

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号： 24601
 研究種目： 基盤研究 C
 研究期間： 2009～2011
 課題番号： 21590958
 研究課題名（和文） 慢性腎臓病に合併する高度動脈硬化症に対する創薬標的としての可溶性 FLT-1 の研究
 研究課題名（英文） Application of sFlt-1 for the prevention of advanced atherosclerosis in chronic kidney disease
 研究代表者 上村 史朗 (UEMURA SHIRO)
 奈良県立医科大学 医学部 准教授
 研究者番号： 80232792

研究成果の概要（和文）：

慢性腎臓病患者では重症動脈硬化症が死因の第一位を占める。我々は、胎盤成長因子（PlGF）およびその内因性拮抗物質である可溶性 FLT-1（sFLT-1）が腎不全時に加速される動脈硬化症の発症に重要な影響を及ぼすことを提唱してきた。本研究では、sFLT-1 と Apo-E KO の二重欠損マウスの発現形態および腎不全を合併させた ApoE-KO マウスに対するリコンビナント sFlt-1 投与の効果を検討し、腎機能障害病態において sFlt-1 を補充する治療が合併する動脈硬化症の進展に対する有効な治療法となる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：

Chronic kidney disease is frequently associated with advanced atherosclerosis. We have found that placental growth factor (PlGF) and its endogenous antagonist, sFlt-1, play important role in this setting. In this study, we investigated the manifestation of sFlt-1 and ApoE double knock-out mouse, as well as the effect of recombinant sFlt-1 administration to ApoE KO mice with renal failure. Our results indicate supplemental enhancement of plasma level of sFlt-1 might be a candidate as a pharmacological intervention for advanced atherosclerosis in patients with renal dysfunction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野： 医歯薬学
 科研費の分科・細目： 循環器内科学
 キーワード： 分子血管病態学

1. 研究開始当初の背景

糖尿病患者数の増加に伴って維持透析療法を必要とする末期腎不全患者数が着実に増

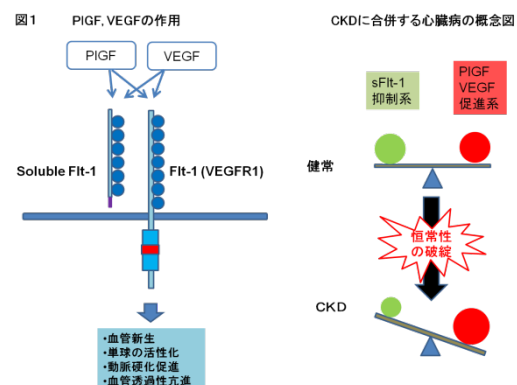
加し、2007 年末においてすでに 27 万人を越えた。CKD 患者における心血管疾患による死亡の Hazard ratio は、腎機能が正常の人口にして GFR が 45ml/分以下の症例で 1.15, 30 ml/分を下回る症例で 5.52, 維持透析患者に至っては 9.12 と著明に上昇することが示されている。さらに NIPPON DATA 90 の成績によると、一般人口の約 6.7%が糸球体濾過率 (GFR) 60ml/分以下の慢性腎臓病 (CKD) を発症しており、その有病率は年齢に伴って増加する (Circ J. 2006 70:954-9.)。

一方、われわれの施設に入院した虚血性心疾患患者を対象として腎機能障害合併の頻度を検討したところ、CKD stage 2 (90ml/min 未満)より高い症例が心疾患全体の約 75%, CKD stage 3 (60ml/min 未満)以上の症例が全体の約 50%に達していた。さらに、多変量解析の成績から入院時の GFR の低下が心疾患患者の生命予後を予測する独立した危険因子であることが明らかとなっている。CKD に伴う心血管疾患の高い罹患率および死亡率の原因として、CKD 自体に高血圧、高脂血症、糖尿病などの古典的な動脈硬化危険因子が高率に合併すること寄与すると考えられてきたが、著明な高罹患率と死亡率を説明する根拠としては不十分であり、腎機能障害と心疾患の発症を直接に結びつける分子生物学的機序は手がかりさえないのが現状であった。

われわれは、心血管疾患における胎盤由来成長因子 (PlGF) およびその内因性拮抗物質である可溶性 VEGF 受容体 1 (可溶性 FLT-1, sFLT-1) に関する役割を継続的に研究し、多くの知見を得てきた (基盤研究 C, 18390238, 15590767, Iwama H, Uemura S, Saito Y et al: J Am Coll Cardiol 47:1559-67, 2006)。この研究の過程において、sFLT-1 の血中濃度

