗塞領域面積(表面+裏面)の割合を心筋梗塞範囲と定義した。

7. 統計処理

各群の結果は平均±標準偏差で表し, 分散分析検定を行い, $p < 0.05$ を有意差の判定とした。

結 果

実験で使用したSprague-Dawleyラットの体重において, 各群間に有意差は認められなかった。

1. 左室発生圧

左室発生圧は各時点において左室収縮期圧から左室拡張末期圧を減じるにより算出した。実験を通し

ての左室発生圧の虚血前値に対する割合(%)をFig. 2に示した。虚血前および再灌流120分間において, 3群間で有意差は認められなかった。

2. 冠灌流量

実験を通しての冠灌流量の虚血前値に対する割合(%)をFig. 3に示した。虚血前および再灌流120分間において, 3群間で有意差は認められなかった。

3. 心筋梗塞範囲

実験終了時の心筋梗塞範囲をFig. 4に示した。H群ではC群に比べて梗塞範囲が有意に低値を示した(C群 vs H群: $42.7 \pm 2.3\%$ vs $26.1 \pm 2.8\%$, $p < 0.01$)。またL群ではH群と比べて梗塞範囲が有意に高値を示した(H群 vs L群: $26.1 \pm 2.8\%$ vs $39.0 \pm 1.6\%$, $p < 0.01$)。3群の再灌流後の左室心筋横断面の代表的な例をFig. 5に示した。

考 察

本実験により, 1) -hANPを虚血前投与することにより再灌流後に生じる心筋梗塞範囲が減少した, 2)同効果はNO合成酵素阻害薬L-NAMEにより阻害された, の2点が明らかになった。

我々は以前より家兔摘出心灌流実験において, NOおよびcGMPの心筋プレコンディショニング反応における役割について明らかにしてきた¹⁰⁾。交感神経遮断様作用¹⁷⁾, 細胞内へのCa流入抑制作用¹⁸⁾, ミトコンドリアにおける呼吸を軽減させる作用¹⁹⁾など, これらNOの持つエネルギー消費抑制作用が虚血心筋に保

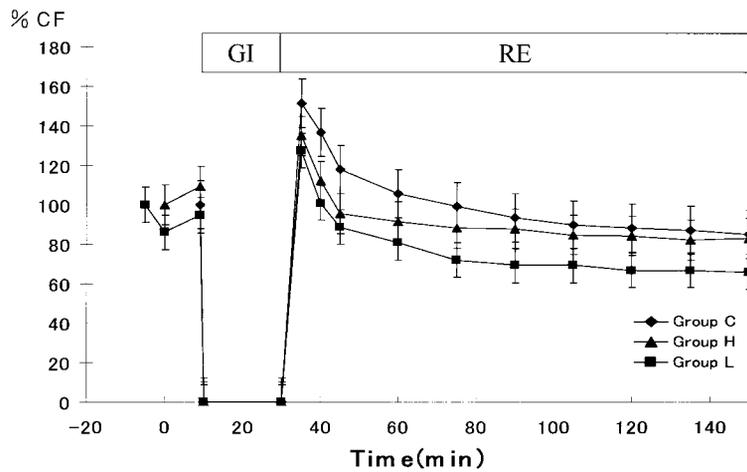


Fig. 3 Normalized coronary flow with time
 The time course of events is shown in Fig. 1. There was no significant difference between the three groups throughout the experiment.
 %CF = percentage coronary flow.
 Explanation of the groups and other abbreviations as in Fig. 1.

護的に働き、再灌流後の心筋梗塞範囲を減少させるのではないかと考えられる。同実験においては、NO前駆体、L-アルギニンを虚血前投与することにより、心筋保護効果が得られたが、ATP感受性Kチャンネル阻害薬グリベンクラミドでその効果が阻害されたことにより、NOによるATP感受性Kチャンネルへの何らかの作用が存在することも否定できない。さらに、NOがプレコンディショニング反応において重要な働きをされるとされるプロテインキナーゼC-を活性化することが知られており²⁰⁾、NOによるプレコンディショニング効果がプロテインキナーゼCを介して発揮されている可能性も考えられる。

