

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25年8月25日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590503

研究課題名（和文） 心血管系バイオマーカーとヒト薬効評価実験系に関する臨床薬理学的研究

研究課題名（英文） Clinical Pharmacology research regarding cardiovascular biomarkers and experimental system for the assessment of drugs in humans

研究代表者

植田 真一郎 (UEDA SHINICHIRO)

琉球大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：80285105

研究成果の概要（和文）：

今後の抗動脈硬化薬の開発や心血管イベント予防においてはより病態の本質をついたメカニズムの解明や指標の同定が必要となる。我々は今回糖尿病患者のみならず耐糖能障害患者においても血管内皮機能低下と選択的な血管平滑筋のNOへの感受性低下が認められ、これらはインスリン感受性と関連すること、そのメカニズムとして遊離脂肪酸負荷は白血球の活性化と共に白血球内でのアンジオテンシン II 産生を亢進させ、血管内皮機能障害、心筋微小血管における血液レオロジーの障害、インスリン抵抗性を惹起すること、これらはRAS系阻害薬やカルシウム拮抗薬で抑制され、白血球のRASの関与とジヒドロピリジン感受性カルシウムチャネルの病態への関与が示唆された。遊離脂肪酸負荷はこれらのメカニズムを模す実験系であり、今後抗動脈硬化薬の評価に有用である。

研究成果の概要（英文）：

We need more specific, relevant and predictive biomarkers for not only daily practice but also development of new drugs for the prevention of cardiovascular events. Our research project firstly revealed that not only endothelial function but also smooth muscle responses to NO were impaired in not only diabetic but also IGT patients. These impaired vascular functions were significantly associated with insulin sensitivity. We also showed that elevation of FFA significantly impaired endothelial function, rheological function of myocardial microcirculation, insulin sensitivity and enhanced leukocyte function and angiotensin II forming activity. RAS inhibitors as well as dihydropyridine calcium antagonists significantly but not completely prevented these effects of FFA. We clarified mechanisms for FFA induced endothelial function and insulin resistance and established experimental system for the assessment antiatherosclerotic drugs in human.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,300,000	930,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：バイオマーカー、遊離脂肪酸、血管内皮機能、白血球活性化、酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

内臓肥満から糖尿病への進展、あるいは動脈硬化の進展に関してのメカニズムは不明な点が多い。我々はこれまで遊離脂肪酸がレニン-アンジオテンシン系 (RAS) を介して内皮機能を低下させることを報告してきたがその機序は不明であった。また以前から血管内皮機能とインスリン感受性の関連についてのメカニズムも不明であった。

2. 研究の目的

(1) 2型糖尿病患者、耐糖能障害患者でのインスリン感受性と血管内皮機能、血管平滑筋機能の関連を明らかにすること

(2) 脂肪負荷による遊離脂肪酸上昇の白血球機能、白血球の RAS 系活性、血管内皮機能、インスリン感受性への影響を測定し、薬剤による阻害効果を評価すること

3. 研究の方法

(1) 血管内皮機能の測定

血管内皮機能はアセチルコリンを撓骨動脈より動注し、前腕径の変化を前腕血流量の変化とみなしプレシスモグラフを用いて測定した。

(2) 血管平滑筋機能の測定

平滑筋機能はニトロプルシッドあるいはベラパミルを撓骨動脈より動注し、前腕径の変化を前腕血流量の変化とみなしプレシスモグラフを用いて測定した。

(3) 白血球活性化の測定

白血球活性化の指標として血中ミエロペルオキシダーゼ (MPO) 濃度、ex vivo の白血球接着能、全血通過時間を毛細血管を模した微小チャンネルで測定した。

(4) インスリン感受性の測定

インスリン感受性は hyperinsulinaemic euglycaemic clamp 法で測定した。

(5) 白血球アンジオテンシン II 産生能の測定

修飾したアンジオテンシン I を基質として蛍光法で測定した。アッセイの妥当性は HPLC にて確認した。

(6) 遊離脂肪酸負荷実験系

遊離脂肪酸そのものの血管機能への影響を検討するために、脂肪乳剤をヘパリンとともに静注し、血中の遊離脂肪酸を上昇させる実験系を用いた。この系では血中遊離脂肪酸濃度が2倍程度となる。

