

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 29 年 4 月 19 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461256

研究課題名(和文) 血圧変動性増大における降圧ペプチドの役割に関する研究

研究課題名(英文) Roles of blood pressure-lowering peptides in augmentation of blood pressure variability

研究代表者

加藤 丈司 (Kato, Johji)

宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・教授

研究者番号：20274780

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000 円

研究成果の概要(和文)：血圧変動性増大は、新たな心血管危険因子であり、心血管疾患予防のための新たな治療ターゲットとなりうる。本研究の目的は、血圧変動性増大における降圧ペプチド(ANP、BNP、アドレノメデュリン)の役割解明、および血圧変動性の病態生理の理解と治療応用へ向けた基礎的研究データの提供である。本研究の動物実験により、アンジオテンシンII持続投与ラットは、血圧変動性のモデル動物として有用であることが判明し、臨床研究では、長期血圧変動性とANPやBNPの血中濃度との関連が明らかになった。今後、同モデルを用いることにより、変動性増大の病態解明および降圧ペプチドの治療応用も含めた治療手段の探索研究が可能である。

研究成果の概要(英文)：Augmented blood pressure (BP) variability has been recently reported to be a cardiovascular risk factor, which could be a novel therapeutic target. The aims of the present study are to identify the roles of the hypotensive peptides of ANP, BNP and adrenomedullin in augmentation of BP variability and to clarify the underlying mechanisms and therapeutic methods for augmented variability. Animal experiments of the present study showed that rat continuously infused with angiotensin II was found to be a useful model of augmented BP variability, while suggesting angiotensin II as a factor involved in augmented BP variability. In the meantime, clinical study revealed the association between long-term BP variability and plasma levels of ANP and BNP in humans. Based on these findings, future study will be aimed to identify the detailed mechanisms and therapeutic agents for augmented BP variability by using this animal model.

研究分野：循環器内科学

キーワード：血圧変動性増大 降圧ペプチド アンジオテンシンII モデル動物 治療手段探索

1. 研究開始当初の背景

我が国の死亡原因の約3割は、脳卒中や心臓病等の心血管疾患である。これらの疾患は、心血管危険因子を基盤に発症するが、危険因子のなかで極めて重要な因子が高血圧である。高齢者では脳卒中の頻度が高く、脳卒中は高齢者の生活の質(QOL)を著しく低下させる疾患であり、心血管疾患を予防するうえでの高血圧対策の意義が大きい。しかし、高齢者では、若年中年者と比較して、血圧レベルと心血管疾患発症の密接な関係が薄れ、高齢者を対象にした厳格な降圧が、予後のさらなる改善に必ずしもつながらない。その背景因子の1つとして、高齢者の血圧変動性増大があり、最近の研究により、血圧変動性増大が脳卒中発症と密接に関連しており、変動性増大と認知症との関係も報告されている。しかし、血圧変動性増大の要因が明確でなく、血圧変動性の増大を伴う高血圧および心血管・腎臓疾患に対する治療戦略も明確でない。

血圧変動性増大の基盤病態として大血管硬度の上昇や圧受容体反射機能の低下が推測されている。従来、高血圧の病態生理と治療介入を考察するうえで、単純化された計算式「 $\text{血圧} = \text{心拍出量} \times \text{末梢血管抵抗}$ 」が用いられてきた。心拍出量または末梢血管抵抗の増加により血圧が上昇し、いずれかの因子の低下が降圧薬の作用機序として理解される。一方で、この理解に含まれない因子が大血管硬度であり、大血管硬度の上昇に伴い、左室駆出力の変化が直接的に血圧に反映される。また、大血管の伸展性が失われると、圧受容器の感受性が低下して圧受容体反射機能が減弱する可能性も指摘されている。高血圧の病態理解において、血圧変動性や血管硬度の機序を解明する必要があるが、インビトロ研究での解析が難しく、インビボの研究を進めるうえでも、血圧変動性や大血管硬度を評価する適切な動物モデルや手段が明らかではなく、国内外において臨床研究を展開し考察するための基盤的研究データに乏しい。

