

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590313

研究課題名(和文)メタボリックシンドロームの合併症予防を目指したキマーゼ阻害の意義

研究課題名(英文)Significance of chymase inhibition to prevent the complication of metabolic syndrome

研究代表者

高井 真司(Takai, Shinji)

大阪医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80288703

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：メタボリックシンドロームの合併症として非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)や脳卒中易発性高血圧自然発症(SHR-SP)ラットにおけるキマーゼ阻害薬の効果を検討した。ハムスターNASHモデルでは、キマーゼ阻害薬による血漿中ASTおよびALTが改善され、肝臓組織中の脂肪滴や線維化の改善効果も示された。SHR-SPラットでキマーゼ阻害薬は血圧に影響なく抗酸化作用と血管内皮への炎症細胞浸潤防止を介して血管内皮機能障害を予防した。キマーゼ阻害薬は有意に生存期間も延長させた。

これらの結果は、キマーゼ阻害がメタボリックシンドロームの合併症を予防するのに有用なストラテジーになることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：Effects of the chymase inhibitor were evaluated on animal models with the non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and stroke-prone spontaneously hypertensive (SHR-SP) rats as complications of the metabolic syndrome. In a hamster NASH model, plasma levels of AST and ALT were improved by the chymase inhibitor and the improvement of lipid deposition and fibrosis was also observed. In SHR-SP rats, the chymase inhibitor showed to prevent the vascular endothelial dysfunction via the anti-oxidative effect and the prevention of inflammatory cell-infiltration into the endothelium without hypotensive effect. The chymase inhibitor also extended the survival term.

These results suggest that chymase inhibition become the useful strategy to prevent the complication of metabolic syndrome.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：キマーゼ メタボリックシンドローム 合併症 阻害薬 高血圧 NASH 脳卒中 血管障害

### 1. 研究開始当初の背景

(1) キマーゼは、血管組織に存在する非アンジオテンシン変換酵素 (ACE) のアンジオテンシン II 産生酵素として精製された。その後、キマーゼは、アンジオテンシン II の産生以外にも Transforming-Growth Factor (TGF)- $\beta$  や Matrix metalloproteinase (MMP)-9 の活性化作用も有することが in vitro で報告された。

(2) キマーゼ阻害薬は、冠動脈結紮による心筋梗塞後の急性心不全モデルや大動脈をエラストラーゼ処置した急性の大動脈瘤モデルにおいて、心臓や血管の機能障害を予防することが示されてきた。その一方で、キマーゼ阻害薬は、血圧や血中脂質などへの影響がなく、メタボリックシンドロームによる合併症 (心臓や血管、その他の慢性の臓器障害) に対する影響は不明であった。

### 2. 研究の目的

(1) メタボリックシンドロームの合併症として脂肪肝が進行した非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) におけるキマーゼの経時的病態解析とキマーゼ阻害薬による治療効果を解析することを目的とした。

(2) メタボリックシンドロームの合併症として高血圧モデルにおけるキマーゼの経時的解析とキマーゼ阻害薬による血管保護、そして、脳卒中発症予防について解析することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) NASH モデルは、8 週齢の雄性ハムスターにメチオニン・コリン欠損 (MCD) 食を 12 週間与えることにより作製した。この時点で正常食と MCD 食で飼育した一部のハムスターの血液および肝臓を解析した。NASH の病態形成を確認後、プラセボまたはキマーゼ阻害薬を 12 週間投与したのち解析した (プラセボ群およびキマーゼ阻害薬群: 各群 n=5)。普通食で飼育したハムスターを正常群とした (n=5)。血液では AST、ALT の解析を行い、肝臓組織抽出液を用いてキマーゼ活性や脂質過酸化物質のマロンジアルデヒド (MDA) やアンジオテンシン II の濃度、TGF- $\beta$ 、コラーゲン I およびコラーゲン III などの遺伝子発現を測定した。また、肝臓組織切片を HE 染色およびアザン染色し、脂肪滴および線維化領域をそれぞれ評価した。

(2) SHR-SP は、4 週齢の雄性ラットを用いて正常群は Wistar Kyoto (WKY) ラットを用いた。2 つの実験を行い、1 つは 8 週間プラセボまたはキマーゼ阻害薬を投与した実験で各群 8 匹を使用し、コントロール群の WKY ラットも 8 匹を使用した。12 週齢まで試験開始後 8 週間、血圧、体重を測定し、その後、血液および心臓と血管を摘出して解析した。

血液では、血漿中のレニン活性、ACE 活性、アンジオテンシン II 濃度を測定した。血管組織では、摘出血管によるアセチルコリンによる弛緩反応を解析し、内皮機能の指標として評価した。残りの血管で、キマーゼ、MMP-9、ACE、p<sup>22phox</sup> などの活性や遺伝子発現を測定し、心臓ではキマーゼやコラーゲン I およびコラーゲン III などの遺伝子発現を測定した。

(2) 8 週間薬物投与した SHR-SP の血管組織切片を用いて組織学的解析を行った。電子顕微鏡にて血管内皮を解析し、内皮細胞への単球/マクロファージの浸潤程度を観察した。また、抗単球/マクロファージ抗体を用いた免疫染色を行い、単位血管面積あたりの血管内皮細胞へ浸潤した単球/マクロファージ数を計測した。

(3) SHR-SP を用いたもう 1 つの実験として、生存率に対するキマーゼ阻害薬の影響を解析するため、4 週齢の雄性 SHR-SP にプラセボまたはキマーゼ阻害薬の投与を開始し、全ラットが死亡するまで観察した (プラセボ群およびキマーゼ阻害薬群: 各群: 20 匹)。この観察期間、4 週毎に血圧および体重を測定した。

### 4. 研究成果

(1) ハムスター-NASH モデルにおけるキマーゼ阻害薬の治療効果

12 週間 MCD 食負荷による NASH モデルの解析

MCD 食負荷後 12 週の時点で、正常食群に比して血中の AST および ALT は有意に増加し、肝臓組織中のキマーゼ活性、アンジオテンシン II 濃度、MDA 値は有意に増加した。また、肝臓組織中のコラーゲン III の遺伝子発現レベルも有意に上昇していた。肝臓組織切片における脂肪滴および線維化面積は有意に増加した。これらの結果より、12 週間 MCD 食をハムスターに負荷することで NASH が形成されることが確認でき、NASH が形成されている肝臓ではキマーゼが有意に増加することが示された。

キマーゼ阻害薬による NASH の治療効果

MCD 食負荷を 12 週間行ったハムスター-NASH モデルに MCD 食負荷を継続しつつプラセボまたはキマーゼ阻害薬の投与を 12 週間行って解析した。血中の AST および ALT は、プラセボ群では投薬前 (MCD 食負荷 12 週後) より更に高値になったのに対し、キマーゼ阻害薬群は投薬前の時点の値に比して有意に減少し、プラセボ群とも有意に差があった。また、肝臓組織中の脂肪滴および線維化面積もキマーゼ阻害薬投与群で、投薬前に比べて有意な低下を示した。更に、コラーゲン I、コラーゲン III、 $\alpha$ -smooth muscle actin、PDGF- $\beta$  などの線維化関連の遺伝子発現量も

キマーゼ阻害薬群はプラセボ群に比して有意に減少していた。

これらの結果より、キマーゼ阻害薬は、一旦形成された NASH に対して治療効果があることが示された。

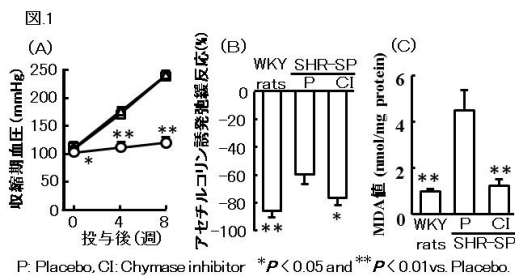
(2) SHR-SP におけるキマーゼ阻害薬の効果  
血管内皮障害に対するキマーゼ阻害薬の効果

4 週齢の時点で既にコントロールの WKY ラットに比べて SHR-SP の血圧は有意に高く、プラセボまたはキマーゼ阻害薬を 8 週間投与後、両群とも 240 mmHg 前後の非常に高い血圧値を示し、両群間の血圧に差はなかった (図 1A)。血管組織抽出液中のキマーゼ活性およびキマーゼの遺伝子発現量は共に SHR-SP のプラセボ群でコントロール群に比して有意に増加していた。しかし、それらは、キマーゼ阻害薬で有意に抑制された。

