

## 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4月15日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590884

研究課題名（和文） 心血管病の発症・進展を予知する新規バイオマーカーの開発

研究課題名（英文） Development of Novel Biomarker to Predict Cardiovascular Diseases

研究代表者：福本 義弘（FUKUMOTO YOSHIHIRO）

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：70363372

## 研究成果の概要（和文）：

本研究では、肺高血圧症患者、安定狭心症患者、急性冠症候群（急性心筋梗塞・不安定狭心症）患者、慢性心不全（Stage C-D）患者、急性心不全患者を対象として、Rho キナーゼ活性測定法を確立し、疾患臓器局所および末梢血における Rho キナーゼ活性の検討を行った。

各心血管病において、疾患臓器局所および末梢血において Rho キナーゼ活性が亢進していることが明らかとなり、新たな治療戦略となり得ることが示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

In the present study, we have examined Rho-kinase activity in organ and peripheral white blood cells in patients with pulmonary hypertension, stable angina pectoris, acute coronary syndrome (acute myocardial infarction, unstable angina), chronic heart failure (Stage C-D), and acute heart failure. These results indicate that Rho-kinase is systemically and locally activated in patients with various cardiovascular diseases, suggesting that inhibition of Rho-kinase could be a new therapeutic strategy for cardiovascular diseases.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：Rho キナーゼ活性、慢性心不全、肺高血圧症、狭心症、急性冠症候群

## 1. 研究開始当初の背景

Rho キナーゼは、1990年代半ばのほぼ同時期に、2つの日本の研究グループと1つのシンガポールのグループから、低分子量GTP結合タンパク質 Rho の標的タンパク質として同

定された細胞内セリンスレオニンリン酸化酵素である。Rho キナーゼには Rho-kinase  $\alpha$  / ROK  $\alpha$  / ROCK2 と Rho-kinase  $\beta$  / ROK  $\beta$  / ROCK1 という2つのアイソフォームがあり、ROCK1 および ROCK2 は体内に広く発現しているが、

ROCK2は特に脳と骨格筋に強く発現している。Rho キナーゼの発現は、アンジオテンシン II やインターロイキン-1 $\beta$ などの炎症性刺激により、プロテインキナーゼ C-NF- $\kappa$ B 依存性経路を介して、促進的に制御されている。

これまでの研究により、Rho キナーゼが平滑筋細胞の収縮のみならず、各種細胞の形態制御、遊走、遺伝子発現制御などの生理機能に関与していることが明らかとなっている。

さらに我々の研究を含む近年の活発な研究により、心血管病の成因に Rho キナーゼが深く関与していることが示されており、Rho キナーゼ阻害薬の開発と臨床応用が期待されているところである。

## 2. 研究の目的

本研究では、以下の心血管病患者において、3年間の研究期間内に、具体的に下記の点を明らかにする。

### (1) Rho キナーゼ活性測定法の確立

- ① 疾患臓器局所における Rho キナーゼ活性の検討
- ② 末梢血における Rho キナーゼ活性の検討

(2) 以下の疾患を対象とし、Rho キナーゼ活性の検討が各疾患の発症・進展のマーカーとして有用であるか否か、を検討する。

- ① 肺高血圧症患者
- ② 安定狭心症患者
- ③ 急性冠症候群（急性心筋梗塞・不安定狭心症）患者
- ④ 慢性心不全（Stage C-D）患者
- ⑤ 急性心不全患者

(3) Rho キナーゼ活性が亢進している患者における Rho キナーゼ阻害薬投与の有効性を検討治療としての Rho キナーゼ阻害の検討

- ① 心血管イベントの発症
- ② 生命予後

## 3. 研究の方法

Rhoキナーゼ活性測定方法は、まず末梢血から白血球を単離し、タンパクを抽出する。次いでWestern blotting法によりRhoキナーゼの基質であるP-MBSおよびT-MBSの発現を検討し、その比（P-MBS/T-MBS比）をRhoキナーゼ活性と定義する。

