

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 10 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591274

研究課題名（和文） 関節炎モデルを用いた全身性炎症による心血管障害の機構解明と治療法開発

研究課題名（英文） Investigation of the mechanism of cardiovascular damage in a rat model of arthritis

研究代表者

守田 吉孝（MORITA YOSHITAKA）

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：50346441

研究成果の概要（和文）：関節リウマチ患者では心血管イベント発症率が高く、生命予後を悪化させており、リウマチ患者およびラット実験的関節炎モデルでは内皮機能障害が認められることが知られている。本研究では、レニン・アンジオテンシン系の活性化が関節炎モデルの早期血管障害に関与していることを初めて明らかにした。これはリウマチ患者の心血管イベント抑制を目的としたアンジオテンシン受容体拮抗薬の有用性に一つの科学的根拠を与えるものである。

研究成果の概要（英文）：The risks of cardiovascular disease and death are higher among patients with rheumatoid arthritis (RA) than the general population. Previous studies identified the presence of endothelial dysfunction in RA patients and rat adjuvant-induced arthritis. This study demonstrated that locally activated renin-angiotensin system (RAS) is involved in the increased vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in the arthritis model. Our findings provide a scientific rationale for a trial of RAS inhibitors to reduce cardiovascular mortality in patients with RA.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
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、膠原病・アレルギー内科学

キーワード：関節リウマチ、アジュバント関節炎、関節炎モデル、アンジオテンシン、内皮機能、活性酸素、炎症、血管障害

1. 研究開始当初の背景

(1) 関節リウマチ(RA)と心血管障害: RA の滑膜病変部での病態解析が進み、生物学的製剤の臨床応用など、現在 RA の治療法は大きな変革時期を迎えている。しかしながら、未だ解決されていない重要な臨床課題の一つが RA の生命予後低下の問題である。RA 患者の平均寿命は一般人と比し約 10 年短く、最大

の原因因子は冠動脈疾患や脳卒中など心血管イベントの増加であることが知られている。活動性の高い RA 患者において動脈硬化の初期変化として知られる血管内皮機能障害が疾患早期より生じていることが報告された。その詳細なメカニズムは未だ明らかにされていないが、動脈硬化と炎症の関連が論じられる中、全身性炎症が早期血管障害に寄

与している可能性も推察される。RA 患者における早期血管障害のメカニズムを明らかにするには、動物モデルでの解析が必須であると考えられた。

(2) 関節炎モデルを用いた血管障害の解析：研究者は既に、RA の実験動物モデルとして広く用いられているラットのアジュバント関節炎において、大動脈の内皮機能が著しく障害されていることを報告している(Arthritis Rheum 2006;54:1847-55)。この研究結果は、RA における血管機能異常が部分的に動物にモデル化できることを示したものであり、このラットモデルは RA 患者の心血管イベントを減少させるための新規治療法の開発および既存薬剤の血管保護作用の検証に利用可能と考えられた。

この研究に引き続き、関節炎ラットの血管障害に対するスタチン(HMG-CoA 還元酵素阻害剤)の効果についても検討も行っている。脂溶性スタチンの一つであるフルバスタチンが関節炎モデルの内皮機能障害を正常化させ、血管壁の酸化ストレスをも改善することを明らかにした(Arthritis Rheum 2007;56:1827-35)。

(3) レニン・アンジオテンシン系と血管障害：全身または局所のレニン・アンジオテンシン系の活性化は、高血圧性臓器障害や冠動脈病変など心血管疾患の病態に深く関与していることが知られている。レニン・アンジオテンシン系の主要因子であるアンジオテンシン II を持続投与されたラットでは、血圧上昇、血管内皮機能の低下、動脈壁の肥厚が観察される。また、糖尿病や高コレステロール血症で引き起こされた内皮障害はアンジオテンシン II 受容体拮抗薬で改善することも報告されている。しかしながら、全身性炎症による血管障害に対するレニン・アンジオテンシン系の関与は不明であった。

