

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590984

研究課題名(和文)

高血圧の退行療法の確立とエピジェネティクス技術を用いた分子機序の検討

研究課題名(英文)

Regression of hypertension: molecular analysis and epigenetic assessment

研究代表者

篠村 裕之 (SASAMURA HIROYUKI)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：00235293

研究成果の概要(和文):

高血圧は全人口の4人に1人以上が罹患している、最も有病率の高い疾患である。高血圧は通常は進行性・不可逆性の病態と考えられているが、本研究では高血圧の一部を正常域に引き戻すこと、すなわち退行(regression)をもたらすことを可能であることを高血圧モデル動物で示した。そのような高血圧の退行を惹起する方法として、レニン-アンジオテンシン系抑制薬の一つであるアンジオテンシン受容体拮抗薬を通常の10-50倍以上の高用量で一過性に投与する、「パルス」投与が有効であることを示し、その分子機序には腎臓の細動脈肥厚の退縮が関与していることが示された。

研究成果の概要(英文):

Hypertension is the most prevalent disease in Japan, and affects at least one in four of the general population. Although hypertension is considered to be a progressive, irreversible disease, we demonstrated in this study that reversal or regression of hypertension may be feasible in animal models of hypertension. Regression of hypertension was achieved by 'pulse' treatment with an angiotensin receptor blocker at 10-50 times the normal dose, by a mechanism involving reversal of renal arteriolar hypertrophy.

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：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：高血圧・退行・レニン-アンジオテンシン系

## 1. 研究開始当初の背景

高血圧は本邦において最も有病率の高い疾患であり、全人口の4人に1人が罹患していることが様々な疫学的検討から示されている。高血圧患者の数は高齢化社会の進行に伴

い増加し、70歳以上の高齢者ではその有病率が50%以上であることも示されている。

高血圧は基本的には進行性・不可逆性の疾患と考えられている。即ち、加齢とともに血圧が上昇するのが一般的であり、一度高血圧に

なると治療を施しても正常血圧にはもどらないということが定説となっていた。

ところが最近の我々の検討では本態性高血圧のモデル動物である高血圧自然発症ラット (SHR) にレニン-アンジオテンシン系抑制薬を高用量投与することにより高血圧の退行 (regression) をもたすことが可能であることを示す予備実験検討を得た。この高血圧退行現象は正常食塩食・低食塩食投与のいずれの条件下でも生じる、即ち塩分バランス非依存性の現象であることが示唆された。この新規の予備実験結果は、高血圧が進行性・非可逆性の疾患であるという従来の考え方を覆すものであり、高血圧の病態の理解を大きく変える可能性を示唆する実験結果である。そこで本研究では今回観察された高血圧退行 (regression) 現象の詳細を検討し、その分子機序を解析することを目的とした。

## 2. 研究の目的

- (1) 本態性高血圧のモデル動物である高血圧自然発症ラット (SHR) における高血圧の退行療法を検討し、その機序を検討すること。
- (2) メタボリックシンドロームを伴う高血圧のモデル動物である SHR/mcr -cp における高血圧の退行療法を検討し、その機序を検討すること。
- (3) 腎硬化症のモデル動物であるアドリアマイシン投与マウスにおける糸球体硬化の退行療法を検討し、その機序を検討すること。

## 3. 研究の方法

- (1) 高血圧の退行療法を検討するために、高血圧モデル動物 (SHR) を用いた。16週齢の雄SHR (n=60) を6群にわけた。コントロール群は無処置とし、他の群には各々ACEI (エナラプリル30 mg/kg/d)、ARB (カンデサルタン50 mg/kg/d)、カルシウム拮抗薬 (CCB) (ニフェ

ジピン50mg/kg/d)、血管拡張薬 (ヒドララジン25mg/kg/d) の各降圧薬を16週齢から18週齢まで2週間投与した後休薬した。休薬後も血圧を経時的に測定し、パルス療法終了後約4ヶ月で各種解析を行った。薬剤投与期間中のみ低食塩食にした群も同時に解析した。また、一部のラットでは降圧薬投与中止後の18週齢で屠殺し、大動脈・腎臓の組織変化を観察するとともに、腎臓の遺伝子発現の違いをマイクロアレイ法で解析した。

