

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590841

研究課題名 (和文) 新しいヒトキマーゼ測定法の確立とその臨床応用

研究課題名 (英文) Establishment and clinical application of new assay method for human chymase

研究代表者

浦田 秀則 (URATA HIDENORI)

福岡大学・筑紫病院・教授

研究者番号：30289524

研究成果の概要：まず第一に、特異性の高いキマーゼ阻害薬を使用し、新しいヒトキマーゼ依存性アンジオテンシンII (AII) 産生能の測定法を確立した。この方法を用いて、人の末梢血検体を分析し、ヒトキマーゼAII産生能がヒトの循環単核球中に存在し、単球に多く、男性で高値であり、白血球数・CRP、HOMA指数・尿中微量アルブミン/クレアチニン比などと正相関することを見出した。すなわち、生活習慣病の病態で循環単核球中のキマーゼ活性が増加することを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：心臓病態学

1. 研究開始当初の背景

ヒトキマーゼは1990年に我々の手によってヒト心臓の左心室ホモジネート中で約80%を占めるアンジオテンシンII (AII) 産生酵素として発見され、約3kgのヒト心臓を元に抽出された。ACE阻害薬では抑制されないセリン酵素であり、主に肥満細胞で産生され、分泌後は心筋の間質部分に存在し、局所AII産生に関与すると考えられた。その後の臨床研究で組織のキマーゼ依存性AII産生活性はヒト大動脈の動脈硬化病巣や心筋梗塞後心筋で増加していることが示され、そのような病態で何らかの役割を担うことが推定された。ま

た、ヒトの内胸動脈のキマーゼ活性は血中のLDLコレステロールレベルと正相関していた。ハムスターを用いた動物実験では高コレステロール食の負荷で大動脈キマーゼ活性の増加が観察され、また経口可能なキマーゼ阻害薬で治療すると動脈硬化の進展が抑制されたことから、LDLコレステロールの増加が動脈キマーゼ発現を増加させその後の動脈硬化の進展に関与することが明らかになった。またヒト心臓から抽出されたヒトキマーゼmRNAを用いて作成したcDNAをマウスに過剰発現させたところ軽症の高血圧とその血圧上昇に見合わない心肥大を生じた。このよう

にキマーゼは動脈硬化の進展や軽度血圧上昇や心筋梗塞後の心筋リモデリングなどに関与することが推察された。

2. 研究の目的

(1) 新しく簡便で臨床応用可能なアンジオテンシンII (AII) 産生酵素活性測定法を確立する (平成 19 年度)

I. キマーゼの本来の基質である AI を修飾し、AII 産生酵素に特異性の高い基質を合成する。

II. キマーゼ阻害に特異性の高い開発中のヒトキマーゼ阻害薬を用いて測定系を確立する。ヒトキマーゼに特異性が高く、HPLC法と同等の感度が得られる測定法を確立する。

III. 臨床検体 (主に白血球) を用いて 3 つの AII 産生酵素を同一検体で測定する。

III-1 どの分画にどの AII 産生酵素がどの程度多いかを同定する。

III-2 各種生理的及び臨床病態での測定を行うために採血条件を設定する。

III-3 キマーゼを含む AII 産生酵素がどのような病態で増減するかを同定する。

III-4 重症疾患の病態変化と白血球 AII の分析

(2) ヒトキマーゼの循環単核球中の活性変化と関連する臨床病態を発見・同定すること (平成 20 年度)

3. 研究の方法

I. キマーゼの本来の基質である AI を修飾し、AII 産生酵素に特異性の高い基質を合成する。

II. キマーゼ阻害に特異性の高い現在開発中のヒトキマーゼ阻害薬を用いて測定系を確率し、ヒトキマーゼに特異性が高く、HPLC法と同等の感度が得られる測定法を確立する。まず、ペプチド結合が切断され AII が産生されると蛍光が増加する Nma/Dnp 型 AI を合成する。また、産生された修飾 AII の標準曲線を作成するために Nma-AII も合成する。これらの基質を用いて AII 測定系を確立する。本研究では特異性の高いキマーゼ阻害薬を使用し、直接法でキマーゼ活性を測定する。ACE 活性は ACE 阻害薬のカプトプリルを使用し、カテプシン G 活性には上述のアプロチニンを使用してすべて直接法で測定する。酵素反応の基本的事項を検定するため、ヒト組織から抽出・純化されたヒトキマーゼ {Urata et al. JBC 1990} をスタンダードとして使用し、さらに同一検体を多数同一日に測定して intra assay variability を、また同数を別日に測定して inter assay variability を算出する。このようにして確立された測定

