

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 27 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390244

研究課題名（和文） 循環器疾患への時間治療の開発

研究課題名（英文） Development of Chronotherapy for Cardiovascular Diseases

研究代表者

前村 浩二（MAEMURA KOJI）

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：90282649

研究成果の概要（和文）：体内時計の動態を考慮に入れた疾患の治療「時間治療学」の循環器疾患への応用をめざして研究を行った。心不全患者においてレニンアンジオテンシン系阻害薬は朝服用した群よりも夜服用した群でアルブミン尿の減少を認めた。また体内時計の乱れを修正するような時間治療の候補として注目されているメラトニンには血圧への直接作用は認められないものの、酸化ストレスの抑制を介した血管内皮機能の改善効果を認め、今後生活リズムが攪乱された生活習慣病への投与の有効性が示唆された。

研究成果の概要（英文）： We investigated the effect of administration time of RAS blockades on renal function associated with congestive heart failure. The patients who took RAS blockades in the evening showed less urinary albumin excretion compared with those in the morning. Melatonin, which exhibits clear circadian rhythm, suppressed ROS generation in endothelial cells and improved endothelial function. The results define the potential clinical applicability of melatonin to the prevention from cardiovascular diseases, especially in patients who are under disturbed circadian rhythm.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2010 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2011 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：循環器疾患・時間薬理学・メラトニン

1. 研究開始当初の背景

心血管系機能や代謝機能には明らかな日

内変動が見られ、また脳卒中や虚血性心疾患の発症頻度にも明らかな日内変動が見られ

る。また夜間シフト就労者で虚血性心疾患の発症リスクが上昇することもよく知られている。このように生活習慣病の発症と概日リズムは密接に関連している。概日リズムは体内時計により調節されているが、実際に体内時計を構成する時計遺伝子に変異のあるマウスで高血圧、動脈硬化、糖尿病などが発症することが示されている。このように体内時計の研究は最近急速に進歩し、その成果を疾患の治療に応用した時間薬理学が注目されるようになった。癌治療の分野においては、至適な時刻に抗癌薬の投与をすることで、最大の腫瘍縮小効果と最少の副作用発生にすることが可能であることが知られ既に臨床応用されている。循環器領域においては、動物実験で高血圧、脳卒中自然発症ラットにACE阻害薬を投与した場合、投与量は同じでも投与時刻が予後に大きく影響することが報告されていたが、臨床的に投薬時刻の予後への影響を検討した報告はなかった。

2. 研究の目的

本研究では、薬剤の投与時刻を選ぶことで、最大の効果と最小の副作用を実現できる「時間治療学」の循環器疾患への応用をめざす。まず高血圧や心不全患者を対象として、降圧薬や心不全薬の投与時刻が24時間の降圧効果、腎機能、アルブミン尿、また副作用の発生に影響するかを検討する。さらに体内時計の乱れを修正するような時間治療をめざすが、まずはその最も有力な候補物質となるメラトニンについて、血圧、血管機能に及ぼす影響を検討する。

3. 研究の方法

(1) ヒト大動脈血管内皮培養細胞(HAEC)を用いた *in vitro* 実験で、メラトニン(10 μ mol/L)単独投与がeNOS活性化およびNO産生にいかなる影響を与えるのか、またアンジオ

テンシンII(Ang II 200 nmol/L)負荷で惹起されるROS産生亢進およびeNOS不活性化をメラトニンが回復させるかについて検討した。次にAng II持続負荷ラットを用いた *in vivo* 実験でAng II負荷で惹起される血管壁でのROS産生亢進および血管内皮機能障害を、メラトニンが回復させるかを検討した。

(2) 心不全患者に、アンジオテンシン変換酵素阻害薬またはアンジオテンシンII受容体拮抗薬を朝投与した場合と夜投与した場合の、臓器保護に及ぼす効果の違いについて83例について比較検討した。

(3) 高血圧患者を対象として、クロスオーバー法にて降圧薬を朝および夜投与し、降圧薬の投与時刻が24時間血圧パターン、腎機能、アルブミン尿、血管内皮機能、また副作用の発生に影響を検討した。

4. 研究成果

(1) メラトニン(10 μ mol/L)投与によりHAECにおいてNO産生が亢進することをNO蛍光指示薬であるDAF-FM DAを用いて確認した。この際、内皮型NO合成酵素(eNOS)のリン酸化および二量体化のいずれも亢進していた。さらに、血管内皮細胞での活性酸素(ROS)産生が亢進し、血管内皮機能が著しく障害されている病的状態においても、メラトニン投与が血管内皮機能を改善することができるか検討を加えた。Ang IIはtype1レセプター(AT1R)を介してNADPHオキシダーゼを活性化し、ROS産生を亢進し、NO産生を低下させることが知られている。そこでROSの蛍光指示薬であるCM-H₂DCFDAを用いてAng II負荷によるROS産生亢進をメラトニン同時投与が軽減できるかに関して検討した。Ang II(200 nmol/L)をHAECに添加するとROS産生が亢進し、メラトニンで抑制された。また、eNOSのリン酸化および二量体化も、Ang IIにより抑

