

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 23 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390249

研究課題名（和文） 慢性腎不全における心血管病発症の分子機構：血管内皮機能の視点から

研究課題名（英文） Mechanism of Endothelial Dysfunction in Chronic Kidney Disease

研究代表者

今泉 勉 (TSUTOMU IMAIZUMI)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：60148947

研究成果の概要（和文）：心・血管・腎連関は臨床的に注目されているが、その分子メカニズムは不明である。本研究は、腎不全患者の血中において上昇が報告されている Asymmetric Dimethylarginine (ADMA)が血管内皮機能障害を引き起こすことが、心腎連関の重要なメカニズムであることを初めて明らかにした。さらに、ADMA の従来報告されていた L-アルギニンアナログとしての内皮型 NO 合成酵素 (eNOS)阻害作用とは独立した eNOS リン酸化抑制作用が、この ADMA による内皮機能障害を起こすことを報告した。

研究成果の概要（英文）：Elevated circulating Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) is a cause, not an epiphenomenon, of endothelial dysfunction in chronic kidney disease. This effect is attributable to inhibition of endothelial nitric oxide synthase phosphorylation, which is independent of the competitive inhibition of nitric oxide synthase.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2010 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2011 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：循環器内科学・分子血管病態学

キーワード：血管内皮、腎不全、Asymmetric Dimethylarginine

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、多くの疫学研究および大規模試験を含めた臨床研究から腎不全が心血管疾患の独立した危険因子であることが示され、「心腎連関」の概念が注目されている。しかしながら、その分子機序は明らかでなく、腎不全において何が心血管

病変を引き起こしているのか、その病態は解明されてない。慢性腎不全患者では内皮依存性血管拡張反応が減弱し、通常動脈硬化危険因子から予想される以上に動脈硬化が促進している。申請者は腎臓病患者における心疾患に先行する病態として血管障害、すなわち

「腎-血管連関」という概念を提唱した。その機序を解明し、予防や治療に繋がる標的分子を見つけることが重要であると考えた。

(2) 血管内皮機能の制御において、最も重要な生理活性物質は一酸化窒素 (NO) であると考えられている。ADMA は1992年に腎不全研究から病態生理学的役割が報告された内因性NO合成酵素(NOS)阻害物質である (Lancet 1992)。ADMA はタンパク質を構成するアルギニン残基のguanidino窒素がprotein arginine N-methyltransferase (PRMT)によりメチル化され、タンパク質の分解に伴って細胞質中に遊離される。L-Arginine と競合阻害することにより全てのNOS isoform を阻害する。大部分は dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH)により代謝される。申請者は、ヒトにおける心不全、頸動脈硬化の程度と血中ADMA濃度増加に強い相関関係があることを世界で初めて報告した (Life Sci 1998, Circulation 1999)。しかし、血中ADMA が細胞内NOSの阻害にどのように関与しているか不明な点が多い。

(3) 申請者は、腎不全ラットにおいて血清ADMA上昇が傍尿細管毛細血管の喪失、腎線維化、血圧上昇と相関があり、さらにDDAH 遺伝子導入により血清ADMA の蓄積と腎不全進展を抑えられることを発見した (J Am Soc Nephrol 2006, J Am Soc Nephrol 2007)。

(4) 以上のことから、申請者は、慢性腎不全におけるADMA蓄積が腎不全に伴う心血管病変形成、特に血管内皮障害に重要な役割を果たすのではないかと考えた (循環性ADMA)。一方、腎不全では酸化ストレス、炎症が惹起されることが知られているため、申請者は、血管内皮細胞障害によるDDAH 機能低下が起こり、その結果、ADMA 過剰蓄積を引き起こす (血管性ADMA) 可能性を考えた。そこで、慢性腎不全における血管内皮機能、