また、NOの多くの作用はcGMPをセカンドメッセンジャーとして発揮されていることが知られている²¹⁾。cGMPの細胞内での作用は多岐にわたり、プレコンディショニングにおけるcGMPの役割については正確に把握することは難しいが、L型Caチャンネルを阻害することで細胞内へのCa流入を抑制し、虚血心筋細胞にみられる浸透圧上昇を抑制すること²²⁾もcGMPを介した細胞保護効果の一つと考えられる。さらに、細胞内cGMP濃度の上昇は心筋酵素消費を抑制する²³⁾ことが知られており、その結果、虚血時のエネルギー消費を抑制し、プレコンディショニング効果を誘導することも考えられる。

いずれにしても、-hANPによる心筋プレコンディショニング効果がL-NAMEにより阻害された事実より、-hANP投与によりNOが産生され、心筋保護効果に寄与したことが強く示唆される。

一方、NOにはperoxynitriteによる細胞傷害性がある

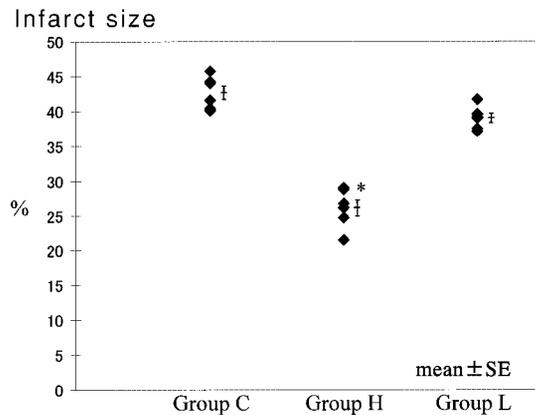


Fig. 4 Infarct size for the different groups
 Note that -hANP significantly decreased infarct size, but prior infusion of L-NAME reversed the effect.
 * $p < 0.01$ vs group C.
 Explanation of the groups and abbreviations as in Fig. 1.

ことも報告されている。本実験ではそのような作用は明らかでなかったが、これは本実験が摘出心による灌流モデルであり、血液成分が灌流液中に含まれていないことが原因と推察される。また、peroxynitriteは代謝速度が速く、本実験系においては細胞傷害性を発揮することができなかった可能性が考えられる。いずれにしても、今後、血液灌流モデルにおいても同様の実験が必要と思われる。臨床では急性心筋梗塞患者において、経皮的冠動脈形成術前に-hANPの冠動脈内投与を行い、血行動態、不整脈発生率、心電図変化の各指標において再灌流障害が抑制されたとの報告がみられる²⁴⁾。同報告ではNOの関与については言及されていないが、-hANPがヒト心筋に対しても再灌流障害

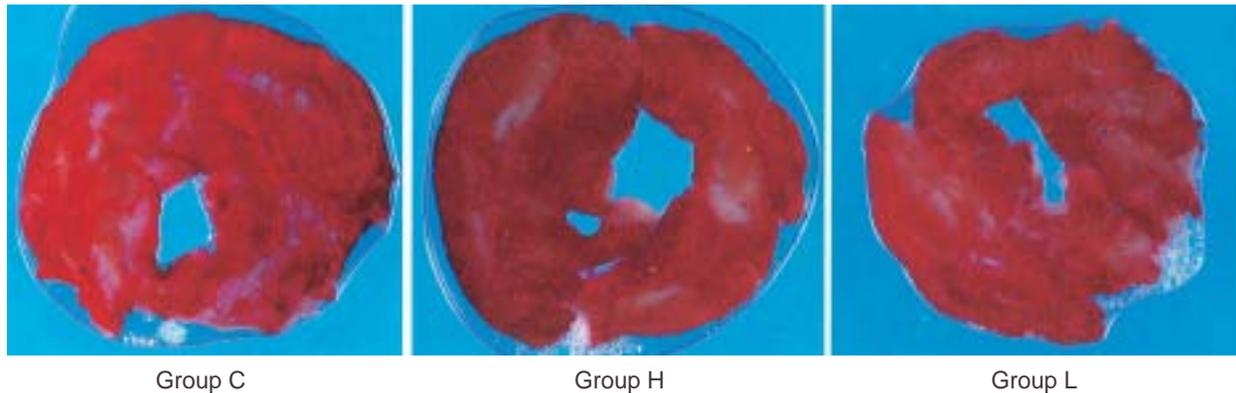


Fig. 5 Representative photographs of left ventricular myocardium by 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride staining after reperfusion in each group

Unstained area indicates infarction. Group H exhibited less unstained area compared to Group C or Group L.

Explanation of the groups as in Fig. 1.