(7) 研究プロトコル

① 2型糖尿病患者、耐糖能低下患者、年齢の適合した健常者においてインスリン感受性、血管内皮機能、血管平滑筋機能を測定した。

② 健常者において脂肪負荷を行い、白血球の活性化 (接着能)、白血球 (単核球、多核球) でのアンジオテンシン II 産生能を測定

した。同時にヘパリン静注下での血中ミエロペルオキシダーゼ濃度を白血球活性化のマーカーとして測定した。アセチルコリンによる血管内皮機能の測定を行った。酸化ストレスのマーカーとして dROM の測定を行った。これらを Valsartan 投与前後で実施した。

③ 健常者において脂肪負荷を行い、白血球の活性化 (接着能) を測定した。同時にヘパリン静注下での血中ミエロペルオキシダーゼ濃度を白血球活性化のマーカーとして測定した。アセチルコリンによる血管内皮機能の測定を行った。酸化ストレスのマーカーとして dROM の測定を行った。これらを

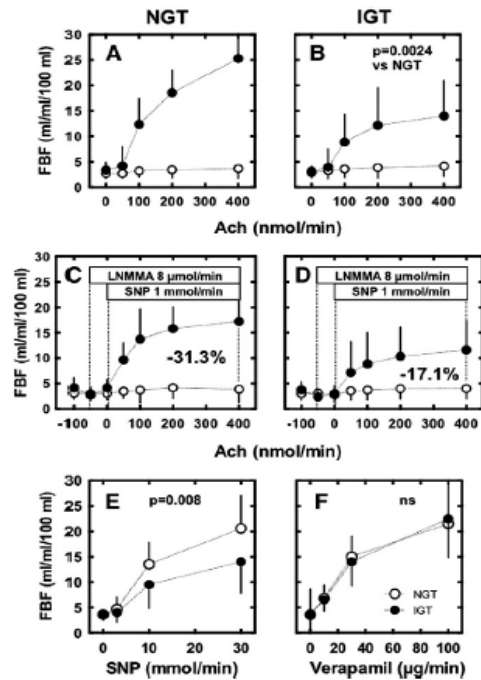
Amlodipine 5mg, nifedipine 40mg, diltiazem 200mg 投与前後に行った。また血球系の培養 THP 細胞においてこれらの Ca 拮抗薬を 24 時間インキュベートし、遊離脂肪酸をアプライして NF κ B p65 リン酸化を評価した。

④ 健常者において二重盲検交叉法により Losartan 50mg, 100mg, プラセボを 2 週間の washout period を設けて 1 週間投与し、その後脂肪負荷を行い、インスリン感受性を測定した。

4. 研究成果

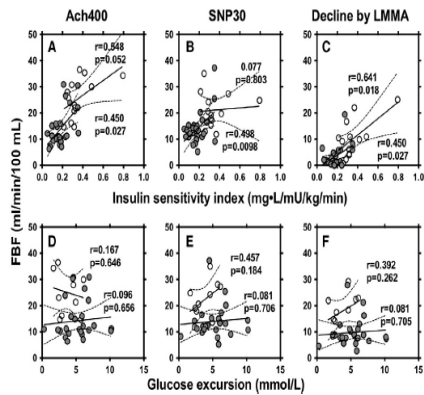
(1)

図に示すように IGT でも血管内皮機能は低下し、特にアセチルコリンによる血管拡張反応のうち NO に依存した部分の低下が認められた。



血管平滑筋機能に関しては、興味深いことに verapamil への反応は IGT において低下していなかったが、ニトロプルシッドへの反応は

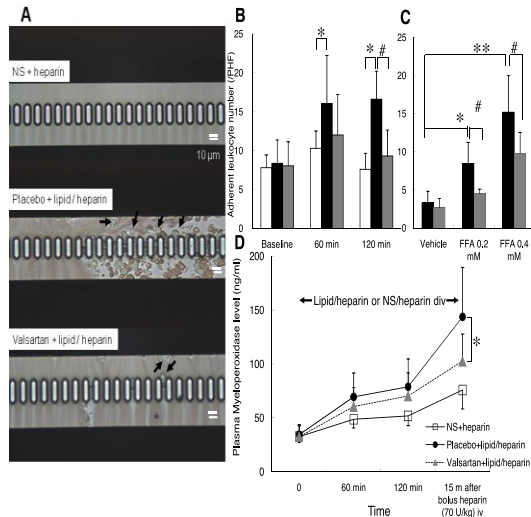
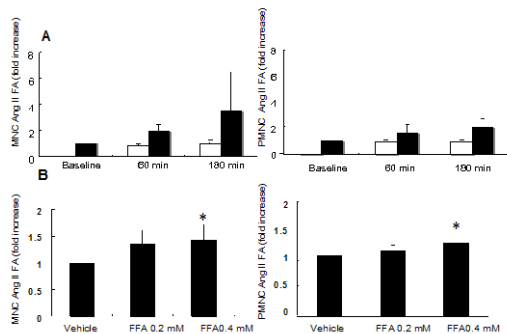
低下しており、平滑筋の NO への反応が選択的に減弱していることが示唆された。これらの NO の産生および感受性に関する血管機能の低下は IGT 患者においてインスリン感受性と強く関連し、共通のメカニズムが存在する可能性が示唆された。