本研究代表者らは、降圧ペプチドのアドレノメデュリン(AM)やナトリウム利尿ペプチド(NPs)の研究に一貫して取り組んできた。その過程で、レニン・アンジオテンシン系や交感神経系の「昇圧系活性」が加齢とともに低下するが、逆に、降圧ペプチドの血中濃度は上昇することを報告した。大血管硬度の上昇により脈圧が開大するが、一般住民を対象にした代表者の研究によると、脈圧と降圧ペプチドの血中レベルが密接に関連する。一方で、合成AMをヒトの静脈内に投与すると脈波伝播速度(PWV)が効率的に低下し、中性エンドペプチダーゼ(NEP)阻害薬にてNPsの分解を抑制することにより、高血圧患者の大血管硬度が低下する。これらの所見は、AMおよびNPsが、それぞれcAMPおよびcGMP依存性に、大血管を拡張させる事実と符合する。本研究代表者らは、アンジオテン

シンII(Ang II)を持続投与したラット高血圧モデルにおいて、AMが血圧非依存性に心筋線維化を抑制することを報告した。代表者らの予備実験では、AMがAng II投与に伴う大血管外膜線維化を抑制して血管硬度を低下させ、血圧変動性増大を抑制することが、AMの血圧非依存性の心筋線維化抑制の機序として示唆されている。また、脳虚血モデルにおいて、AMが認知機能を改善する可能性も指摘されている。これらの結果は、降圧ペプチドが血圧変動性増大、大血管硬度上昇、認知機能低下に対して抑制的に機能する可能性を示唆している。

2. 研究の目的

血圧変動性の増大は心血管疾患のリスクであり、血圧変動性増大と認知症との関係も指摘されている。加齢に関連した大血管硬度(stiffness)の上昇が血圧変動性増大の重要な要因の一つであるが、血圧変動性や大血管硬度の上昇に関連する因子の解明が不十分である。一方、アドレノメデュリン(AM)およびナトリウム利尿ペプチド(ANP、BNP)は降圧ペプチドであり、加齢とともに血中濃度が上昇し、これまでの研究成果は、これらの降圧ペプチドが、血圧変動性増大および大血管硬度上昇や認知機能低下に対して抑制的に機能する可能性を示唆している。本研究の目的は、血圧変動性の増大における降圧ペプチドの役割を解明し、血圧変動性の病態生理の理解と治療応用へ向けた基礎的研究データを提供することである。

3. 研究の方法

1) 血圧変動性増大モデルの開発

血圧変動性増大に関する実験に適切な動物モデルを探索する目的にて、アンジオテンシンII(Ang II)持続投与高血圧および高血圧自然発症ラット(SHR)の血圧変動性を、ヒトにおける24時間自由行動下血圧測定(ABPM)に準じて無麻酔無拘束下に解析した。8週齢のWistarラット、15週齢の自然発症高血圧ラット(SHR)とWistar-Kyotoラット(WKY)を対象に、慢性実験テレメトリー自動計測システムを用いて、大動脈に留置したカテーテルより無麻酔無拘束下に血圧と心拍数をモニターした。血圧変動性の指標として、15分毎の血圧測定値をもとに変動係数(CV)を算出した(24時間に96回血圧測定)。Wistarラットについては、14日間、Ang II(240 pmol/kg/min)を持続的に皮下投与して、血圧と心拍数のモニターを実施し、血圧値のCVを算出した。

(2) 血圧変動性増大における降圧ペプチドの役割解析

2005年から2014年の間、毎年実施された地元自治体健診の際に、任意に抽出した40

歳以上の健診受診者を対象に、同意のもと血中 ANP および BNP 濃度を測定した。心疾患の病歴や治療歴、および推算 GFR (eGFR) が 30 ml/min/1.73 m² 未満を除外基準とした。それらの対象者の中から、血中濃度測定の年を含めて過去 7 年間に、6 回以上の健診を受診していた住民 314 名 (男性 109 名、女性 205 名、65.3 ± 8.0 歳、平均 ± SD) を抽出した。過去 7 年間の 6 または 7 点の血圧測定値の year-by-year 変動性の指標として標準偏差 (SD)、変動係数 (CV)、average real variability (ARV) を算出し、血中 ANP および BNP 濃度との関連を調べた。

4. 研究成果

(1) 血圧変動性増大モデルの開発

Ang II 持続投与群では、7 日後および 14 日後の昼間の平均収縮期血圧 (SBP) および拡張期血圧 (DBP) が、対照群と比較して有意に上昇し、SBP および DBP の変動係数 (CV) も 2 倍以上に増加した (図 1 および図 2)。夜間の平均 SBP と DBP および SBP と DBP の CV にも同様の有意な上昇が観察された。SHR の昼間および夜間の平均 SBP および DBP は、WKY と比較して有意に上昇していたが、昼間と夜間の SBP および DBP の

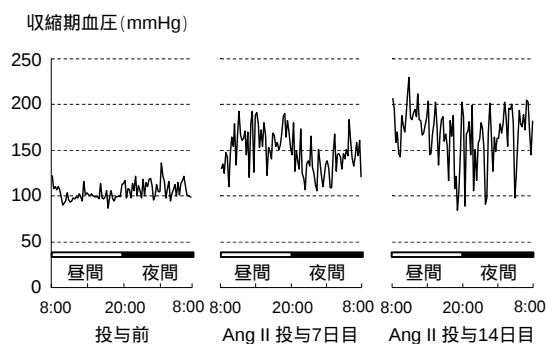


図 1. アンジオテンシン II (Ang II) による血圧の上昇と変動性の増大 (Am J Hypertens, 2016)

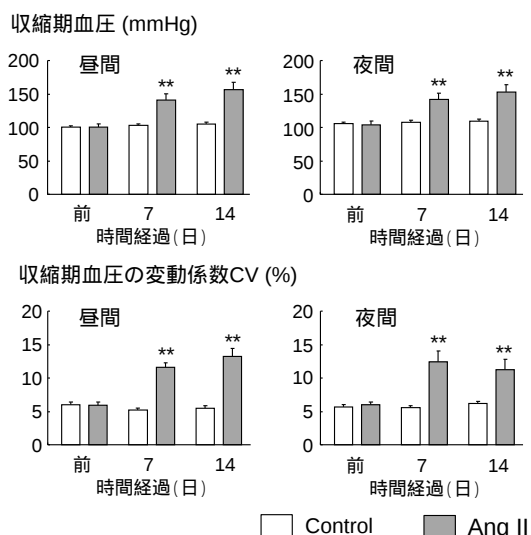


図 2. Ang II による収縮期血圧の上昇と変動性の増大 **P<0.01, vs Control (Am J Hypertens, 2016)

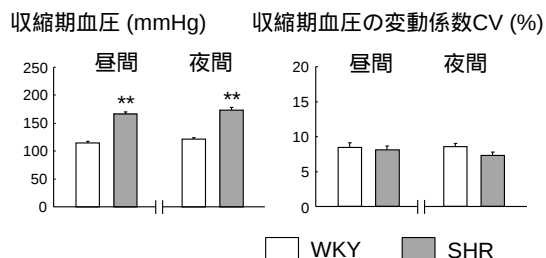


図 3. SHR と WKY の血圧と血圧変動性の比較 **P<0.01, vs WKY (Am J Hypertens, 2016)

CV には有意差がみられなかった (図 3)。

Ang II 持続投与により血圧上昇のみでなく血圧変動性が増大した (図 4)。SHR では血圧上昇にもかかわらず血圧変動性の増大が観察されなかったことより、Ang II による血圧変動性の増大は、高血圧非依存性に生じていることが示唆された (図 4)。Ang II 持続投与と高血圧ラットは、血圧変動性増大の病態生理や薬剤効果の解析に有用であると思われる。

