様　式　C－19、F－19－1、Z－19　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　３ 年　６ 月 １４ 日現在

機関番号：３７１１１

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：１９Ｋ１７６１８

研究課題名（和文）アンジオテンシンII受容体拮抗薬/ネフリライシン阻害薬の動脈硬化抑制メカニズム

研究課題名（英文）Mechanism of suppressive effects for atherosclerosis by Angiotensin Receptor-Neprilysin Inhibitor

研究代表者

末松　保憲（Yasunori, Suematsu）

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：７０７１６９２７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,700,000円

研究成果の概要（和文）：アンジオテンシンII 1型受容体拮抗薬バルサルタンとネフリライシン阻害薬サクビトリルを組み合わせた薬剤（ARNI）の動脈硬化抑制能とそのメカニズムについて検証した。アポEノックアウトマウスに高脂肪食を負荷し、4週間経過した後から、マウスを4群に分け、コントロール、ARNI 60 mg/kg、バルサルタン30 mg/kg、サクビトリル30 mg/kg群とした。
しかし十分な動脈硬化が形成されず、ARNIの動脈硬化抑制能、脂肪細胞褐色化作用についての評価が困難であった。ただ、高脂肪食負荷によって引き起こされる心収縮能障害をARNIは抑制し、そこには血管新生能亢進作用が影響している可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
動脈硬化性疾患は心筋梗塞、脳梗塞といった致命的な心血管疾患を引き起こす。また動脈硬化は大血管疾患のみならず、血管内皮障害による臓器障害も引き起こす。しかし動脈硬化を退縮させる薬は未だ開発されていない。本研究では現在心不全薬として日本で承認されたアンジオテンシンII 1型受容体ネフリライシン阻害薬（ARNI）の抗動脈硬化作用について検討したが検証できなかった。しかし、ARNIの心不全への作用機序として新たに血管新生能が作用している可能性を見出すことが出来た。本研究結果は、心不全の早期段階からARNIを投与することの有用性を示唆しており、臨床での薬剤選択への一助となるものである。

研究成果の概要（英文）：We investigated the effect of angiotensin receptor neprilysin inhibitor (ARNI) for atherosclerosis with apolipoprotein-E knockout mice were fed a high-fat diet. Male apolipoprotein-E knockout mice were fed a high-fat diet. Mice were divided into control (CTL), valsartan (30 mg/kg), sacubitril (30 mg/kg), and valsartan plus sacubitril (30 mg/kg each) (ARNI) groups after 4 weeks of pre-feeding and treated for 12 weeks. But this model mouse did not show mature atherosclerosis and we could not investigate the effect of ARNI for atherosclerosis and browning of adipose tissue enough. But in this model, early stage of cardiac dysfunction was also observed. ARNI preserved LV systolic function in apolipoprotein E knockout mice fed a high-fat diet, and myocardial angiogenetic factors induced by ARNI might reflect cardioprotective effects.

研究分野：動脈硬化

キーワード：アンジオテンシンII受容体ネフリライシン阻害薬　動脈硬化モデルマウス　アポEノックアウトマウス　左室収縮能保護作用

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

平成 28 年厚生労働省による人口動態統計では、日本の死因のうち、動脈硬化性疾患が含まれている心疾患は 2 位、脳血管疾患は 4 位であり、1 位の悪性新生物による死亡と匹敵する大きな割合を占め、総死亡の約 24%に及んでいる。これらの疾患の基盤にある動脈硬化は、今後益々重要性が高まり、その発症の予防や治療法の確立は喫緊の課題として日本動脈硬化学会でも重要視されている。動脈硬化性疾患は心筋梗塞、脳梗塞といった致命的な心血管疾患を引き起こす。また動脈硬化は大血管疾患のみならず、血管内皮障害による臓器障害も引き起こす。脂質異常症治療薬であるスタチン製剤は、心血管イベントリスクを 30%低下させることが出来たが、残余リスクに対する効果的な薬は未だ開発されていない。

２．研究の目的

アンジオテンシン II 1 型受容体拮抗薬（ARB）バルサルタンとネフリライシン阻害薬サクビトリルを組み合わせた薬剤（ARNI）は欧米では心不全薬として臨床応用されており、近年では日本でも臨床使用可能となった薬剤であるが、その作用機序からは抗動脈硬化作用を持つ可能性がある。本研究では、ARNI の脂肪組織の褐色化作用を介した HDL-C 機能改善作用による抗動脈硬化作用について検討した。

３．研究の方法

アポ E ノックマウスに 12 週間高脂肪食を負荷して動脈硬化モデルマウスを作製した。マウスを 4 群に分け、薬剤として ARNI 60 mg/kg、バルサルタン 30 mg/kg、サクビトリル 30 mg/kg を投与した。経過中に体重、非観血的血圧測定器を用いて尾部での血圧を定期的に測定した。動脈硬化の評価は大動脈をオイルレッド O 染色して行った。

