

機関番号：24601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790722

研究課題名（和文） 腎不全における可溶性 Flt-1 の動脈硬化制御機序の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the arteriosclerosis control mechanism of soluble Flt-1 in the renal insufficiency

研究代表者 竹田 征治 (TAKEDA YUKIJI)
奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：60398443

研究成果の概要（和文）：我々は、Vascular Endothelial Cell Growth Factor (VEGF) family である Placental Growth Factor (PlGF) の急性心筋梗塞での意義を解明してきた (JACC2006;47:1559, Circ. J 2009;73:1674)。この次段階として PlGF と拮抗的に働く PlGF 受容体である Flt-1 の可溶性アイソフォーム (sFlt-1) も同時に解析し、総合的に PlGF 系の病態生理的意義を追求してきた (慢性では PlGF はマクロファージを活性化して動脈硬化促進性に働く)。

腎不全では動脈硬化や冠動脈疾患が高率に合併することは周知の事実であるが、その分子機序は解明されておらず、PlGF 系の意義は全く研究されていなかった。

[結果]腎機能低下を伴う 329 例の冠動脈疾患症例を対象にカテーテル検査中に血中 sFlt-1、PlGF 濃度を測定した。血中 sFlt-1 濃度は推算 GFR の低下に比例して有意に低下し、PlGF/sFlt-1 比は GFR と逆相関するとともに、冠動脈の重症度と比例していた。PlGF 濃度は有意な変化を示さなかった。sFlt-1 特異的 PCR での解析では 76 例のヒト腎生検組織中の sFlt-1 mRNA も腎機能の低下に比例して低下していた。

この臨床知見をもとに ApoE ノックアウトマウスに 5/6 腎摘出腎不全モデルを作製すると、血中 sFlt-1 濃度と腎臓での sFlt-1 産生が減少すると同時に、大動脈硬化病変の有意な増悪が確認された。リコンビナント sFlt-1 蛋白の連続 4 週間投与にて、マクロファージの浸潤を減少させることにより有意にレスキューすることに成功した。このことは sFlt-1 が腎不全における動脈硬化発症・進展機序に少なくとも部分的には関与していること、さらにその補充により治療に応用できるという可能性を世界で初めて提唱した。

研究成果の概要（英文）：Placental growth factor (PlGF), a family of VEGF, plays important roles in the development of atherosclerosis, which is antagonized by sFlt-1. In our study, plasma sFlt-1 level was positively correlated with eGFR in the 329 patients underwent cardiac catheterization (after 20-Unit heparin administration). The PlGF/sFlt-1 ratio was significantly correlated with multi-vessel coronary artery disease.

Heparin is reported to affect on plasma sFlt-1 level, we have to consider the effect of heparin during the cardiac catheterization. We hypothesized that the heparin-induced increment of plasma sFlt-1 level would indicate the total circulating sFlt-1 and systemic release from endothelial cells. Plasma sFlt-1 levels increased in 251 CKD patients after heparin injection (0.4IU/Kg) and that the level was positively correlated with eGFR,

though the effect is opposite in baseline circulating sFlt-1 level. Mice study also revealed that sFlt-1 mRNA expression in organs examined (kidney, lung) was suppressed by about 50% in 5/6 nephrectomized mice, indicating total amount of sFlt-1 was decreased in CKD.

Analysis of 343 CKD patients revealed that patients with higher PlGF/sFlt-1 ratio after heparin injection had significantly higher risk of acute cardiac death plus total cardiovascular event compared to lower ratio.

Atherosclerotic plaque area and macrophage infiltration into the plaque were significantly increased in 5/6 nephrectomized ApoE-deficient mice; a model of atherosclerosis in renal failure. Replacement therapy with recombinant sFlt-1 significantly reduced atherosclerotic plaque formation.

PlGF/sFlt-1 has an important role in atherosclerotic process of CKD patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

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：分子心臓病態学

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病（CKD）患者では心血管疾患の罹患率および死亡率が著明に高く、現在の医療における重大な問題であるが、CKDに合併する動脈硬化症の発症・増悪の原因解明と機序に立脚した治療法の確立は極めて不十分である。申請者らはこれまでの研究によってCKD患者で産生が低下する可溶性Flt-1が腎機能障害と心血管疾患発症を関連づける重要な因子であることを発見した。われわれは可溶性Flt-1の腎不全における動態を検討することで、慢性腎臓病関連動脈硬化症の新たな治療法の開発を目指す。

