

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 11 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461115

研究課題名(和文) 可溶性Flt-1のCKD関連心不全における役割と肺水腫発症抑制効果の検討

研究課題名(英文) Roles of soluble Flt-1 in renal dysfunction-related heart failure.

## 研究代表者

竹田 征治 (TAKEDA, YUKIJI)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：60398443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎臓病(CKD)は、心肥大を呈し心不全をよく合併することは臨床的によく観察されるが、その分子機序は不明であった。

今回の研究で、CKDでは慢性炎症や血管新生を惹起するサイトカインであるPLGFの産生が増加し、その内因性の拮抗物質である可溶性Flt-1の産生が低下することによって、CKDで心肥大や心不全の発症に関与していることを、sFlt-1を特異的に欠損するマウスを用いて証明した。PLGFの働きを抑制することや、sFlt-1の産生を増加させることが、CKDに合併する心肥大や心不全の治療に応用される可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Cardiac hypertrophy and heart failure are highly associated with chronic kidney diseases (CKD), by which mechanism is not fully understood.

The present study showed that production of PLGF is up-regulated and a soluble form of its receptor, fms-like tyrosine kinase, is down-regulated in CKD.

Given that sFlt-1 acts as an endogenous antagonist against PLGF, the present study also provides the evidence that the imbalance of PLGF and sFlt-1 production enhances the biological signaling pathway via Flt-1, and is involved in the cardiac hypertrophy and heart failure associated with CKD, via relative activation of the PLGF/Flt-1 pathway, using mice specifically lacking sFlt-1 but not Flt-1. These findings raise the possibility that the treatment strategy, inhibiting PLGF action or enhancing sFlt-1 production, is useful for the treatment of hypertrophy and heart failure in CKD.

研究分野：循環器内科

キーワード：心腎連関 可溶性Flt-1 PLGF 心不全 肺水腫

## 1. 研究当初の背景

慢性心不全はあらゆる心疾患の終末像であり、高齢化と冠動脈疾患に対する治療の進歩とともに増加の一途をたどっている。近年、慢性心不全治療法が進歩したにもかかわらず、心不全の予後は依然不良であり、重症心不全の5年生存率は50%以下であり、ある種の悪性腫瘍より不良である。特に、腎機能低下症例では心不全の合併率が高く重症化しやすく、腎機能は慢性心不全の強力かつ独立した予後規定因子である。

心不全の主要症状である肺水腫は収縮不全あるいは拡張不全により、左室拡張末期圧の上昇から左房内圧の上昇を惹起することで生じるとされている。われわれは、肺血管内皮細胞の透過性を抑制し、肺水腫を抑制し、心不全の臨床症状の出現を減少させる物質として可溶性 Fms-like tyrosine kinase-1 (Flt-1) に注目した。血管内皮細胞および末梢血単球の細胞膜表面に発現する Flt-1 は、Vascular Endothelial Cell Growth Factor (VEGF)ファミリーのサイトカイン、特に Placental Growth Factor (PLGF) をリガンドとする膜受容体である。膜型 Flt-1 受容体遺伝子からの alternative splicing によって産生される細胞外ドメインのみより構成されるアイソフォーム (可溶性 Flt-1 : sFlt-1) は、血漿あるいは細胞間液中で VEGF あるいは PLGF と結合することにより、VEGF や PLGF による Flt-1 活性化に対する内因性

の拮抗物質として働くとされている。われわれは冠動脈疾患を有する慢性腎臓病 (CKD) 患者による検討で sFlt-1 産生が CKD 患者で低下していることや、その補充が CKD 関連動脈硬化症を抑制し得ることを明らかとしてきた (1)。

その中の検討で、われわれは PLGF/可溶性 Flt-1 比が高値群において心不全発症率が有意に上昇すること、すなわち sFlt-1 の低い群で心不全の発症率が高いことを見出した(2-3)。これらの事実から、腎機能低下症例における、心不全の易発症性に PLGF と Flt-1、あるいは sFlt-1 を介する系のバランスの破綻が関与していることが示唆されている。