心血管リモデリングとDDAH-ADMA-NOS pathway の関係を検討する本研究を着想した。

2. 研究の目的

慢性腎不全において、循環性のみならず血管性ADMA が心血管機能障害やリモデリングを惹起する機序を解明し、ADMA 抑制による血管・心臓の保護に対する早期介入治療法を見いだすことが目的である。

- (1) 血中ADMA と血管内皮機能低下との関係を示す。
- (2) 慢性腎不全における血管ADMA代謝系の変化、及び、内皮機能低下との関連を明らかにする。
- (3) ADMA を標的とした抗酸化剤・抗炎症療法の可能性を探る。

3. 研究の方法

(1) 腎不全マウスの作成

申請者は5/6 腎臓摘出ラットにおいて、血中ADMA 上昇と血圧上昇がみられることを明らかにしている (Matsuguma, Imaizumi et al, J Am Soc Nephrol, 2006, Matsumoto, Imaizumi et al, J Am Soc Nephrol, 2007)。マウスを用いて5/6 腎臓摘出モデルを作成し、腎機能の経時変化を観察する。そのモデルにおける血管内皮機能、心肥大、心機能、組織学的な評価を行う。ADMA、DDAH、PRMT、NOS 活性などを評価する。さらにジーンチップ解析 (アフメトリクス社)を行い、野生型マウスと腎不全マウスの心臓、大動脈における遺伝子プロファイルを作成、比較評価し、網羅的解析を行う。

(2) 腎不全マウスにおける ADMA の役割解明

① ADMA 抑制効果: DDAH1 トランスジェニック (TG)マウスにおける腎不全モデルにおいて、血中ADMA上昇を予防できるか否かを検討する。

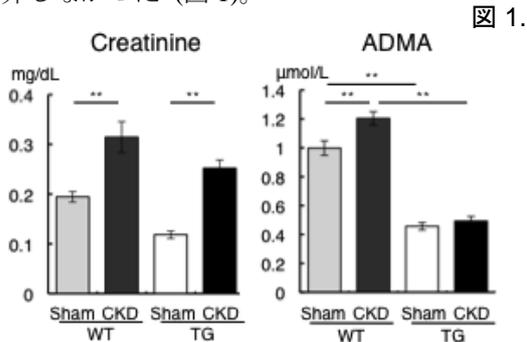
② 血管内皮機能保持効果: WildマウスとTGマウスにおいてShamマウスと腎不全マウスを作成し、それぞれのマウスから大動脈を摘出し、アセチルコリン依存性の血管拡張反応を調べる。TGマウスでは、腎不全であっても血管内皮障害が予防できるか否かを検討する。

③ 上記4群のマウス大動脈を用いて、eNOS 制御に関わるリン酸化を含むタンパク発現量の変化を調べる。

(3) 培養内皮細胞に ADMA を投与し、eNOS 制御に関わるリン酸化を含むタンパク発現量の変化を調べる。L-アルギニンアナログとしての内皮型 NO 合成酵素 (eNOS)阻害作用以外について検討する。

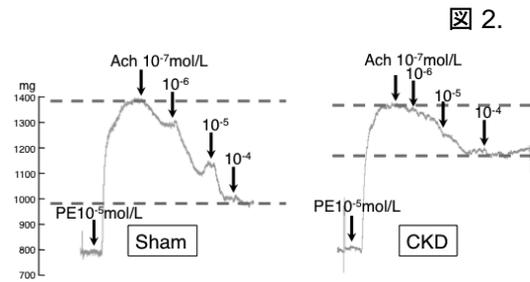
4. 研究成果

(1) Wild マウスと DDAH1-TG マウスを用いて 5/6 腎臓摘出モデルを作成した。両マウスともに CKD マウスでは、血圧上昇を伴わずに、中等度腎機能低下がみられた。Wild+CKD マウスでは、血中 ADMA 値は上昇したが、TG+CKD マウスでは、上昇しなかった (図 1)。



