

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461118

研究課題名(和文) 食塩依存性高血圧における肥満細胞キマーゼの役割解明

研究課題名(英文) Elucidation of the role of mast cell chymase in salt-dependent hypertension

研究代表者

浦田 秀則 (Urata, Hidenori)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：30289524

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：8%高食塩食では高血圧を発症しない野生型マウス(C57BL/6J)で、2%食塩水飲水により12週後の血圧が146/100 mmHgへ上昇し、食塩依存性高血圧モデルを確立した。このモデルで特異的キマーゼ阻害薬は用量依存性に降圧及び心拍数減少効果を示した。一方、既存の降圧薬投与では、アンジオテンシン受容体拮抗薬とアルドステロン受容体拮抗薬がわずかに、しかし、有意に降圧及び心拍数減少効果を示した。さらに、各臓器のキマーゼ依存性アンジオテンシン産生活性は、主に、消化管そして皮膚・骨格筋で有意に増加していた。すなわち、高食塩負荷に伴う組織キマーゼ活性化が昇圧と交感神経活性化を促す事を証明した。

研究成果の概要(英文)：Establishment of a salt-dependent moderate hypertension mouse model was confirmed, namely, 2% NaCl concentration in drinking water for 3 months increased blood pressure up to 146 / 100 mmHg. Depressor effect of chymase inhibitors and various antihypertensive drugs were challenged and we found that complete depressor effect of a specific chymase inhibitor was confirmed in salt dependent hypertensive mice model. Chymase inhibitors showed dose-dependent antihypertensive and heart rate reduction. On the other hand, among existing antihypertensive drugs, only angiotensin receptor antagonist and aldosterone receptor antagonists slightly, but significantly, reduced blood pressure. The tissue chymase activity was increased in the gastrointestinal tract, skin, and skeletal muscle. Those results proved that increased tissue chymase activity with high salt loading contributed to hypertension and activated sympathetic nervous system.

研究分野：医歯薬学

キーワード：心臓病態学 高血圧 食塩過剰摂取 マウス キマーゼ アンジオテンシン

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトキマーゼは1990年に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・純化・クローニングされた。ACE阻害薬では抑制されないセリン酵素であり、組織レベルでは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。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明らかとなった。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・軽度血圧上昇・心肥大及び線維化・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

**食塩依存性高血圧の機序に肥満細胞キマーゼが関与するか否かを基礎研究で検証することである。**食塩負荷の影響を短期かつ長期間(3ヶ月)観察できる**食塩依存性高血圧マウス(C57BL/6J)を確立する。**食塩負荷後の経時的血圧・心拍変化を**食塩非投与野生型マウス**食塩負荷に伴うレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系(RAAS)因子変化(血漿・尿・組織)も経時的(1ヶ月毎)に比較検討し、血圧上昇の原因を同定する。さらに、**特異的キマーゼ阻害薬**や各種降圧薬の単剤や併用効果からこの食塩依存性高血圧モデルでのキマーゼの貢献度を判定する。

### 3. 研究の方法

**目的**：一般的には8%**高食塩食**では高血圧を発症しない野生型マウス(C57BL/6J)で、飲水中食塩濃度を0.25%から2%まで変化させ、3ヶ月間、血圧・心拍の変動を観察し、血圧上昇を惹起する適切な飲水中食塩濃度を設定する。

**目的**：目的で設定したモデルと飲水食塩負荷を3ヶ月間施行し、1週間毎の体重・血圧・心拍測定と飲水量・尿量をメタボリックケージで測定する。さらに、血中・尿中・組織中各RAASコンポーネントを1ヶ月毎に測定して、血圧変

化に伴う各RAASコンポーネントおよび炎症・酸化ストレス変化を明らかにする。病学的にも組織肥満細胞数測定や臓器障害の程度を判定する。食塩依存性血圧上昇と肥満細胞の関連を明らかにする。

**目的**：特異的キマーゼ阻害薬やRAAS抑制型降圧薬(ACE阻害薬・ARB・アルドステロン受容体拮抗薬)を単独や併用で使用して降圧・心拍変化などをモニターし、1ヵ月後に各RASコンポーネントを測定し、各薬物の食塩依存性高血圧モデルでの有用性を同定する。この結果から食塩依存性高血圧でのキマーゼの寄与率を判定する。サイアザイド系利尿薬やカルシウム拮抗薬もコントロール薬群とする。

### 4. 研究成果

1) 食塩依存性高血圧モデルの確立  
2%食塩水飲水12週負荷後の血圧が146/100 mmHg程度と、中等度高血圧が確認されたので、2%食塩水をその後の実験に用いた。食塩負荷の体重は非負荷群と有意差を示さなかった。尿中アンジオテンシノーゲン・アルドステロンは有意に増加した。

2) 特異的キマーゼ阻害薬の効果  
特異的キマーゼ阻害薬(TPC-806)の経口摂取は用量依存性に降圧・心拍減少作用を示した。しかし、アンジオテンシン受容体阻害薬とアルドステロン受容体阻害薬が、多少、しかし、有意に降圧作用を示した。一方その他の降圧薬は降圧作用を示さなかった。

3) 組織キマーゼ活性の測定  
上述したモデルで組織キマーゼ活性を測定したところ、腸管・皮膚・骨格筋でキマーゼ活性が有意に増加していた。

このような一連の結果は、高食塩負荷(2%飲水)マウスモデルでは、腸管・皮膚・骨格筋キマーゼが活性化され、昇圧や交感神経活性化に寄与することを *in vivo* で証明できた。その変化を従来の降圧薬では抑制できず、特異的キマーゼ阻害薬でのみ抑制できたことは、将来のキマーゼ阻害作用を持つ経口摂取可能物質が降圧商品として臨床応用できる可能性があることを世界で始めて示した。

### 研究期間以外の参考文献

- Okamura K, Increased angiotensin II forming chymase activity in the circulating mononuclear leukocyte associated with diastolic dysfunction detected by echocardiography, 第76回日本循環器学会総会・学術集会、2012年3月17日
- Urata H., Angiotensin forming system in various cardiovascular

- disease, CSDS2010、2010年9月24日
3. Okamura K., Inoue Y., Uehara Y., Maruyama S., Sumi S., Furuyama S., Kodama S., Andoh C., Niimura H., Tojo H., Miyoshi K., Tsuchiya Y., Miura S., Yamanouchi Y., Saku K., Urata H., Higher chymase dependent angiotensin II-forming activity in the circulating mononuclear leukocyte is a significant contributing factor for atrial fibrillation、ACC 2010 59th Annual Scientific Session、2010年3月16日
  4. Okamura K., Inoue Y., Uehara Y., Matsumoto K., Maruyama S., Sumi S., Fukuda Y., Furuyama S., Kodama S., Andoh C., Niimura H., Kubota K., Tohjoh H., Miyoshi K., Miura S., Yamanouchi Y., Saku K., Urata H., Higher Chymase Dependent Angiotensin II-Forming Activity in the Circulating Mononuclear Leukocyte is a Significant Contributing Factor for Atrial Fibrillation、第74回日本循環器学会総会・学術集会、2010年3月7日
  5. Inoue Y., Okamura K., Ide H., Maruyama S., Sumi S., Furuyama S., Kodama S., Ando C., Niimura H., Tojo H., Miyoshi K., Yamanouchi Y., Urata H., Increased chymase-dependent Angiotensin forming activity of circulating mononuclear leukocyte in patients with coronary artery disease、ESH2009 19th European Meeting on Hypertension、2009年6月14日
  6. Okamura K, Urata H. et al., 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
  7. Takahashi Y, Urata H. et al., 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
  8. 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
  9. 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

10. Okamura K, Urata H. et al., 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
11. Azekoshi Y, Urata H. et al., Enhancement of angiotensin forming activity in mononuclear cells by free fatty acids、ISH2008、2008年6月16日
12. Y.-Y. Fan, Urata H. et al., The role of chymase in angiotensin formation and progression of fibrosis in obstructed kidneys、ISH2008、2008年6月16日

#### 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1件)

Sankar D, Yahiro E, Uehara Y, Habe S, Nishiyama A, Miura S, Saku K, Urata H., Blood glucose level and survival in streptozotocin-treated human chymase transgenic mice、Am J Physiol Heart Circ Physiol、309、H1987-H1996、2015、有

〔学会発表〕(計2件)

Urata H., Antihypertensive Effect of Chymase Intake in Salt-Dependent Hypertension Mouse Model、High Blood Pressure Research 2014、2014年9月10日

Okamura K, Urata H., Confirmation of Depressor Effect of Chymase Inhibitory Japanese Water Pepper in Randomized, Prospective, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial、第80回日本循環器学会学術集会、2016年3月20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