制されたが、メラトニン前処置により改善がみられた。これらより培養血管内皮細胞において、メラトニンは、NADPHオキシダーゼ活性化を抑えることにより、Ang II負荷によるROS産生亢進を抑え、さらにeNOS活性化障害を抑制することが明らかになった。

次に *in vivo* の実験でメラトニンの血管内皮機能に対する効果を検討した。Ang II を浸透圧ポンプにより 1 週間持続負荷し高血圧 (sBP 約 200 mmHg) を惹起したラットでは、血管壁の ROS 産生が亢進し、内皮依存性血管拡張反応が低下していた。このラットにメラトニンを同時投与すると、血圧自体は変化しなかったが、血管壁の全層にわたり Ang II により惹起される ROS 産生亢進が抑えられ、また Ang II 持続投与により低下した内皮依存性血管拡張反応が回復した (Figure1)。

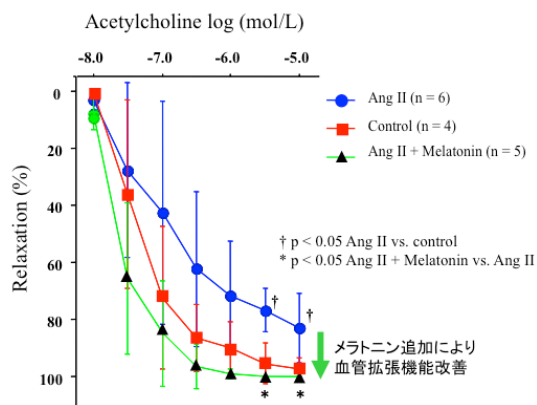


Figure1 アセチルコリンによる血管拡張反応：アセチルコリンによる血管拡張は AngII により抑制されたが、メラトニンの投与により改善した。

血管内皮機能には日内変動を呈することが知られているが、これらの結果は血管内皮機能の日内変動にメラトニンが関与していることを示唆するとともに、眠前のメラトニン投与による生活習慣病改善の可能性も示唆している。さらにメラトニン投与により体内時計の位相が偏位するか培養細胞を行って検討したが、研究期間内には明確な結果は得られなかった。現在、メラトニン受容体の

アゴニスト、ラメルテオンを、昼夜逆転している入院患者に投与した際に活動度や自律神経機能、血管内皮機能の日内変動が変化するかを検討中である。

(2) 心不全患者に、アンジオテンシン変換酵素阻害薬またはアンジオテンシン II 受容体拮抗薬を朝投与した場合と夜投与した場合の、臓器保護に及ぼす効果の違いについて 83 例について比較検討した。外来診察時の血圧は朝服用群 123±14 mmHg、夜服用群 124±13 mmHg で有意差は無かった。朝の尿中アルブミン/クレアチニン比 (UACR) は朝服用群で 98±196 mg/gCr、夜服用群で 66±129 mg/gCr であり、夜服用群の方で有意にアルブミン尿が少なかった (Figure2)。一方推定 GFR は 62±17 と 60±16 ml/min/1.73m² で有意差は無かった。このように心不全薬の投与時間が腎保護作用の効果発現に関与している可能性が示された。今後この機序をさらに明らかにするために、無作為に朝投与群と夜投与群に割り当てて、腎保護作用、心不全への効果、自律神経活動の日内変動に及ぼす影響を前向きに解析して行く予定である。

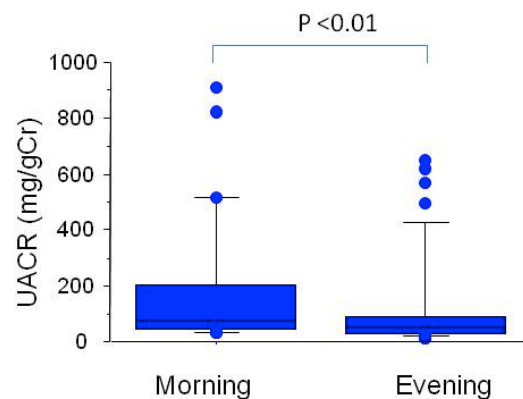


Figure2 服薬時刻がアルブミン尿に及ぼす影響：ACEI または ARB を夜服用した群の方がアルブミン尿が有意に少なかった。

(3) 高血圧患者への降圧薬投与時間の 24 時間血圧のパターン、腎機能、また副作用の発生に影響するかを検討では、当初の計画よりエントリーが遅れており、研究期間内に結果を出すには至らず、さらに期間を延長して解析中である。

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 41 件)