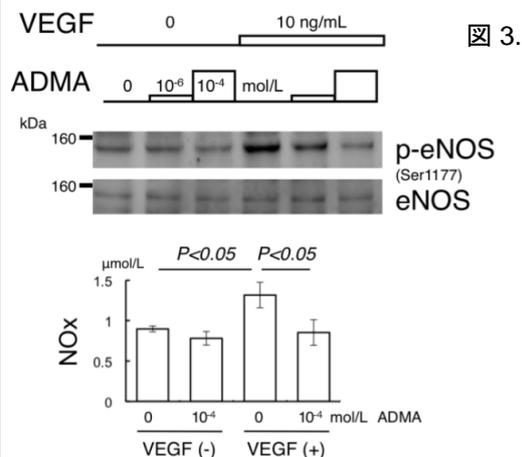
(2) 内皮機能: マウスの大動脈を用いて、等尺張力実験により内皮依存性血管拡張反応を評価した。Wild+CKD マウス大動脈は、アセチルコリンに対する弛緩反応が低下していた (図 2)。しかし、TG+CKD マウスでは、アセチルコリン

に対する弛緩反応は保たれ、内皮依存性血管拡張反応は保たれた。



(3) マウス大動脈の NOS 活性の評価: リン酸化 eNOS (p-eNOS) (Ser1177)は NOS 活性を positive に制御している。Wild+Sham、Wild+CKD、TG+Sham、TG+CKD マウスの4群から大動脈を摘出し、total eNOS, p-eNOS の発現量を比較した。Wild マウスでは、CKD により、p-eNOS/eNOS ratio は減少した。TG+Sham では Wild+Sham と同程度であり、TG+CKD においても変化しなかった。

(4) さらに、培養内皮細胞を用いて ADMA の内皮細胞に対する eNOS 活性抑制について、直接的なメカニズムを調べる。L-アルギニンアナログとしての eNOS 阻害作用以外について検討するために、培養液には十分量の L-アルギニンを添加した。VEGF 存在下において、ADMA は eNOS タンパクのリン酸化を抑制することにより NO 産生量を低下させた (図 3)。ADMA の競合的内因



性 NOS 阻害作用とは独立した、新たな NOS 阻害機序の発見だった。さらに、eNOS の protein kinase として、リン酸化 ERK の減少もみられ、ERK リン酸化の抑制を介していることが示唆された。

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 47 件)

- ① Kajimoto H, Kai H, Imaizumi T (他 6 人 9 番目): Inhibition of eNOS Phosphorylation Mediates Endothelial Dysfunction in Renal Failure: New Effect of Asymmetric Dimethylarginine. *Kidney International*, 81: 762-768, 2012. DOI: 10.1038/ki.2011.476. 査読有
- ② Ohmura H, Imaizumi T (他 8 人 10 番目): Cardiomyocyte-specific transgenic expression of lysyl oxidase-like protein-1 induces cardiac hypertrophy in mice. *Hypertens Res*, (in press) 査読有
- ③ Oba T, Imaizumi T (他 14 人 16 番目): Cardiac-specific deletion of SOCS-3 prevents development of left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 59: 838-852, 2012. DOI: 10.1016/j.jacc.2011.10.887. 査読有
- ④ Takayama N, Kai H, Imaizumi T (他 7 人 10 番目): Simvastatin prevents large blood pressure variability induced aggravation of cardiac hypertrophy in hypertensive rats by inhibiting RhoA/Ras-ERK pathways. *Hypertens Res*, 34: 341-347, 2011. DOI: 10.1038/hr.2010.229. 査読有
- ⑤ Mori T, Kai H, Imaizumi T (他 7 人 10 番目): Enhanced cardiac inflammation and fibrosis in ovariectomized hypertensive rats : a possible mechanism of diastolic dysfunction in postmenopausal women. *Hypertens Res*, 34: 496-502, 2011. DOI: 10.1038/hr.2010.261. 査読有
- ⑥ Koiwaya H, Imaizumi T (他 7 人 9 番目): Augmented neovascularization with magnetized endothelial progenitor cells in rats with hind-limb ischemia. *J Mol Cell Cardiol*, 51: 33-40, 2011. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2011.03.012. 査読有
- ⑦ Kai H, Imaizumi T (他 5 人 7 番目), on behalf of CREDO-Kyoto Investigators: Low DBP may not be an independent risk for cardiovascular death in revascularized coronary artery disease patients. *J Hypertens*, 29: 1889-1896, 2011. DOI: 10.1097/HJH.0b013e32834a5a67. 査読有
- ⑧ Kumagai E, Imaizumi T (他 15 人 17 番目): Plasma aldosterone levels and development of insulin resistance: prospective study in a general population. *Hypertension*, 58: 1043-1048, 2011. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.180521. 査読有
- ⑨ Tahara N, Imaizumi T (他 8 人 10 番目): Serum level of pigment epithelium-derived factor is a marker of atherosclerosis in humans. *Atherosclerosis*, 219: 311-315, 2011. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.06.022. 査読有
- ⑩ Fukui D, Kai H, Imaizumi T (他 9 人 12 番目): Longest survivor of pulmonary atresia with ventricular septal defect -well-developed major aortopulmonary collateral arteries demonstrated by multidetector computed tomography. *Circulation*, 124: 2155-2157, 2011. DOI:

- 10.1161/ CIRCULATIONAHA.111.035469. 査読有
- ⑪ Ueda S-I, Imaizumi T (他 3 人 5 番目): Administration of pigment epithelium-derived factor inhibits left ventricular remodeling and improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction. *Am J Pathol*, 178: 591-598, 2011. DOI: 10.1016/j.ajpath.2010.10.018. 査読有
- ⑫ Takemiya K, Kai H, Imaizumi T (他 3 人 6 番目): Mesenchymal stem cell-based prostacyclin synthase gene therapy for pulmonary hypertension rats. *Basic Res Cardiol*, 105: 409-417, 2010. DOI: 10.1007/s00395-009-0065-8. 査読有
- ⑬ Arima K, Kai H, Imaizumi T (他 8 人 11 番目): Autologous transplantation of bone marrow mononuclear cells improved ischemic peripheral neuropathy in humans. *J Am Coll Cardiol*, 56: 238-239, 2010. DOI: 10.1016/j.jacc.2010.02.050. 査読有
- ⑭ Ogihara T, Imaizumi T (他 12 人 12 番目): Target blood pressure for treatment of isolated systolic hypertension in the elderly: Valsartan in elderly isolated systolic hypertension study. *Hypertension*, 56: 196-202, 2010. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.146035. 査読有
- ⑮ Kudo H, Kai H, Imaizumi T (他 10 人 13 番目): Exaggerated blood pressure variability superimposed on hypertension aggravates cardiac remodeling in rats via angiotensin II system-mediated chronic inflammation. *Hypertension*, 54: 832-838, 2009. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.135905. 査読有
- ⑯ Shigetoh Y, Imaizumi T (他 8 人 10 番目): Higher heart rate may predispose to obesity and diabetes mellitus : 20-year prospective study in a general population. *Am J Hypertens*, 22: 151-155, 2009. DOI: 10.1038/ajh.2008.331. 査読有
- ⑰ 梶本英美、甲斐久史、今泉勉: 慢性腎不全患者の心血管病変進展における内因性 NO 合成阻害物質 (ADMA) の役割. *腎臓*, 32: 103-107, 2009. 査読無
- [学会発表] (計 12 件)
- ① Kajimoto H, Kai H, Aoki H, Yasuoka S, Ane-gawa T, Imaizumi T: Inhibition of CaMKII/ERK-mediated eNOS phosphorylation by asymmetric dimethylarginine is novel molecular mechanism of endothelial dysfunction in chronic kidney disease mice. (76th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, *Fukuoka, Japan, 16-18/3/2012*)
- ② Kajimoto H, Kai H, Aoki H, Yasuoka S, Ane-gawa T, Imaizumi T: Inhibition of CaMKII- and ERK-mediated eNOS phosphorylation impairs endothelial function in renal failure mice: New effect of asymmetric dimethylarginine. (American Heart Association's Scientific Sessions, *Orlando, USA, 12-16/11/2011*)
- ③ Kajimoto H, Kai H, Aoki H, Yasuoka S, Ane-gawa T, Imaizumi T: Increased circulating asymmetric dimethylarginine in chronic kidney disease mice induces endothelial dysfunction by inhibiting Ca/Calmodulin-dependent protein kinase II-eNOS signaling. (American Heart Association's Scientific Sessions, *Chicago, USA, 13-17/11/2010*)
- ④ Kajimoto H, Kai H, Yasuoka S, Imaizumi

