

## 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 25 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590916

研究課題名（和文） 新しく確立したヒトキマーゼ測定法の臨床応用：急性冠動脈症候群と危険因子の分析

研究課題名（英文） Clinical application of newly developed h-chymase assay method : changes in acute coronary syndrome and association with coronary risk factors

研究代表者

浦田 秀則 (URATA HIDENORI)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：30289524

研究成果の概要（和文）：特異性の高いキマーゼ阻害薬を使用して、ヒトキマーゼ依存性アンジオテンシンII (AII) 産生能の測定法を確立した。この方法を用いて、人の末梢血単核球分画検体を分析し、急性冠動脈症候群症例では入院後1日目にピークを示し、その後漸減することを見出した。そのピーク値は心筋梗塞重症度と正相関していた。そして、慢性期の冠動脈危険因子との関連では、単核球中キマーゼ活性は、男性で女性より有意に増加しており、その他の病態では、白血球数・CRP増加、HOMA指数・CKD病態などと正相関することを見出した。すなわち、生活習慣病の病態で軽微な炎症病態・耐糖能異常・CKD等で、循環単核球中のキマーゼ活性が増加することを明らかにした。琉球大学との共同研究では、脂肪酸の静注で循環単核球中のAng II 産生能が増加し、その際の内皮機能障害と関連していた。香川大学との共同研究では偏腎尿管クリップで腎盂内圧を増加させると腎臓間質部分でのキマーゼ活性が増加し、組織Ang II レベルの増加に寄与していた。このように、循環単核球中キマーゼ活性は急性期及び慢性期病態で増加し、組織Ang II レベルを増加させてその後の臓器機能障害に関与することが明らかになった。

研究成果の概要(英文) : Chymase assay method was established using the specific chymase inhibitor with modified angiotensin I (Ang I). Analysis in circulating mononuclear leukocyte (CML) of the patients post myocardial infarction (MI) revealed significant increase in acute phase (1-2 days) and the level of increase was positively correlated with the MI severity. In the analysis of stable angina patient chymase activity in CML was significantly higher in male and positively correlated with white blood cell number, c-reactive protein, HOMA index, degree of chronic kidney disease(CKD), suggesting that mild inflammatory status, glucose intolerance or CKD facilitate chymase levels in CML. In collaborative work with Ryuku University acute venous infusion of free fatty acid significantly increased serine protease dependent Ang II forming activity in CML, which was associated with endothelial dysfunction. In collaborative work with Kagawa University unilateral urethral clipping was associated with increased chymase activity only in the affected kidney and increased renal Ang II levels.

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：心臓病態学

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトキマーゼは1990年に我々の手によって、ヒト心臓の左心室ホモジネート中で約80%を占めるアンジオテンシンII (Ang II) 産生酵素として発見され、約3kgのヒト心臓を元に抽出された。ACE阻害薬では抑制されないセリン酵素であり、主に肥満細胞で産生され、分泌後は心筋の間質部分に存在し、局所Ang II産生に関与すると考えられた。その後の臨床研究で組織のキマーゼ依存性Ang II産生活性はヒト大動脈の動脈硬化病巣や心筋梗塞後心筋で増加していることが示され、そのような病態で何らかの役割を担うことが推定された。また、ヒトの内胸動脈のキマーゼ活性は血中のLDLコレステロールレベルと正相関していた。ハムスターを用いた動物実験では高コレステロール食の負荷で大動脈キマーゼ活性の増加が観察され、また経口可能なキマーゼ阻害薬で治療すると動脈硬化の進展が抑制されたことから、LDLコレステロールの増加が動脈キマーゼ発現を増加させその後の動脈硬化の進展に関与することが明らかになった。またヒト心臓から抽出されたヒトキマーゼmRNAを用いて作成したcDNAをマウスに過剰発現させたところ軽症の高血圧とその血圧上昇に見合わない心肥大を生じた。このようにキマーゼは動脈硬化の進展や軽度血圧上昇や心筋梗塞後の心筋リモデリングなどに関与することが推察された。