(1) 肺高血圧症：肺動脈性肺高血圧患者（n=40）を対象とする。すでに測定系は確立されつつあり、図2に示すごとく、肺高血圧症においては、コントロールに比し、Rhoキナーゼ活性が有意に亢進している基礎データが得られている。

（評価項目）末梢血白血球におけるRhoキナーゼ活性と以下の項目との関連を検討

する。

- ① 自覚症状（WHO機能分類）
- ② BNP・高感度CRP・尿酸値
- ③ 心臓カテーテル検査での血行動態（PCWP, PAP, RVEDP, RAP, CI, PVRなど）
- ④ 心血管イベントの有無
- ⑤ 生命予後

さらに肺高血圧症患者においては、移植肺の組織標本におけるRhoキナーゼ活性を検討する準備が整っている。

(2) 狭心症：安定狭心症患者（n=50）を対象とする。

（評価項目）末梢血白血球におけるRhoキナーゼ活性と以下の項目との関連を検討する。

- ① 冠動脈造影上の冠動脈病変枝数
- ② 高感度CRP・血清脂質・血糖
- ③ 高血圧・喫煙の有無
- ④ 心血管イベントの有無
- ⑤ 生命予後

(3) 急性冠症候群：急性心筋梗塞・不安定狭心症患者（n=30）を対象とする。

（評価項目）急性期における末梢血白血球におけるRhoキナーゼ活性の経時変化と以下の項目との関連を検討する。

- ① 冠動脈造影上の冠動脈病変枝数
- ② 心筋逸脱酵素（CPK, Trop T）・高感度CRP・血清脂質・血糖
- ③ 高血圧・喫煙の有無
- ④ 心筋壊死後の残存心機能
- ⑤ 心血管イベント再発の有無
- ⑥ 生命予後

(4) 慢性心不全：慢性心不全患者（Stage C-D, n=50）を対象とする。

（評価項目）末梢血白血球におけるRhoキナーゼ活性と以下の項目との関連を検討する。

- ① 自覚症状（NYHA分類、身体活動能力指数：Mets）
- ② BNP・高感度CRP・血清脂質・血糖
- ③ 高血圧・喫煙の有無
- ④ 心臓カテーテル検査での血行動態（PCWP, PAP, RVEDP, RAP, CI, LVEDP, LVEFなど）
- ⑤ 心血管イベントの有無
- ⑥ 生命予後

(5) 急性心不全：臓器うっ血を伴う急性心不全患者（n=30）を対象とする。

（評価項目）急性期における末梢血白血球におけるRhoキナーゼ活性の経時変化と以下の項目との関連を検討する。

- ① 自覚症状（NYHA分類）改善に要する時間
- ② BNP・高感度CRPなどの改善に要する時間
- ③ 急性期治療に要する機械的補助循環の有無
- ④ 血清脂質・血糖
- ⑤ 高血圧・喫煙の有無
- ⑥ 心臓カテーテル検査での血行動態（PCWP, PAP, RVEDP, RAP, CI, LVEDP, LVEFなど）

⑦ 心血管イベント再発の有無 ⑧ 生命予後

#### 4. 研究成果

肺高血圧症患者においては、まず肺高血圧症患者及び健常者の末梢血由来多型核白血球における Rho キナーゼ活性の検討を行った。Western blot 法により Rho キナーゼの基質であるミオシン結合サブユニット (MBS) のリン酸化体および総 MBS の比 (Rho キナーゼ活性) が、肺高血圧症患者の末梢血由来多型核白血球では健常者に比し、有意に亢進していることを認めた。また、Rho キナーゼ活性と肺血行動態の重症度と緩やかな相関関係を認めた。次に、肺移植を受ける肺高血圧患者の肺組織およびコントロール (肺がん患者) の正常肺組織に対し、Rho キナーゼ発現および活性を免疫組織染色法および摘出血管にて検討を行ったところ、免疫組織学的に Rho キナーゼの発現及び活性が、肺高血圧症患者ではコントロールと比べ有意に亢進していることが認められた。さらに肺高血圧患者の摘出肺動脈において、内皮依存的弛緩反応低下およびセロトニンに対する過収縮を認め、この平滑筋過収縮は Rho キナーゼ阻害薬によって抑制された。これらのデータから初めて、肺高血圧症患者における Rho キナーゼ活性の亢進が証明され、肺高血圧症の発症、進展における Rho キナーゼ経路の関与が示された肺組織および末梢血において、Rho キナーゼ活性の亢進を認めた。