- T: 血清 Asymmetric Dimethylarginine の増加が腎機能低下における血管内皮障害を起こす. (47th Annual Meeting of the Japanese Society of Pediatric Cardiology and Cardiac Surgery *Chiba, Japan, 7-9/7/2010*)
- ⑤ Kajimoto H, Kai H, Yasuoka S, Imaizumi T: Asymmetric dimethylarginine triggers vascular dysfunction in CKD mice. (Xth World Congress of the International Society for Heart Research 2010 *Kyoto, Kyoto, Japan, 13-16/5/2010*)
- ⑥ Kajimoto H, Kai H, Yasuoka S, Imaizumi T: Asymmetric dimethylarginine impairs endothelial function in CKD mice. (ISN-Nexus Symposium 2010, *Kyoto, Japan, 15-18/4/2010*)
- ⑦ Kajimoto H, Kai H, Yasuoka S, Anegawa T, Imaizumi T: Smad-Msx2 pathway plays an initial role in vascular calcification in CKD mice. (74th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, *Kyoto, Japan, 5-7/3/2010*)
- ⑧ Kajimoto H, Kai H, Yasuoka S, Anegawa T, Aoki H, Imaizumi T: Asymmetric dimethylarginine triggers vasculo-renal interaction in CKD mice. (American Heart Association's Scientific Sessions, *Orlando, USA, 15-17/11/2009*)
- ⑨ Kajimoto H, Kai H, Yasuoka S, Aoki H, Anegawa T, Imaizumi T: 腎不全マウスにおける血清 Asymmetric Dimethylarginine の上昇が血管内皮に与える影響. (The 32nd Annual Scientific Meeting of the Japanese Society of Hypertension, *Shiga, Japan, 30/10-1/11/2009*)
- ⑩ Kajimoto H, Kai H, Yasuoka S, Aoki H, Anegawa T, Imaizumi T: Asymmetric dimethylarginine is a paracrine regulator of vascular function in CKD. (The 13th Annual Scientific Meeting of the Japanese Heart Failure Society, *Fukuoka, Japan, 30/10-1/11/2009*)
- ⑪ 甲斐久史: 「内皮と脈管疾患」腎-血管連関-ADMA による内皮障害-. (第 50 回日本脈管学会学術集会、*東京、29-31/10/2009*)
- ⑫ Kajimoto H, Kai H, Yasuoka S, Aoki H, Anegawa T, Imaizumi T: 血清 Asymmetric Dimethylarginine の増加が腎不全マウスにおける内皮機能障害を起こす. (The 57th Annual Scientific Session of the Japanese College of Cardiology, *Sapporo, Japan, 18-20/9/2009*)

6. 研究組織

(1)研究代表者

今泉 勉 (TSUTOMU IMAIZUMI)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：60148947

(2)研究分担者

梶本 英美 (HIDEMI KAJIMOTO)

久留米大学・循環器病研究所・助教

研究者番号：50349700

甲斐 久史 (HISASHI KAI)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：60281531

(3)連携研究者

()

研究者番号：