

平成 22 年 5 月 21 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19590541
 研究課題名 (和文) 心血管薬の薬効評価に資するヒト実験系と臨床試験でのサロゲートマーカーの開発評価
 研究課題名 (英文) Development of methods of clinical experiment and biomarkers for the assessment of cardiovascular drugs
 研究代表者
 植田 真一郎 (UEDA SHINICHIRO)
 琉球大学・大学院医学研究科・教授
 研究者番号：80285105

研究成果の概要 (和文)：

1. 今後の観察研究や臨床研究での使用を念頭に、動脈硬化の指標として用いられているバイオマーカー、Flow mediated vasodilatation によるヒト血管内皮機能評価の方法の標準化、脈波速度による大動脈 stiffness の測定法の比較など方法論的な視点から検討を行った。
2. グルコースクランプ法で求めたインスリン感受性とアディポネクチンなどの血中代謝マーカーの関連を検討した。
3. 腹部肥満を想定した遊離脂肪酸負荷の白血球アンジオテンシン II 産生能、ヒト血管内皮機能、インスリン感受性、酸化ストレス、白血球活性化を評価できるヒト実験系を確立した。これらの実験系においてアンジオテンシン II 受容体拮抗薬、ACE 阻害薬、Ca 拮抗薬、抗血小板薬の薬効評価を実施した。遊離脂肪酸上昇は一部白血球アンジオテンシン II 産生増加を介して血管内皮機能障害、インスリン抵抗性、酸化ストレス亢進、白血球活性化などの微小循環障害を引き起こすことが明らかになり、これらを指標にした抗動脈硬化薬の評価に有用である可能性が示唆された。白血球アンジオテンシン II の産生能も肥満などのバイオマーカーとなり得る可能性がある。

研究成果の概要 (英文)：

1. We assessed methods of the measurement of endothelial function by flow-mediated vasodilatation and of aortic stiffness by pulse wave velocity. We also standardized the method of flow-mediated vasodilatation, which had varied among researchers.
2. We estimated the association of insulin sensitivity measured by glucose clamp technique and serum metabolic marker such as adiponectin.
3. The methods of experiments in humans for the assessment of effects of elevated free fatty acids on angiotensin II forming activity in leukocytes, endothelial function, insulin sensitivity, and leukocyte activation was established. We tested effects of several cardiovascular drugs in this lipid loading experiment mimicking visceral fat obesity. We found that elevated FFA caused endothelial dysfunction, microcirculatory dysfunction (leukocyte activation), insulin resistance partly via leukocyte renin-angiotensin system. This experimental protocol may be useful for the assessment of anti-atherosclerotic drugs. Leukocyte angiotensin II forming activity could be a biomarker for visceral fat obesity linking to vascular dysfunction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
平成 20 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
平成 21 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：心血管薬、薬効評価システム、サロゲートマーカー

1. 研究開始当初の背景

近年日常診療に Evidence Based Medicine の考え方が浸透し、さまざまな心血管薬の、心血管イベント抑制に関するランダム化臨床試験(RCT)の結果が注目されている。しかし RCT は観察期間が比較的短期間であること、統計学的検出力が心血管イベント発生数に依存するため、対象になる患者がおしなべて高リスクであることなどから、比較的风险の低い、日常診療で多く遭遇する患者の診療に結果を適用できない難点が生じる。最近発表になった ALLHAT 研究や VALUE 研究は死亡率や心血管イベント発症率が高く、比較的风险の低い患者を対象とした MRC 研究などに比べ 4~5 倍となっている。このことから、その薬剤の心血管イベント発生リスク減少効果を予測できる、心血管イベント以外の指標が必要である。おそらく最も優れた指標は血圧であり、心血管イベント抑制には基本的に血圧の厳格な管理が必要であるが、同等の降圧を達成してもなお予後の差が生じることから、血糖や脂質など他のリスクを含めて、患者個人のリスクを統合的に判定できる指標が必要である。このような視点から我々は動脈硬化性疾患の指標としてヒト血管機能の研究に取り組んできた。