## 2. 研究の目的

- 1) CKD における心不全の易発症性に sFLT-1 の産生低下が関与しているかを、sFlt-1 特異的欠損マウス(sFlt-1KO)を作成して明らかにする
- 2) CKD 症例を対象に、血中 PLGF あるいは sFlt-1 濃度が心血管イベントの予測因子となるかを臨床的に検討する。

## 3. 研究の方法

### 1-1) sFlt-1KO の作成

sFlt-1 は Flt-1 遺伝子のイントロン 13 の alternative splicing によって産生されるので、エクソン 13 とエクソン 14 を直接連結させた transgene を作成し、それを knock-in することによって作成した。このマウスを CKD のモデルマウスとして実験に供した。

## 1-2) 心不全モデルの作成

sFlt-1KOの横行大動脈を27Gの注射針と一緒に結紮し、その後注射針を抜去して大動脈縮窄(TAC)モデルを作製して、圧負荷心不全モデルを作成した。心不全モデルの心機能解析は心エコーで、分子生物学的あるいは組織学的検討を型通り行った。

## 2) 臨床研究

奈良県立医科大学とその関連病院に心臓カテーテル検査および腎生検の目的で入院した症例からCKDの診断基準に合致する1377名より予後の追跡が可能であった1351名を対象に血中PLGF濃度を測定し、予後との関係を検討した。

## 4. 研究成果

### 1) sFlt-1の心不全発症における意義の解明

#### sFlt-1KO-TACマウスの変化

sFlt-1KOは正常に出生し、正常に成長する。このマウスではsFlt-1mRNAは全く検出されなかったが、血中ではsFlt-1-likeの免疫活性がEIAで野生型の半分ほど検出され、イントロン13におけるalternative splicing以外で生成されるsFlt-1様免疫活性が生成されていることが示された。

sFlt-1KOにTACを作製すると、sFlt-1KOでは作製後1週間以内に肺水腫をきたし、約50%のマウスが死亡した。この生命予後は野生型マウスと比べ有意に不良であった。また、死亡時の肺重量がsFlt-1KOでは野生型と比べて有意に重かった。

1週間まで生存したマウスを用いて、心機能や左心室の組織学的あるいは分子生物学的検討を加えた。超音波で検討した結果sFlt-1KOマウスでは駆出率が $51.5\pm 4.8\%$ であり、これは野生型の $76.8\pm 1.6\%$ と比べて有意に低下していた。また、心臓の重量も野生型より有意に重く、エコーで測定した左室中隔、後壁の壁厚は $0.97\pm 0.03\text{mm}$ と $1.07\pm 0.04\text{mm}$ で野生型にTACを実施したマウスの $0.79\pm 0.01\text{mm}$ と $0.79\pm 0.01\text{mm}$ と比べ有意に肥厚しており、心室重量も有意に重く、心室リモデリングがsFlt-1KOで野生型と比べて顕著であることが示された。

心室の組織変化ではsFlt-1KOでは、TAC後3日目より、M1マクロファージの浸潤が顕著であり、繊維化が増悪していた。また、Flt-1の下流で活性化することが知られているMCP-1の発現が野生型と比べて顕著であった。MCP-1の発現増加は組織中のMCPmRNAやwestern blotで解析されたタンパク量でもその増加が確認された。

#### リコンビナント sFlt-1、PLGF 抗体、MCP-1 抗体による中和実験

sFlt-1KO-TACマウスで観察された、易心不全性、心室リモデリングがsFlt-1の欠損による特異的な現象であることを確認するために、リコンビナントsFlt-1( $15\mu\text{g}/\text{kg}$ )を作製しTAC処置1週間よりTAC後1週間まで毎日腹腔内投与した。その結果、上記のような、心不全による死亡は野生型と同様のレベルまで減少し、左室肥大、左室機能低下も認めらなくなった。

