

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月28日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08237

研究課題名(和文) 高血圧患者における新規バイオマーカーとしての尿中アンジオテンシノーゲンの臨床応用

研究課題名(英文) Clinical application of urinary angiotensinogen as the new biomarker in patients with hypertension

研究代表者

小堀 浩幸 (Kobori, Hiroyuki)

国際医療福祉大学・医学部・教授

研究者番号：80245480

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者の移籍ならびに移籍先の新設医学部における研究環境の新規構築の遅れにより、申請時との研究環境の変化に苦慮し、表立った研究実績を示すことが出来ていないが、学内外の共同研究者たちによって、本事業に関する臨床研究参加者のリクルートは進行させている。平成30年度末に、約250の臨床検体の測定が完了し、現在解析を進めている。補助事業期間は終了してしまったが、今後も、さらなる臨床検体の蓄積・測定・解析を進め、最終的なアウトカムに繋げる予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本や米国や欧州では、高血圧患者の降圧薬の使い方のガイドラインが作成されている。しかしながら、現時点でのガイドラインでは、一言で言えば、5種類のクラス(利尿薬、アンジオテンシン転換酵素阻害剤、アンジオテンシン受容体拮抗薬、ベータ遮断薬、カルシウムチャネル拮抗剤)から、選択することとされているが、第一選択薬を決定するための明確なマーカーは提唱されていない。ここで、本研究にて目的が達成されれば、高血圧患者において、尿中アンジオテンシノーゲンを測定することで、腎臓内レニン-アンジオテンシン系をモニター出来ることになり、高血圧患者を尿中アンジオテンシノーゲンの値で病態分類することが可能となる。

研究成果の概要(英文)：By new architectural delay of the study environment in the new faculty of medicine of transfer of the study representative and transfer ahead, we have a hard time for a change of the study environment with application and cannot show the conspicuous study results. However, by colleagues inside and outside the study, the recruitment of the clinical studies participant about this business makes it progress. At the end of fiscal year 2018, the measurement of approximately 250 clinical specimen is completed and is pushing forward analysis now. It has been completed during the supporting business period, but go ahead through accumulation, measurement, the analysis of the further clinical specimen and is going to connect it with definitive outcome in future.

研究分野：腎臓内科学・薬理学・生理学・高血圧学

キーワード：尿中アンジオテンシノーゲン

1. 研究開始当初の背景

世界の成人人口 36 億 8200 万人に対して高血圧患者が 9 億 7200 万人、すなわち全世界の成人人口の 26.4% が高血圧患者である。これは 2000 年のデータであるが、2025 年には 29.2% に上昇することが想定されている。高血圧の罹患率が上昇すると、それを重大な危険因子とする心血管疾患(例えば脳卒中や心筋梗塞)、あるいは、腎疾患(例えば腎硬化症)が増加する。したがって、高血圧患者への対策は、今世紀の最大の医学問題の一つと言っても過言ではない。

アンジオテンシノーゲン(AGT)は、レニン-アンジオテンシン系(RAS)の律速段階である酵素レニンの唯一の基質である。生体内における AGT の量は、レニンのミカエリス・メンテン定数に近いので、レニンの量のみならず、AGT の量も、RAS の活性を規定する。したがって、AGT の増加は、アンジオテンシンペプチドの増加につながり、血圧の上昇および腎臓障害を引き起こす。腎臓内 AGT の mRNA およびタンパクの増加は、各種高血圧や腎疾患で認められており、腎臓内 AGT は、高血圧や腎疾患の発症や進展に重要な役割を果たしている(Kobori H, et al. *Pharmacol Rev.* 2007;59:251-287) (Figure 1)。高血圧や各種病態において、腎臓内 RAS の活性化が認められているが、これまでヒトで腎臓内 RAS を正確に評価する方法が存在しなかった。応募者は、世界に先駆けて、尿中 AGT の排泄量が、腎臓内 RAS の活性を正確に反映することを、まず動物実験で証明した(Kobori H, et al. *Hypertension.* 2004;43:1126-1132)

