

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790770

研究課題名(和文) 食塩感受性高血圧の病態解析と合併する心拡張不全に関する臨床研究

研究課題名(英文) The investigation of mechanism of salt-sensitive hypertension in animal models and cardiac diastolic heart failure in hypertensive patients

研究代表者

山本 英一郎 (Yamamoto, Eiichiro)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50573614

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、酸化ストレス(ROS)の新たな産生源として注目されている“一酸化窒素合成酵素(eNOS)アンカップリング”現象の、食塩感受性高血圧に合併する慢性腎臓病や心拡張不全への関与機序や病態における役割を、病態モデル動物(Dahl食塩感受性ラット、eNOS欠損マウス)や、実際の拡張不全心不全患者を対象にして明らかにした。これにより、食塩感受性高血圧の病態解明や合併症への新たな治療法の確立に寄与できると考えている。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we demonstrated the crucial role of eNOS uncoupling-induced vascular endothelial dysfunction in chronic kidney disease (CKD) and salt-sensitive hypertension using Dahl salt-sensitive hypertensive (DS) rats and eNOS knockout mice. Furthermore, in clinical study, we found that peripheral endothelial dysfunction, assessed by digital peripheral arterial tonometry, was significantly impaired in human cardiac diastolic heart failure (DHF) patients. Furthermore, blood BH4 levels tended to be decreased in DHF patients, indicating the involvement of eNOS uncoupling by BH4 downregulation in human DHF as well as DS rats.

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：循環器学 血管内皮機能

1. 研究開始当初の背景

食塩過剰摂取が脳卒中や心血管病など高血圧合併症のリスクになることは数々の疫学研究から明らかである。従って、食塩感受性が比較的強い日本人にとって、食塩感受性高血圧の病態や、その合併症であり昨今本邦でも社会問題となっている慢性腎臓病(CKD)や心拡張不全の発症機序を解明することは極めて重要な課題である。

我々は以前より DS ラットで起こる高血圧性血管内皮機能障害や、これに続発する CKD や心拡張不全のメカニズムを基礎的に検討してきた。我々の検討で、DS ラットの血管内皮機能障害に、eNOS の補酵素 BH4 の低下による eNOS 二量体形成不全、いわゆる“eNOS アンカップリング現象”が深く関与しており、eNOS アンカップリングによる酸化ストレス増加を抑制すると、DS ラットの CKD のみならず心拡張不全も改善することが明らかになった。このことは、食塩感受性高血圧病態やその合併症に eNOS アンカップリングに代表される eNOS 機能不全が関与すること、食塩感受性高血圧が特異的に CKD や心拡張不全を惹起する可能性を示唆している。

さらに、様々な大規模臨床試験や疫学研究により、食塩感受性高血圧が non-dipper 型高血圧を呈し、CKD(Kidney Int,2004) や心不全(JAMA,2008)の合併率が高いことが明らかにされている。しかし、その分子メカニズムあるいは実際の臨床病態における役割に関しては全く明らかになっていないため、本研究では DS ラットや eNOS 遺伝子欠損マウスを用いて食塩感受性高血圧の病態を検討する基礎研究と食塩感受性高血圧と血管内皮機能障害や心不全の関連を検討する臨床研究の両側面により、これらの詳細なメカニズムを解明することを目的とする。

2. 研究の目的

我々は以前より食塩感受性高血圧のモデル動物であるダール食塩感受性ラット(DS ラット)を用いて食塩感受性高血圧の病態機構や合併する心拡張不全の発症機序を基礎的に検討してきた。本研究は、今までの研究を進展させ DS ラットや血管内皮型一酸化窒素(NO)合成酵素(eNOS)遺伝子欠損マウスを用いた基礎研究と食塩感受性高血圧と合併症する心拡張不全との関連を検討する臨床研