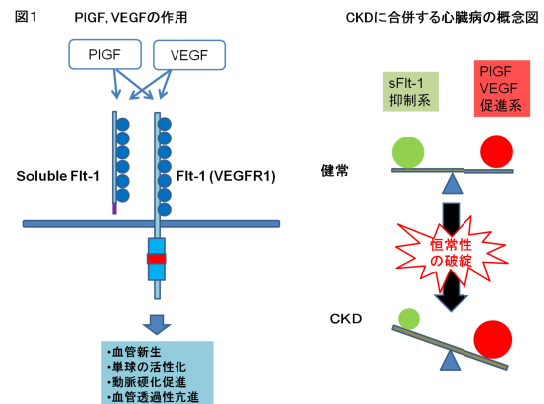
sFlt-1 KO マウスでの TAC 後の変化をきたしている原因となるリガンドが PLGF であることを確認するために抗 PLGF 抗体を IgG として 50mg/kg を TAC 後週に 3 回腹腔内投与した。

PLGF 中和抗体を投与することによって、心機能の低下、左室リモデリングがレスキューされ、sFlt-1 が欠損した為に少なくとも PLGF/Flt-1 の系が相対的に活性化したことが確認された。さらに、sFlt-1KO マウスでは TAC 後に、Flt-1 の下流で遺伝子発現亢進することが報告されている MCP-1 の遺伝子発現が亢進していることが確認されたが、この MCP-1 が上記の現象に関与していることを確認する為に、MCP-1 中和抗体を IgG として 50mg/kg TAC 後週 3 回腹腔内投与した。MCP-1 中和抗体投与により、PLGF 中和抗体と同様に、上記の現象はレスキューされ少なくとも MCP-1 を介する系が Flt-1 の下流で働いていることが証明された。

以上より、sFlt-1 が約 50 % に減少するだけで、心不全の易発症性や心室リモデリングが惹起されることが証明された。CKD では重症例では sFlt-1 産生が約半減することを考慮すると、CKD 症例で心不全易発症性や心室リモデリング認められる分子機序の一部に少なくとも sFlt-1 の産生減少に伴う PLGF/Flt-1/MCP-1 系の相対的活性化が関与していることが示唆された。

さらに、PLGF の産生抑制や sFlt-1 の産生増加は CKD にともなう動脈硬化や心不全、心室リモデリングの発症予防や治療に応用する proof of concept を示すことができた(図

1)。



## 2) CKD における PLGF の心血管イベント予測因子としての検討

CKD 症例では腎機能の低下に平行して、sFlt-1 の産生が低下することを我々はヒト腎生検組織での sFlt-1 mRNA の測定により明らかにしていた。しかし、血中 sFlt-1 濃度は産生量に平行していないことを報告した。その原因はおそらく sFlt-1 が細胞膜上に結合しており、その結合と血中で循環している割合が CKD で変化しているためであろうと推測している。ヘパリンを少量投与後の血中 sFlt-1 濃度はむしろ産生量と平行していることも報告してきた。一方 血中 PLGF 濃度は腎機能の低下に従って上昇することを確認し、CKD 5 の症例の血清を血管内皮細胞培養に添加すると PLGF 産生が増加すること、sFlt-1 産生は減少することを確認した(4)。これらの観察結果より、PLGF/Flt-1 系の産生増減を検討するためには、血中の PLGF 濃度あるいは、少量のヘパリン負荷後の sFlt-1 濃度が適当と思われるが、臨床的には前者の方が簡便であり、

血中 PLGF 濃度の意義を検討することにした。

奈良県立医科大学第一内科とその関連病院に入院した CKD 症例 1351 例を対象に全例血中 PLGF 濃度を測定し、全死亡と心血管イベント（致死性、非致死性心筋梗塞、脳卒中、心予期せぬ不全入院）の発症率との関係を検討した。血中 PLGF 濃度を 4 分位に分けると PLGF の値は Q1 は  $\leq 10.1$  pg/ml, Q2 は 10.2-14.4 pg/ml, Q3 は 14.5-19.5 pg/ml, Q4 は  $\geq 19.6$  であった。

Q1 を対照グループとして、全死亡、心血管イベント発症の危険率(HR)は、年齢、性別、高血圧、糖尿病、脂質異常症、肥満、喫煙、冠動脈疾患の既往、CKD ステージ、