われわれはこれまで薬理学的アプローチ、すなわちアセチルコリンによる末梢抵抗血管拡張作用、NO 合成阻害薬 L-NMMA による血管収縮作用、ニトロプルシッドの血管拡張作用などから血管内皮機能、平滑筋機能、およびこれらにおける NO の関与を評価し、インスリン抵抗性をはじめさまざまな危険因子や薬物との関連を検討してきた。このような薬理学的な指標は、科学的正当性は強いが、そのまま診療の現場で使用することはできない。そのためこれらの血管機能を可及的に正確に反映できる、簡便な指標が必要である。この観点から我々はより侵襲が少ない方法の、科学的な正当性、方法論的な妥当性を検討してきた。

一般に心血管薬は開発の段階においては、血圧、血糖値、コレステロール値などの代替評価項目により薬効評価がなされる。しかし、動脈硬化性疾患における薬物治療の目的はリスクファクターへの介入による心血管リスクの減少であり、心血管イベントと血圧などの臨床的マーカーの間の中間的な指標で評価できれば、用量設定や適応の拡大などに

応用できる。例えば HMGCoA reductase 阻害薬は、コレステロール低下作用とは独立して、血管内皮機能を改善するが、この研究の結果、コレステロール値にかかわらず冠動脈疾患高リスク患者に広く使用されるようになった。すなわち血管内皮機能測定はスタチン系薬剤の臨床的薬効評価に適している。われわれはアセチルコリン、ニトロプルシッドによる末梢抵抗血管の血管内皮機能、平滑筋機能評価を行ってきた (BJCP 2000, Hypertens Res 2003)。最近我々はこの系に脂肪負荷を行い、その結果得られる遊離脂肪酸の上昇がアセチルコリンの用量反応曲線を右方へ偏位させること、すなわち血管内皮機能を低下させることを報告した (Watanabe S et al ATVB 2005)。遊離脂肪酸上昇は、2 型糖尿病、インスリン抵抗性を持つ患者、メタボリック症候群を有する患者で認められており、インスリン抵抗性の発生や、血圧上昇、動脈硬化の進展に関与しているとされる。その機序の少なくとも一つは、われわれの研究からは内皮機能低下を介していると考えられる。従ってこの実験系は、代謝性疾患を想定した薬剤の、内皮機能に関する薬効評価に適切である。これまでの実験で酸化ストレスの関与と、RA 系抑制薬(ATVB 2005)や Rho-kinase 阻害薬 (21st ISH meeting 2006)によるアセチルコリン用量反応曲線の改善が認められている。

2. 研究の目的

(1) 新たな薬剤の開発に資する、メタボリック症候群、レニン-アンジオテンシン系活性亢進などを想定した、安全かつ科学的に正当なヒト実験系の確立とその系を用いた薬効評価、そして(2) 心血管イベント抑制を目的にした、薬物療法の効果を判定可能な、代替エンドポイント (サロゲートバイオマーカー) の開発および評価である。

3. 研究の方法

(1) 薬物負荷 Augmentation Index (AI) による血管内皮機能測定
 β 2 アゴニスト吸入前後の AI を測定し、低下した割合を血管内皮機能として測定した。内皮非依存の血管拡張はニトログリセリン舌下投与時の AI の変化で測定、用量反応も検討した。撓骨動脈および頸動脈での測定を比較した。

(2) 脈波速度測定における方法論的な検討
 欧州を中心に使用され、心血管イベントなどの関連が既に報告されている COMPLIAR により頸動脈鼠蹊動脈間の脈波速度を測定し、本邦で既に広く用いられている FORM により測定された頸動脈鼠蹊動脈間の脈波速度、橈骨動脈足首間の脈波速度との関連、これらの再現性も含めて検討した。