安定狭心症患者、急性冠症候群 (急性心筋梗塞・不安定狭心症) 患者では末梢血に Rho キナーゼ活性の亢進を認め、冠拡張薬による治療に伴い、Rho キナーゼ活性は低下した。なお、標的臓器サンプルの採取は不可能なため、疾患臓器局所での検討はできなかった。

急性心不全においては、末梢血において、Rho キナーゼ活性の亢進を認め、これは急性心不全の加療により改善した。

慢性心不全においては、まず心筋生検サンプルにおいて、p-MBS の免疫染色にて Rho キナーゼ活性の亢進を認めた。また末梢血においても、Rho キナーゼ活性の亢進を認めたが、これは左室収縮能の保たれた心不全 (LVEF >50) でも左室収縮能が低下した心不全 (LVEF <50%) でも差がなく、また既存の心不全重症度のマーカーである BNP 値や血行動態 (大動脈圧、左室拡張末期圧、心係数、心拍出量、右房圧、右室圧、肺動脈圧、肺動脈楔入圧) との相関はなく、新たなバイオマーカーと成り得ることが示唆された。

以上より、心血管病において Rho キナーゼ

活性が亢進していることが明らかとなり、新たな治療戦略となり得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 16 件)

1. Satoh K, Fukumoto Y, Nakano M, Sugimura K, Nawata J, Demachi J, Karibe A, Kagaya Y, Ishii N, Sugamura K, Shimokawa H. Statin ameliorates hypoxia-induced pulmonary hypertension associated with down-regulated stromal cell-derived factor-1. Cardiovasc Res. 2009;81:226-34. (査読有)
2. Rashid M, Tawara S, Fukumoto Y, Seto M, Yano K, Shimokawa H. Importance of Rac1 signaling pathway inhibition in the pleiotropic effects of HMG-CoA reductase inhibitors. Circ J. 2009;73:361-70. (査読有)
3. Fukui S, Fukumoto Y, Suzuki J, Saji K, Nawata J, Shinozaki T, Kagaya Y, Watanabe J, Shimokawa H. Diabetes mellitus accelerates left ventricular diastolic dysfunction through activation of the renin-angiotensin system in hypertensive rats. Hypertens Res. 2009;32:472-80. (査読有)
4. Do E Z, Fukumoto Y, Takaki A, Tawara S, Ohashi J, Nakano M, Tada T, Saji K, Sugimura K, Fujita H, Hoshikawa Y, Nawata J, Kondo T, Shimokawa H. Evidence for Rho-Kinase Activation in Patients With Pulmonary Arterial Hypertension. Circ J. 2009;73:1731-9. (査読有)
5. Toyohara T, Suzuki T, Morimoto R, Akiyama Y, Souma T, Shiwaku HO, Takeuchi Y, Mishima E, Abe M, Tanemoto M, Masuda S, Kawano H, Maemura K, Nakayama M, Sato H, Mikkaichi T, Yamaguchi H, Fukui S, Fukumoto Y, Shimokawa H, Inui K, Terasaki T, Goto J, Ito S, Hishinuma T, Rubera I, Tauc M, Fujii-Kuriyama Y, Yabuuchi H, Moriyama Y, Soga T, Abe T. SLCO4C1 transporter eliminates uremic toxins and attenuates hypertension and renal inflammation. J Am Soc Nephrol. 2009;20:2546-55. (査読有)
6. Kikuchi Y, Ito K, Ito Y, Shiroto T, Tsuburaya R, Aizawa K, Hao K, Fukumoto Y, Takahashi J, Takeda M, Nakayama M, Yasuda S, Kuriyama S, Tsuji I, Shimokawa H. Double-blind and placebo-controlled

- study of the effectiveness and safety of extracorporeal cardiac shock wave therapy for severe angina pectoris. *Circ J.* 2010;74:589-91. (査読有)
7. Fujita H, Fukumoto Y, Saji K, Sugimura K, Demachi J, Nawata J, Shimokawa H. Acute vasodilator effects of inhaled fasudil, a specific Rho-kinase inhibitor, in patients with pulmonary arterial hypertension. *Heart Vessels.* 2010;25:144-9. (査読有)
  8. Tatebe S, Fukumoto Y, Sugimura K, Nakano M, Miyamichi S, Satoh K, Oikawa M, Shimokawa H. Optical coherence tomography as a novel diagnostic tool for distal type chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Circ J.* 2010;74:1742-4. (査読有)
  9. Ito Y, Ito K, Shiroto T, Tsuburaya R, Yi GJ, Takeda M, Fukumoto Y, Yasuda S, Shimokawa H. Cardiac shock wave therapy ameliorates left ventricular remodeling after myocardial ischemia-reperfusion injury in pigs in vivo. *Coron Artery Dis.* 2010;21:304-11. (査読有)
  10. Miura Y, Fukumoto Y, Sugimura K, Oikawa M, Nakano M, Tatebe S, Miyamichi S, Satoh K, Shimokawa H. Identification of new prognostic factors of pulmonary hypertension. *Circ J.* 2010;74:1965-71. (査読有)
  11. Nishigaki K, Inoue Y, Yamanouchi Y, Fukumoto Y, Yasuda S, Sueda S, Urata H, Shimokawa H, Minatoguchi S. Prognostic effects of calcium channel blockers in patients with vasospastic angina. *Circ J.* 2010;74:1943-50. (査読有)
  12. Miura Y, Fukumoto Y, Shiba N, Miura T, Shimada K, Iwama Y, Takagi A, Matsusaka H, Tsutsumi T, Yamada A, Kinugawa S, Asakura M, Okamatsu S, Tsutsui H, Daida H, Matsuzaki M, Tomoike H, Shimokawa H. Prevalence and clinical implication of metabolic syndrome in chronic heart failure. *Circ J.* 2010;74:2612-21. (査読有)
  13. Nakano M, Fukumoto Y, Satoh K, Ito Y, Kagaya Y, Ishii N, Sugamura K, Shimokawa H. OX40 ligand plays an important role in the development of atherosclerosis through vasa vasorum neovascularization. *Cardiovasc Res.* 2010;88:539-46. (査読有)
  14. Sugimura K, Fukumoto Y, Nawata J, Wang H, Onoue N, Tada T, Shirato K, Shimokawa H. Hypertension promotes phosphorylation of focal adhesion kinase and proline-rich tyrosine kinase 2 in rats -Implication for the pathogenesis of hypertensive vascular disease-. *Tohoku J Exp Med.* 2010;222:201-210. (査読有)
  15. Aoki T, Fukumoto Y, Sugimura K, Oikawa M, Satoh K, Nakano M, Nakayama M, Shimokawa H. Prognostic impact of myocardial interstitial fibrosis in non-ischemic heart failure. *Circ J.* 2011;75:2605-13. (査読有)
  16. Miyamichi-Yamamoto S, Fukumoto Y, Sugimura K, Ishii T, Satoh K, Miura Y, Tatebe S, Nochioka K, Aoki T, Do E Z, Shimokawa H. Intensive immunosuppressive therapy improves pulmonary hemodynamics and long-term prognosis in patients with pulmonary arterial hypertension associated with connective tissue disease. *Circ J.* 2011;75:2668-74. (査読有)
- [学会発表] (計6件)
1. 第58回 日本心臓病学会学術集会、東京、平成22年9月17日  
福本義弘 下川宏明 (東北大学病院 循環器内科) 肺高血圧症における新たな分子治療標的: Rho キナーゼの重要性
  2. 第58回 日本心臓病学会学術集会、東京、平成22年9月18日  
福本義弘、三浦 裕、福井重文、柴 信行、下川宏明 (東北大学病院 循環器内科) 三浦俊郎、松崎益徳 (山口大学) 島田和典、岩間義孝、高木篤俊、代田浩之 (順天堂大学) 朝倉正紀、友池仁暢 (国立循環器病センター) 堤 孝樹、山田 明 (飯塚病院) 絹川真太郎、筒井裕之 (北海道大学) わが国の慢性心不全の成因における糖尿病の意義
  3. 第74回日本循環器学会総会・学術集会 京都 平成22年3月5日 (金)  
Yoshihiro Fukumoto, Yutaka Miura, Shigefumi Fukui, Tatsuo Aoki, Toshiro Miura, Masunori Matsuzaki, Kazunori Shimada, Yoshitaka Iwama, Atsutoshi Takagi, Hiroyuki Daida, Takaki Tsutsumi, Akira Yamada, Shintaro Kinugawa, Hiroyuki Tsutsui, Masanori Asakura, Hitonobu Tomoike, 1Nobuyuki Shiba, Hiroaki Shimokawa (Department of Cardiovascular Medicine, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Japan.) Current Status and Future Perspectives of Diastolic Heart Failure in Japan -Rho-kinase as a Possible Therapeutic Target-
  4. 第14回 日本心不全学会学術集会、東京、平成22年10月7-9日

- 福本義弘 (東北大学病院 循環器内科)  
心不全に期待される新薬：ファスジル  
(Rho キナーゼ阻害薬)
5. 第 15 回 日本心不全学会学術集会、  
鹿児島、平成 23 年 10 月 14 日  
福本義弘 (東北大学病院 循環器内  
科)  
心不全ガイドラインを見直す
6. 第 7 6 回日本循環器学会総会・学術集会  
京都 平成 24 年 3 月 17 日 (土)  
YZhulanqiqige Do. e, Yoshihiro  
Fukumoto, Koichiro Sugimura, Yutaka  
Miura, Saori Yamamoto, Shunsuke  
Tatebe, Tatsuo Aoki, Kotaro Nochioka,  
Kimio Satoh, Hiroaki Shimokawa.  
(Department of Cardiovascular  
Medicine, Tohoku University Graduate  
School of Medicine, Sendai, Japan.)  
Rho-kinase Activity in Circulating  
Leukocytes as a Novel Biomarker in  
Patients with Chronic Heart Failure

[図書] (計 5 件)

1. 福本義弘、下川宏明。5 章重症心不全を  
予防する 10. メタボリックシンドロ  
ームを治す。重症心不全の予防と治療  
2009/9 p377-380 中外医学社 (査読  
無)
2. 福本義弘、下川宏明。薬効群別副作用  
脂質異常症治療薬。医薬品副作用ハンド  
ブック 第 2 版 2010/5/10 p97-102  
日本臨床社 (査読無)
3. 珠蘭其其格、福本義弘。心疾患動物モデル。  
完全版マウス・ラット疾患モデル活  
用ハンドブック 2011/1/1 p320-333  
羊土社 (査読無)
4. 福本義弘、下川宏明。肺高血圧症に対す  
る Rho キナーゼ阻害薬の治療効果。  
Annual Review 2011 中外医学社  
2011/1/25 p263-269 (査読無)
5. 青木竜男、杉村宏一郎、福本義弘。「心  
不全日常診療 Q&A」1-1-Q4 拡張不全と  
はどんな心不全ですか? p 13-16  
2-1-Q29 肺疾患による心不全 (肺性心)  
の鑑別ポイントを教えてください。 p  
125-126 2-4-Q39 どの時点で専門施設  
に紹介すべきでしょうか? 13-Q84 高  
齢心不全患者の生活指導のポイントを  
教えてください。 p 264-266 2011/4/1  
南山堂 (査読無)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：

種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.cardio.med.tohoku.ac.jp/class/research/blood02.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福本 義弘 (FUKUMOTO YOSHIHIRO)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：70363372

(2) 研究分担者

下川 宏明 (SHIMOKAWA HIROAKI)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00235681

(3) 連携研究者

なし ( )