摘出した血管によるアセチルコリンによる弛緩反応はコントロール群に比べて有意にプラセボ群で減弱したのに対し、キマーゼ阻害薬群は有意にこの弛緩反応の減弱を予防し、コントロール群との間に有意差を認めなかった (図 1B)。また、血管組織中の MDA 値もプラセボ群で有意に増加したが、キマーゼ阻害薬群では有意に抑制されていた (図 1C)。

一方、血中のレニン活性、ACE 活性およびアンジオテンシン II 濃度にはキマーゼ阻害薬は、血圧同様に影響がなかった。

これらの結果は、キマーゼ阻害薬が降圧効果やレニン-アンジオテンシン系に影響することなく、酸化ストレスを軽減して血管内皮障害を予防したことを示唆する。



心臓においても SHR-SP 群のプラセボ群でコントロール群に比したキマーゼの増加が確認され、キマーゼ阻害薬群では有意に抑制された。また、コラーゲン I やコラーゲン III の遺伝子発現もプラセボ群で有意に増加していたが、キマーゼ阻害薬群で有意に抑制され、心臓/体重比もプラセボ群でコントロール群よりも大きかったが、キマーゼ阻害薬群では有意に減少していた。

これらの結果は、キマーゼ阻害薬が、降圧機序を介さずに SHR-SP の心肥大および心臓へのコラーゲン沈着を予防したことを示唆

する。

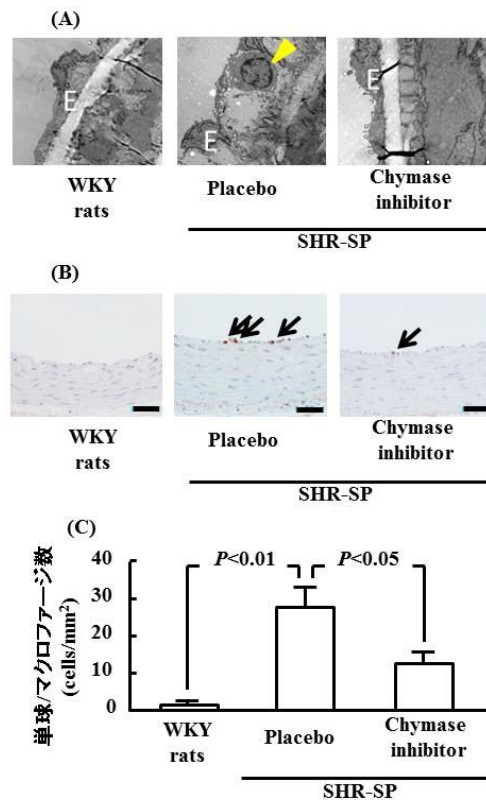
血管内皮への炎症細胞浸潤に対するキマーゼ阻害薬の効果

プラセボまたはキマーゼ阻害薬を 8 週間投与後に摘出した血管組織切片の電子顕微鏡による典型写真 (図 2A) と光学顕微鏡による抗単球/マクロファージ抗体による免疫染色した典型写真 (図 2B) を示した。

電子顕微鏡による解析および免疫染色による単球/マクロファージの免疫染色の結果では、コントロール群で単球/マクロファージの血管内皮への浸潤はほとんど見られなかった。しかし、プラセボ群では単球/マクロファージの浸潤が明らかに増加し、キマーゼ阻害薬ではその増加が抑制されていた。定量した結果が図 3C になり、プラセボ群でコントロール群に比べて有意に増加し、キマーゼ阻害薬群で有意に減少した。

これらのことより、キマーゼ阻害薬は血管内皮への炎症細胞浸潤抑制作用を有することを示す。

図 2



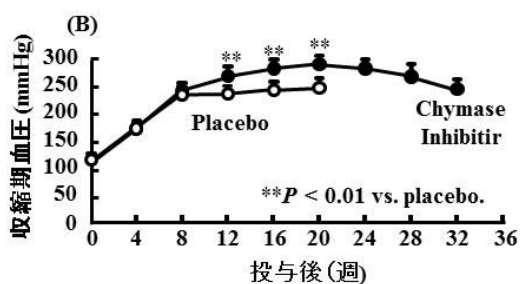
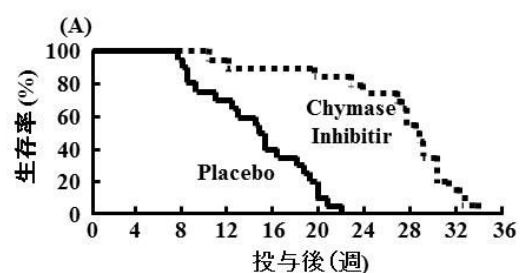
SHR-SP の生存期間に対するキマーゼ阻害薬の効果

キマーゼ阻害薬およびプラセボ群は、投与後 8 週までは死亡例を認めなかったが、投与後 8 週直後からプラセボ群では死亡例が急増し始めた (図 3A)。一方、キマーゼ阻害薬群も投与後 10 週を超えた頃より死亡例が開始

めた。そして、投与後 22 週を超えた時点でプラセボ群は、全 20 匹のラットが死亡した。一方、キマーゼ阻害薬群では投与後 32 週を超えた時点で全てのラットが死亡し、生存期間を約 1.5 倍、有意に延長させた (図 3A)。また、プラセボ群の血圧は、死亡例が出始めた投与後 8 週から上昇することなく、250 mmHg を超えるラットはほとんどなかったのに対し、キマーゼ阻害薬群では、投与後 20 週まで上昇を続け、約 270 mmHg 近くまで平均値が上昇した (図 3B)。

これらの結果は、キマーゼ阻害薬が、降圧効果なしで血管保護効果を発揮し、生存期間を延長させることを示す。

図 3



\*\* $P < 0.01$  vs. placebo.

本研究期間に行った実験結果より、キマーゼ阻害薬には、メタボリックシンドロームによる慢性的な臓器障害 (合併症) の発症や進展にも深く関与すること、そして、キマーゼ阻害薬が、これらの合併症予防に有用であることが示唆された。現在、メタボリックシンドロームの症状の軽減目的で使用されている高血圧治療薬、高脂血症治療薬、糖尿病治療薬とキマーゼ阻害薬との併用による有用性が期待される。

#### 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 2 件)

Takai S, Jin D, Chen H, Li W, Yamamoto H, Yamanishi K, Miyazaki M, Higashino H, Yamanishi H, Okamura H. Chymase inhibition improves vascular dysfunction and

survival in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. J Hypertens, 査読有. In press.

Masubuchi S, Takai S, Jin D, Tashiro K, Komeda K, Li ZL, Otsuki Y, Okamura H, Hayashi M, Uchiyama K. Chymase inhibitor ameliorates hepatic steatosis and fibrosis on established non-alcoholic steatohepatitis in hamsters fed a methionine- and choline-deficient diet. Hepatol Res. 査読有. 2013, Vol.43, No.9, pp. 970-978.

[学会発表](計 3 件)

高井真司、金徳男、陳紅、李文、山本英幸、山西恭輔、宮崎瑞夫、山西博道、岡村春樹. 脳卒中易発性高血圧自然発症ラットの血管障害に対するキマーゼ阻害薬の効果. 第 124 回日本薬理学会近畿部会、2013 年 11 月 1 日、京都

高井真司、金徳男、陳紅、李文、山本英幸、山西恭輔、宮崎瑞夫、山西博道、岡村春樹. 脳卒中易発性高血圧自然発症ラットの血管障害におけるキマーゼの役割. 第 36 回日本高血圧学会総会、2013 年 10 月 25 日、大阪

Masubuchi S, Takai S, Jin D, Tashiro K, Komeda K, Hayashi M, Uchiyama K. A chymase inhibitor, ty-51469, ameliorates already formed hepatic steatosis and fibrosis in a hamster nonalcoholic steatohepatitis (nash) model. 63th Annual meeting of American Association for the Study of Liver Diseases. 2012 年 11 月 9 日、ボストン (米国),

[図書](計 3 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

高井 真司 (TAKAI Shinji)

大阪医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 80288703