## 2. 研究の目的

I. 我々が確立したキマーゼ測定法を用い、急性期心血管疾患患者(急性冠動脈症候群, ACS)の循環白血球(単核球)中のAng II産生酵素活性を測定し、梗塞の有無・重症度・病態変化・投与薬物と単核球中Ang II産生酵素活性間の関連を明らかにする。

II. 慢性期心血管疾患での横断的観察とその治療経過に伴った循環白血球中(単核球)のAng II産生酵素活性変化を分析し、治療法(生活療法や薬物療法)やその経過に伴った病態変化とAng II産生酵素活性との関連を明らかにする。

III. 急性冠動脈症候群の病型・発症機転・臨床経過や既存の薬物治療とキマーゼを含む単核球中Ang II産生酵素が関連するかを同定し、急性冠動脈症候群のうちどの病型でキマーゼ阻害薬が使用可能か? またその投与時期の検討を行なう。

## 3. 研究の方法

目的I. 急性心筋梗塞やACSにて緊急入院後の患者(年間約60例)に同意取得後1日毎に採血し、キマーゼを含む単核球Ang II産生能を測定し、病変重症度や症例背景と単核球キマーゼ活性との相関性などを検討した。

目的II. 外来入院症例の安定慢性期の測定結果と症例背景と比較し、年齢・性別・BMIなどと生活習慣病態との関連を統計計算した。長期(2年)に渡るデータコホートを作成し、データ収集した。

目的III. 梗塞病変の有無による解析や、病態変化との相関性を調査した。また、緊急入院後の投薬の影響を調査するために、投薬群別の解析も行った。

## 4. 研究成果

### (1) 心筋梗塞急性期の分析結果

心筋梗塞急性期(入院7日目まで)の単核球キマーゼ活性は、梗塞発生後1-2日目にピークを示し、その増加の程度は梗塞の重症度の指標であるCPKやWBCと正相関していた{Inoue et al. 2009}。この結果は、以前我々が報告したヒト心筋梗塞後心筋で5-7目の梗塞層及び非梗塞層でほぼ同等のキマーゼ活性増加を認めていたが、その起源が循環血中単核白血球であることを示唆した。さらに、梗塞を伴わないACSでは、単核球キマーゼ活性は増加しておらず、梗塞層からの炎症性サイトカインや細胞遊走活性化因子などの関与が推察された。薬物投与との関連では、ACE阻害薬投与症例で単核球キマーゼ活性が増加していた。

### (2) 慢性期冠動脈疾患での分析結果

慢性期冠動脈疾患症例での分析では、非冠動脈症例と比較して有意に単核球キマーゼ活性が増加しており{Inoue et al. 2009}、冠動脈疾患の原因となる危険因子との関連が推定された。

### (3) 多数症例での網羅的解析結果

外来通院中や入院症例を対象とする網羅的検索での単核球キマーゼ活性は、男性・白血球数・高CRP症例・HOMA指数・CKDの重症度と正相関を示した{Okamura et al. 2008, 2009}。この結果は成果(2)で上述したように、冠動脈疾患の基礎となりえる軽微な炎症病態・インスリン抵抗性・慢性腎機能障害症例で単核球キマーゼ活性が増加していて、この白血球が組織へ取り込まれると組織レベルでAng IIを産生し、臓器障害を進展させる機序を証明し

た。

(4) 心房細動症例での分析

多くの循環器疾患の中で、有意に単核球キマーゼ活性が増加している疾患群として心房細動症例が明らかになった{Okamura et al. 2010}。さらに、左房内径と正相関しており左心室拡張末期圧との関連が示唆された。現在はさらに左心室機能との関連を調査中である。

(5) 琉球大学臨床薬理学教室(植田教授)との共同研究では、臨床試験で脂肪酸溶液を静脈ラインから点滴をすると循環血単核球中のキマーゼやカテプシンGを介するAII産生能が増加することが示されている。そして、その増加したAII産生能と内皮機能障害との間に関連があった{Azekoshi et al. 2010}。すなわち、カロリー過多摂取による血中の脂肪酸増加が循環単核白血球中のAngII産生能を増強することが急性実験でも確かめられ、このような白血球を介するAngII産生系は、急性期及び慢性期の病態で増加してくることが、推定される。