このモデルマウスでは心機能低下を引き起こすため、薬剤投与前後の心機能を心エコー検査で評価した。心臓はマッソントリクローム染色、CD34 免疫染色を行い、病理学的評価を行い、その他 transforming growth factor-β (TGF-β), myosin heavy chain 7 (MyH7), CD34, vascular endothelial growth factor A (VEGFA), monocyte chemotactic protein 1 (MCP1), gene of sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium adenosine triphosphatase 2 (ATP2a2), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), β catenin, vascular endothelial-cadherin (VE cadherin)の mRNA 発現量を RT-PCR 法で評価した。

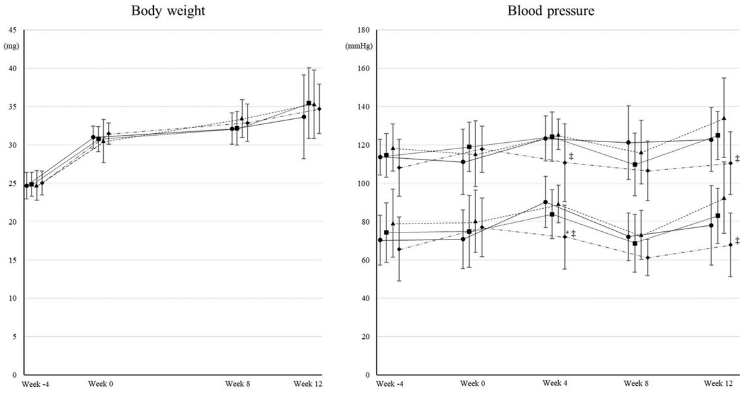
また、血液中の HDL-C のコレステロール引き抜き能を評価した。J774 マクロファージに ^{3}H-cho を取り込ませ、血清からアポ B 沈殿法によって分離させた HDL-C をマクロファージに投与した。一定の反応時間後に培養液とマクロファージを分離し、それぞれに含まれる ^{3}H 量を liquid scintillation counting で評価する事で HDL-C のコレステロール引き抜き能を評価した。

４．研究成果

（１）体重と血圧

実験開始時の平均体重は 24.8 ± 1.6 g、SBP は 113.7 ± 12.2 mmHg であった。12 週間の薬剤投与後には平均体重 34.7 ± 4.3 g、収縮期血圧 123.0 ± 18.3 mmHg であり、いずれの薬剤群でもコントロール群と比較して有意差を認めなかった。(図 1 より)（図は実線と●：コントロール群、点線と■：ＶＡＬ群、点線と▲：SAC 群、点線と◆：ARNI 群。*, †, ‡はそれぞれコントロール群、VAL 群、SAC 群との有意差を示す。以下同様）

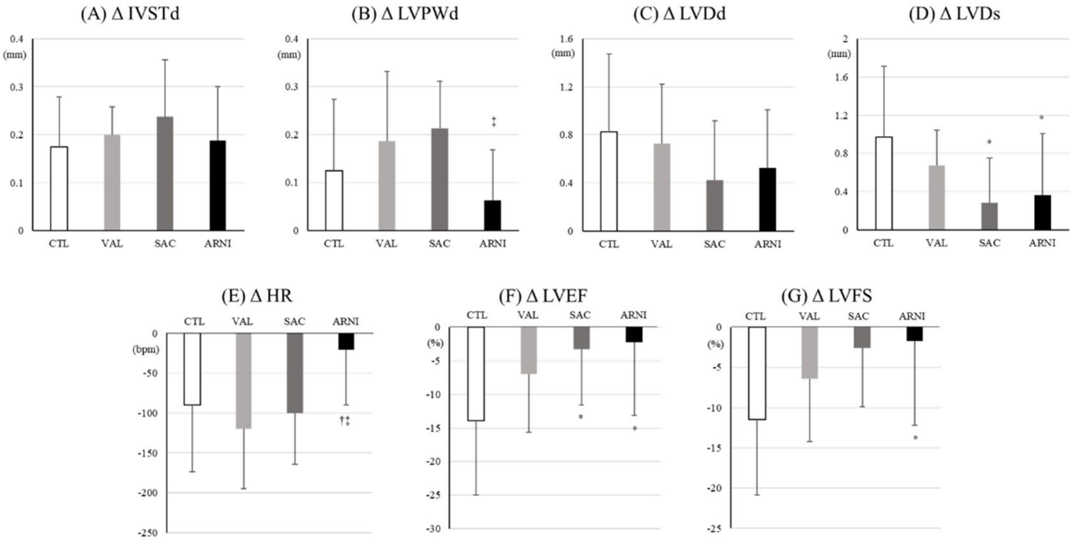
図１



（２）心機能

12 週間の経過でコントロール群では LVDｓが 0.98 ± 0.74 ㎜ 増加し、LVEF が 13.9 ± 11.1 %、LVFS は 11.5 ± 9.4 %低下した。しかし ARNI 群では LVDｓの増加は 0.36 ± 0.64 ㎜ に留まり、LVEF の低下は 2.25 ± 10.9 %、LVFS の低下は 1.8 ± 10.5 %に留まり、コントロール群と比較して有意に心機能低下を抑制した。(図２より)