2. 研究の目的

RA など全身性炎症による血管障害におけるレニン・アンジオテンシン系の関与を検討することが本研究課題の主目的である。具体的にはラットのアジュバント関節炎にアンジオテンシン II を投与し、血圧・血管内皮機能・動脈壁の肥厚などアンジオテンシン II に対する血管の反応性を検討する。関節炎ラット血管壁におけるアンジオテンシン II 受容体の発現も解析する。さらに、関節炎ラットにアンジオテンシン II 受容体拮抗薬を投与し、活性酸素産生や血管機能障害への効果も明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ラット関節炎の処置：ラットのアジュバ

ント関節炎を作成し、その発症時より浸透圧ポンプにてアンジオテンシン II (0.25 あるいは 1.0 mg/kg/日)を 3 週間投与し、血圧、関節腫脹、体重を継続的に評価する。別の実験系にて、関節炎発症時よりロサルタン(3 mg/kg)あるいはイルベサルタン(5 mg/kg)を連日経口投与する。

(2) ラット大動脈の血管内皮機能測定：ラットより胸部大動脈リングを作成。ノルエピネフリンにて最大収縮を惹起後、内皮依存性血管拡張薬であるアセチルコリン、あるいは内皮非依存性血管拡張薬であるニトロプルシドによる弛緩反応を測定する。

(3) 大動脈の中膜厚測定：アンジオテンシン II を 3 週間投与あるいは未投与の関節炎ラットの胸部大動脈組織を HE 染色後に中膜厚を計測し、アンジオテンシン II による壁肥厚に関節炎誘導が及ぼす影響について検討する。

(4) 大動脈壁におけるアンジオテンシン II 受容体の発現：ラット血管壁における AT1R の発現は western blot 及び real-time PCR 法にて解析する。

(5) 大動脈壁の活性酸素産生と NAD(P)H オキシダーゼの発現および活性の検討：動脈組織切片内の活性酸素産生をジヒドロエチジウムの蛍光的酸化反応と共焦点レーザー顕微鏡を利用し検討する。血管壁における NAD(P)H オキシダーゼ(p22phox, gp91phox コンポーネント)の発現は real-time PCR 法で、その活性は lucigenin chemiluminescence assay にて検討する。

(6) Ex vivo 培養系を用いたアンジオテンシン II 拮抗薬の効果：関節炎ラットの胸部大動脈をロサルタンあるいはイルベサルタン(各 10 μ M)で 18 時間短期培養し、内皮依存性血管弛緩反応に与える影響を検討した。

4. 研究成果

(1) 関節炎ラットの外因性アンジオテンシン II の反応性：アンジオテンシン II 持続投与にて血圧上昇および血管内皮機能障害は、コントロールと比して関節炎ラットで有意に増悪していた(図 1)。さらに、大動脈の中膜肥厚も関節炎の誘導によって増強しており、外因性アンジオテンシン II による血管反応性が関節炎ラットで増強していることが明らかとなった。

(2) 関節炎ラット血管壁におけるアンジオテンシン II 受容体の発現：血管壁局所のアンジオテンシン II 受容体の発現を解析したところ、その蛋白(図 2)および遺伝子発現は関節炎ラ

ットでは有意に増強していた。

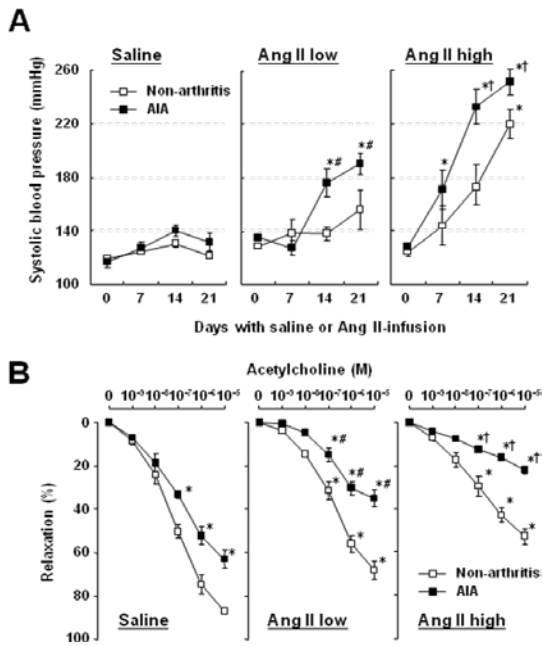


図1: 関節炎(AIA)ラットの外因性アンジオテンシン II (Ang II) の反応性は有意に増強している。正常ラットと AIA ラットに Ang II を 0.25 (low) または 1.0 mg/kg/日 (high) で 3 週間投与し、血圧(A)あるいは内皮依存性血管弛緩反応(B)を測定した。