遮断薬、RAS 阻害薬、CCB、ミネラルコルチコイド受容体ブロッカーの投薬状況、Hb、血清アルブミン、HbA1C、LDL コレステロール、HDL コレステロール、中性脂肪、BNP 値で補正後で、検討した。全死亡に対しては、Q2 で 1.72(0.84-3.68)、Q3 で 2.55(1.39-4.92)、Q4 で 3.37(1.90-6.37) と Q3, Q4 で有意であった。また、心血管イベントに対しては Q2 で 1.42(0.83-2.50)、Q3 で 2.80(1.80-4.50)、Q4 で 7.25 (4.72-11.6) であった。

また、多変量解析した PLGF 値の全死亡と心血管イベントに対する HR は図 2 に示すごとくであった。

以上のように血中 PLGF 濃度は、CKD 症例で全死亡および心血管イベントの有意で独立した予測因子であることが示唆された。

#### 引用文献

1) Onoue K, Uemura S, Takeda Y, Somekawa S, Iwama H, Imagawa K, Nishida T, Morikawa Y, Takemoto Y, Asai O, Soeda T, Okayama S, Ishigami K, Nakatani K, Kawata H, Horii M, Nakajima T, Akai Y, Iwano M, Saito Y.

Reduction of circulating soluble fms-like tyrosine kinase-1 plays a significant role in renal dysfunction-associated aggravation of atherosclerosis.

Circulation. 15;120:2470-2477, 2009.

2) Onoue K, Uemura S, Takeda Y, Somekawa S, Iwama H, Nishida T, Morikawa Y, Nakagawa H, Tsutsumi T, Sung J. H, Takemoto Y, Soeda T, Okayama S, Ishigami K, Kawata H, Horii M, Nakajima T, Saito Y.

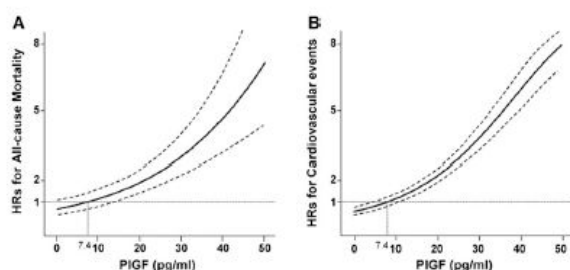
Usefulness of soluble Fms-like tyrosine kinase 1 as a biomarker of acute severe heart failure in patients with acute myocardial infarction.

Am J Cardiol. 104:1478-1483, 2009.

3) Matsumoto T, Uemura S, Takeda Y, Matsui M, Okada S, Nishida T, Soeda T, Okayama S, Somekawa S, Ishigami K, Onoue K, Kawata H, Kawakami R, Horii M, Saito Y.

An Elevated Ratio of Placental Growth Factor to Soluble Fms-Like Tyrosine Kinase-1 Predicts Adverse Outcomes in Patients with Stable

【図 2】



Coronary Artery Disease.  
Intern Med. 52: 1019-27, 2013.

## 5. 主な発表論文等

4) Matsui M, Takeda Y, Uemura S, Matsumoto T, Seno A, Onoue K, Tsushima H, Morimoto K, Soeda T, Okayama S, Somekawa S, Samejima K, Kawata H, Kawakami R, Nakatani K, Iwano M, Saito Y.

Suppressed Soluble Fms-Like Tyrosine Kinase-1 Production Aggravates Atherosclerosis in CKD : Evaluation by Circulating sFlt-1 Levels after Low-Dose Heparin Injection.

Kidney Int.85:393-403, 2014.

5) Matsui M, Uemura S, Takeda Y, Samejima K, Matsumoto T, Hasegawa A, Tsushima H, Hoshino E, Ueda T, Morimoto K, Okamoto K, Okada S, Onoue K, Okayama S, Kawata H, Kawakami R, Maruyama N, Akai Y, Iwano M, Shiiki H, Saito Y, for the NARA-CKD investigators.

Placental Growth Factor As A Predictor Of Cardiovascular Events In Patients With Chronic Kidney Disease from the Novel Assessment of Risk management for Atherosclerotic diseases in Chronic Kidney Disease (NARA-CKD) Study.

J Am Soc Nephrol. 26:2871-81, 2015.

## 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・医学部第1内科・助教  
研究者番号：60398443

(2)研究分担者

齋藤 能彦 ( SAITO, Yoshihiko )

奈良県立医科大学・医学部第1内科・教授  
研究者番号：30250260