(Figure 2)。この知見をヒトで確認するために、続いて、AGT の正確かつ簡便な ELISA 測定法を開発した(Katsurada A, Kobori H, et al. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;293:F956-F960) (Figure 3)。ELISA による定量法の開発によって、大量の被験者の検体を、時を追って繰り返し測定することが可能となった結果、尿中 AGT の排泄量が腎臓内 RAS の活性のバイオマーカーとなることを、慢性腎炎患者(Nishiyama A, Kobori H, et al. *Nephrol Dial Transplant.* 2011;26:170-177 など)や糖尿病患者(Sawaguchi M, Kobori H, et al. *J Diabetes Investig.* 2012;3:318-324 など)において、相次いで報告することが出来た。現在では、このコンセプトは数多

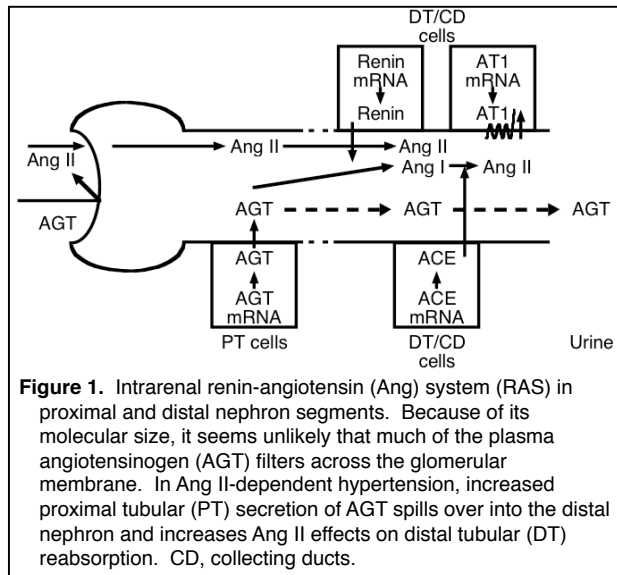


Figure 1. Intrarenal renin-angiotensin (Ang) system (RAS) in proximal and distal nephron segments. Because of its molecular size, it seems unlikely that much of the plasma angiotensinogen (AGT) filters across the glomerular membrane. In Ang II-dependent hypertension, increased proximal tubular (PT) secretion of AGT spills over into the distal nephron and increases Ang II effects on distal tubular (DT) reabsorption. CD, collecting ducts.

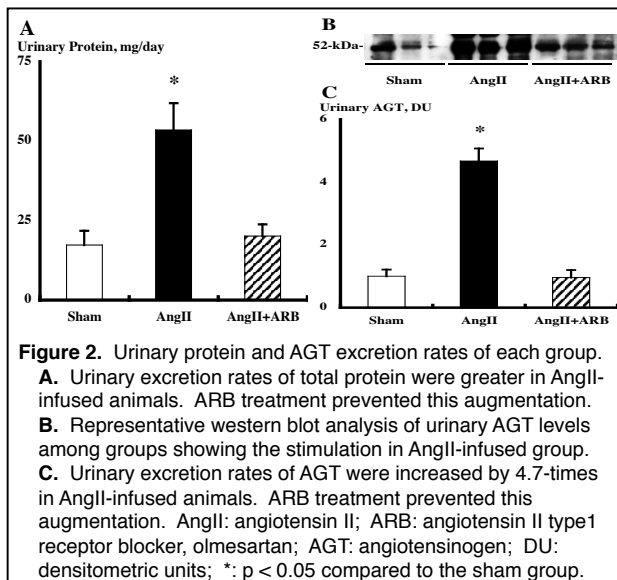


Figure 2. Urinary protein and AGT excretion rates of each group. **A.** Urinary excretion rates of total protein were greater in AngII-infused animals. ARB treatment prevented this augmentation. **B.** Representative western blot analysis of urinary AGT levels among groups showing the stimulation in AngII-infused group. **C.** Urinary excretion rates of AGT were increased by 4.7-times in AngII-infused animals. ARB treatment prevented this augmentation. AngII: angiotensin II; ARB: angiotensin II type 1 receptor blocker, olmesartan; AGT: angiotensinogen; DU: densitometric units; *: $p < 0.05$ compared to the sham group.