(2) メタボリックシンドロームを伴う高血圧の退行療法を検討するために、SHRmcr -cpラットを用いた。16週齢の雄SHRmcr -cpを3群にわけた。コントロール群は無処置とし、第2群と第3群には各々ARB (カンデサルタン50 mg/kg/d) またはカルシウム拮抗薬 (CCB) (ニフェジピン50mg/kg/d) を16週齢から18週齢まで2週間投与した後休薬し、無処置群と比較した。休薬後も血圧、血糖、インスリン抵抗性を経時的に測定し、パルス療法終了後約4ヶ月で屠殺し、組織変化の解析を行った。

(3) 腎硬化症のモデル動物であるアドリアマイシン投与マウスにおける糸球体硬化の退行療法を検討するために、FVBマウスにアドリアマイシン (ADM) を投与し、糸球体硬化を惹起した。糸球体硬化が確立した時から各種濃度のARB (カンデサルタン0.50 mg/kg/day) を2週間投与し、各時点での蛋白尿・糸球体硬化・IV型コラーゲン沈着・MMP活性の変動等を解析した。更にDoxycycline (MMP阻害剤) とARBの同時投与、及びMMP-2 KOマウスを用いて、MMPの関与を検討した。

## 4. 研究成果

- (1) 降圧薬のパルス療法中は各群とも血圧が約150 mmHg とほぼ同様に低下した。ACEI・

ARB 投与群では投与中止後も血圧低値が続き、終了 4 ヶ月後でも無処置群と比較して約 30-50mmHg 低値 ( $p < 0.01$ ) が保たれていた。心血管合併症への影響を検討するために、心肥大・大動脈肥大を比較解析したところ、ACEI・ARB 投与群では有意に抑制された。一方、CCB・血管拡張薬ではそのような効果を認めなかった。これらの結果は、正常食塩食、低食塩食ともに同様であった。次に、高血圧の退行が引き起こされる機序を検討するために、SHR に ARB もしくは CCB を高濃度で一過性に投与した直後の 18 週齢でラットを屠殺し、大動脈と腎臓の組織学的変化を比較した。その結果、大動脈肥厚では両群間で有意な変化を認めなかったのに対し、腎臓の小動脈～細動脈の肥厚が有意に改善していることが明らかとなった。マイクロアレイ解析では構造蛋白の mRNA 発現の変化、更には蛋白分解酵素(MMP)の変化が示唆された。これらの結果を確認するために、腎臓における MMP 活性の変化を Highly sensitive in situ zymography 法で検討した結果、腎細動脈の MMP-13 活性が ARB 投与群で有意に上昇していることが明らかとなった。

(2) 雄 SHRmcr-cp ( $n=18$ ) に ARB あるいはカルシウム拮抗薬を 16 週齢から 18 週齢にパルス投与したのち薬剤を中止した。その結果、パルス投与中止後も血圧の持続抑制 (Control:  $222 \pm 4$ , ARB pulse  $186 \pm 4$ , CCB  $217 \pm 6$  mmHg,  $p < 0.01$ ) とともにインスリン抵抗性の改善ならびに尿中アルブミン排泄の有意 ( $p < 0.05$ ) な低下を認めた。すなわち、MetS を伴う高血圧のモデル動物である SHRmcr-cp では SHR と同様に、ARB 高用量パルス投与は高血圧の退行 (regression) をもたらすこと、またパルス終了後も尿アルブミン排泄の持続抑制が見られることが示唆された。

(3) FVB マウスに ADM を静注することに、糸球体硬化の発生とともに、著明なアルブミン尿が出現することが明らかとなった。ADM 静注 8 週間後より、各種濃度の ARB を投与すると、用量依存性に蛋白尿の減少および糸球体硬化の改善が見られることが明らかとなった。糸球体における各種 MMP の活性の変動を Highly sensitive in situ hybridization 法で検討した結果、糸球体 MMP-2 活性の上昇を認めることが明らかとなった。ARB 高用量投与による糸球体硬化の退縮効果は Doxycycline の併用及び MMP-2 KO マウスで一部抑制された。また、培養糸球体上皮細胞に AII を添加すると上清の MMP-2 活性の低下傾向、ARB で有意な上昇が見られたが培養メサンギウム細胞ではそのような変化を認めなかった。以上の結果より、高血圧の退行に有効である ARB 高用量パルス療法は、高血圧の重要な合併症の一つである糸球体硬化の退行にも有効であることが示され、またその分子機序には MMP の発現誘導が関与している可能性が示された。

#### 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 6 件)

K. Hayashi, H. Sasamura, K. Ishiguro, Y. Sakamaki, T. Azegami, H. Itoh. Regression of glomerulosclerosis in response to transient treatment with angiotensin II blockers is attenuated by blockade of matrix metalloproteinase-2. *Kidney International* 78:69-78, 2010. (査読あり)

Y. Sakamaki, H. Sasamura, K. Hayashi, K. Ishiguro, H. Takaishi, H. Okada, J.M. D'Armiento, T. Saruta, H. Itoh. Absence of gelatinase (MMP-9) or collagenase (MMP-13) attenuates adriamycin-induced albuminuria and

glomerulosclerosis. *Nephron* 115:e22-e32, 2010.