が腎機能が低下した冠動脈疾患症例では健康者に比して著明な低値を示すことを発見した。また、腎静脈血中の sFLT-1 濃度が末梢静脈に比して高値を示し、動脈血中濃度が腎静脈濃度と相関することから、腎での sFLT-1 産生が全身の血中レベルを決定していることを示した。さらにヒト腎生検サンプルを用いて sFLT-1 の遺伝子発現量を検討したところ、腎機能の増悪に関連してその遺伝子発現量が低下していくこと、さらに 329 例の心疾患患者を対象とした検討では血中 sFLT-1 濃度は腎機能低の程度に相関して減少し、さらにその値は冠動脈硬化症の重症度とも関連することも確認した。

PlGF が属する VEGF ファミリーのサイトカイン



インは強力な血管新生作用を有しており、血中の sFLT-1 はこれらのサイトカインの生物活性を抑制的に制御している。動脈硬化症の進展にはプラーク内への新生血管が重要な役割りを担っており、VEGF ファミリーのサイトカインの動脈硬化進展作用と sFLT-1 の抑制作用のバランスが病態の発症および進展に寄与していると考えられる (図 1)。以上のような知見に基づいて我々は、sFLT-1 は腎臓が心血管の恒常性維持のために血中に分泌する重要な分子である可能性を示し、さらに機能の低下した腎臓での本分子の産生低下が腎不全時に加速される動脈硬化症の

発症に直接的な影響を及ぼすことを世界で初めて提唱した。

2. 研究の目的

急速な高齢化と生活習慣病の増加が進む本邦においてはCKDの増加と心血管病合併症による死亡率の上昇は保健衛生および医療行政における重大な問題である。本研究では、sFLT-1が心腎連関に重要な役割を担う機序を明らかにし、さらにCKDに合併する重症動脈硬化症治療に対する分子機序に立脚した創薬標的としての可溶性FLT-1の可能性を探ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) sFLT-1欠損マウスの作成

本研究では、sFLT-1を特異的に欠損した遺伝子改変マウスを作成し、この動物に操作を加えることにより心血管疾患の発症に関わる可溶性FLT-1の機序を検討する。

全長のFlt-1をノックアウトすることなくsFLT-1のみをノックアウトしたマウス(sFlt-1 KO)をまず作成する。Flt-1は30個のエクソンよりなる大きな遺伝子である。sFLT-1はFLT-1遺伝子から alternative splicingにより生成されるが、エクソン13の3'末端でスプライスされずにイントロン13の5'側の93塩基を含んだ形でスプライスされ、その結果イントロン13の5'側の塩基配列よりエクソン13のC端側に31アミノ酸よりなるユニークな配列を持っている。sFLT-1 KOはエクソン13とエクソン14をダイレクトに結合させた(イントロン13の存在しない) targeting vectorを作成することにより作成する。実際、このターゲットベクターと相同組み換えしたES細胞の作製に成功しており、現在キメラマウスの作成に着手している。胎生期および生下後のフェノタイプを解析する。

第16週において、採血、採尿、心・大血管、腎臓のサンプリングを行ない、sFLT-1欠損が血管壁に置ける病態生理に及ぼす影響を検討する。

(2) 慢性腎不全を合併した動脈硬化発症モデルに対するリコンビナント可溶性FLT-1投与の検討

本研究においては、腎を5/6摘出して慢性腎不全を作成した動脈硬化マウスモデル(ApoEノックアウトモデル)に対するリコンビナント可溶性FLT-1投与が、動脈硬化巣の形成および進展に及ぼす影響を観察し、腎不全時に認められる低可溶性FLT-1血症に対する治療的介入の基礎的データを採取する。

準備状況：当施設では、動脈硬化および腎不全の動物モデルがすでに確立されており、組織学的評価および分子生物学的検討に必要な機材と手技もすべてそろっている。3. 可溶性FLT-1欠損マウスに対するリコンビナント可溶性FLT-1投与の心血管系の病態生理に及ぼす影響を検討する。

(3) 慢性冠動脈疾患患者の長期予後に及ぼす血中PlGF/sFLT-1の影響

本研究では、当科で心臓カテーテル検査を行った冠動脈疾患患者を対象として、ベースラインでの臨床指標、血漿PlGF、sFlt-1、PlGF/sFLT-1比を測定し、長期の心血管イベントおよび総死亡との関連性を検討する。

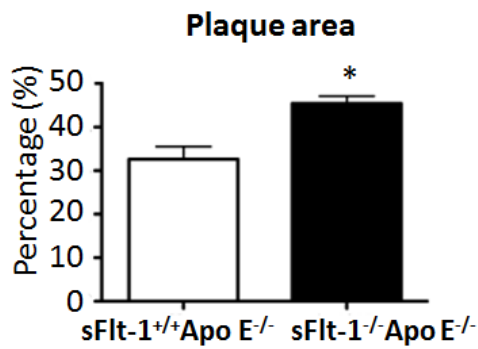
4. 研究成果

(1) sFLT-1欠損マウス

sFLT-1 KOマウスの血中sFLT-1濃度はWildマウスと比較して約30%に低下していた。ELISA法で測定するsFLT-1値が0にならなかったのは、膜型FLT-1のSheddingによる影響と考えられた。形質発現はWildマウスと比較して明らかな変化は認められなかった。

一方、sFLT-1 KO と Apo-E KO の二重欠損マウスの大動脈における動脈硬化病巣の形成は、Apo-E 単独欠損マウスに比して有意に促進されており (図 2), 内因性の sFLT-1 が動脈硬化病巣の形成に対して抑制的に作用していることが確認された。

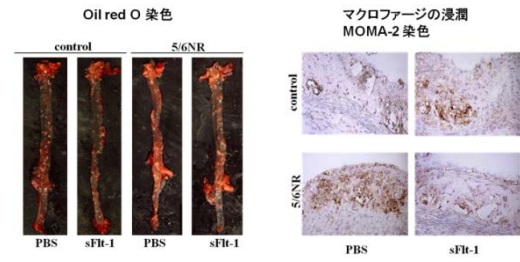
図 2



(2) 慢性腎不全を合併した動脈硬化発症モデルに対するリコンビナント可溶性 FLT-1 投与

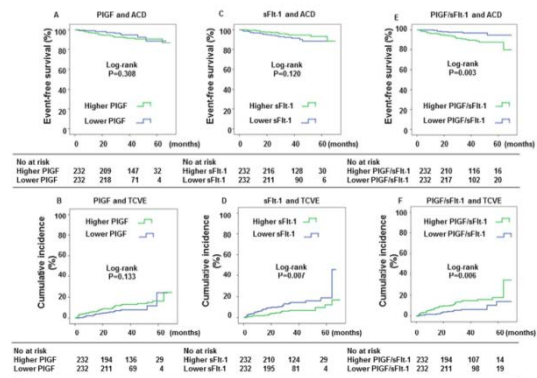
片腎と残腎の 2 / 3 を摘出する 5 / 6 腎摘処置を行った ApoE-KO マウスでは通常 ApoE-KO に比して、臨床例で観察された所見に一致して、血中 sFLT-1 濃度が有意に定置を示した。また、腎不全合併 ApoE-KO マウスでは大動脈の粥状硬化病変面積およびマクロファージの集積面積が有意に大きかった。さらに、腎不全合併 ApoE-KO マウスに対してリコンビナント sFLT-1 を 10 週間にわたって反復投与することにより、腎不全によって増悪した粥状硬化病変面積が有意に縮小した (図 3)

図 3



(3) CKD 患者 464 例を対象として平均 3.3 年の追跡調査を行った観察研究では、観察開始時において PIGF / 可溶性 FLT-1 比が高値 ($>4.22 \times 10^{-2}$) の患者では総死亡 (ACD) および 総心血管イベント (TCVE) の発症が低値の患者に比して有意に高いことが明らかになった (hazard ratio [HR]: 3.32, 95% confidence interval [CI]: 1.43 to 7.72, $p = 0.005$, and HR: 2.23, 95% CI: 1.23 to 4.03, $p = 0.008$) 図 4.

図 4



以上、本研究では、冠動脈疾患患者の予後に PIGF および sFLT-1 が重要な役割を担っていること、腎機能障害病態において sFlt-1 を補充する治療が合併する動脈硬化症の進展に対する有効な治療法となる可能性を示した。

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)

〔雑誌論文〕 (計 8 件)

①Uemura S, Ishigami K, Soeda T, Okayama S, Sung JH, Nakagawa H, Somekawa S, Takeda Y, Kawata H, Horii M, Saito Y. Thin-Cap Fibroatheroma and Microchannel Findings in Optical Coherence Tomography Correlate with Subsequent Progression of Coronary Atheromatous Plaques. *Eur Heart J* 2012;33(1):78-85

②Soeda T, Uemura S, Morikawa Y, Ishigami K, Okayama S, Hee SJ, Nishida T, Onoue K, Somekawa S, Takeda Y, Kawata H, Horii M, Saito Y. Diagnostic accuracy of dual-source computed tomography in the characterization of coronary atherosclerotic plaques: Comparison with intravascular optical coherence tomography. *Int J Cardiol.* 2011; 148: 313-318.

③Saito Y, Morimoto T, Ogawa H, Nakayama M, Uemura S, Doi N, Jinnouchi H, Waki M, Soejima H, Sugiyama S, Okada S, Akai Y. Japanese Primary Prevention of Atherosclerosis with Aspirin for Diabetes Trial Investigators. Low-dose aspirin therapy in patients with type 2 diabetes and reduced glomerular filtration rate: subanalysis from the JPAD trial. *Diabetes Care.* 2011; 34: 280-5.

④Okada S, Morimoto T, Ogawa H, Kanauchi M, Nakayama M, Uemura S, Doi N, Jinnouchi H, Waki M, Soejima H, Sakuma M, Saito Y; for the Japanese Primary Prevention of Atherosclerosis With Aspirin for Diabetes (JPAD). Trial Investigators. Differential

effect of low-dose aspirin for primary prevention of atherosclerotic events in diabetic management: A subanalysis of the JPAD Trial. *Diabetes Care.* 2011; 34(6): 1277-83

⑤Okayama S, Uemura S, Soeda T, Onoue K, Somekawa S, Ishigami K, Watanabe M, Nakajima T, Fujimoto S, Saito Y. Clinical significance of papillary muscle late enhancement detected via cardiac magnetic resonance imaging in patients with single old myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 2011; 146: 73-9.

⑥Morikawa Y, Uemura S, Ishigami K, Soeda T, Okayama S, Takemoto Y, Onoue K, Somekawa S, Nishida T, Takeda Y, Kawata H, Horii M, Saito Y. Morphological features of coronary arteries in patients with coronary spastic angina: Assessment with intracoronary optical coherence tomography. *Int J Cardiol.* 2011; 146: 334-340.

⑦Uemura S, Onoue K, Saito Y. Author reply to letter by Di Marco and Brand regarding article, "Reduction of circulating soluble fms-like tyrosine kinase-1 plays a significant role in renal dysfunction-associated aggravation of atherosclerosis". *Circulation.* 2010; 122: e417.

⑧Onoue K, Zaima N, Sugiura Y, Isojima T, Okayama S, Horii M, Akai Y, Uemura S, Takemura G, Sakuraba H, Sakaguchi Y, Setou M, Saito Y. Using imaging mass

spectrometry to accurately diagnose Fabry's disease. Circ J. 2010; 75: 221-223.

[学会発表] (計 3 件)

①尾上健児, 上村史朗, 中谷公彦, 赤井靖宏, 岩野正之, 斎藤能彦. 循環血中soluble Flt-1 と動脈硬化 シンポジウム1. 第40回日本腎臓病学会東部学術大会. 2010. (2010.9)

②上村史朗, 尾上健児, 川田啓之, 竹田征治, 岡山悟志, 斎藤能彦. 可溶性 Fms-like Tyrosine Kinase-1 (sFlt-1) 慢性および急性冠動脈疾患におけるバイオマーカー. パネルディスカッション3. 第58回日本心臓病学会学術集会. 2010. (2010.9)

③Saito Y, Morimoto T, Ogawa H, Nakayama M, Okada S, Uemura S, Nishiura K, Soejima H, Jinnouchi H, Waki M, Doi N. Low-dose aspirin therapy in patients with type 2 diabetes mellitus coexisting renal damage: Subanalysis from the JPAD study. Late Breaking Clinical Trials 02. The 74th annual meeting of the Japanese Circulation Society, 2010. (2010.3)

[図書] (計 件)

①上村史朗, 斎藤能彦. 第6章EBM ALOFT 高血圧ナビゲーター (熊谷裕生, 小室一成, 堀内正嗣, 森下竜一) 2011, p228-229.

②上村史朗, 斎藤能彦: β 遮断薬の選択と臨床エビデンス. 伊藤浩 編集. 新心臓病診療プラクティスー動脈硬化の内科治療に迫

る. 東京: 文光堂. 2011. 236-239.

③添田恒有, 上村史朗, 斎藤能彦. 併用療法ARB フェーマナビゲーター β 遮断薬編 「改訂版」 (小室一成, 北風政史, 室原豊明, 山下武志) 2011 p162-169.

④上村史朗, 斎藤能彦: 硝酸イソソルビド. 急性心不全. 北風政史 編集. 循環器治療薬ハンドブック. 東京: 中外医学社. 2010. 131-133.

[その他]

ホームページ等

<http://www.narmed-u.ac.jp/~lint/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上村 史朗 (UEMURA SHIRO)

奈良県立医科大学 医学部 准教授

研究者番号: 21590958

(2) 研究分担者

斎藤 能彦 (SAITO YOSHIHIKO)

奈良県立医科大学 医学部 教授

研究者番号: 30250260