(2)

正常の 2-3 倍の脂肪酸上昇により単核球、多核球のアンジオテンシン II 産生能が亢進した。遊離脂肪酸の全血への添加後の測定でも同様の反応が認められた。遊離脂肪酸によるレニン-アンジオテンシン活性亢進が示唆される。

脂肪酸負荷は以前の報告と同様血管内皮機能を低下させ、ARB 前投与はこれを予防した。

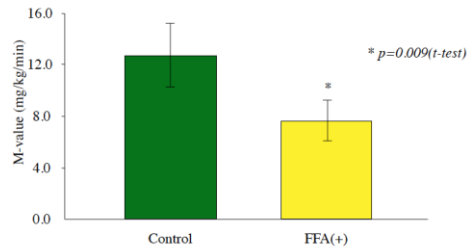


脂肪酸負荷は、白血球の活性化による白血球接着の亢進、micro array channel における全血通過時間の延長を来し、ARB はこれを改善した。白血球由来のミエロペルオキシダーゼ (MPO) も脂肪酸負荷による白血球活性化により上昇しておりこれも ARB で抑制された。ヘパリンによる MPO の内皮細胞からの liberation が内皮機能を改善させたことから、遊離脂肪酸によるアンジオテンシン II 産生亢進に伴う白血球活性化が、MPO を介して直接内皮機能を障害する可能性が示唆された。

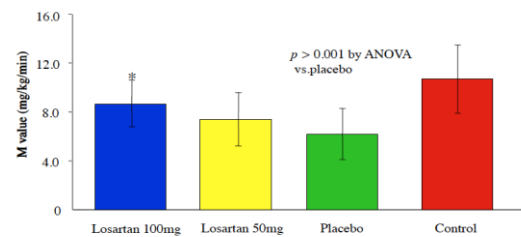
(3)

脂肪負荷による脂肪酸の上昇はインスリン感受性を低下させた。また Losartan は用量依存性に脂肪酸によるインスリン感受性の低下を予防した。

The Effect of FFA on Insulin Sensitivity(M-value)



The Effect of Losartan on Insulin Sensitivity(M-value)



(4)

ジヒドロピリジン系 Ca 拮抗薬 (c, d) は遊離脂肪酸上昇による血管内皮機能低下 (b) を予防したが、ベンゾジアゼピン系である diltiazem は予防しなかった (e)。

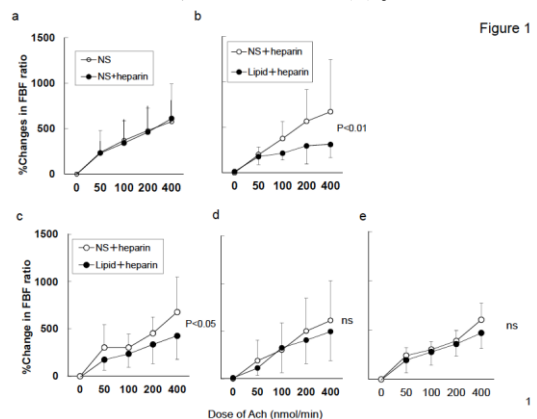
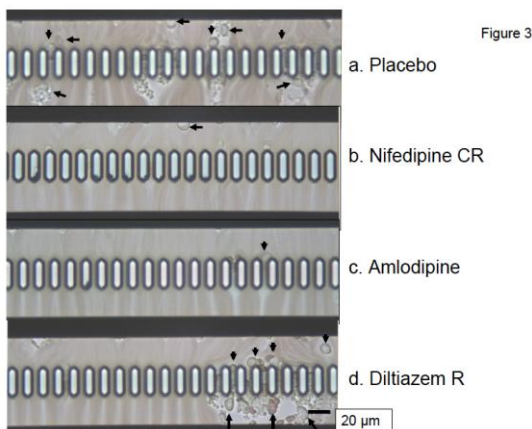
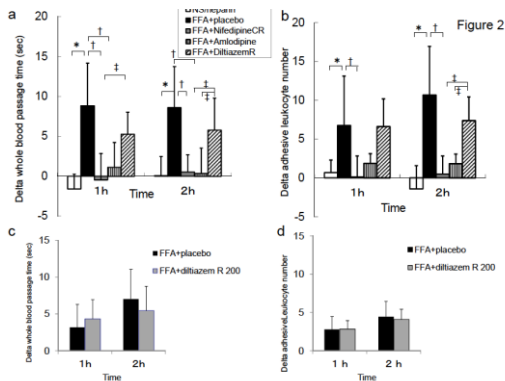