( 査読あり )

K. Ishiguro, K. Hayashi, H. Sasamura, Y. Sakamaki, H. Itoh. "Pulse" treatment with high-dose angiotensin blocker reverses renal arteriolar hypertrophy and regresses hypertension. *Hypertension* 53: 83-89, 2009. ( 査読あり )

H. Sasamura, K. Hayashi, K. Ishiguro, H. Nakaya, T. Saruta, H. Itoh. Prevention and regression of hypertension: role of renal microvascular protection. *Hypertension Research* 32:658-664, 2009. ( 査読あり )

K. Ishiguro, H. Sasamura, Y. Sakamaki, K. Hayashi, H. Itoh. Differential effects of transient treatment of spontaneously hypertensive rats with various antihypertensive agents on the subsequent development of diabetic nephropathy. *Nephron* 109:20-28, 2008. ( 査読あり )

H. Sasamura, H. Nakaya, T. Takebayashi, Y. Sato, K. Ishiguro, M. Ryuzaki, M. Murakami, S. Julius, H. Itoh. Short treatment with the angiotensin receptor blocker candesartan surveyed by telemedicine (STAR CAST) study: rationale and study design. *Hypertension Research* 31:1843-1849, 2008. ( 査読あり )  
[ 学会発表 ] ( 計 20 件 )

H. Sasamura, H. Nakaya, S. Julius, Y. Sato, H. Itoh. The short treatment with the angiotensin receptor blocker candesartan surveyed by telemedicine (STAR CAST) study: design and preliminary report. 23<sup>rd</sup> Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, Vancouver, September 26, 2010.

K. Ishiguro, H. Sasamura, Y. Sakamaki, K. Hayashi, T. Azegami, H. Itoh. Transient treatment with high-dose angiotensin receptor blocker (ARB) causes regression of hypertension in a rat model of metabolic syndrome (SHRmcr-cp). 23<sup>rd</sup> Scientific Meeting of the International Society of

Hypertension, Vancouver, September 26, 2010.

T. Azegami, H. Sasamura, K. Hayashi, K. Ishiguro, H. Itoh. Prevention of hypertension and renal injury by a renin-angiotensin system (RAS) vaccine in L-NAME-treated spontaneously hypertensive rats (SHR). 23<sup>rd</sup> Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, Vancouver, September 26, 2010.

K. Hayashi, H. Sasamura, K. Ishiguro, Y. Sakamaki, T. Azegami, H. Itoh. Short-term treatment with high-dose angiotensin blocker (ARB) induces sustained regression of adriamycin-induced glomerulosclerosis and albuminuria. 23<sup>rd</sup> Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, Vancouver, September 26, 2010.

K. Hayashi, H. Sasamura, T. Hishiki, M. Suematsu, S. Ikeda, T. Soga, H. Itoh. Assessment of potential risk factors for cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease (CKD) by metabolome analysis. 23<sup>rd</sup> Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, Vancouver, September 26, 2010.

T. Azegami, H. Sasamura, K. Hayashi, K. Ishiguro, H. Itoh. Efficacy of renin-angiotensin system (RAS) vaccine for prevention of proteinuria and renal injury in spontaneously hypertensive rats (SHR). 6<sup>th</sup> International Congress of Pathophysiology, Montreal, September 22, 2010.

K. Hayashi, H. Sasamura, K. Ishiguro, Y. Sakamaki, T. Azegami, H. Itoh. Role of extracellular matrix (ECM) remodeling in high-dose angiotensin blocker-induced regression of hypertension and glomerulosclerosis. 6<sup>th</sup> International Congress of Pathophysiology, Montreal, September 22, 2010.

H. Sasamura, H. Nakaya, S. Julius, Y. Sato, H.

Itoh. The short treatment with the angiotensin receptor blocker candesartan surveyed by telemedicine (STAR CAST) study: rationale and interim report. 20<sup>th</sup> European Meeting of Hypertension, Oslo, June 18, 2010.

