

研究種目：	基盤研究(C)
研究期間：	2008 ～ 2010
課題番号：	20590265
研究課題名(和文)	メタボリックシンドローム合併症におけるキマーゼの病態生理学的役割
研究課題名(英文)	Pathophysiological role of chymase in complications of metabolic syndrome
研究代表者	
高井 真司	(Takai Shinji)
大阪医科大学・医学部・准教授	
研究者番号：	80288703

研究成果の概要(和文)：キマーゼはアンジオテンシン(Ang) II、Transforming growth factor(TGF)- β やマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)-9を活性化する。糖尿病モデルではキマーゼはAng II増加を介して膵島組織を破壊した。大動脈瘤モデルではキマーゼ阻害薬がMMP-9活性化を抑制し、進展を抑制した。非アルコール性脂肪肝炎モデルでは脂肪肝と線維化がキマーゼ阻害で抑制された。キマーゼはメタボリックシンドローム合併症において重要な役割を果たしていることが示された。

研究成果の概要(英文)：Chymase converts precursors of angiotensin(Ang) II, Transforming growth factor(TGF)- β and matrix metalloproteinase(MMP)-9 to their active forms. In a diabetic animal model, chymase induced pancreatic disorganization by augmentation of chymase-forming Ang II. In an animal model with abdominal aneurysmal aorta(AAA), the inhibition of MMP-9 activation by chymase inhibitor resulted in attenuation of the AAA progression. Steatosis and fibrosis in liver were strongly prevented by chymase inhibition in an animal model with nonalcoholic steatohepatitis. These results demonstrated that chymase plays a crucial role in complications of metabolic syndrome.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：循環薬理

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：キマーゼ、メタボリックシンドローム、糖尿病、高脂血症、臓器障害、脂肪肝、線維化、大動脈瘤

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒト心臓組織においてキマーゼは、アン

ジオテンシン(Ang) IIを産生する酵素として発見された。従来、Ang IからAng IIへ変

換する酵素としては、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) がよく知られていた。しかし、この Ang I から Ang II への変換には、ACE に加えてキマーゼが存在し、しかも組織抽出液中では、ACE よりむしろキマーゼの方が Ang II 変換能が高いことより、その機能が非常に注目された。我々は、ヒト血管組織からキマーゼを精製し、ヒト血管組織でも Ang II 産生酵素として重要な役割を果たしていることを報告した (Clin Chim Acta 265, 13-20, 1997)。さらに、ヒト以外の動物種でハムスター、サルなどの心臓組織や血管組織にも Ang II を産生するキマーゼが存在することを明らかにするとともに精製およびクロニングを行い、酵素学的特徴を解析してきた (Life Sci 58, 591-597, 1996; FEBS Lett 412, 86-90, 1997; J Cardiovasc Pharmacol 32, 826-833, 1998; Circulation 100, 654-658, 1999)。

(2) キマーゼの心不全、動脈硬化、腎不全との関連性は、患者から摘出された臓器の解析結果により明らかにされてきた。従来、キマーゼの動態解析は、主にバルーン傷害血管後や移植血管の血管狭窄など比較的急性期の病態モデルが中心であり、慢性疾患をターゲットにしたモデル解析、特に、高血圧、高脂血症、糖尿病のモデルを用いた長期実験での解析は、国内外ともにほとんどなかった。

(3) キマーゼには Ang II を産生する以外の作用として、MMP-9 活性化、TGF- β 活性化、コラーゲン産生などが報告されている。Ang II、MMP-9、TGF- β 、コラーゲンはいずれも心不全、動脈硬化、腎不全との強い関連性が示唆されている。したがって、キマーゼは Ang II、MMP-9、TGF- β 、コラーゲンの作用亢進を介して心不全、動脈硬化、腎不全の病態機序に関与している可能性が高い。2005年4月、本邦におけるメタボリックシンドロームの基準がまとめられた。メタボリックシンドロームは、予防を行うことが最も重要であるが、他方、その合併症を如何に軽減するかということも重要と考えた。私は、病態モデルの解析を通じてメタボリックシンドロームの合併症に共通する危険因子の一つにキマーゼの関与の可能性を考え、この仮説を具体化する目的で、メタボリックシンドロームの合併症におけるキマーゼの病態生理学的役割を明らかにし、キマーゼ阻害薬の合併症治療薬としての位置づけを明確にしたいと考えた。