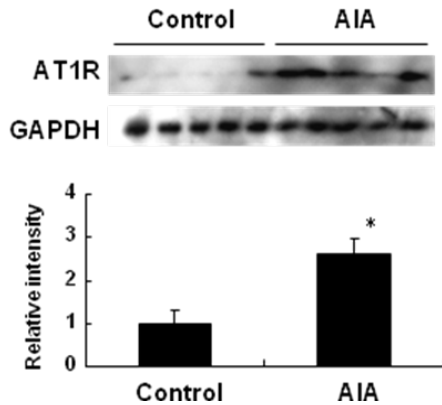


図2: 関節炎(AIA)ラット血管壁のアンジオテンシン II 受容体(AT1R)の蛋白発現。AT1R の蛋白発現は western blot 法にて解析した。

(3) 関節炎ラットの endothelial dysfunction に対するアンジオテンシン II 受容体拮抗薬の効果: 関節炎発症時よりアンジオテンシン II 受容体拮抗薬のロサルタンあるいはイルベサルタンを 3 週間経口投与した。図 3 に示すとおり、分離した動脈組織切片内の血管内皮や平滑筋細胞の活性酸素産生は有意に低下し、活性酸素産生に参与する NAD(P)H オキシダーゼの酵

素活性と発現も低下していた(図 3)。関節炎の程度や血圧に変化は認められなかった。

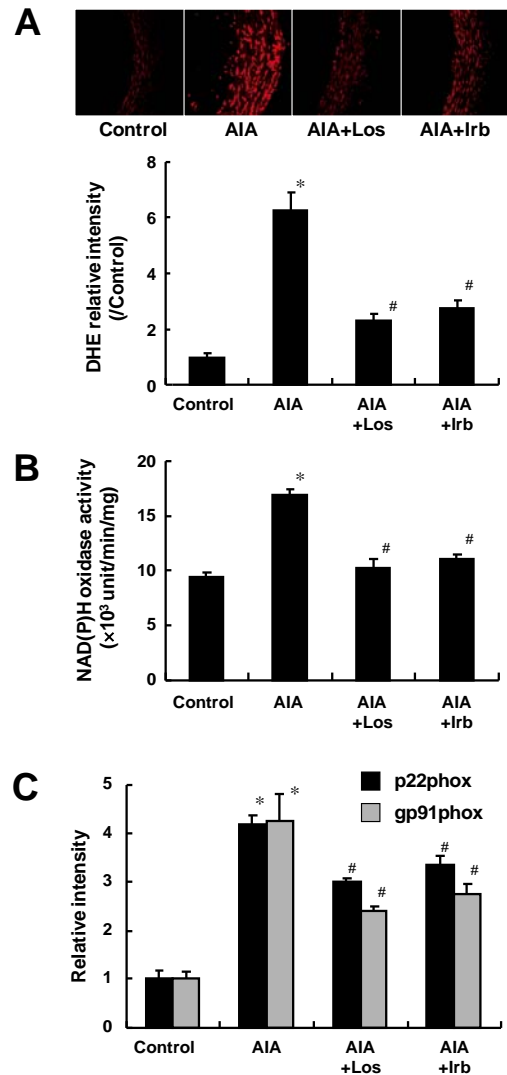


図3: アンジオテンシン II 受容体(ロサルタン; Los あるいはイルベサルタン; Irb)を投与された関節炎(AIA)ラット血管壁の活性酸素産生(A)と NAD(P)H オキシダーゼ活性(B)及び NAD(P)H オキシダーゼ・コンポーネント (p22phox, gp91phox) の mRNA 発現(C)。

さらに、関節炎ラットで障害されているアセチルコリン依存性血管弛緩反応、すなわち内皮機能障害はアンジオテンシン II 受容体拮抗薬の投与にて正常ラットレベルまで回復した(図 4)。L-NAME の共投与にてアセチルコリンによる弛緩が阻害されたため、この弛緩反応が活性酸素依存性であることが確認された。また、ニトロプルシドによる内皮非依存性の血管弛緩反応には違いは認められなかった(図 4)