T. Azegami, H. Sasamura, K. Hayashi, K. Ishiguro, H. Itoh. Prevention of proteinuria and renal injury by a renin-angiotensin system (RAS) vaccine in spontaneously hypertensive rats (SHR). International Society of Nephrology Nexus Symposium, Kyoto, April 15, 2010.

K. Hayashi, H. Sasamura, K. Ishiguro, Y. Sakamaki, T. Azegami, H. Itoh. Treatment with high-dose angiotensin blocker regresses adriamycin-induced glomerulosclerosis and albuminuria. International Society of Nephrology Nexus Symposium, Kyoto, April 15, 2010.

K. Hayashi, H. Sasamura, T. Hishiki, M. Suematsu, S. Ikeda, T. Soga, H. Itoh. Metabolomic profiling as a tool for the assessment of patients with chronic kidney disease. International Society of Nephrology Nexus Symposium, Kyoto, April 15, 2010.

H. Sasamura, K. Hayashi, K. Ishiguro, Y. Sakamaki, T. Azegami, H. Itoh. Microarray analysis of mechanisms involved in the prevention and regression of hypertension by angiotensin receptor blocker (ARB) in spontaneously hypertensive rats. 14<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology, Kyoto, March 26, 2010.

K. Ishiguro, H. Sasamura, Y. Sakamaki, K. Hayashi, H. Itoh. 'Pulse' treatment with high-dose angiotensin receptor blocker (ARB) causes regression of hypertension in SHRmcr-cp rats with metabolic syndrome. 14<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology, Kyoto, March 26, 2010.

Y. Sakamaki, H. Sasamura, K. Ishiguro, K. Hayashi, Y. Okada, T. Saruta, H. Itoh. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) deletion suppresses the development of glomerulosclerosis in mice by a blood pressure- and oxidative stress-independent mechanism. 22nd Scientific Meeting, International Society of Hypertension, Berlin, June 14, 2008.

H. Nakaya, H. Sasamura, Y. Sakamaki, S. Ikeda, Y. Sato, H. Itoh. Comparison of costs between angiotensin receptor blocker (ARB) and calcium channel blocker (CCB) in hypertensive patients with high cardiovascular risks and analysis of the effects of new-onset diabetes, from the CASE-J Trial. 22nd Scientific Meeting, International Society of Hypertension, Berlin, June 14, 2008.

K. Ishiguro, H. Sasamura, Y. Sakamaki, K. Hayashi, T. Saruta, H. Itoh. Transient prepubertal exposure to an angiotensin receptor blocker or aldosterone antagonist suppresses the development of nephropathy in streptozotocin-induced diabetic hypertensive rats. 22nd Scientific Meeting, International Society of Hypertension, Berlin, June 14, 2008.

K. Hayashi, H. Sasamura, K. Ishiguro, Y. Sakamaki, H. Itoh. 'Pulse' treatment with high-dose angiotensin receptor blocker (ARB) causes prominent regression of established glomerulosclerotic lesions in mice. 22nd Scientific Meeting, International Society of Hypertension, Berlin, June 14, 2008.

K. Hayashi, K. Ishiguro, H. Sasamura, Y. Sakamaki, H. Itoh. Microarray analysis of vascular and renal mechanisms involved in suppression of hypertension development by prehypertensive treatment in spontaneously hypertensive rats (SHR). 22nd Scientific Meeting,

International Society of Hypertension, Berlin,  
June 14, 2008.

K. Ishiguro, K. Hayashi, H. Sasamura, Y. Sakamaki, T. Saruta, H. Itoh. Effects of ‘pulse’ treatment with high-dose angiotensin receptor blocker (ARB) or calcium channel blocker (CCB) on regression of hypertension and microvascular remodeling in spontaneously hypertensive rats (SHR). 22nd Scientific Meeting, International Society of Hypertension, Berlin, June 14, 2008.

H. Sasamura, H. Nakaya, T. Takebayashi, Y. Sato, K. Ishiguro, M. Ryuzaki, M. Murakami, S. Julius, H. Itoh. Short treatment with the angiotensin receptor blocker candesartan surveyed by telemedicine (STAR CAST) study: rationale and study design. 22nd Scientific Meeting, International Society of Hypertension, Berlin, June 14, 2008.

〔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〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

篠村 裕之(SASAMURA HIROYUKI)  
慶應義塾大学・医学部・准教授  
研究者番号：00235293

### (2) 研究分担者

伊藤 裕 (ITOH HIROSHI)  
慶應義塾大学・医学部・教授  
研究者番号：40252457