(3) FMD の標準化

FMD 測定時のカフおよび超音波プローブの位置、カフ圧、ニトログリセリンの用量、測定時間、解析法などについて検討した。

(4) インスリン感受性と血清マーカー
 健康人のインスリン感受性を測定し、血中アディポネクチンなどのマーカーとの相関を検討した。

(5) 白血球アンジオテンシン II 産生能の測定と脂肪酸上昇が及ぼす影響

健康人において脂肪乳剤をヘパリンとともに静注し、血中遊離脂肪酸を上昇させ、単離した単核球および多核球においてアンジオテンシン II 産生能を測定した。

(6) 脂肪酸負荷による血管内皮機能障害と白血球活性化のメカニズムに関する研究
 脂肪酸負荷前後で血管内皮機能をアセチルコリン動注時の前腕血流量の増加として測定した。また脂肪酸負荷前後で全血の通過時間、白血球の接着を、毛細血管を模したマイクロチャンネルアレイを用いて測定した。同時に血中のミエロペルオキシダーゼをヘパリン投与後に測定した。これらの実験をアンジオテンシン II 受容体拮抗薬の投与後に繰り返した。

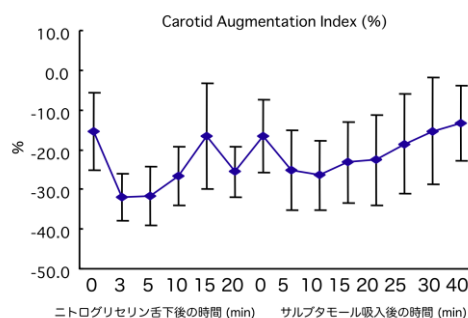
(7) 脂肪酸負荷によるインスリン抵抗性に関する研究

健康人において脂肪負荷時、生理食塩水（コントロール）静注時にグルコースクランプ法でインスリン感受性を測定した。次に二重盲検法で ARB 高用量、低用量、プラセボを一週間投与しその後インスリン感受性を測定した。

4. 研究成果

(1) 薬物負荷 Augmentation Index (AI) による血管内皮機能測定

Carotid AI はニトログリセリン舌下後、サルブタモール吸入後に有意な減少を示し、評価可能であったが、Brachial AI では反応が明瞭ではなく、評価は困難であった。FORM を用いた Carotid AI であれば本法による非侵襲的血管内皮機能測定は可能かもしれない。



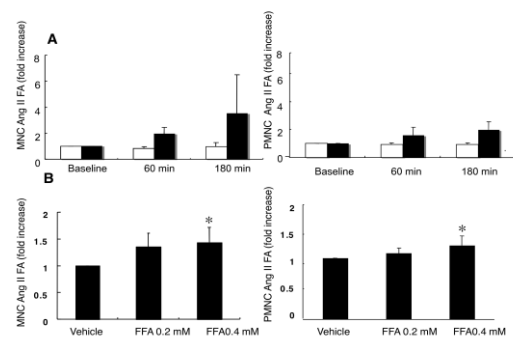
(3) FMD の標準化

今後の大規模、多施設共同研究の実施を念頭に置き、方法の標準化を実施した。

(4) インスリン感受性と血清マーカー
 インスリン感受性とアディポネクチンの有意な相関がみられた。FOMA-IR をアディポネクチンで補正したものがより鋭敏なインスリン感受性のマーカーとなり得ることが示唆された。