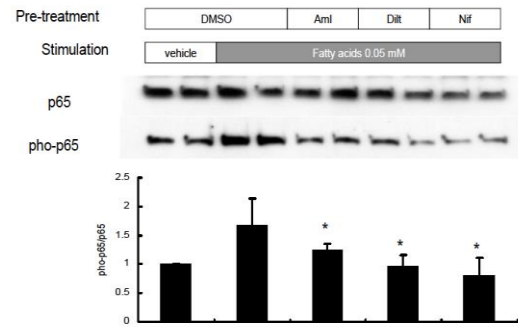
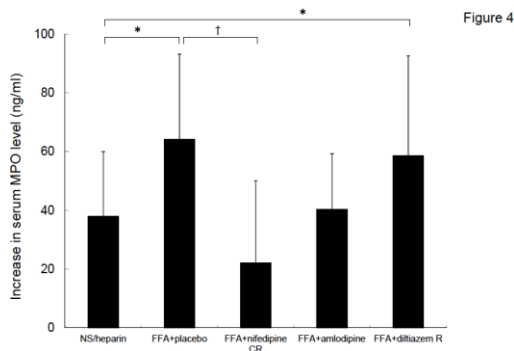
Figure 1

同様にジヒドロピリジン系 Ca 拮抗薬は白血球の活性化を抑制した。しかし diltiazem による抑制は認められなかった。



nifedipine によるヘパリン静注下血中 MPO 濃度の抑制が認められた。これらはジヒドロピリジン系 Ca 拮抗薬による白血球活性化の抑制を意味する

元来、血球細胞はジヒドロピリジン感受性 Ca チャネルを有さないと言われていたが、最近の報告では白血球の活性化に関与しているとされている。我々は血球系の培養細胞 THP1 細胞において遊離脂肪酸のアプライが NF κ B p65 のリン酸化をおこすことそれを Ca 拮抗薬が抑制することを示した。このことは白血球でのジヒドロピリジン感受性 Ca チャネルの存在と活性化への関与を示唆するものである。



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 11 件)

1. Mutoh A, Ueda S. Peroxidized Unsaturated Fatty Acids Stimulate Toll-like Receptor 4 Signaling in Endothelial Cells. *Life Sci* (in press) (査読有り)
2. Yasu T, Kobayashi M, Mutoh A, Yamakawa K, Momomura S, Ueda S. Dihydropyridine calcium channel blockers inhibit free fatty acid-induced endothelial and rheological dysfunction. *Clin Sci* 2013 Mar 27. [Epub ahead of print] (査読有り)
3. Iseki K, Arima H, Kohagura K, Komiya I, Ueda S, Tokuyama K, Shiohira Y, Uehara H, Tohma S. Effects of ARB on mortality and cardiovascular outcome in patients with long-term haemodialysis: a randomised controlled trial. *Nephrol. Dial. Transplant* 2013 Jan 25. [Epub ahead of print] (査読有り)
4. Yamakawa K, Shimabukuro M, Higa N, Asahi T, Ohba K, Arasaki O, Higa M, Oshiro Y, Yoshida H, Higa T, Saito T, Ueda S, Masuzaki M, Sata M. Eicosapentaenoic acid (EPA) supplementation changes fatty acid composition and corrects endothelial dysfunction in hyperlipidemic patients *Cardiol Res Pract* 2012;754181. doi: 10.1155/2012/754181. (査読有り)
5. Shimabukuro M, Higa N, Tagawa T, Yamakawa K, Sata M, Ueda S. Defects of vascular nitric oxide bioavailability in subjects with impaired glucose tolerance: A potential link to insulin resistance. *Int J Cardiol* 2012 Oct 15. doi:pil: S0167-5273(12)01315-0. 10.1016/j.ijcard.2012.09.194. (査読有り)