くの研究者に受け入れられており、他のグループからも既に 50 以上の論文が発表されている。応募者が開発した技術革新によって、このトランスレーショナル研究では、高血圧患者における尿中 AGT の測定の意義を明らかにすることを目的とする。

2. 研究の目的

本研究における応募者の作業仮説は、「高血圧患者において、尿中 AGT は、腎臓内 RAS を反映する新規バイオマーカーとなる」である。この仮説に基づき、以下の三点を明らかにすることを、本研究の目的とする。

目的 1: 高血圧患者と健常人とを区別する尿中 AGT のカットオフ値を設定する。

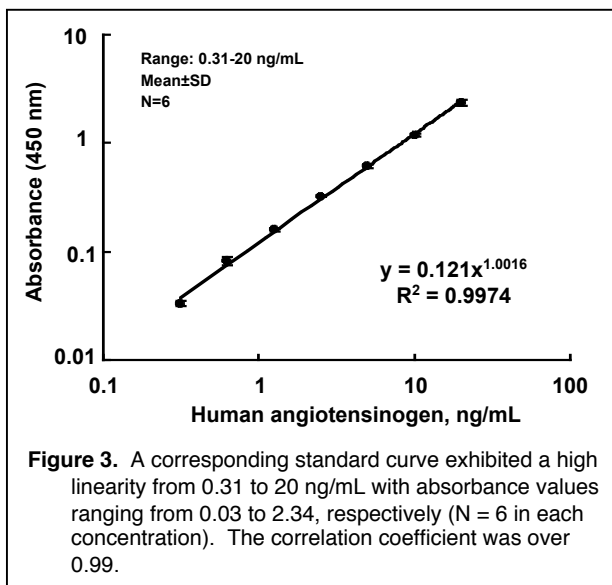
目的 2: 高血圧患者において、RAS を抑制するアンジオテンシン受容体拮抗薬 (ARB) による治療により、血圧の低下とともに尿中 AGT は減少するが、RAS を抑制しないカルシウムチャネル拮抗剤 (CCB) による治療では、血圧は低下するものの尿中 AGT は減少しないことを示す。

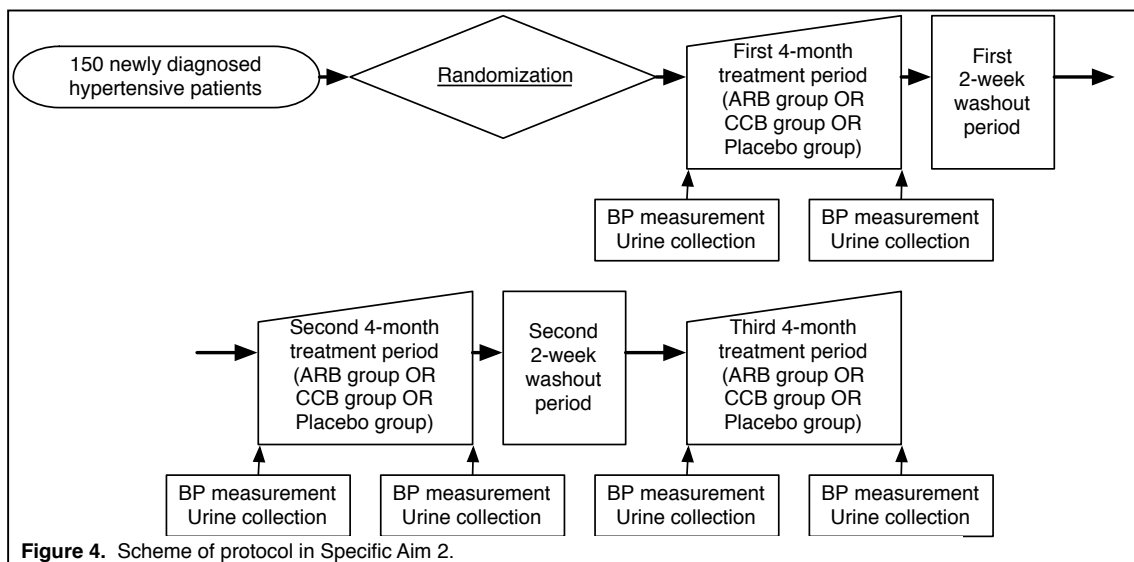
目的 3: 尿中 AGT の基礎値の中央値により、高血圧患者を二群に分けた際、尿中 AGT の基礎値が高い群では、ARB による治療により、血圧と尿中 AGT が効果的に減少するものの、尿中 AGT の基礎値が低い群では、ARB による治療により、血圧と尿中 AGT の減少が少ないことを示す。

3. 研究の方法

目的 1: 高血圧患者と健常人とを区別する尿中 AGT のカットオフ値を設定する。

方法 1: 新規高血圧患者 150 名と健常人 150 名をリクルートし、一回限りの採血と採尿を行う。高血圧患者と健常人とを区別する尿中 AGT のカットオフ値を設定する。すなわち、健常人を 0、高血圧患者を 1 として、尿中 AGT 量を用いて、logistic fit analysis を行う。この解析結果をもとに、receiver operating characteristic curve (ROC 曲線) を作成し、area under the curve (AUC) 値を計算する。これらの分析結果をもとに、Youden index [Sensitivity - (1 - Specificity)] を計算する。限られた検体数での予備臨床研究では、5.4 µg/g Creatinine というカットオフ値を設定することで、Sensitivity = 79%, Specificity = 80%, Youden index = 59% と、かなり良好なデータが得られている。



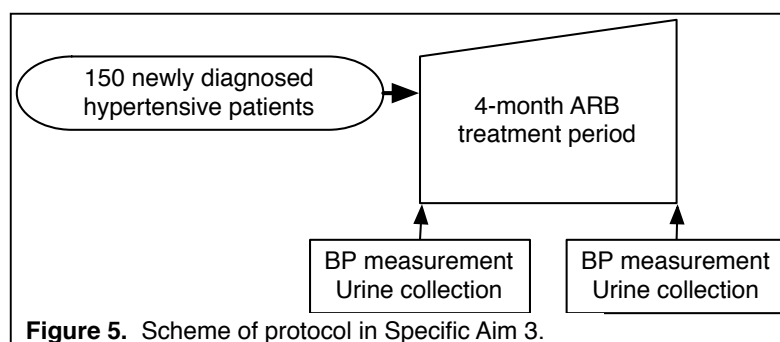


目的 2: 高血圧患者において、RAS を抑制する ARB による治療により、血圧の低下とともに尿中 AGT が減少するものの、RAS を抑制しない CCB による治療では、血圧の低下は認められるものの尿中 AGT の減少は認められないことを示す。

方法2: 新規高血圧患者を150名、リクルートする(目的1の高血圧患者と同一)。Figure 4に示したように、Prospective, Randomized, Open-labeled Blinded-Endpoint (PROBE)法により、患者を以下の3群に割り付ける: ARB (olmesartan)群 (N = 50), CCB (amlodipine)群 (N = 50), placebo群 (N = 50)。薬剤投与量は、olmesartan 10 mgあるいは、amlodipine 2.5 mgから開始し、临床上必要な場合は、olmesartan 20 mgあるいは、amlodipine 5 mgまで増量する。140/90 mmHgを目標血圧値とする。フェーズ1-3からなるクロスオーバー法でこの研究は実施され、各フェーズは4ヶ月とし、各フェーズの間には2週間のウォッシュアウト期間を設ける。各フェーズの最初と最後で、採血と採尿を行う。さらには、月に一回、血圧などの経過観察を行う。

目的 3: 尿中 AGT の基礎値の中央値により、高血圧患者を二群に分けた際、尿中 AGT の基礎値が高い群では、ARB による治療により、血圧と尿中 AGT が効果的に減少するものの、尿中 AGT の基礎値が低い群では、ARB による治療により、血圧と尿中 AGT の減少が少ないことを示す。

方法 3: 新規高血圧患者を 150 名、リクルートする(目的 1, 2 の高血圧患者と同一)。Figure 5 に示したように、尿中 AGT の基礎値によらず、すべての患者に、ARB (olmesartan)を投与する。薬剤投与量は、olmesartan 10 mg から開始し、临床上必要な場合は、olmesartan 20 mg まで増量する。140/90 mmHg を目標血圧値とする。4 ヶ月の観察期間の最初と最後で、採血と採尿を行う。さらには、月に一回、血圧などの経過観察を行う。すべての行程が完了した後に、



尿中 AGT の基礎値の中央値により、高血圧患者を二群に分け、データ解析を行う。実際には、この目的 3 は、目的 2 の一部(ARB による介入フェーズのデータ)として実施されるので、独立した臨床試験は不要である。

4. 研究成果

研究代表者の移籍ならびに移籍先の新設医学部における研究環境の新規構築の遅れにより、申請時との研究環境の変化に苦慮し、表立った研究実績を示すことが出来ていないが、学内外の共同研究者たちによって、本事業に関する臨床研究参加者のリクルートは進行させている。

平成 30 年度末に、約 250 の臨床検体の測定が完了し、現在解析を進めている。補助事業期間は終了してしまったが、今後も、さらなる臨床検体の蓄積・測定・解析を進め、最終的なアウトカムに繋げる予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：