- ① Koga S, Ikeda S, Nakata T, Yasunaga T, Takeno M, Koide Y, Maemura K. Low glomerular filtration rate is associated with high prevalence of vasospastic angina. *Circ J*. 2011;75:1691-1695. 査読有
- ② Haruta D, Matsuo K, Tsuneto A, Ichimaru S, Hida A, Sera N, Imaizumi M, Nakashima E, Maemura K, Akahoshi M. Incidence and prognostic value of early repolarization pattern in the 12-lead electrocardiogram. *Circulation*. 2011;123:2931-2937. 査読有
- ③ Takeda N, Maemura K. Circadian clock and cardiovascular disease. *J Cardiol*. 2011;57:249-256. 査読無
- ④ Ikeda S, Maemura K. Ezetimibe and vascular endothelial function. *Curr Vasc Pharmacol*. 2011;9:87-98. 査読有
- ⑤ Takeda N, Maemura K. Cardiovascular disease, chronopharmacotherapy, and the molecular clock. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010; 62: 956-966. 査読有
- ⑥ Takeda N, Maemura K. Circadian clock and vascular disease. *Hypertens Res*. 2010;33:645-651. 査読有
- ⑦ Suzuki J, Ogawa M, Tamura N, Maejima Y, Takayama K, Maemura K, Honda K, Hirata Y, Nagai R, Isobe M. A critical role of sympathetic nerve regulation for the treatment of impaired daily rhythm in hypertensive Dahl rats. *Hypertens Res*. 2010;33:1060-1065. 査読有
- ⑧ 前村浩二:メタボリックシンドロームと概日リズム. メタボリックシンドロームⅡ (後篇) -メタボリックシンドロームの基礎- 最新医学 66 (6月増刊):1477-86, 2011 査読無
- ⑨ 前村浩二:生体リズムの乱れを調整する3要素(光、食事、メラトニン). *心臓* 43 (2):154-158, 2011 査読無
- ⑩ 前村浩二:循環器領域における時間生物学. *日本心電学会誌 心電図JPN JElectrocardiology* 30 suppl 3:43-52, 2010 査読無
- ⑪ 前村浩二:循環器領域の時間治療. *心臓* 41 (10):1067, 2009 査読無
- ⑫ 前村浩二:特集 ストレス・日内変動と循環器疾患-エビデンスとその発生機序-循環器疾患と時計遺伝子. *循環器科* 66 (2):202-208, 2009 査読無
- ⑬ 前村浩二:特集 時間薬理学～最適な投与方法を求めて～ 循環器疾患の時間治療. *医薬ジャーナル* 45 (69):137-141, 2009 査読無
- ⑭ 前村浩二:特集:生体リズムから心血管病を探る 血管内皮と時計遺伝子の関連性をみる. *Vascular Medicine* 5(4):43-49, 2009 査読無
- ⑮ 前村浩二:特集 時間と病気 生体時計から時間医学へ循環器疾患のリズム. *Medical Bio* 11:42-46, 2009 査読無

〔学会発表〕（計 13 件）

- ① 第 76 回日本循環器学会年次学術集会
（福岡、2012/3/16-18）トピックス：体内時計と循環器疾患 前村浩二：
Circadian Clock and Cardiovascular Diseases-Overview
- ② 第 18 回日本時間生物学会学術大会（名古屋、2011/11/24-25）シンポジウム：臨床時間生物学の現状と展望 前村浩二：生活習慣病発症における体内時計の意義
- ③ 第 84 回日本生化学会大会（京都、2011/9/21-24）シンポジウム：生物時計と代謝制御-中枢時計から末梢時計へ 前村浩二：循環器疾患発症における生物時計の意義
- ④ 第 75 回日本循環器学会年次学術集会（横浜、2011/8/3-4）Focus Session：Cardio-Metabolic “Clock” and “Memory” 前村浩二：Role of Clock Genes in the Development of Cardiovascular Disease
- ⑤ 第 28 回日本医学会総会（東京 2011/4/8-10，東日本大震災のため Web 上での開催）教育講演：循環と呼吸 前村浩二：体内時計と心血管疾患
- ⑥ 第 18 回 日本血管生物医学会学術大会（大阪、2010/12/1）シンポジウム Koji Maemura：The Role of Biological Clock in Cardiovascular Diseases
- ⑦ 第 19 回日本医療薬学会年会（長崎、2009/10/25）前村浩二：教育講演 循環器疾患とサーカディアンリズム

〔図書〕（計 2 件）

- ① 前村浩二：概日リズム。（日本血管生物医学会（編）：血管生物医学事典，朝倉

書店，東京，pp. 473-474 所収）2011

- ② 前村浩二：生活習慣病の薬物療法。（島田和幸（編）：からだの科学primary選書 生活習慣病のくすり，日本評論社，東京，pp. 2-15 所収）2011

〔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

<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/junkanki/research/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前村 浩二 (MAEMURA KOJI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：90282649

(2) 研究分担者

池田 聡司 (IKEDA SATOSHI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・講師
研究者番号：10336159

(3) 連携研究者

森田 啓之 (MORITA HIROYUKI)
東京大学・大学院医学系研究科・特任准教授
研究者番号：60323573

定永 恒明 (SADANAGA TSUNEAKI)
熊本市立植木病院