2. 研究の目的

本研究の全体構想は、キマーゼとメタボリックシンドロームによる臓器障害との関連

性を明らかにすることを目的とする。具体的には、メタボリックシンドロームによって惹起される合併症の動物モデルを用いて、キマーゼおよびキマーゼにより産生される、もしくは活性化される Ang II、MMP-9、TGF- β を解析し、キマーゼが関連する因子と合併症との関連性を明らかにする。また、キマーゼ阻害薬を用いる実験においては、投与時期を変えることにより、各疾患の合併症の進行度による阻害薬の影響を解析し、キマーゼの合併症における病態機序を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ハムスター糖尿病モデルの臓器障害におけるキマーゼの病態生理学的役割

① 糖尿病モデルの経時的解析

8週齢雄性ハムスターにストレプトゾトシン (60 mg/kg, i. p.) を投与し、1、3、7、14、21、28、56日後、経時的に血糖値、血管内皮機能、心機能を解析し、さらに、組織学的な変化を検討した。

血糖値は、グルコメーターにて測定し、血管内皮機能は、摘出した頸動脈を用いてアセチルコリンによる弛緩反応を指標に解析した。心機能はエコーにて解析を行った。

血管、心臓および膵臓の組織抽出液を用いてキマーゼ活性および蛋白濃度を定量した。また、酸化ストレスの指標としてマロンジアルデヒドを定量した。

心臓、腎臓および膵臓をカルノア固定し、それらの組織切片を作製した。切片を用いて HE 染色およびキマーゼの免疫染色を行った。膵臓では、インスリンの免疫染色を行って膵島組織構造の破壊の指標とした。心臓および腎臓では、アザン染色を行い、線維化の定量を行った。また、腎臓ではパス染色もを行い、糸球体の組織解析を行った。

② ハムスター糖尿病モデルを用いたキマーゼ阻害薬による膵島保護効果の検討

8週齢雄性ハムスターにストレプトゾトシン (60 mg/kg, i. p.) を投与し、14日後に血糖値を測定し、血糖値を平均化して2群に分け、プラセボまたはキマーゼ阻害薬を腹腔内投与した。薬物投与後7日の時点で、血糖値を測定し、膵臓を摘出した。

血糖値は、グルコメーターにて測定した。摘出した膵臓の組織抽出液を用いてキマーゼ活性および蛋白濃度を定量し、マロンジアルデヒドも定量した。残りの膵臓をカルノア固定した。その切片を用いて HE 染色を行い、そして、キマーゼおよびインスリンの免疫染色を行った。また、トルイジンブルー染色を行い、肥満細胞数を定量した。

(2) マウス腹部大動脈瘤モデルの臓器障害におけるキマーゼの病態生理学的役割

①マウス腹部大動脈瘤モデルの経時的解析
高脂血症モデルとして知られる ApoE 遺伝子欠損マウス (16 週齢、雄性) に Ang II (1000 ng/min) を 4 週間皮下に持続投与した。

血圧は、無麻酔下で非観血的に測定した。Ang II 投与前、投与後 1 週、4 週、24 週の時点で、血管径をエコーで定量したのち、直視下でも測定した。その後、大動脈を摘出した。

摘出した大動脈の組織抽出液を用いて、キマーゼ活性および MMP-9 活性を測定した。また、残りの組織を用いて、血管の内腔面積を定量した。

②マウス腹部大動脈瘤モデルを用いたキマーゼ阻害薬の抑制効果の検討

高脂血症モデルとして知られる ApoE 遺伝子欠損マウス (16 週齢、雄性) に Ang II (1000 ng/min) を 4 週間皮下に持続投与することによって作製する大動脈瘤モデルを用いた。プラセボまたはキマーゼ阻害薬を Ang II を持続投与する 3 日前より経口投与を開始し、Ang II の持続投与を終了するまで投与した。

血圧は、無麻酔下で非観血的に測定した。Ang II 投与前、投与後 1 週および 4 週の時点で、血管径をエコーで定量したのち、直視下でも測定した。その後、大動脈を摘出した。

摘出した大動脈の組織抽出液を用いて、キマーゼ活性および MMP-9 活性を測定した。また、残りの組織をカルノア固定し、血管組織切片を用いて内腔面積を定量した。また、抗マクロファージ抗体を用いて、マクロファージの浸潤程度を解析した。