に対する保護効果を発揮することを示唆するものである。

-hANPの投与時期については光島ら²⁵⁾がラット心筋超微細構造の観察から、虚血前に投与した群では虚血後に投与した群に比べて、形態的傷害が軽微であったと報告している。我々の実験でも -hANPを虚血前にのみ投与し、良好な結果が得られたことから、虚血前からの投与が望ましいと思われる。

一般に、-hANPはその種々の薬理作用により、前負荷および後負荷を軽減するため、心不全治療に用いられている。その際に使用される -hANPの投与量が本実験で確認されたNOを介した心筋保護作用を發揮

するに足りうるかどうかについては今後の検討課題であるが、少なくとも、今回の実験結果が -hANPの心不全のみならず、虚血再灌流障害に対する有効性を示唆していると思われる。

結 語

-hANPの虚血前投与により心筋梗塞範囲が減少したことから、-hANP投与による心筋プレコンディショニング効果が確認された。また、この効果はNO合成酵素阻害薬であるL-NAMEを投与することにより抑制されたことから、-hANP投与による心筋プレコンディショニング効果にはNOの関与が示唆された。

要 約

目 的: ヒト心房性Na利尿ペプチド(-hANP)は血管平滑筋の膜型グアニル酸シクラーゼ受容体に作用し、強力なNa利尿作用および血管拡張作用を有し、心不全治療に使用されているが、心筋への直接作用については不明である。一方、近年 -hANPが一酸化窒素(NO)を産生することが報告されており、我々はNOを介した心筋プレコンディショニング効果を確認していることから、-hANPの虚血前投与によりNOを介した心筋保護作用が期待される。今回我々は、ラット摘出心における -hANPの虚血再灌流障害に対する心筋プレコンディショニング効果およびNOの関与について検討した。

方 法: Sprague-Dawleyラット(8-10週齢,雄,260-340g)摘出心を37℃,75mmHgで酸素化したKrebs-Henseleit液を用いてLangendorff冠灌流し,30分間の安定化後,20分間の全虚血,続いて120分間の再灌流を行い,以下の3群に分けた。無処置のC群(6例),全虚血前の10分間に -hANP(0.1μM)を投与したH群(6例), -hANP投与前にNO合成酵素阻害薬L-NAME(1mM)を5分間投与したL群(6例)。実験を通じて左室圧および冠灌流量,再灌流120分後に心筋梗塞範囲を測定した。

結果: 120分後の心筋梗塞範囲は -hANP 投与により有意に減少し, L-NAME 投与によって -hANP の作用が抑制された(C群 $42.7 \pm 2.3\%$, H群 $26.1 \pm 2.8\%$ *, L群 $39.0 \pm 1.6\%$, * $p < 0.01$ vs C群). 左室圧および冠灌流量は3群間でいずれも有意差が認められなかった.

結論: -hANP 虚血前投与により心筋プレコンディショニング効果を認め, その効果はNO産生を介して発揮されている可能性が示唆された.