関節炎ラットの単離大動脈をアンジオテ

ンシン II 受容体拮抗薬存在下で 18 時間培養したところ、内皮依存性弛緩反応は有意に改善し、同薬剤が血管局所に直接的効果を有することを確認した。

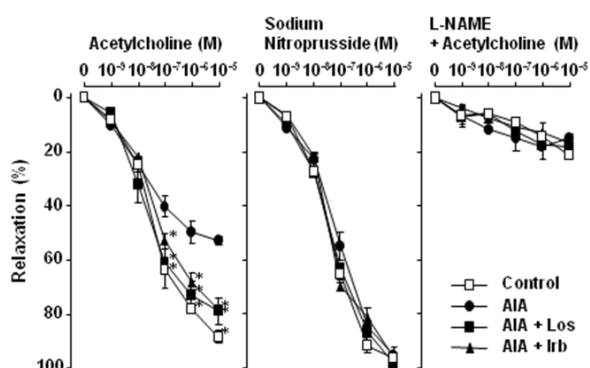


図4: 関節炎(AIA)ラットで障害されているアセチルコリンによる血管弛緩反応(内皮機能)は、ロサルタン(Los)あるいはイルベサルタン(Irb)の3週間の経口投与にて改善する。

(4) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト: 従来、全身または局所のレニン・アンジオテンシン系の活性化は、高血圧や高脂血症による血管障害の病態に関与していることが知られている。しかしながら、全身性炎症による血管障害におけるレニン・アンジオテンシン系の関与をモデル動物を用いて解析した基礎的研究は今までになかった。

本研究では、関節炎ラットの血管壁で、アンジオテンシン II 受容体の発現が有意に亢進し、また外因性のアンジオテンシン II に対する血管反応性が増強していることを明らかにした。さらに、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬は、関節炎ラットで障害された内皮機能を有意に改善することを証明した。

RA 患者と動脈硬化の関連に関しては数々の臨床研究結果が近年報告されている。RA 患者の心血管障害をいかにして保護するかは解決しなければならない臨床課題である。本研究結果は、リウマチ診療におけるアンジオテンシン II 受容体拮抗薬の使用に関し、基礎的な支持を与えるかもしれない。勿論のこと、実際の使用の是非に対しては、更なる臨床研究の結果が待たれるが、リウマチ患者は多様な合併症を有し、ステロイドなど治療薬が多岐にわたり、また炎症の程度も変動することより、信頼性の高い臨床研究結果を得ることは比較的困難である。そうした背景のもと、本研究のようにモデル動物を用いた基礎的研究の成果は特に重要性が高く、臨床的なインパクトも高いと考える。

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 Sakuta T, Morita Y, Satoh M, Fox DA, Kashihara N. Involvement of the renin-angiotensin system in the development of vascular damage in a rat arthritis model: effect of angiotensin receptor blockers. *Arthritis Rheum* 62: 1319-28, 2010. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① 作田建夫(代表: 守田吉孝)、ラット関節炎モデルの血管障害進展におけるレニン・アンジオテンシン系(RAS)の関与、第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2010 年 4 月 24 日、神戸
- ② Yoshitaka Morita, Role of renin-angiotensin system activation in the development of vascular damages in rat adjuvant-induced arthritis: effect of angiotensin receptor blockers、欧州リウマチ学会(EULAR)、2009 年 6 月 11 日、コペンハーゲン、デンマーク
- ③ 作田建夫(代表: 守田吉孝)、アンジオテンシン受容体拮抗薬はラット関節炎モデルの血管内皮機能障害を改善する - 全身性炎症による血管障害におけるレニン・アンジオテンシン系の関与 -、第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2009 年 4 月 25 日、東京
- ④ 作田建夫(代表: 守田吉孝)、ラット関節炎モデルの血管内皮機能障害における IL-6 と TNF α の関与、第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2009 年 4 月 23 日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

守田 吉孝 (MORITA YOSHITAKA)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号: 50346441

(2) 研究分担者

佐藤 稔 (SATO MINORU)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号: 70449891

矢田 豊隆 (YADA TOYOTAKA)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号: 00210279

(3) 連携研究者

石原 克彦 (ISHIHARA KATSUHIKO)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号: 10263245