究の両側面により、食塩感受性高血圧の分子機序の解明と実際の心拡張不全への関与の証明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) DS ラットによる慢性腎臓病および食塩感受性高血圧における eNOS 機能不全の関与に関する検討

昨今、慢性腎臓病(CKD)という概念が心血管病の独立した危険因子として注目されている。CKD では糸球体濾過量(GFR)の低下から食塩感受性が亢進することが知られるが、DS ラットは食塩負荷早期より CKD を発症し、食塩感受性がさらに増悪することが知られる。つまり、食塩感受性の亢進に CKD が強く関与することが示唆される。

糖尿病性腎症に対する関与の基礎的検討はあるが(Am J Physiol Renal Physiol,2005)、食塩感受性高血圧下での CKD に対する eNOS アンカップリングの関与を検討した報告はない。そこで本研究では、DS ラットに eNOS アンカップリングの改善薬(塩酸 sapropterin)などを投薬し、その効果を検討する。これにより、eNOS アンカップリングによる CKD 発症の分子メカニズム、さらにはこれらによる食塩感受性増悪への関与機序の詳細を明らかにしたい。

(2) eNOS 遺伝子欠損マウスによる NO の non-dipper 型高血圧への関与に関する検討

前述のように、食塩感受性高血圧は CKD を合併し、non-dipper 型高血圧(夜間に血圧が 10%未満しか低下しない夜間降圧減弱タイプ)を呈しやすいことが臨床研究で明らかにされているが、non-dipper 型高血圧は心血管事故の発症が有意に高いため、その発症機序の解明は重要である。

我々は以前、eNOS 遺伝子欠損マウスが高血圧を呈し、腎糸球体の硬化や炎症細胞浸潤を主体とした CKD をきたすことを報告しているが、他のグループによる検討でも NO 阻害薬が血圧日内変化を障害することが示されており(Circ Res, 2008)、NO の調節障害・機能不全が non-dipper 型高血圧(血圧日内リズムの障害)に強く関与することが示唆される。

我々は本研究で、eNOS の活性化と血圧日内リズムの関係を、様々な生理機能の日内変動を制御する時計遺伝子とよばれる一連の分子に着目し検討する。

(3) 食塩感受性高血圧と拡張性心不全に関する臨床研究

近年、心不全症例の約半分は左室拡張機能のみが障害される心拡張不全によることが明らかとなり予後不良なことから本邦でも社会問題となっている。現在では、拡張不全は収縮不全と異なる病態とされているが (Hypertension, 2005)、その発症機序や治療法は不明である。さらに、食塩感受性高血圧に心不全発症が多いことや、心不全患者の血管内皮機能が低下していることは既知であるが、いずれも収縮不全と拡張不全のどちらが多いかなど明確でない点が多い。

前述のように、DS ラットは高食塩負荷早期に血管内皮機能障害をきたし CKD 発症を経て、やがて心拡張不全をきたすことから、食塩感受性高血圧による血管内皮機能障害が心拡張不全を特異的に惹起する可能性が示唆される。そこで我々は本研究で、心拡張不全患者における血管内皮機能を新しい測定装置を用いて客観的・非侵襲的に測定し、実際の臨床病態における食塩感受性高血圧と血管内皮機能の相関を心拡張不全患者において検討する。

4. 研究成果

- (1) 我々の検討で、DS ラットの腎組織ホモジネート、血中・尿中における eNOS 補酵素である BH4 の低下と、その酸化物である BH2 の上昇がみられていた。BH4 の相対的低下が eNOS アンカップリングの主因といわれていることから、食塩感受性高血圧における CKD への eNOS アンカップリング関与が示唆された。

さらに、eNOS アンカップリング改善薬である塩酸 sapropterin を DS ラットに直接投薬すると、CKD が病理学的に有意に改善し、蛋白尿も有意に改善することが示された。