(3) ハムスター非アルコール性脂肪性肝炎

(NASH) モデルの脂肪肝ならびに肝臓線維化におけるキマーゼの関与

12 週齢雄性ハムスターにメチオニン・コリン欠損食を与えて作製する NASH モデルを用いた。プラセボまたはキマーゼ阻害薬は、メチオニン・コリン欠損食を与えると同時に投与を開始した。メチオニン・コリン欠損食飼育開始 8 週間において、採血および肝臓を摘出した。

血中のビリルビン、トリグリセリド、ヒアルロン酸は、定量キットにて測定した。

肝臓組織の一部は、カルノア固定後、HE 染色にて脂肪滴を解析した。また、シリウスレッド染色により線維化面積を定量した。キマーゼの免疫染色ならびにトルイジンブルー染色を行い、キマーゼ陽性細胞数ならびに肥満細胞数を定量した。

残りの肝臓組織を用いて、組織抽出液中のキマーゼ活性、MMP-9 活性およびマロンジアルデヒドを定量した。

(4) ハムスター肝硬変におけるキマーゼの関与

8 週齢雄性ハムスターに四塩化炭素 (1 mg/kg) を週に 2 回皮下投与して 8 週間飼育することにより肝臓線維化モデルを作製した。

血中のアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、総ビリルビン、ヒアルロン酸の濃度は、測定キットにて定量した。

肝臓組織の一部は、カルノア固定後、アザン染色にて線維化を定量した。また、キマーゼおよび Ang II の免疫染色を行い、肝臓組織中のキマーゼ陽性細胞ならびに Ang II 陽性細胞数を定量した。α-Smooth Muscle Actin (SMA) の陽性細胞を免疫染色し、活性化星細胞の検出の指標とした。トルイジンブルー染色により肥満細胞数も定量した。

4. 研究成果

(1) ハムスター糖尿病モデルを用いた臓器障害におけるキマーゼの病態生理学的役割

①糖尿病モデルの経時的解析

ストレプトゾトシン投与 3 日後より血糖値が有意に上昇した。摘出した血管内皮機能は、28 日後より有意に減弱していた。心機能の指標である Ejection Fraction (EF) および Fractional Shortening (FS) は、56 日後において低下傾向を認めた。一方、拡張期末期径には大きな差を認めなかった。

腎臓の組織切片のパス染色による解析からは、56 日後の時点においても糸球体構造の著明な変化を認めなかった。膵臓の組織解析により、14 日後から 21 日後においてインスリン陽性細胞数が急激に減少することが判明した。一方、アザン染色による心臓および腎臓の線維化形成は、ほとんど認めなかった。

ストレプトゾトシン投与 14 日後までは、膵臓の組織抽出液中のキマーゼ活性の有意な変化を認めなかったが、21 日後の時点では有意な上昇を認めた。その後も膵臓の組織抽出液中ではキマーゼ活性の有意な上昇が続いた。また、血管組織抽出液中においても 28 日後以降でキマーゼ活性が有意に上昇していた。しかし、心臓および腎臓の組織抽出液中においては、キマーゼ活性の有意な変化を認めなかった。

膵島破壊ならびに血管内皮障害の起こる時期に一致してそれぞれの組織抽出液中のキマーゼ活性が増加したことより、これらの臓器障害においてキマーゼが関与している可能性が示唆された。

②ハムスター糖尿病モデルを用いたキマーゼ阻害薬による膵島保護効果の検討

ストレプトゾトシン投与 14 日後の血糖値は、プラセボ投与群では有意に上昇していたが、キマーゼ阻害薬投与群ではその上昇は有意に抑制されていた。

膵臓組織解析の結果、プラセボ投与群では

インスリン陽性細胞数が有意に減少していたが、キマーゼ阻害薬投与群では、その減少は有意に予防された (図. 1 参照)。また、キマーゼ陽性細胞数ならびにトルイジンブルー陽性細胞数が、プラセボ投与群で有意に増加したが、キマーゼ阻害薬投与群では有意に抑制されていた。