(6) 香川大学薬理学教室(西山教授)との共同研究では、動物モデルで偏側の尿管結察モデルを作成し、健測と患測の腎臓内のキマーゼ活性の変化を調べた。その結果尿管閉塞を施した腎内圧が上昇する患測の腎臓でのみキマーゼ活性の増大が認められ、尿管結察による腎内圧の増加が、腎臓内部でのキマーゼ依存性AII産生能を活性化させることが明らかになった。すなわち、臨床的には尿管結察や腎結石などによって腎内圧が上昇すると、以前からレニン依存性高血圧になることが知られていたが、本実験の結果は腎臓間質でのキマーゼ活性の増加並びに腎間質内でのAII産生が増加し、腎機能の低下に関与していることが推察される。

以上のような自主研究や共同研究によって、ヒトキマーゼが各種心血管病態に関与することが明らかになり、今後このような病態の中から、キマーゼ阻害薬を使用できる対象疾患を同定し、臨床応用の方向へ進めていきたい。

研究期間以外の参考文献

- ①Okamura K, Urata H. et al., Chymase Dependent Angiotensin II-Forming Activity in the Circulating Mononuclear Leukocyte Increases Post Acute Myocardial Infarction、第73回日本循環器学会総会・学術集会、2009年3月21日
- ②Takahashi Y, Urata H. et al., In vitro profile of a novel chymase inhibitor and the improvement of survival in hamsters

with myocardial infarction、第12回日本心不全学会学術集会、2008年10月18日

- ③Okamura K, Chymase activity in the circulating mononuclear leukocytes in chronic kidney disease patients、第31回日本高血圧学会総会、2008年10月10日
- ④Okamura K, Chymase activity in the circulating mononuclear leukocyte increases in chronic kidney disease patients、第12回 Molecular Cardiovascular Conference、2008年9月6日
- ⑤Okamura K, Urata H. et al., High chymase activity in the circulating mononuclear leukocyte is related to high c-reactive protein and insulin levels、ISH2008、2008年6月16日
- ⑥Azekoshi Y, Urata H. et al., Enhancement of angiotensin II forming activity in mononuclear cells by free fatty acids、ISH2008、2008年6月16日
- ⑦Y.-Y. Fan, Urata H. et al., The role of chymase in angiotensin II formation and progression of fibrosis in obstructed kidneys、ISH2008、2008年6月16日

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 14 件)

- ①浦田秀則、発症機序・病態 キマーゼ、高血圧ナビゲーター 第3版、8、86-87、2011、無
- ②Rafiq. K., Sherajee. S. J., Fan. Y.-Y., Nakano. D., Hitomi. H., Nishiyama. A., Fujisawa. Y., Takahashi. Y., Matsuura. J., Hase. N., Urata. H.、Blood glucose level and survival in streptozotocin-treated human chymase transgenic mice、Chinese Journal of Physiology、54、30-35、2011、有
- ③林 ちはる、浦田秀則、ACE阻害薬とアンジオテンシンII受容体拮抗薬 高血圧における使い方、Heart View、14、90-95、2010、無
- ④Maeda Y., Inoguchi T., Takei R., Sawada F., Sasaki S., Fujii M., Kobayashi K., Urata H., Nishiyama A., Takayanagi R., Inhibition of chymase protects against diabetes-induced oxidative stress and renal dysfunction in hamsters、Am J Physiol Renal Physiol、299、F1328-F1338、2010、有
- ⑤久保田和充、浦田秀則、これからの高血圧治療 新しい降圧薬 レニン阻害薬、最新高血圧治療学、8、318-323、2010、無
- ⑥久保田和充、浦田秀則、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系、medicina、47、