つまり、食塩感受性高血圧における CKD への eNOS アンカップリング関与のみならず、これへの介入が CKD、ひいては食塩感受性高血圧の治療に有用である可

能性が示唆された。

- (2) 今回の検討で eNOS 欠損マウスでは、高血圧のみならず血圧日内変化の障害がみられることが分かった。これは、他のグループによる報告で、NO 阻害薬が血圧日内変化を障害することが示されている結果を支持するものであり、血圧日内変動への eNOS の関与をしめす興味深い結果である。

今後は、eNOS がどの時計遺伝子に影響して血圧日内リズムを調節しているか分子学的に検討していく。

- (3) 心拡張不全患者 (収縮機能は正常範囲) においては、非侵襲的血管内皮障害測定装置: Endo-PAT2000 を用いて測定した血管内皮機能が有意に低下しており、血管内皮機能が心拡張不全の重症度と有意に相関しており、さらに高度内皮機能低下患者は、その後の予後が有意にわるいことが明らかになった。

さらに、これら心拡張不全患者の血中においては、前述の DS ラットと同様に血中の BH4 濃度および BH4/BH2 比が有意に低下しており、Endo-PAT2000 により測定した血管内皮機能障害の程度とも有意に相関していることを同時に見出している。

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 13 件)

- Matsubara J., Yamamoto E., Ogawa H., et al. (12 人中 9 番目) Incremental prognostic significance of the elevated levels of Pentraxin 3 in patients with heart failure with normal left ventricular ejection. **J Am Heart Assoc.** 2014 (印刷中) 査読有
- Hanatani S, Yamamoto E., Ogawa H., et al. (15 人中 8 番目) Circulating thrombospondin-2 reflects disease severity and predicts prognosis of patients with heart failure with reduced ejection fraction. **Circ J.** 2014 (印刷中) 査読有
- Hanaoka Y., Yamamoto E., Ogawa H., et al. (12 人中 5 番目) Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 knockout mice exhibit enhanced energy expenditure through thermogenesis. **PLoS One.** 9(4):e94930 2014. 査読有
- Hirata Y., Yamamoto E., Ogawa H., et al. (15 人中 3 番目) Endothelial function and cardiovascular events in chronic kidney

disease. **Int J Cardiol.** 173(3):481-6, 2014. 査読有

Takashio S., Yamamoto E., Ogawa H. et al. (17人中9番目) Correlation between extent of myocardial fibrosis assessed by cardiac magnetic resonance and cardiac troponin T release in patients with nonischemic heart failure. **Am J Cardiol.** 113(10):1697-704, 2014. 査読有

Izumiya Y., Yamamoto E., Ogawa H. et al. (17人中5番目) Growth differentiation factor-15 is a useful prognostic marker in patients with heart failure with preserved ejection fraction. **Can J Cardiol.** 30(3):338-44, 2014. 査読有

Hanatani S., Yamamoto E., Ogawa H., et al. (15人中9番目) Growth differentiation factor 15 can distinguish between hypertrophic cardiomyopathy and hypertensive hearts. **Heart Vessels.** 29(2):231-7, 2014. 査読有

Takashio S., Yamamoto E., Ogawa H., et al. (12人中6番目) Coronary Microvascular Dysfunction and Diastolic Load Correlate with Cardiac Troponin T Release Measured by a Highly Sensitive Assay in Patients with Nonischemic Heart Failure. **J Am Coll Cardiol.** 62(7):632-640, 2013. 査読有

Matsubara J., Yamamoto E., Ogawa H., et al. (13人中9番目) Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, sitagliptin, improves endothelial dysfunction in association with its anti-inflammatory effects in uncontrolled diabetic patients with coronary artery disease. **Circ J.** 77(5):1337-1344, 2013. 査読有

Ohba K., Yamamoto E., Ogawa H., et al. (24人中16番目) Microvascular coronary artery spasm presents distinctive clinical features with endothelial dysfunction as nonobstructive coronary artery disease. **J Am Heart Assoc.** 1(5):e002485, 2012. 査読有

Yamamoto E., Ogawa H., Kim-Mitsuyama S., et al. (10人中1番目) Calcium channel blockers, more than diuretics, enhance vascular protective effects of angiotensin receptor blockers in salt-loaded hypertensive rats. **PLoS One.** 7(6):e39162, 2012. 査読有

Onoue Y., Yamamoto E., Ogawa H., et al. (14人中7番目) Multidisciplinary mechanical supports improve outcome in a shock patient with cardiac amyloidosis: a case report. **Intern Med.** 51(10):1215-9, 2012 査読有

Sueta D., Yamamoto E., Kim-Mitsuyama S. et al. (10人中6番目) Amlodipine enhances amelioration of vascular insulin resistance, oxidative stress, and metabolic disorders by candesartan in metabolic syndrome rats. **Am J Hypertens.** 25(6):

704-710, 2012 査読有

[学会発表](計 10 件)

山本英一郎, 平田快紘, 小川久雄 内皮型一酸化窒素合成酵素機能異常の心拡張不全病態での役割の臨床的検討 第14回日本NO学会学術集会、2014.5.16、ホテルニューオータニ佐賀(佐賀県)

山本英一郎, 日下裕章, 小川久雄 Cardiac Th1/Th2 Cytokine Imbalance was Closely Associated with the Transition from Left Ventricular Hypertrophy to Diastolic Heart Failure 第78回日本循環器学会学術集会、2014.3.22、東京国際フォーラム(東京都)

山本英一郎, 杉山正悟, 小川久雄 The Clinical Usefulness of Digital Peripheral Arterial Tonometry for Identifying Coronary Artery Disease in Hypertensive Patients 第78回日本循環器学会学術集会、2014.3.23、東京国際フォーラム(東京都)

山本英一郎, 辻田賢一, 小川久雄 高齢発症急性冠症候群の臨床背景および式人病変の血管内超音波所見の検討 第24回日本老年医学会九州地方会、2014.3.8、産業医科大学(福岡県)

山本英一郎, 松澤泰志, 小川久雄 The Clinical Usefulness of Digital Peripheral Arterial Tonometry for Identifying Coronary Artery Disease in Hypertensive Patients 第86回 米国心臓協会 学術集会、2013.11.17、アメリカ合衆国 グラス市

山本英一郎, 大庭圭介, 小川久雄 アンジオテンシン受容体拮抗薬(ARB): オルメサルタンは高血圧患者における血管内皮機能と拡張不全心不全を改善する 第61回日本心臓病学会学術集会、2013.9.21、ホテル日航熊本(熊本県)

山本英一郎, 小川久雄 DES時代の降圧療法について-日本人でのエビデンスを中心に- 第22回日本心血管インターベンション治療学会学術集会、2013.7.11、神戸国際展示場(兵庫県)

山本英一郎, 日下裕章, 小川久雄 新しい線維化マーカーである Galectin-3 の左室収縮保持性心不全における役割についての臨床的検討 第2回臨床高血圧フォーラム、2013.5.25、JPタワーホール(東京都)

山本英一郎, 杉山正悟, 小川久雄 AT1 Receptor Blockade Reverses not only Vascular Endothelial Dysfunction but also Cardiac Diastolic Dysfunction in Hypertensive Patients - ORION Study - 第77回日本循環器学会学術集会、2013.3.16、パシフィコ横浜(神奈川県)

山本英一郎, 杉山正悟, 小川久雄 新しい非侵襲的血管内皮機能測定による高血圧患者のリスク層別化について-Reactive Hyperemia Peripheral Arterial Tonometry(RH-PAT)を用いた検討- 第35

回日本高血圧学会総会、2012.9.21、ウエ
スティンナゴヤキャッスル（愛知県）

6．研究組織

(1)研究代表者

山本 英一郎 (YAMAMOTO EIICHIRO)
熊本大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：50573614

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：