J Cardiol 2002 Jun; 39(6): 299 - 304

文献

- 1) Maack T, Marion DN, Camargo MJF, Kleinert HD, Laragh JH, Vaughn ED Jr, Atlas SA: Effects of auricular(atrial natriuretic factor) on blood pressure, renal function, and the renin-aldosterone system in dogs. *Am J Med* 1984; **77**: 1069 - 1075
- 2) Weder AB, Sekkarie MA, Takiyyuddin M, Schork NJ, Julius S: Antihypertensive and hypotensive effects of atrial natriuretic factor in men. *Hypertension* 1987; **10**: 582 - 589
- 3) Winqvist RJ, Faison EP, Nutt RF: Vasodilator profile of synthetic atrial natriuretic factor. *Eur J Pharmacol* 1984; **102**: 169 - 173
- 4) Naruse M, Obana K, Naruse K, Yamaguchi H, Demura H, Inagami T, Shizume K: Atrial natriuretic polypeptide inhibits cortisol secretion as well as aldosterone secretion in vitro from human adrenal tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; **64**: 10 - 16
- 5) Atarashi K, Mulrow PJ, Franco-Saenz R, Snajdar R, Rapp J: Inhibition of aldosterone production by an atrial extract. *Science* 1984; **224**: 992 - 994
- 6) Waldman SA, Rapoport RM, Murad F: Atrial natriuretic factor selectively activates particulate guanylate cyclase and elevates cyclic GMP in rat tissue. *J Biol Chem* 1984; **259**: 14332 - 14334
- 7) Soualmia H, Barthelemy C, Eurin J, Masson F, Carayon A: Role of nitric oxide on atrial natriuretic peptide release induced by angiotensin in superfused rat atrial tissue. *Regul Pept* 2001; **98**: 105 - 110
- 8) Waldman SA, Murad F: Biochemical mechanisms underlying vascular smooth muscle relaxation: The guanylate cyclase-cyclic GMP system. *J Cardiovasc Pharmacol* 1988; **12**(Suppl 5): S115 - S118
- 9) Ali IS, Gandhi M, Finegan BA, Koshal A, Clanachan AS: Cardioprotection by activation of NO/cGMP pathway after cardioplegic arrest and 8-hour storage. *Ann Thorac Surg* 1998; **65**: 1303 - 1309
- 10) Horimoto H, Gaudette GR, Saltman AE, Krukenkamp IB: The role of nitric oxide, K⁺ + γ ATP channels, and cGMP in the preconditioning response of the rabbit. *J Surg Res* 2000; **92**: 56 - 63
- 11) 田中正治, 孫田浩二: 遺伝子操作によるショートペプチドの産生. *蛋・核・酵* 1991; **35**: 2613 - 2619
- 12) 日本実験動物学会: 動物実験に関する指針. *Exp Anim* 1987; **36**: 285 - 288
- 13) 寒川顕治, 井上雅博, 中西浩之, 河田政明, 佐野俊二: 心房性ナトリウム利尿ペプチド(-hANP)の虚血再灌流障害に対する心筋保護効果. *日胸外会誌* 1999; **47**(Suppl): 214(abstr)
- 14) Tohse N, Nakaya H, Takeda Y, Kanno M: Cyclic GMP-mediated inhibition of L-type Ca²⁺ channel activity by human natriuretic peptide in rabbit heart cells. *Br J Pharmacol* 1995; **114**: 1076 - 1082
- 15) Zhu P, Zaugg CE, Simper D, Hornstein P, Allegrini PR, Buser PT: Bradykinin improves postischemic recovery in the rat heart: Role of high energy phosphates, nitric oxide, and prostacyclin. *Cardiovasc Res* 1995; **29**: 658 - 663
- 16) Valen G, Skjelbakken T, Vaage J: The role of nitric oxide in the cardiac effects of hydrogen peroxide. *Mol Cell Biochem* 1996; **159**: 7 - 14
- 17) Balligand JL, Kelly RA, Marsden PA, Smith TW, Michel T: Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 347 - 351
- 18) Levi RC, Alloati G, Fischmeister R: Cyclic GMP regulates the Ca-channel current in guinea pig ventricular myocytes. *Pflugers Arch* 1989; **413**: 685 - 687
- 19) Xie YW, Shen W, Zhao G, Xu X, Wolin MS, Hintze TH: Role of endothelium-derived nitric oxide in the modulation of canine myocardial mitochondrial respiration in vivo: Implications for the development of heart failure. *Circ Res* 1996; **79**: 381 - 387
- 20) Liu H, McPherson BC, Zhu X, Da-Costa ML, Jeevanandam V, Yao Z: Role of nitric oxide and protein kinase C in ACh-induced cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; **281**: H191 - H197
- 21) Chinkers M, Garbes DL: Signal transduction by guanylate cyclase. *Annu Rev Biochem* 1991; **60**: 553 - 575
- 22) Brady AJB, Warren JB, Poole-Wilson PA, Williams TJ, Harding SE: Nitric oxide attenuates cardiac myocyte contraction. *Am J Physiol* 1993; **265**: H176 - H182
- 23) Weiss HR, Rodriguez E, Tse J, Scholz PM: Effect of increased myocardial cyclic GMP induced by cyclic GMP-phosphodiesterase inhibition on oxygen consumption and supply of rabbit hearts. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1994; **21**: 607 - 614
- 24) 上嶋 亨, 田口 功, 久我英世, 中津川昌利, 杉村浩之, 星 俊安, 鈴木 豊, 土田英希, 小川研一, 金子昇, 崎尾秀彰: 虚血再灌流障害及び左室リモデリングにおける心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)の効果. *日臨生理会誌* 1999; **29**(Suppl): 90(abstr)
- 25) 光島隆二, 安倍十三夫: ラット摘出心の虚血再灌流障害に対するANPの抑制効果についての検討. *札幌医誌* 2000; **69**: 1 - 9