1199-1204、2010、無

- ⑦松本研三、浦田秀則、ACE 阻害薬の歴史と種類、Modern physician、30、377-381、2010、無
- ⑧Fujimi K, Uehara Y, Abe S, Kawamura A, Devarajan S, Miura S, Saku K, Urata H.、Homocysteine-induced oxidative stress upregulates chymase in mouse mastocytoma cells、Hypertension Research、33、149-154、2010、有
- ⑨Wei C. C., Hase N., Inoue Y., Bradley E. W., Yahiro E., Li M., Naqvi N., Powell P. C., Shi K., Takahashi Y., Saku K., Urata H., Dell' Italia L. J., Husain A.、Mast cell chymase limits the cardiac efficacy of Ang I-converting enzyme inhibitor therapy in rodents、The Journal of clinical investigation、120、1229-1239、2010、有
- ⑩ Azekoshi, Yoko; Yasu, Takanori; Watanabe, Saiko; Tagawa, Tatsuya; Abe, Satomi; Yamakawa, Ken; Uehara, Yoshinari; Momomura, Shinichi; Urata, Hidenori; Ueda, Shinichiro、Free fatty acid causes leukocyte activation and resultant endothelial dysfunction through enhanced angiotensin II production in mononuclear and polymorphonuclear cells、Hypertension、56、136-142、2010、有
- ⑪ Fan Y. Y., Nishiyama A., Fujisawa Y., Kobori H., Nakano D., Matsuura J., Hase N., Hitomi H., Kiyomoto H., Urata H., Kohno M.、Contribution of chymase-dependent angiotensin II formation to the progression of tubulointerstitial fibrosis in obstructed kidneys in hamsters、Journal of Pharmacological Sciences、111、82-90、2009、有
- ⑫ 浦田秀則、話題のホルモン・受容体・酵素：最近の知見から キマーゼ、Heart View、13、22-27、2009、無
- ⑬ 東條秀明、浦田秀則、レニン阻害薬について、その可能性は？、循環器科、66、89-92、2009、無
- ⑭ 丸山誠代、レニンアンジオテンシン系と糖尿病血管合併症-病態生理-、内分泌・糖尿病科、28、294-300、2009、無

[学会発表] (計 5 件)

- ① Okamura K, Increased angiotensin II forming chymase activity in the circulating mononuclear leukocyte associated with diastolic dysfunction detected by echocardiography、第76回日本循環器学会総会・学術集会、2012年3月17

日

- ② Urata H.、Angiotensin II forming system in various cardiovascular disease、CSDS2010、2010年9月24日
- ③ Okamura K., Inoue Y., Uehara Y., Maruyama S., Sumi S., Furuyama S., Kodama S., Andoh C., Niimura H., Tojo H., Miyoshi K., Tsuchiya Y., Miura S., Yamanouchi Y., Saku K., Urata H.、Higher chymase dependent angiotensin II-forming activity in the circulating mononuclear leukocyte is a significant contributing factor for atrial fibrillation、ACC 2010 59th Annual Scientific Session、2010年3月16日
- ④ Okamura K., Inoue Y., Uehara Y., Matsumoto K., Maruyama S., Sumi S., Fukuda Y., Furuyama S., Kodama S., Andoh C., Niimura H., Kubota K., Tohjoh H., Miyoshi K., Miura S., Yamanouchi Y., Saku K., Urata H.、Higher Chymase Dependent Angiotensin II-Forming Activity in the Circulating Mononuclear Leukocyte is a Significant Contributing Factor for Atrial Fibrillation、第74回日本循環器学会総会・学術集会、2010年3月7日
- ⑤ Inoue Y., Okamura K., Ide H., Maruyama S., Sumi S., Furuyama S., Kodama S., Ando C., Niimura H., Tojo H., Miyoshi K., Yamanouchi Y., Urata H.、Increased chymase-dependent Angiotensin II forming activity of circulating mononuclear leukocyte in patients with coronary artery disease、ESH2009 19th European Meeting on Hypertension、2009年6月14日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

浦田 秀則 (URATA HITENORI)  
福岡大学・医学部・教授  
研究者番号：30289524

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし