

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：19590828  
 研究課題名 (和文) 慢性腎不全で加速される重症心血管疾患発症の分子機序の解明と新しい治療法の開発  
 研究課題名 (英文) Molecular mechanisms of advanced atherosclerosis in chronic renal failure  
 研究代表者  
 上村史朗 (UEMURA SHIRO)  
 奈良県立医科大学 医学部 講師  
 研究者番号：80232792

## 研究成果の概要：

慢性腎臓病 (CKD) は心血管病 (CVD) の独立した危険因子であるが、CVD の発症に係わる分子機序は明らかではなかった。本研究では動脈硬化進展作用を有する胎盤成長因子 (PlGF) およびその内因性阻害因子である可溶性 Fms-like tyrosine kinase 1; 可溶性 FLT-1) に着目し、CKD 患者における可溶性 FLT-1 関連分子の動態および動脈硬化病変の進展に寄与するメカニズムの解析を行なった。その結果、CKD の進展に伴う腎での可溶性 FLT-1 産生低下および血中可溶性 FLT-1 濃度の低下が、CKD 患者における冠動脈病変の重症度を規定する重要な因子であることが判明した。さらに CKD 合併動脈硬化マウスモデルを用いた実験により、リコンビナント可溶性 FLT-1 蛋白の持続投与が動脈硬化病変の進展を抑制することを明らかにし、可溶性 FLT-1 が新しい創薬標的分子になる可能性を示した。

## 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：医師薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学・心臓病態学

キーワード：腎不全, 再生医学, 心血管

## 1. 研究開始当初の背景

2006 年に発表された NIPPON DATA 90 の解析結果 (Circ J. 2006 70:954-9.) 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と

報告されている。さらに最近では、糖尿病患者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/分を下回る症例では 5.52, さらに腎機能廃絶した症例においては 9.12 と著明に上昇することが示されている。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) 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)。われわれはこの研究の過程において, 可溶性 FLT-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常者に比して著明な低値を示すことを発見した。PlGF が属する VEGF ファミリーのサイトカインは強力な血管新生作用を有しており, 血中の可溶性 FLT-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可溶性 FLT-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。以上のような知見に基づいて我々は, 可溶性 FLT-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となりつつある。本研究では, われわれがすでに明らかにした心腎の結びつきを橋渡しする可溶性 FLT-1 が腎機能低下と心血管疾患発症を関連づける直

接的な機序を明らかにし, 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 の研究を行い, 臨床応用に結びつけることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) (臨床的検討) 可溶性 FLT-1 血中濃度を規定する因子の解明と心血管疾患発症との関連性の検討

本臨床研究では, 心臓カテーテル検査を目的として当院に入院する虚血性心疾患のうち, 同意が得られた患者を対象とした。腎静脈を含む体内各部位で採血した血液中の VEGF ファミリーに属するサイトカインおよび可溶性 FLT-1 を ELISA 法で測定する。得られたサイトカイン濃度の臓器間濃度格差を腎機能に着目して検討する。さらに, ヒト腎生検サンプルから mRNA を抽出し, 腎での可溶性 FLT-1 遺伝子発現様式と腎機能障害の程度との関連性を検討する。

これらの成績から可溶性 FLT-1 濃度と全身の動脈硬化・冠動脈硬化症の重症度, さらに心疾患との病態との関連を検討し, 腎機能低下と心疾患発症の分子機序にかかわるこれらの分子の役割りを明らかにする。

(2) (実験的検討) 慢性腎不全合併動脈硬化モデルにおける可溶性 FLT-1 動態とリコンビナント可溶性 FLT-1 投与の検討

本実験的検討では, 動脈硬化発症モデルである ApoE ノックアウト (ApoEKO) マウスに 6 分の 5 腎臓摘出を行うことによって慢性腎不全 (CKD) 合併モデルを作成して, 1) CKD の合併が ApoEKO マウスの動脈硬化病変を重症化させるか, 2) CKD の合併が ApoEKO の血中 PlGF, VEGF, および可溶性 FLT-1 濃度を変化させるか, 3) リコンビナント可溶性 FLT-1 の持続投与が, CKD の合併によって増悪した動脈硬化症を改善できるか否かを検討した。

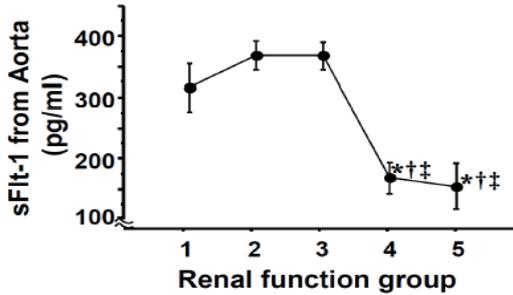
さらにマウス心筋梗塞モデルを作成して, リコンビナント PlGF, リコンビナント可溶性 FLT-1 を投与することにより, 心筋梗塞の治療機転におけるこれら分子の重要性を明らかにし, さらに心筋梗塞および動脈硬化疾患に対する創薬対象としての可能性を探索する。

## 4. 研究成果

(1) (臨床的検討)

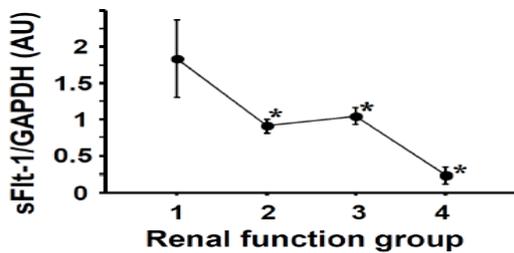
329 例の心臓カテーテル検査を受けた冠動脈疾患患者では, 腎静脈血中の可溶性 FLT-1 濃度が末梢静脈に比して高値を示し, 動脈血中濃度が腎静脈濃度と相関した。さらに血中可溶性 FLT-1 濃度は腎機能低の程度に相関し

て減少した。



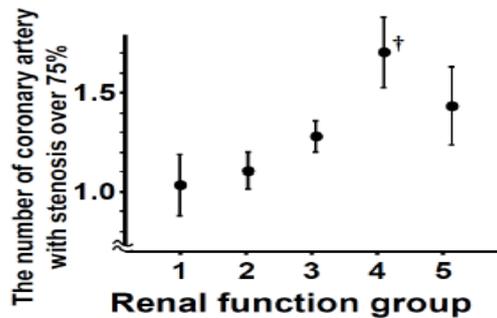
(図注：横軸；CKD ステージ分類)

さらにヒト腎生検サンプルを用いて可溶性 FLT-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た。

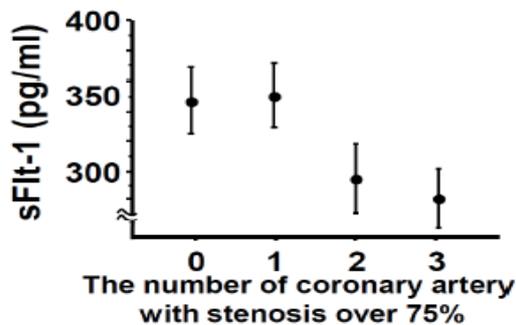


(図注：横軸；CKD ステージ分類)

さらに腎機能障害程度と可溶性 FLT-1 濃度は冠動脈硬化症の重症度とも関連することも確認した。



(図注：横軸；CKD ステージ分類)

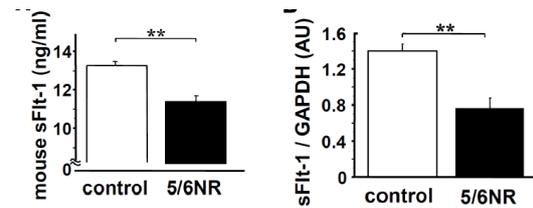


(2) (実験的検討)

ApoEKO マウスに6分の5腎臓摘出術を施行

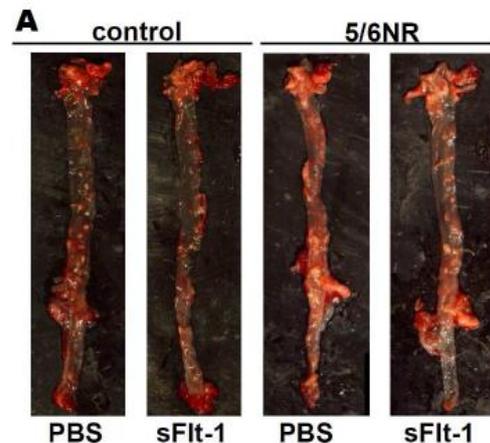
することにより、血漿クレアチニンは  $0.7 \pm 0.08$  から  $1.30 \pm 0.09$  mg/dl に、BUN は  $28.6 \pm 1.2$  から  $67.0 \pm 4.4$  mg/dl にそれぞれ上昇し、慢性腎不全 (CKD) の合併が確認された。CKD 合併マウスとコントロールマウスの間に、体重、血圧などの差は認めなかった。

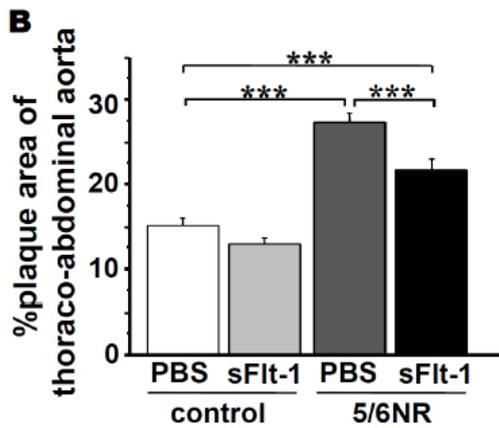
CKD 合併 ApoEKO マウスでは、コントロール ApoEKO マウスに比して、腎での可溶性 FLT-1 遺伝子発現量および血中濃度はともに有意に減少していた。



また、CKD 合併 ApoEKO マウスではコントロール ApoEKO マウスに比して大動脈での動脈硬化巣面積が有意に増大していた。

さらに CKD 合併 ApoEKO マウスに対するリコンビナント可溶性 FLT-1 (15ng/g/BW) の反復腹腔内投与 (週3回、10週間) は、大動脈での動脈硬化巣面積を有意に減少させた。一方、コントロール ApoEKO マウスに対するリコンビナント可溶性 FLT-1 投与は動脈硬化巣面積に影響を及ぼさなかった。





以上の臨床的研究の成績から、1) 健常腎での可溶性 FLT-1 産生が末梢循環血中の可溶性 FLT-1 濃度の規定因子であること、2) 腎機能低下の進展に伴って可溶性 FLT-1 濃度の腎での産生および血中濃度が低下することがあきらかになった。さらに実験的検討の成績からは、1) 実験的 CKD は ApoEKO マウス腎での可溶性 FLT-1 産生および濃度を低下させる、2) CKD の合併によって増悪した動脈硬化病変はリコンビナント可溶性 FLT-1 の反復投与によって改善する可能性があることが示された。

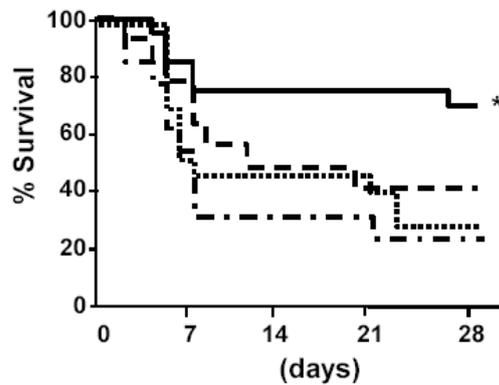
以上の成績は、可溶性 FLT-1 が慢性腎不全で増悪する心血管疾患発症に重要な Key Molecule である可能性を示したと言える。

さらに、マウス心筋梗塞モデルを用いて、心筋梗塞後の治癒機転に及ぼすリコンビナント P1GF およびリコンビナント可溶性 FLT-1 の持続投与の影響を検討した。血管新生作用を有するリコンビナント P1GF 投与はコントロール動物に比して慢性期の梗塞面積を有意に減少させ、この減少には梗塞域および梗塞境界域での血管新生促進作用が関与していた。一方、P1GF の内因性阻害物質であるコンビナント可溶性 FLT-1 はコントロール動物に比して慢性期の梗塞面積を有意に増大させ、内因性 P1GF の阻害が創傷治癒過程に保護的に作用していることが示唆され

た。



術後 28 日目までの生存解析では、リコンビナント P1GF 投与は慢性期の生命予後を改善することが明らかになった。



以上の臨床的および実験的研究は、可溶性 FLT-1 は、慢性的な動脈硬化症の進展には保護的に、一方、心筋梗塞における急性の治癒機転には P1GF の保護作用を抑制的に制御している可能性を示したといえる。

以上の検討の成績により、可溶性 FLT-1 および P1GF は循環器疾患治療の新しい創薬ターゲットとなる可能性があり、今後の研究の進展が望まれる。

## 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 13 件)

- ① Takeda Y, Uemura S, Saito Y, (and 15 authors). Treatment with Recombinant Placental Growth Factor (PLGF) Enhances both Angiogenesis and Arteriogenesis and Improves Survival after Myocardial Infarction. PLGF therapy in acute myocardial infarction. **Circ J**, 2009 (in press). (査読有)
- ② Okayama S, Uemura S, Saito Y, (and 6 authors). Novel application of black-blood echo-planar imaging to the assessment of myocardial infarction. **Heart and Vessels** 2009 (in press) (査読有)
- ③ Somekawa S, Uemura S, Saito Y, (and 10 authors). Regulation of aldosterone and cortisol production by the transcriptional repressor neuron restrictive silencer factor. **Endocrinology**, 2009 (in press) (査読有)
- ④ Ogawa H, Uemura S, Saito Y, (and 6 authors). Low-dose aspirin for primary prevention of atherosclerotic events in patients with type 2 diabetes: a randomized controlled trial. **JAMA**, 300:1742-1747, 2008. (査読有)
- ⑤ Yasue H, Uemura S, Saito Y, (and 15 authors). Effects of a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, fluvastatin, on coronary spasm after withdrawal of calcium-channel blockers. **J Am Coll Cardiol** 51(18):1742-8, 2008. (査読有)
- ⑥ Horii M, Uemura S, Saito Y, (and 9 authors). Acute myocardial infarction as a systemic prothrombotic condition evidenced by increased von Willebrand factor protein over ADAMTS13 activity in coronary and systemic circulation. **Heart Vessel** 23(5):301-307, 2008. (査読有)
- ⑦ Okayama S, Uemura S, Saito Y, (and 2 authors). Continuing improvement of cardiac sympathetic activity on I-123 MIBG scintigraphy in a patient with hypertrophic obstructive cardiomyopathy after percutaneous transluminal septal myocardial ablation. **J Nucl Cardiol** 15(5):31-34. (査読有)
- ⑧ Zhang Q, Saito Y, Uemura S, (and 7 authors). The specific mineralocorticoid receptor blocker eplerenone attenuates left ventricular remodeling in mice lacking the gene encoding guanylyl cyclase-A. **Hypertens Res** 31(6):1251-6, 2008. (査読有)
- ⑨ Okayama S, Uemura S, Saito Y, (and 13 authors). Progression of non-culprit coronary artery atherosclerosis after acute myocardial infarction in comparison with stable angina pectoris **J Atheroscler Thromb**, 2008 (in press) (査読有)
- ⑩ Okayama S, Uemura S, Saito Y. Detection of infarct-related myocardial edema using cardiac diffusion-weighted magnetic resonance imaging. **Int J Cardiol** 123(1), 2007 (査読有)
- ⑪ Kawata H, Uemura S, Saito Y, (and 8 authors). Ultrasound accelerates thrombolysis of acutely induced platelet-rich thrombi similar to those in acute myocardial infarction. **Circ J** 71(10):1643-8, 2007. (査読有)
- ⑫ Tatsumi T Uemura S, Saito Y, (and 21 authors). Intracoronary trans plantation of non-expanded peripheral blood-derived mononuclear cells promotes improvement of cardiac function in patients with acute myocardial infarction. **Circ J** 71(8):1199-207, 2007. (査読有)
- ⑬ Kimura K, Uemura S, Saito Y, (and 4 authors). ANP is cleared much faster than BNP in patients with congestive heart failure. **Eur J Clin Pharmacol** 2007 Jul;63(7):699-702. (査読有)

〔学会発表〕（計 6 件）

① Saito Y, Uemura S, (and 8 authors). Soluble Flt-1 is a novel biomarker for the development of severed atherosclerosis in renal dysfunction. Symposium 1. Biomarkers, genetic polymorphism, and risk estimation. The 73<sup>rd</sup> Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. March 20-22 (Osaka, Japan).

② Ogawa H, Uemura S, Saito Y, (and 5 authors). JPAD Trial: Japanese Primary Prevention of Atherosclerosis with Aspirin for Diabetes trial. Late-Breaking Clinical Trials-American Heart Association Scientific Session 2008. November 8-12 (New Orleans, USA).

③ Onoue K, Uemura S, Saito Y, (and 13 authors). Soluble Fms-like Tyrosine Kinase 1: Decreased Levels Promote Atherosclerosis in Renal Dysfunction while Exogenous Administration Reduces Atherosclerosis Progression. Late-Breaking Basic Science - American Heart Association Scientific Session 2008 November 8-12 (New Orleans, USA).

④ Uemura S, Saito Y, (and 5 authors) Tissue characterization of coronary artery in patients with coronary spastic angina by optical coherence tomography. Symposium Coronary Spasm Revisited. The 72<sup>nd</sup> Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. March 20-22 (Fukuoka, Japan).

⑤ Takeda Y, Uemura S, Saito Y, (and 14 authors). Angiogenesis, but not vasculogenesis, plays major role in placental growth factor (PlGF) mediated improvement of cardiac function after myocardial infarction. American Heart Association Scientific Session 2007. November 4-7 (Orlando, USA).

⑥ Onoue K, Uemura S, Saito Y, (and 10 authors). Plasma Level of Soluble Fms-like Tyrosine Kinase 1 (sFlt-1) as a Predictive Marker of Acute Severe Heart Failure in Patients with Acute Myocardial Infarction. American Heart Association Scientific Session 2007. November 4-7 (Orlando, USA).

〔図書〕（計 4 件）

① 上村史朗, 竹田征治, 川田啓之, 斎藤能彦. 血管病のモデル-3. 心筋梗塞. 連載血管病モデルシリーズ. 血管医学 9 (1) : 73-78, 2008.

② 上村史朗, 斎藤能彦. 7. 腎機能障害における動脈硬化進展の機序. 特集: 腎障害と心疾患—心腎相関を識る— [織る] Heart View 12 (3) : 42-47, 2008.

③ 尾上健児, 上村史朗, 斎藤能彦. 慢性腎臓病 (CKD) と心血管疾患 (CVD). アディオサイエンス 5 (3) : 271-277, 2008 .

④ 上村史朗, 斎藤能彦. 中外医学社. Annual Review2009 循環器. 循環器の生物学3. PlGF と血管新生 pp18-24. 2009.

〔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

<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・講師

研究者番号 : 80232792

(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

(3) 連携研究者

なし