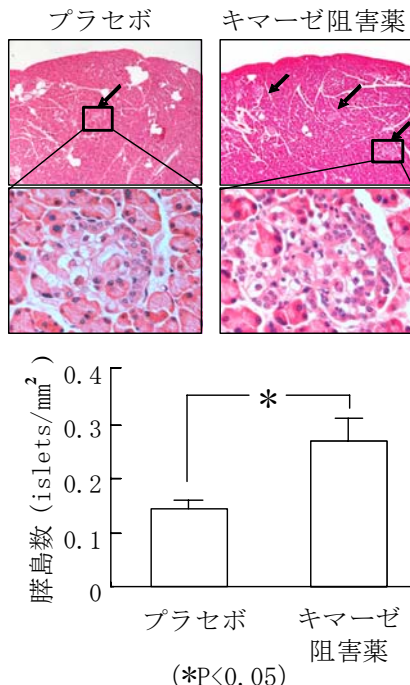


図 1. ストレプトゾトシン誘発ハムスター糖尿病モデルにおける膵臓組織に対するキマーゼ阻害薬の影響

膵臓の組織抽出液中のキマーゼ活性および Ang II 産生酵素は、プラセボ投与群で有意に上昇したが、キマーゼ阻害薬投与群では有意に減少した。また、膵臓の組織抽出液中のマロンジアルデヒド値もプラセボ投与群で有意に増加したが、キマーゼ阻害薬投与群で有意に減少した。

これらのことは、キマーゼの発現および活性増加に伴う Ang II 産生亢進が、糖尿病による膵臓破壊に深く関与し、キマーゼ阻害薬は、糖尿病の進行に伴う膵臓破壊によって起こるインスリン分泌抑制の予防に有効である可能性が示唆された。

(2) マウス腹部大動脈瘤モデルを用いたキマーゼ阻害薬の抑制効果の検討

① マウス腹部大動脈瘤モデルの経時的解析

Ang II 持続投与後 1 週の時点で収縮期血圧は約 160 mmHg になり、持続投与終了後 (4 週間後) も同様の血圧であった。その時点で、正常に比して、大動脈径の有意な増加が確認できた。また、Ang II 持続投与終了後 1 週の時点において、収縮期血圧は正常に戻っていた。この Ang II 持続投与 4 週間後の血管の組織抽

出液中のキマーゼ活性および MMP-9 活性は有意に増加していた。

Ang II 持続投与終了後 20 週の時点で、大動脈径を測定したところ、Ang II 投与群では持続投与終了時の大動脈径に比して、有意な増加が確認された。また、血管組織抽出液中において、更なる MMP-9 活性の増加を認めた。

これらのことより、Ang II の刺激亢進が、血管におけるキマーゼの発現を増加させ、MMP-9 活性の作用亢進を介して大動脈瘤の発症ならびに進展に深く関与していた可能性が強く示唆された。

② マウス腹部大動脈瘤モデルを用いたキマーゼ阻害薬の抑制効果の検討

キマーゼ阻害薬を Ang II の持続投与する 3 日前より投与を介したキマーゼ阻害薬投与群では、プラセボ投与群の Ang II 持続投与後に認められた昇圧に影響しなかった。

一方、キマーゼ阻害薬は、プラセボ投与群で認めた Ang II 持続投与 4 週間後の大動脈径の拡大を有意に抑制した (図. 2 参照)。また、プラセボ投与群の 4 週後に認めた血管組織抽出液中のキマーゼ活性および MMP-9 活性の増加は、キマーゼ阻害薬により共に有意に抑制された。

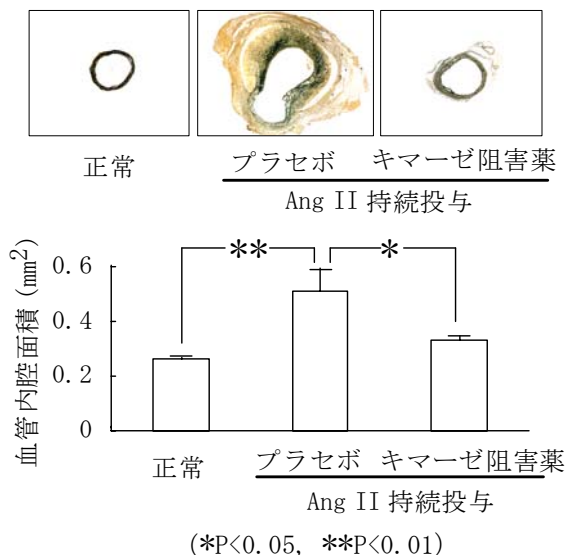


図 2. マウス腹部大動脈瘤モデルの大動脈内腔面積に対するキマーゼ阻害薬の影響

大動脈壁のマクロファージの免疫染色の結果、プラセボ投与群で認めたマクロファージの浸潤がキマーゼ阻害薬で著明に抑制されていた。

これらのことは、キマーゼが MMP-9 を活性化し、その MMP-9 の活性化が更なる MMP-9 の発現細胞であるマクロファージの集積も増加させることが示唆された。また、MMP-9 活性の増加は、血管壁の構造破壊に密接に関与し、腹部大動脈瘤の発症ならびに進展に深く