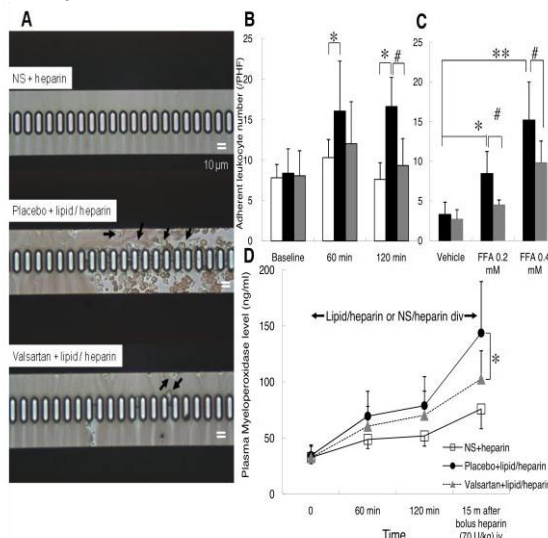
(5) 白血球アンジオテンシン II 産生能の測定と脂肪酸上昇が及ぼす影響

正常の2-3倍の脂肪酸上昇により単核球、多核球のアンジオテンシン II 産生能が亢進した。遊離脂肪酸の全血への添加後の測定でも同様の反応が認められた。遊離脂肪酸によるレニン-アンジオテンシン活性亢進が示唆される。



(6) 脂肪酸負荷による血管内皮機能障害と白血球活性化のメカニズムに関する研究

脂肪酸負荷は以前の報告と同様血管内皮機能を低下させ、ARB 前投与はこれを予防した。脂肪酸負荷は、白血球の活性化による白血球接着の亢進、micro array channel における全血通過時間の延長を来とし、ARB はこれを改善した。白血球由来のミエロペルオキシダーゼ (MPO) も脂肪酸負荷による白血球活性化により上昇しておりこれも ARB で抑制された。ヘパリンによる MPO の内皮細胞からの liberation が内皮機能を改善させたことから、遊離脂肪酸によるアンジオテンシン II 産生亢進に伴う白血球活性化が、MPO を介して直接内皮機能を障害する可能性が示唆された。



(7) 脂肪酸負荷によるインスリン抵抗性に関する研究

脂肪酸負荷により健常人においてもインスリン感受性(M値)は約40%減少した。ARBは用量依存性にインスリン感受性を改善したが、完全にコントロール(脂肪非負荷時)までは回復しなかった。脂肪酸上昇によるインスリン抵抗性は少なくとも一部はレニン-アンジオテンシン系の活性亢進を介している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

1. Azekoshi Y, Yasu T, Watanabe S, Tagawa T, Uehara Y, Abe S, Urata H, Yamakawa K, Momomura S, Ueda S. FFA causes leukocyte activation and resultant endothelial dysfunction through enhanced angiotensin II production in mononuclear and polymorphonuclear cells *Hypertension* 2010;56:136-142
2. Arao K, Yasu T, Umemoto T, Jimbo S, Ikeda N, Ueda S, Momomura S. Effects of pitavastatin on fasting and postprandial endothelial function and blood rheology in patients with stable coronary artery disease. *Circ J* 2009;73:1523-30
3. Inoue T, Matsuoka H, Higashi Y, Ueda S, Sata M, Shimada KE, Ishibashi Y, Node K; Vascular Failure Workshop Group. Flow-mediated vasodilation as a diagnostic modality for vascular failure. *Hypertens Res*. 2008;31:2105-13.
4. Ikeda N, Yasu T, Kubo N, Nakamura T, Sugawara Y, Ueda S, Ishikawa SE, Saito M, Kawakami M, Momomura S. Daily exercise and bone marrow-derived CD34+/133+ cells after myocardial infarction treated by bare metal stent implantation. *Circ J*. 2008;72:897-901.
5. Minami H, Yasu T, Tagawa T, Yamakawa K, Ueda S. Slower onset of vasodilating action of brain natriuretic peptide (BNP) compared to atrial natriuretic peptide (ANP) in human forearm resistant vessels. *Eur J Clin Pharmacol*. 2008;64:859-62.
6. Ueda I, Tagawa T, Watanabe S, Yamakawa K, Yasu T, Ueda S. Comparability and reproducibility of the carotid-femoral pulse wave velocity measurements using a multi-element carotid tonometry sensor. *J Hum Hypertens*. 2008;22:699-703.
7. Chinen I, Shimabukuro M, Yamakawa K, Ueda S, et al Vascular lipotoxicity: endothelial dysfunction via fatty acid-induced reactive oxygen species overproduction in obese Zucker diabetic rats *Endocrinology* 2007;148:160-165
8. Matsuhisa M, Yamasaki Y, Emoto M, Shimabukuro M, Ueda S, Funahashi T, Matsuzawa Y. A novel index of insulin resistance determined from the homeostasis model assessment index and adiponectin levels in Japanese subjects. *Diabetes Res Clin Pract* 2007;77:151-4
9. Shimabukuro M, Chinen I, Higa N, Takasu N, Yamakawa K, Ueda S. Effects of dietary composition on postprandial endothelial function and adiponectin concentrations in healthy humans: a crossover controlled study. *Am J Clin Nutr*. 2007;86:923-8.
10. 松岡秀洋、東幸仁、野出孝一、植田真一郎 心血管サロゲートマーカーとしてのFMD測定と標準化案 *Jpn J Clin Pharmacol Ther* 2007;38:305-309
11. 植田真一郎 サロゲートマーカーの必要性と限界 *Jpn J Clin Pharmacol Ther* 2007;38:295-298.