法を III 以下の実験に使用する。

III. 臨床検体 (主に白血球) を用いて 3 つの AII 産生酵素を同一検体で測定する。

III-1 多核球と単核球に白血球を分離し、さらに単核球は表面抗体を利用して sub fractionation を行って (NK, helper, suppressor, killer t cell と monocyte) どの分画にどの AII 産生酵素がどの程度多いかを同定する。

III-2 各種生理的及び臨床病態での測定を行うために採血条件を設定する。生理的変動としては日内変動、食事の影響等

III-3 キマーゼを含む AII 産生酵素がどのような病態で増減するかを同定し、白血球 AII 産生系と最も関連する臨床的状況を把握する。

メタボリック症候群、高血圧、糖尿病、高脂血症、肥満、喫煙、心筋梗塞後や心不全治療後の変化、動脈硬化の程度との関連、服薬の影響 (各種降圧薬、抗高脂血症薬、糖尿病、治療薬、抗凝固薬等) などについて分析する。

III-4 重症疾患の病態変化と白血球 AII の分析

重症疾患患者では経時的変化を測定し、疾患の初期重傷度とその後の治療効果による変化から白血球 AII 産生系が治療効果に反映される可能性があるか検証する。また、手術症例等から得られる組織検体を用いて同一患者の白血球での測定が組織検体直接測定の結果と相同性を有しているか検定する。

4. 研究成果

(1) 特異性の高いキマーゼ阻害薬を使用することにより確立し、循環白血球中に AII 産生酵素活性が存在し、しかも多核球ではそのほとんどがカテプシン G 依存性であることが判明し、単核球ではアンジオテンシン変換酵素・キマーゼ・カテプシン G 活性がバランスよく活性を示し、単核球を使用すると各 AII 産生酵素活性測定が可能であることを報告した (Murakami et al. 2007)。単核球をさらに分類して分析すると、T 細胞 (NK, killer, helper)・B 細胞・単核球のどの分画にも 3 つの AII 産生酵素活性があり、キマーゼ活性は単核分画で最も高かった (Abe et al. 2008)。

(2) 単核球中キマーゼ依存性 AII 産生活性は男性で高値、白血球数・CRP、HOMA 指数・尿中微量アルブミン/クレアチニン比などと正相関することから、軽度な炎症病態・インスリン抵抗性・慢性腎機能障害 (CKD) などで増加することが明らかとなった (Okamura et al. 2008, 2009)。これらの結果は循環器疾患の誘因となる危険因子のある患者では循環単核球中キマーゼ依存性 AII 産生活性が高いことが示唆され、心血管病の予測因子としての役割が推測された。また、急性期病態との関連では、急性心筋梗塞の急性期にキマーゼ活性を

含む単核球中AII産生活性が増加することが明らかとなった(Okamura et al. 2009)。

他学との共同研究(琉球大学, 香川大学)

琉球大学との共同研究では、臨床試験で脂肪酸溶液を静脈ラインから点滴をすると循環血単核球中のキマーゼやカテプシンGを介するAII産生能が増加することが示されている。そして、その増加したAII産生能と内皮機能障害との間に関連があった。すなわち、カロリー過多摂取による血中の中性脂肪の増加が循環白血球中のAII産生能を増強することが急性実験でも確かめられ、このような白血球を介するAII産生系は、急性期及び慢性期の病態で増加してくることが、推定される。一方香川大学との共同研究では、動物モデルで偏側の尿管結察モデルを作成し、健測と患測の腎臓内のキマーゼ活性の変化を調べた。その結果尿管閉塞を施した腎内圧が上昇する患測の腎臓でのみキマーゼ活性の増大が認められ、尿管結察による腎内圧の増加が、腎臓内部でのキマーゼ依存性AII産生能を活性化させることが明らかになった。すなわち、臨床的には尿管結察や腎結石などによって腎内圧が上昇すると、以前からレニン依存性高血圧になることが知られていたが、本実験の結果は腎臓間質でのキマーゼ活性の増加並びに腎間質内でのAII産生が増加し、腎機能の低下に関与していることが推察される。

以上のような自主研究や共同研究によって、ヒトキマーゼが各種心血管病態に関与することが明らかになり、今後このような病態の中から、キマーゼ阻害薬を使用できる対象疾患を同定し、臨床応用の方向へ進めていきたい。

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 7 件)