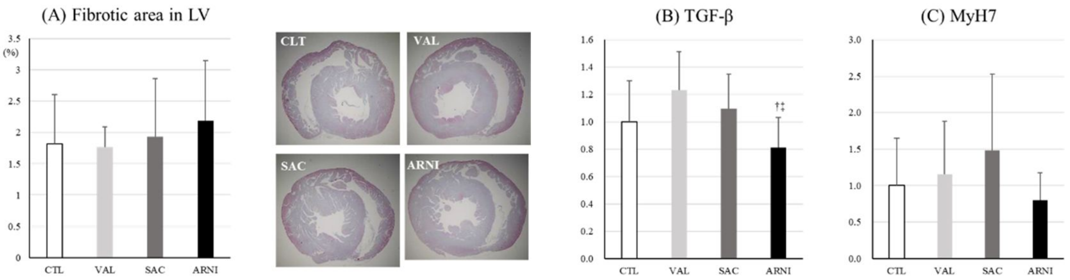
図 2



（3）心肥大と線維化

マッソントリクローム染色によって評価した心臓の線維化は平均 1.8 ± 0.8%しかできておらず、その他 RT-PCR で評価した TGF-βや MyH7 についてもコントロール群と比較して有意差を認めなかった。(図 3 より)

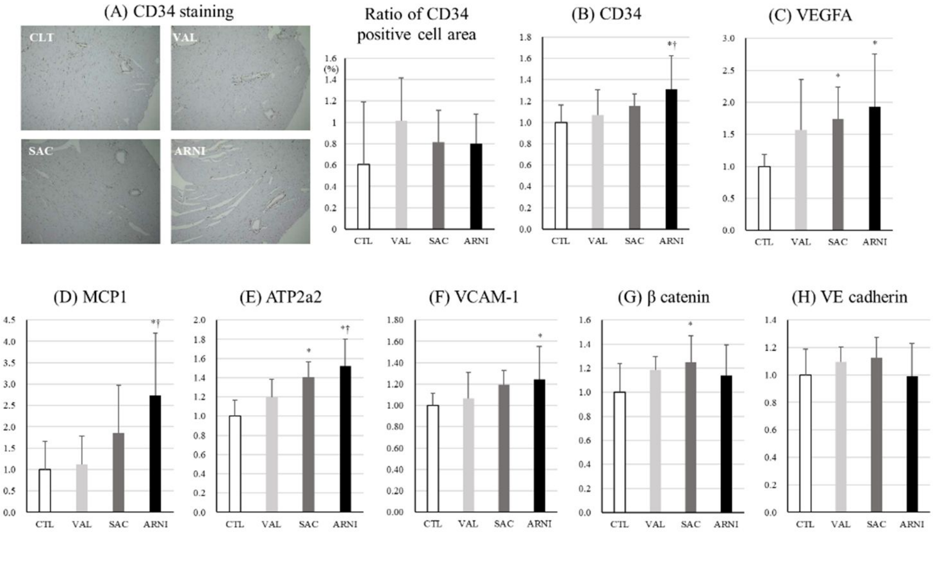
図 3



(4)血管新生能

CD34 免疫染色では各群に有意差を認めなかったが、CD34、VEGFA、 MCP1、ATP2a2、VCAM-1 の mRNA 発現量は ARNI 群においてコントロール群よりも有意に発現が亢進していた。(図４より)

図 4



（5）コレステロール引き抜き能

血清からアポ B 沈殿法によって抽出した HDL-C でのコレステロール引き抜き能を評価したがコントロール群 4.78 ± 0.24%、ARNI 群 4.64 ± 0.02%と有意差を認めなかった。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計2件（うち招待講演　0件／うち国際学会　2件）

１．発表者名 Yasunori Suematsu, Akihito Ideishi, Kohei Tashiro, Shin-ichiro Miura
２．発表標題 Angiotensin Receptor-Neprilysin Inhibitor Suppressed Cardiac Dysfunction by angiogenesis in Mice Model of Atherosclerosis
３．学会等名 Joint Meeting of the European Society of Hypertension (ESH) and International Society of Hypertension (ISH) 2021（国際学会）
４．発表年 2021年

１．発表者名 Yasunori Suematsu, Akihito Ideishi, Kohei Tashiro, Takashi Kuwano, Shin-ichiro Miura
２．発表標題 Angiotensin receptor-neprilysin inhibitor preserved cardiac function via improving angiogenetic ability in mice model of atherosclerosis-ARNI improves angiogenetic ability
３．学会等名 ESC Congress 2019（国際学会）
４．発表年 2019年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

－

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関