[学会発表] (計 9 件)

1. 植田真一郎 メタボリックシンドロームにおける key player としての FFA-レニン-アンジオテンシン系 第 73 回日本循環器学会学術集会 シンポジウム 平成 21 年 3 月 20 日 大阪
2. 安隆則、小林真由美、植田真一郎 Elevated FFA from visceral adipose tissue cause microcirculatory dysfunction partly via local renin-angiotensin system in mononuclear cells. 第 73 回日本循環器学会学術集会 平成 21 年 3 月 21 日 大阪
3. Yasu T, Azekoshi Y, Yamakawa K, Urata H, Ueda S. Elevated FFA from visceral adipose tissue cause microcirculatory dysfunction partly via local renin-angiotensin system in mononuclear cells. American Collage of Cardiology, 27th Mar 2009, Orland, USA
4. Ueda S, Azekoshi Y, Yasu T, Yamakawa K, Urata H. Angiotensin II production in human mononuclear cells is enhanced by elevated FFA. Possible implication in endothelial dysfunction as mobile renin-angiotensin system. Scientific Session of American Heart Association 10th Nov 2008, New Orleans, USA.
5. 畔越陽子、小林真由美、安隆則、山川研、植田真一郎。アンジオテンシン II 受容体拮抗薬は FFA 惹起性インスリン抵抗性を改善する 第 31 回日本高血圧学会総会 平成 20 年 10 月 10 日 札幌
6. 安隆則、小林真由美、山川研、植田真一郎 Ca 拮抗薬による FFA 惹起性内皮機能低下と白血球活性化の改善 第 31 回日本高血圧学会総会 平成 20 年 10 月 11 日 札幌
7. 畔越陽子、植田真一郎、浦田秀則、安隆則。 FFA 負荷は単核球のアンジオテンシン II 産生能を亢進させる。 第 30 回日本高血圧学会総会 平成 19 年 10 月 25 日 沖縄
8. 山川研、島袋充生、田川辰也、植田真一郎 メタボリックシンドロームにおけるインスリン感受性と血管内皮機能の関連 第 30 回日本高血圧学会総会 平成 19 年 10 月 25 日 沖縄
9. 植田真一郎、渡部彩子、田川辰也、安隆則 内因性、外因性のアンジオテンシン負荷はヒト血管内皮機能を低下させない。 第 30 回日本高血圧学会総会 平成 19 年 10 月 27 日 沖縄

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植田 真一郎 (UEDA SHINICHIRO)
琉球大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：80285105

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

大屋 祐輔 (OHYA YUSUKE)
琉球大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：30240964

安 隆則 (YASU TAKANORI)
琉球大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：40265278

浦田 秀則 (URATA HIDENORI)
福岡大学・筑紫病院・教授
研究者番号：30289524

松岡 秀洋 (MATSUOKA HIDEHIRO)
久留米大学・医学部・准教授
研究者番号：80248393

山川 研 (YAMAKAWA KEN)
琉球大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：00363664