6. Kageyama S, Ueda S, Mochizuki K, Miyakawa M, Sugawara M, Nakayama M, Ohashi Y, Saito I, Saruta T; OCEAN Study Group. Optimal Combination of Effective ANtihypertensives (OCEAN) study: a prospective, randomized, open-label, blinded endpoint trial--rationale, design and results of a pilot study in Japan. *Hypertens Res.* 2012;35:221-7. (査読有り)
7. Tomiyama H, Kohro T, Higashi Y, Takase B, Suzuki T, Ishizu T, Ueda S, Yamazaki T, Furumoto T, Kario K, Inoue T, Koba S, Watanabe K, Takemoto Y, Hano T, Sata M, Ishibashi Y, Node K, Maemura K, Ohya Y, Furukawa T, Ito H, Yamashina A. A multicenter study design to assess the clinical usefulness of semi-automatic measurement of flow-mediated vasodilatation of the brachial artery. *Int Heart J.* 2012;53:170-5. (査読有り)
8. Tomiyama H, Higashi Y, Takase B, Node K, Sata M, Inoue T, Ishibashi Y, Ueda S, Shimada K, Yamashina A. Relationships among hyperuricemia, metabolic syndrome, and endothelial function. *Am J Hypertens.* 2011;24:770-4. (査読有り)
9. Matsuzaki M, Ogihara T, Umemoto S, Rakugi H, Matsuoka H, Shimada K, Abe K, Suzuki N, Eto T, Higaki J, Ito S, Kamiya A, Kikuchi K, Suzuki H, Tei C, Ohashi Y, Saruta T; Combination Therapy of Hypertension to Prevent Cardiovascular Events Trial Group. Prevention of cardiovascular events with calcium channel blocker-based combination therapies in patients with hypertension: a randomized controlled trial. *J Hypertens.* 2011;29:1649-59. (査読有り)
10. Ueda S. New approaches to blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system: evidence from randomized controlled trials (RCTs) of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II-receptor blockers. Questions remain unsolved. *J Pharmacol Sci* 2010;113:292-5. (査読有り)
11. Azekoshi Y, Yasu T, Watanabe S, Tagawa T, Abe S, Yamakawa K, Uehara Y, Momomura S, Urata H, Ueda S. Free fatty acid causes leukocyte activation and resultant endothelial dysfunction through enhanced angiotensin II production in mononuclear and

polymorphonuclear cells. *Hypertension.* 2010;56:136-42. (査読有り)

[学会発表] (計 10 件)

1. 植田真一郎 患者レジストリに基づいた治療法の効果比較 pragmatic trial と新規抗凝固薬の観察研究 2012年11月29日 沖縄
2. 植田真一郎 循環器領域の pragmatic trial 立案, 実施, RCT on registry 第33回日本臨床薬理学会学術総会 2012年11月29日 沖縄
3. 植田真一郎 日本人本態性高血圧患者における利尿薬使用と糖尿病発症に関するランダム化比較試験 第35回 日本高血圧学会総会 2012年09月20日 名古屋
4. 植田真一郎 PGX の臨床的有用性と妥当性 第32回日本臨床薬理学会 2011年12月31日 浜松
5. 植田真一郎 Clinical Validity and utility of PGX 第26回日本薬物動態学会(招待講演) 2011年11月18日 広島
6. Matsushita A, Ueda S The Importance of Lipid Peroxidation in TLR4 Activation by Fatty Acids in Endothelial Cells American Heart Association Scientific Session 2011 2011年11月16日 Orland, FL, USA
7. 松下明子、植田真一郎 脂肪酸による Toll-like receptor4 活性化における脂質過酸化の重要性 第33回日本高血圧学会 2011年10月22日 宇都宮
8. 植田真一郎 臨床試験のピットフォール 第3回アブライドセラピューティクス学会(招待講演) 2011年6月11日 東京
9. 植田真一郎 動脈硬化性疾患のバイオマーカー 臨床試験研究会(招待講演) 2011年6月4日 東京
10. Ueda S. Hypertension and endothelial dysfunction: an early phase of vascular aging in humans Korean Society of Hypertension (招待講演) 2011年5月27日 Seoul, Korea

[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]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植田真一郎 (UEDA SHINICHIRO)
琉球大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：80285105

(2) 研究分担者

浦田秀則 (URATA HIDENORI)
福岡大学・筑紫病院・教授
研究者番号：30289524

松岡秀洋 (MATSUOKA HIDEHIRO)
久留米大学・医学部・教授
研究者番号：80248393

(3) 連携研究者 なし