関与していることより、キマーゼ阻害薬は、腹部大動脈瘤の発症ならびに進展予防に有用である可能性が高いと考えられた。

(3) ハムスター非アルコール性脂肪性肝炎

(NASH) モデルの脂肪肝ならびに肝臓線維化におけるキマーゼの関与

ハムスターにメチオニン・コリン欠損食を負荷後8週の時点において、血中の総ビリルビン、トリグリセリド、ヒアルロン酸の濃度は、プラセボ投与群において、有意に増加していたが、キマーゼ阻害薬投与群では、その増加がすべて強く抑制されていた。

肝臓組織切片の解析により、脂肪滴がプラセボ投与群では、有意に増加していたのに対し、キマーゼ阻害薬投与群では、有意に抑制されていた(図. 3参照)。また、シリウスレッド染色にて線維化を抑制した結果、プラセボ投与群では、線維化面積の有意な増加を認めたが、キマーゼ阻害薬では有意に抑制され、正常群との間に有意な差を認めなかった。また、キマーゼ陽性細胞数の有意な増加とトリジンブルー染色による肥満細胞数の有意な増加がプラセボ投与群で認められたが、キマーゼ阻害薬投与群では、それらは共に強く抑制されていた。また、Ang II 陽性細胞数もプラセボ投与群で有意に増加したが、キマーゼ阻害薬投与群では有意に抑制されていた。

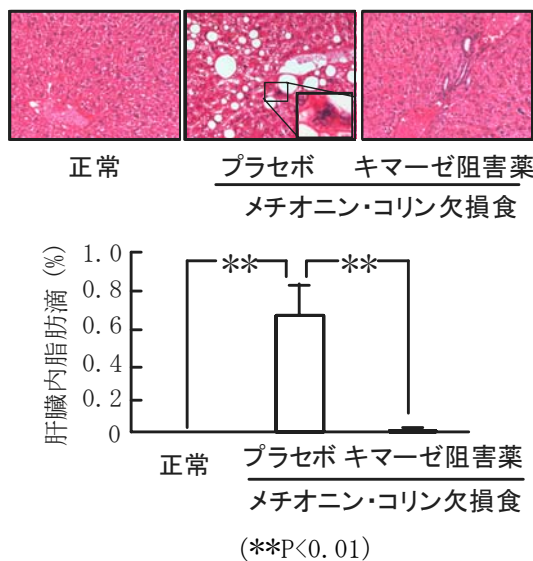


図3. メチオニン・コリン欠損食飼育によるハムスター肝臓内脂肪滴に対するキマーゼ阻害薬の影響

肝臓の組織抽出液中のキマーゼ活性およびMMP-9活性は、プラセボ投与群で有意に増加していたが、キマーゼ阻害薬投与群では有意に抑制されていた。

これらのことは、NASHのよる脂肪肝ならびに肝硬変の発症およびその進展において、キ

マーゼの産生するAng II産生の増加やMMP-9の活性化増加が深く関与することを強く示唆した。

(4) ハムスター肝硬変におけるキマーゼの関与

四塩化炭素投与開始後8週の時点で、血中のALT、総ビリルビン、ヒアルロン酸の濃度は、プラセボ投与群で有意に増加していたが、キマーゼ阻害薬投与群では、その増加は有意に抑制されていた。

肝臓組織切片を用いた解析では、アザン染色による線維化面積がプラセボ投与群では有意に増加していたが、キマーゼ阻害薬投与群では、有意に抑制されていた(図. 4参照)。活性化星細胞の指標である α -SMAの発現細胞もプラセボ投与群では確認されたが、キマーゼ阻害薬投与群では、ほとんど検出されなかった。また、キマーゼ陽性細胞数ならびにAng II陽性細胞数は、プラセボ投与群で有意に増加していたが、キマーゼ阻害薬投与群では有意に抑制されていた。

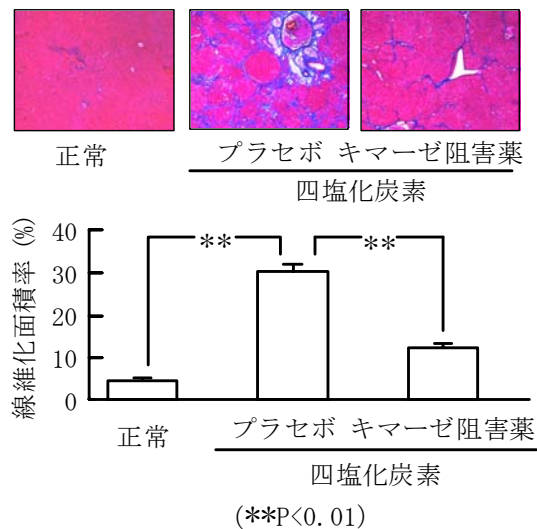


図4. 四塩化炭素誘発ハムスター肝臓線維化に対するキマーゼ阻害薬の影響

肝臓の組織抽出液中のキマーゼ活性は、プラセボ投与群で有意に増加し、キマーゼ阻害薬投与群では有意に抑制された。また、Ang II産生活性もプラセボ投与群で有意な増加を認めたが、キマーゼ阻害薬投与群では、その増加が有意に抑制されていた。

肝臓組織の線維化率、肝臓抽出液中のキマーゼ活性、肝臓のAng II産生活性の相関関係を解析したところ、肝臓組織の線維化率と肝臓抽出液中のキマーゼ活性、肝臓組織の線維化率と肝臓抽出液中のAng II産生活性、肝臓組織抽出液中のキマーゼ活性とAng II産生活性のすべてにおいて有意な相関性が認められた。

これらの結果は、肝臓の線維化形成部位で

は、キマーゼの発現が亢進し、その活性増加に伴う Ang II 産生活性の亢進が深く関与していることを強く示唆する。また、これら一連のキマーゼ阻害薬による線維化抑制効果は、肝硬変予防にキマーゼ阻害薬が有用である可能性を強く期待させた。

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 28 件)

- ① Takai S, Jin D, Miyazaki M. Chymase as an important target for preventing complications of metabolic syndrome. *Curr Med Chem*, 査読有, 2010, 17, 3223-3229.
- ② Inoue N, Jin D, Takai S, et al. Effects of chymase inhibitor on angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm development in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis*, 査読有, 2009, 204 (2), 359-364.
- ③ Simard E, Jin D, Takai S, et al. Chymase-dependent conversion of exogenously administered big endothelin-1 in the mouse in vivo. *J Pharmacol Exp Ther*, 査読有, 2009, 328 (2), 540-548.
- ④ Jin D, Takai S, et al. Long-term angiotensin II blockade may improve not only hyperglycemia but also age-associated cardiac fibrosis. *J Pharmacol Sci*, 査読有, 2009, 109 (2), 275-284.
- ⑤ Matsumoto C, Jin D, Takai S, et al. Chymase plays an important role in left ventricular remodeling induced by intermittent hypoxia in mice. *Hypertension*, 査読有, 2009, 54 (1), 164-171.

[学会発表] (計 46 件)

- ① Takai S, Jin D, Miyazaki M. Chymase as a useful target to prevent abdominal aortic aneurysm. *Keystone Symposia*, 2011 年 1 月 26 日、リノ、米国.
- ② 高井真司、金徳男、宮崎瑞夫、キマーゼ阻害薬による腹部大動脈瘤進展予防の可能性 (シンポジウム) 第 38 回薬物活性シンポジウム、2010 年 11 月 11 日、札幌
- ③ Takai S, Jin D, et al. Combination therapy with angiotensin receptor blocker and T- and L-type calcium channel blocker for attenuation of proteinuria in Dahl-salt sensitive rats. 23rd Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, 2010 年 9 月 26 日 September 26th, Vancouver, Canada.

- ④ 高井真司、金徳男、宮崎瑞夫、キマーゼ阻害薬のターゲット疾患について (シンポジウム)、第 15 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会、2010 年 8 月 20 日、大阪
- ⑤ 高井真司、金徳男、宮崎瑞夫、キマーゼ阻害薬の開発と臓器保護効果 (シンポジウム)、日本薬理学会、2009 年 3 月 16 日、横浜

[図書] (計 1 件)

- ① 高井真司、日本臨床社、日本臨床 高血圧 (第 4 版) 上巻、キマーゼ、184-187、2009.

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高井 真司 (Takai Shinji)
大阪医科大学・医学部・准教授
研究者番号：80288703

(2) 研究分担者

金 徳男 (Jin Denan)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：90319533