2. 研究の目的

今回の研究にて、動物モデルを用いて腎不全患者で可溶性Flt-1が低下する機序、可溶

性Flt-1が動脈硬化病変を制御している機序を検討することにより、腎不全における動脈硬化進展機序の解明をめざす。また、臨床応用に向け、可溶性Flt-1の最適な投与条件の検討も平行して行う。

3. 研究の方法

血管内皮細胞にて可溶性Flt-1の分泌を制御している因子の解明を動脈硬化モデルであるアポEノックアウトマウスに5/6腎摘にて腎不全を発症させ、高コレステロール食を10週間投与した後に大動脈をオイルレッド染色で検討した。また、可溶性Flt-1に影響し得るヘパリンをIn vivo、Ex vivo、In vitroの系を用いて可溶性Flt-1の動態を検討した。可溶性Flt-1ノックアウトマウスのマクロファージの発現遺伝子につき動脈硬化促進的

に働きうるかどうかにつき検討した。

4. 研究成果

5/6 腎臓摘出マウスの検討では腎臓だけではなく肺でも可溶性 F1t-1 の mRNA が低下していた。このことからわれわれは可溶性 F1t-1 が全身の血管内皮細胞で低下している可能性を考えた。われわれは可溶性 F1t-1 の CKD 患者での動態を検討するために血中可溶性 F1t-1 値に影響し得るヘパリンに注目した。343 人の CKD 症例にごく少量のヘパリン (0.4 IU/Kg) を投与すると投与前に比して、投与後に優位に可溶性 F1t-1 値が上昇しておりその値は腎機能と有意な相関を示した。可溶性 F1t-1 は血中に存在するものに加えヘパリン硫酸に結合して血管内皮細胞膜上に存在するといわれている。このことを証明するために C57BL/6 マウスにヘパリンを尾静脈から投与し、10 分後の血中可溶性 F1t-1 値を測定すると非投与群に比して優位に高値を示した。また、マウス大動脈を採取し Ex vivo で培養した群でもヘパリン投与後に可溶性 F1t-1 値の高値を示した。ヒト血管内皮細胞を用いた検討でも、ヘパリン投与 10 分後に可溶性 F1t-1 高値を示し、mRNA 量に変化は認めなかった。このことから全身の血管内皮細胞膜上に存在する可溶性 F1t-1 がヘパリンにより血中に遊出し、CKD 患者ではその発現量が低下していることが明らかとなった。実際に、腎不全患者の血清をヒト内皮細胞に投与すると、可溶性 F1t-1 の mRNA 発現量は低下した。また、その機序として同アッセイ系において内皮細胞障害マーカー (Selectin、ICAM、VCAM) の mRNA 量が CKD 患者血清投与群で増加しており、酸化ストレスマーカー (HO-1、NOX-2) も発現増強していた。さらに抗酸化剤であるビタミン E を投与すると可溶性 F1t-1 値が一

部レスキューされた。5/6 腎摘 ApoE ノックアウトマウスの検討では通常の ApoE ノックアウトマウスに比して大動脈の動脈硬化病変が進行しており、リコンビナント可溶性 F1t-1 蛋白の投与でその進行は抑えられた。さらにわれわれは可溶性 F1t-1 ノックアウトマウスも作成し、ApoE ノックアウトマウスと掛けあわせたところ、可溶性 F1t-1 ノックアウトマウス群ではコントロール群に比して動脈硬化病変が進行していた。このことから、可溶性 F1t-1 が動脈硬化進展に非常に重要な役割を果たしており、CKD 患者では酸化ストレスによる内皮障害が可溶性 F1t-1 の発現低下を惹起し、PLGF の動脈硬化促進シグナルが相対的に亢進することで動脈硬化が進展すること、ヘパリン投与により CKD 患者における抗動脈硬化作用が予測できることが示唆された。

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)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 竹田征治、上村史朗、松井 勝、Novel mechanisms of anti-atherogenic effect by soluble F1t-1 in CKD patients、第 76 回日本循環器学会総会、平成 24 年 3 月 16 日、福岡
- ② 竹田征治、上村史朗、松井 勝、可溶性 F1t-1 による慢性腎臓病患者における抗動脈硬化作用のメカニズム解明、第 109 回日本内科学会総会、平成 24 年 4 月 13 日、京都

- ③ 松井 勝、上村史朗、竹田征治、Plasma Soluble Flt-1 after heparin administration can be a predictor of endothelial damage in CKD patients、The 44th Annual Meeting of the American Society of Nephrology 2011、平成 24 年 11 月 10 日、Philadelphia

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹田 征治 (TAKEDA YUKIJI)
奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：60398443