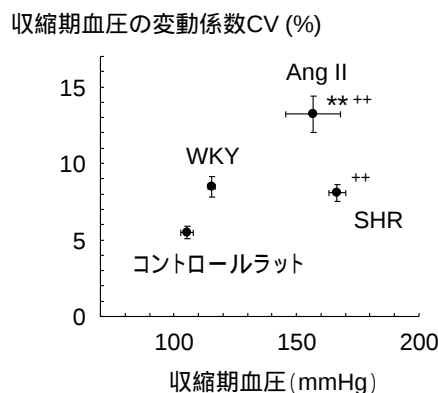


図 4. 収縮期血圧と血圧変動性の関連. **P<0.01 vs コントロールの CV, **P<0.01 vs コントロール or WKY の血圧 (Am J Hypertens, 2016)

(2) 血圧変動性増大における降圧ペプチドの役割解析

対象者の血中 ANP、BNP 濃度を、収縮期血圧 (SBP) の SD 値の四分位で比較すると、図 5 に示すように、SD 値の増加に伴い血中 ANP、BNP が共に有意に高値を示した。単回帰分析では、血中 ANP および BNP のレベルは、SBP および DBP の SD、CV、ARV のいずれの変動性指標とも有意に相関していた。一方、血中 ANP および BNP と血圧変動性との相関と比較して、ANP および BNP と過去の血圧平均値との関連は薄かった。多変量解析では、血圧変動性 (SBP の SD) は、血圧平均値、性別、年齢、BMI、腎機能 (eGFR) とは独立した有意な血中 ANP および BNP レベルの規定因子であった。

地域一般住民の血中 ANP および BNP レベルは、血圧や年齢とは独立して year-by-year の長期血圧変動性と関連していた。心疾患や腎不全のない一般住民において、血中 ANP および BNP レベルが長期血圧変動性の指標

となる可能性が示唆され、血圧変動性の増大は心臓への圧負荷または容量負荷と関連している可能性が推測された。

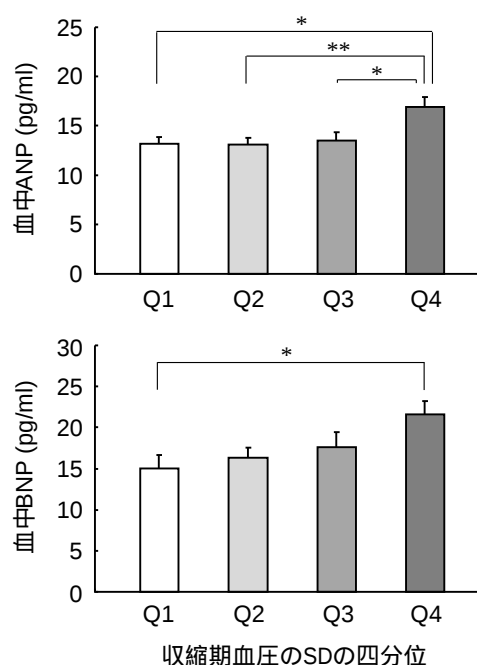


図5. 血圧変動性(収縮期血圧のSD)の四分位による血中ANPまたはBNPレベルの比較. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (*J Hum Hypertens* 2017, in press)

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、全て査読あり)

- 1) Jiang D, Kawagoe Y, Kuwasako K, Kitamura K, Kato J (2017) Inhibitory effects of losartan and amlodipine on augmentation of blood pressure variability induced by angiotensin II in rats. *Eur J Pharmacol*, in press. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.04.018.
- 2) Kato J, Kawagoe Y, Jiang D, Kuwasako K, Shimamoto S, Igarashi K, Tokashiki M, Kitamura K (2017) Plasma levels of natriuretic peptides and year-by-year blood pressure variability: a population-based study. *J Hum Hypertens*, in press, doi: 10.1038/jhh.2017.14.
- 3) Kuwasako K, Kitamura K, Nagata S, Sekiguchi T, Jiang D, Murakami N, Hattori Y, Kato J (2017) β -arrestins negatively control human adrenomedullin type 1-receptor internalization. *Biochem Biophys Res Commun*, in press doi: 10.1016/j.bbrc.2017.04.083
- 4) Jiang D, Tokashiki M, Hayashi H, Kawagoe Y, Kuwasako K, Kitamura K, Kato J (2016) Augmented blood

pressure variability in hypertension induced by angiotensin II in rats. *Am J Hypertens* 29: 163-169. doi: 10.1093/ajh/hpv102.

- 5) Kuwasako K, Sekiguchi T, Nagata S, Jiang D, Hayashi H, Murakami M, Hattori Y, Kitamura K, Kato J (2016) Inhibitory effects of two G protein-coupled receptor kinases on the cell surface expression and signaling of the human adrenomedullin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 470: 894-899. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.01.138.
- 6) Tsuruda T, Sekita-Hatakeyama Y, Hao Y, Sakamoto S, Kurogi S, Nakamura M, Udagawa N, Funamoto T, Sekimoto T, Hatakeyama K, Chosa E, Kato J, Asada Y, Kitamura K (2016) Angiotensin II stimulation of cardiac hypertrophy and functional decompensation in osteoprotegerin-deficient mice. *Hypertension* 67: 848-856. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.06689.
- 7) Ogawa N, Komura H, Kuwasako K, Kitamura K, Kato J (2015) Plasma levels of natriuretic peptides and development of chronic kidney disease. *BMC Nephrol* 16: 171. doi: 10.1186/s12882-015-0163-9.
- 8) Kawano S, Kawagoe Y, Kuwasako K, Shimamoto S, Igarashi K, Tokashiki M, Kitamura K, Kato J (2015) Gender-related alterations in plasma adrenomedullin level and its correlation with body weight gain. *Endocr Connect* 4: 43-49. doi: 10.1530/EC-14-0131.
- 9) Kato J, Kitamura K (2015) Bench-to-bedside pharmacology of adrenomedullin. *Eur J Pharmacol* 764: 140-148. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.06.061.
- 10) Kubo K, Tokashiki M, Kuwasako K, Tamura M, Tsuda S, Kubo S, Yoshizawa-Kumagaye K, Kato J, Kitamura K (2014) Biological properties of adrenomedullin conjugated with polyethylene glycol. *Peptides* 57: 118-121. doi: 10.1016/j.peptides.2014.05.005.
- 11) Koyama S, Tsuruda T, Ideguchi T, Kawagoe J, Onitsuka H, Ishikawa T, Date H, Hatakeyama K, Asada Y, Kato J, Kitamura K (2014) Osteoprotegerin is secreted into the coronary circulation: a possible association with the renin-angiotensin system and

cardiac hypertrophy. Horm Metab Res
46: 581-586. doi:
10.1055/s-0034-1375611.

〔図書〕(計1件)

- 1) Kato J (2014) Natriuretic peptides.
Caplan M (ed), Reference Module in
Biomedical Sciences, Elsevier, London,
doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.0397
2-6.

〔産業財産権〕

○出願状況(計2件)

名称：高血圧ならびに血圧変動性増大を備え
たモデル動物、およびこれを用いた評価方法
発明者：加藤 丈司、姜 丹鳳
権利者：国立大学法人宮崎大学
種類：特許
番号：特願 2015-076673
出願年月日：2015 年 4 月 3 日
国内外の別：国内

名称：長時間作用型アドレノメデュリン誘
導体
発明者：北村和雄，加藤丈司，久保恵是，桑
迫健二，久保茂，熊谷久美子
権利者：国立大学法人宮崎大学
種類：特許
番号：PCT/JP2015/058416
出願年月日：2015 年 3 月 20 日
国内外の別：国際

〔その他〕

ホームページ等
[http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/peptides/
katou/jp/](http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/peptides/katou/jp/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 丈司 (KATO, Johji)
宮崎大学・フロンティア科学実験総合センタ
ー・教授
研究者番号：20274780