- ① 浦田秀則、キマーゼ阻害薬の展望、医学のあゆみ レニン・アンジオテンシン系のすべて、228、577-582、2009、無
- ② 浦田秀則、ACE非依存性のアンジオテンシンII産生系、Heart View、13、16-21、2009、無
- ③ 浦田秀則、レニン・アンジオテンシン系阻害薬の心保護作用を再考する～ACE阻害薬の冠動脈・心筋保護に関する新知見～、日経CME(日経メディカル同封別冊)、6、2008、無
- ④ Imaizumi S, Miura S, Nakamura K, Kiya Y, Uehara Y, Bo Zhang, Matsuo Y, Urata H, Ideishi M, Kerry-Anne Rye, Sata M, Saku K.、Antiarrhythmogenic Effect of Reconstituted High-Density Lipoprotein

- Against Ischemia/Reperfusion in Rats、Journal of the American College of Cardiology、51、1604-1612、2008、有
- ⑤ Yanagi D, Shirai K, Takayama Y, Fukada Y, Kuwano T, Ike A, Mori K, Kubota K, Iwata A, Fujimi K, Kawamura A, Nishikawa H, Nathan Millerb, Bo Zhang, Tsuchiya Y, Urata H, Saku K.、Results of provisional stenting with a Sirolimus-eluting stent for bifurcation lesion:Multicenter study in Japan、Journal of Cardiology、51、89-94、2008、有
 - ⑥ Murakami K, Uehara Y, Abe S, Inoue Y, Ideishi M, Saku K, Urata H.、Positive Correlation Between Chymase-Like Angiotensin II -Forming Activity in Mononuclear Cells and Serum Cholesterol Level、Journal of Cardiology、50、291-298、2007、有
 - ⑦ Urata H.、Chymase and Matrix Metalloproteinase、Hypertens Res、30、3-4、2007、有

[学会発表] (計 11 件)

- ① Okamura K, Inoue Y, Uehara Y, Maruyama S, Sumi S, Furuyama S, Kodama S, Andoh C, Niimura H, Tohjoh H, Miyoshi K, Miura S, Yamanouchi Y, Saku K, Urata H.、Chymase Dependent Angiotensin II-Forming Activity in the Circulating Mononuclear Leukocyte Increases Post Acute Myocardial Infarction、第73回日本循環器学会総会・学術集会、2009年3月21日
- ② Takahashi Y, Hase N, Muroga Y, Matsuura J, Machida T, Kobayashi T, Yamanaka Y, Kasahara Y, Urata H.、In vitro profile of a novel chymase inhibitor and the improvement of survival in hamsters with myocardial infarction、第12回日本心不全学会学術集会、2008年10月18日
- ③ Okamura K、Chymase activity in the circulating mononuclear increases in chronic kidney disease patients、第31回日本高血圧学会総会、2008年10月10日
- ④ Okamura K、Chymase activity in the circulating mononuclear leukocyte increases in chronic kidney disease patients、第12回 Molecular Cardiovascular Conference、2008年9月6日
- ⑤ Okamura K, Inoue Y, Uehara Y, Sumi S, Kudo K, Kodama S, Ando C, Mihara H, Niimura H, Miyoshi K, Tsuchiya Y, Miura S, Yamanouchi Y, Saku K, Urata H.、High chymase activity in the circulating mononuclear leukocyte is related to high c-reactive protein and insulin levels、

ISH2008、2008年6月16日

- ⑥Azekoshi Y, Yamakawa K, Yasu T, Abe S, Tagomori Y, Urata H, Ueda S.、Enhancement of angiotensin II forming activity in mononuclear cells by free fatty acids、ISH2008、2008年6月16日
- ⑦Y.-Y. Fan, Kohno M, Fujisawa Y, Kimura S, Matsuura J, Hase N, Hitomi H, Urata H.、The role of chymase in angiotensin II formation and progression of fibrosis in obstructed kidneys、ISH2008、2008年6月16日
- ⑧Okamura K, Inoue Y, Uehara Y, Abe S, Sumi S, Kudo K, Kodama S, Ando C, Mihara H, Niimura H, Miyoshi K, Tsuchiya Y, Miura S, Yamanouchi Y, Saku K, Urata H.、High chymase activity in the circulating mononuclear leukocyte is related to high c-reactive protein and insulin levels、第72回日本循環器学会総会・学術集会、2008年3月29日
- ⑨浦田 秀則、ヒト心臓キマーゼの同定、第30回日本高血圧学会総会、2007年10月26日
- ⑩Urata H.、Chymase Inhibitor in the Treatment of Heart Failure、第11回日本心不全学会学術集会、2007年9月10日
- ⑪Urata H.、Beneficial effects of ACEI on Coronary Heart Disease、ヨーロッパ心臓病学会、2007年9月3日

[図書] (計 0 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

浦田 秀則 (URATA HITENORI)

福岡大学・筑紫病院・教授

研究者番号：30289524

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし