

ular mechanism of the LDL apheresis-mediated effects on endothelial cells needs to be further investigated, these results suggest that the long-term effects of LDL apheresis on endothelial cell functions through the activation of eNOS contribute to the improvement in peripheral circulation.

The role of angiogenesis in atherosclerosis remains controversial.²⁵ Angiogenic cytokine therapy has been widely regarded as an attractive approach to treating ischemic heart disease and PAD.²⁶ Furthermore, a variety of studies suggest that neovascularization contributes to the growth of atherosclerotic lesions.^{27,28} We did not find any change in tube formation activity in HUVECs cultured with the serum collected during the study period in either group. Although the angiogenic cytokines VEGF and HGF stimulate angiogenesis events such as tube formation, as well as the activation of eNOS and proliferation in endothelial cells, the concentrations of VEGF and HGF were not affected by LDL apheresis in this study. Previous studies have reported differential effects of antiangiogenic factors that preserved endothelial proliferation but inhibited tube formation capacity.^{29,30} The results of this study suggested that LDL apheresis increased activated eNOS protein expression and proliferative activity without a promotion of angiogenic properties and that the activating effects of LDL apheresis and the angiogenic cytokines VEGF and HGF occur through different mechanisms. Additional studies are necessary to address the molecular mechanisms of this differential activating effect of LDL apheresis on endothelial cells, including identification of the responsible factor(s) involved.

Although the absolute walking distance and ABI still remained significantly improved in the responders at 3 months after the 10th apheresis compared with at baseline, the LDL apheresis-mediated decrease in the oxidized LDL, CRP, and fibrinogen concentrations lasted until the 10th apheresis, but it did not persist at 3 months after the 10th apheresis. With respect to endothelial cellular function in the responders, although the proliferative activity, as estimated by BrdUrd incorporation, was significantly activated at 3 months after the 10th apheresis in comparison with baseline (Figure 2), the increase in the activated eNOS protein level at 3 months after the 10th session did not reach statistical significance compared with baseline (Figure 1). Thus, there is a discrepancy between the long-term therapeutic effects of LDL apheresis on clinical parameters, including walking distance and ABI, and the improvements in laboratory and endothelial functional parameters, including oxidized LDL, CRP, fibrinogen, and activated eNOS expression.

However, significant correlations were found between walking distance and laboratory parameters, including oxidized LDL and fibrinogen, and significant relationships were also disclosed between the activated eNOS protein level, one of the endothelial functional parameters, and walking distance and ABI in the responders (Figure 3). These results suggests that the long-term therapeutic effects of LDL apheresis may involve the chronic reduction

of oxidized LDL and fibrinogen and a relatively sustained activation of eNOS protein in endothelial cells.

On the other hand, there was no significant correlation between BrdUrd incorporation, which is an index of endothelial proliferative activity, and ABI or walking distance in the responders, and this may be one of the reasons why BrdUrd incorporation was significantly increased by incubation with the responder serum collected 3 months after the 10th apheresis, but not that collected at the 1st and 10th aphereses, compared with the serum at baseline (Figure 2). Thus, there is a possibility that other factors that have not identified in this study play a critical role in mediating the long-term therapeutic effects of LDL apheresis on endothelial cellular function. Also, the components of the nonresponders' serum responsible for the insufficient clinical improvement by LDL apheresis remain to be determined. Therefore, additional studies, such as microarray analysis, are necessary to address these important issues.

A limitation of the present study is that it did not examine the effects of LDL apheresis on other in vitro endothelial functions, including the expression of proinflammatory adhesion molecules, reactive species production, and NADPH oxidase expression in HUVECs, or on in vivo endothelial function, such as forearm endothelium-dependent vasodilatation. Another limitation is the lack of a control therapy group, and the general applicability of the results thus awaits further confirmation by a study with a larger number of patients. In conclusion, the results of the present study suggest that the long-term therapeutic effects of LDL apheresis on patients with end-stage renal disease who have PAD are at least partly dependent on the sustained reduction of oxidized LDL and inflammatory stress, along with the activated eNOS-mediated improvement of endothelial cell function. Because the activation of endothelial cells is an important strategy for suppression of the atherosclerotic vascular process,³¹ further efforts to improve the therapeutic efficacy of LDL apheresis are warranted.

Sources of Funding

This study was supported by grants from the Japan Society for the Promotion of Science, the Yokohama Foundation for Advancement of Medical Science, Takeda Science Foundation, Salt Science Research Foundation (No. 0911), The Kidney Foundation, Japan (JKFB09-25), Mitsubishi Pharma Research Foundation, and the Strategic Research Project of Yokohama City University.

Disclosures

None.

References

1. Agishi T, Kitano Y, Suzuki T, Miura A, Murakami J, Minagawa H, Ban K. Improvement of peripheral circulation by low density lipoprotein adsorption. *ASAIO Trans*. 1989;35:349–351.
2. Kroon AA, van Asten WN, Stalenhoef AF. Effect of apheresis of low-density lipoprotein on peripheral vascular disease in hypercholesterolemic patients with coronary artery disease. *Ann Intern Med*. 1996;125:945–954.

3. Kizaki Y, Ueki Y, Yoshida K, Yano M, Matsumoto K, Miyake S, Tominaga Y, Eguchi K, Yano K. Does the production of nitric oxide contribute to the early improvement after a single low-density lipoprotein apheresis in patients with peripheral arterial obstructive disease? *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1999;10:341-349.
4. Sampietro T, Tuoni M, Ferdeghini M, Ciardi A, Marraccini P, Prontera C, Sassi G, Taddei M, Bionda A. Plasma cholesterol regulates soluble cell adhesion molecule expression in familial hypercholesterolemia. *Circulation*. 1997;96:1381-1385.
5. Tamai O, Matsuoka H, Itabe H, Wada Y, Kohno K, Imaizumi T. Single LDL apheresis improves endothelium-dependent vasodilatation in hypercholesterolemic humans. *Circulation*. 1997;95:76-82.
6. Suhara T, Fukuo K, Sugimoto T, Morimoto S, Nakahashi T, Hata S, Shimizu M, Ogihara T. Hydrogen peroxide induces up-regulation of Fas in human endothelial cells. *J Immunol*. 1998;160:4042-4047.
7. Tanaka Y, Tamura K, Koide Y, Sakai M, Tsurumi Y, Noda Y, Umemura M, Ishigami T, Uchino K, Kimura K, Horiuchi M, Umemura S. The novel angiotensin II type 1 receptor (AT1R)-associated protein ATRAP down-regulates AT1R and ameliorates cardiomyocyte hypertrophy. *FEBS Lett*. 2005;579:1579-1586.
8. Tsurumi Y, Tamura K, Tanaka Y, Koide Y, Sakai M, Yabana M, Noda Y, Hashimoto T, Kihara M, Hirawa N, Toya Y, Kiuchi Y, Iwai M, Horiuchi M, Umemura S. Interacting molecule of AT1 receptor, ATRAP, is colocalized with AT1 receptor in the mouse renal tubules. *Kidney Int*. 2006;69:488-494.
9. Azuma K, Tamura K, Shigenaga A, Wakui H, Masuda S, Tsurumi-Ikeya Y, Tanaka Y, Sakai M, Matsuda M, Hashimoto T, Ishigami T, Lopez-Illasaca M, Umemura S. Novel regulatory effect of angiotensin II type 1 receptor-interacting molecule on vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. 2007;50:926-932.
10. Szmítko PE, Wang CH, Weisel RD, Jeffries GA, Anderson TJ, Verma S. Biomarkers of vascular disease linking inflammation to endothelial activation: Part II. *Circulation*. 2003;108:2041-2048.
11. Stocker R, Kearney JF Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev*. 2004;84:1381-1478.
12. Himmelfarb J. Linking oxidative stress and inflammation in kidney disease: which is the chicken and which is the egg? *Semin Dial*. 2004;17:449-454.
13. Chavakis E, Dernbach E, Hermann C, Mondorf UF, Zeiher AM, Dimmeler S. Oxidized LDL inhibits vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration by an inhibitory effect on the Akt/endothelial nitric oxide synthase pathway. *Circulation*. 2001;103:2102-2107.
14. Chen J, Mehta JL, Haider N, Zhang X, Narula J, Li D. Role of caspases in Ox-LDL-induced apoptotic cascade in human coronary artery endothelial cells. *Circ Res*. 2004;94:370-376.
15. Akishita M, Nagai K, Xi H, Yu W, Sudoh N, Watanabe T, Ohara-Imaizumi M, Nagamatsu S, Kozaki K, Horiuchi M, Toba K. Renin-angiotensin system modulates oxidative stress-induced endothelial cell apoptosis in rats. *Hypertension*. 2005;45:1188-1193.
16. Zambon A, Gervois P, Pauletto P, Fruchart JC, Staels B. Modulation of hepatic inflammatory risk markers of cardiovascular diseases by PPAR-alpha activators: clinical and experimental evidence. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:977-986.
17. Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation*. 2000;102:2165-2168.
18. Languino LR, Plescia J, Duperray A, Brian AA, Plow EF, Geltosky JE, Altieri DC. Fibrinogen mediates leukocyte adhesion to vascular endothelium through an ICAM-1-dependent pathway. *Cell*. 1993;73:1423-1434.
19. Venugopal SK, Devaraj S, Yuhanna I, Shaul P, Jialal I. Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells. *Circulation*. 2002;106:1439-1441.
20. Kojima S, Shida M, Yokoyama H. Changes in C-reactive protein plasma levels during low-density lipoprotein apheresis. *Ther Apher Dial*. 2003;7:431-434.
21. Kobayashi S, Moriya H, Negishi K, Maesato K, Ohtake T. LDL-apheresis up-regulates VEGF and IGF-I in patients with ischemic limb. *J Clin Apher*. 2003;18:115-119.
22. Otto C, Geiss HC, Empen K, Parhofer KG. Long-term reduction of C-reactive protein concentration by regular LDL apheresis. *Atherosclerosis*. 2004;174:151-156.
23. Hara T, Kiyomoto H, Hitomi H, Moriaki K, Ihara G, Kaifu K, Fujita Y, Higashiyama C, Nishiyama A, Kohno M. Low-density lipoprotein apheresis for haemodialysis patients with peripheral arterial disease reduces reactive oxygen species production via suppression of NADPH oxidase gene expression in leucocytes. *Nephrol Dial Transplant*. 2009;24:3818-3825.
24. Kone BC, Kuncewicz T, Zhang W, Yu ZY. Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003;285:F178-F190.
25. Khurana R, Simons M, Martin JF, Zachary IC. Role of angiogenesis in cardiovascular disease: a critical appraisal. *Circulation*. 2005;112:1813-1824.
26. Simons M, Ware JA. Therapeutic angiogenesis in cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2:863-871.
27. Moreno PR, Purushothaman KR, Fuster V, Echeverri D, Trusczyńska H, Sharma SK, Badimon JJ, O'Connor WN. Plaque neovascularization is increased in ruptured atherosclerotic lesions of human aorta: implications for plaque vulnerability. *Circulation*. 2004;110:2032-2038.
28. Tenaglia AN, Peters KG, Sketch MH Jr, Annex BH. Neovascularization in atherectomy specimens from patients with unstable angina: implications for pathogenesis of unstable angina. *Am Heart J*. 1998;135:10-14.
29. Roomi MW, Ivanov V, Kalinovsky T, Niedzwiecki A, Rath M. Anti-angiogenic effects of a nutrient mixture on human umbilical vein endothelial cells. *Oncol Rep*. 2005;14:1399-1404.
30. Tsuzuki T, Shibata A, Kawakami Y, Nakagawa K, Miyazawa T. Conjugated eicosapentaenoic acid inhibits vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis by suppressing the migration of human umbilical vein endothelial cells. *J Nutr*. 2007;137:641-646.
31. Ehsan A, Mann MJ, Dell'Acqua G, Tamura K, Braun-Dullaeus R, Dzau VJ. Endothelial healing in vein grafts: proliferative burst unimpaird by genetic therapy of neointimal disease. *Circulation*. 2002;105:1686-1692.

Supplement Material

Sustained Inhibition of Oxidized Low-density Lipoprotein Is Involved in the Long-term Therapeutic Effects of Apheresis in Dialysis Patients

Yuko Tsurumi-Ikeya*, MD, PhD; Kouichi Tamura*, MD, PhD;

Koichi Azuma, MD, PhD; Hiroshi Mitsuhashi, MD; Hiromichi Wakui, MD;

Ichiro Nakazawa, MD, PhD; Teruyasu Sugano, MD; Yasuyuki Mochida, MD; Toshiaki Ebina, MD, PhD; Nobuhito Hirawa, MD, PhD; Yoshiyuki Toya, MD; Kazuaki Uchino, MD; Satoshi Umemura, MD.

*Tsurumi-Ikeya Y and Tamura K equally contributed to this work.

Department of Medical Science and Cardiorenal Medicine, Yokohama City University
Graduate School of Medicine, Yokohama, Japan

Address for correspondence:

Kouichi Tamura, MD, PhD, FAHA

Department of Medical Science and Cardiorenal Medicine, Yokohama City University
Graduate School of Medicine,

3-9 Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama 236-0004, JAPAN

Phone: +81-45-787-2635; Fax: +81-45-701-3738;

E-mail: tamukou@med.yokohama-cu.ac.jp

Supplemental Figure Legends

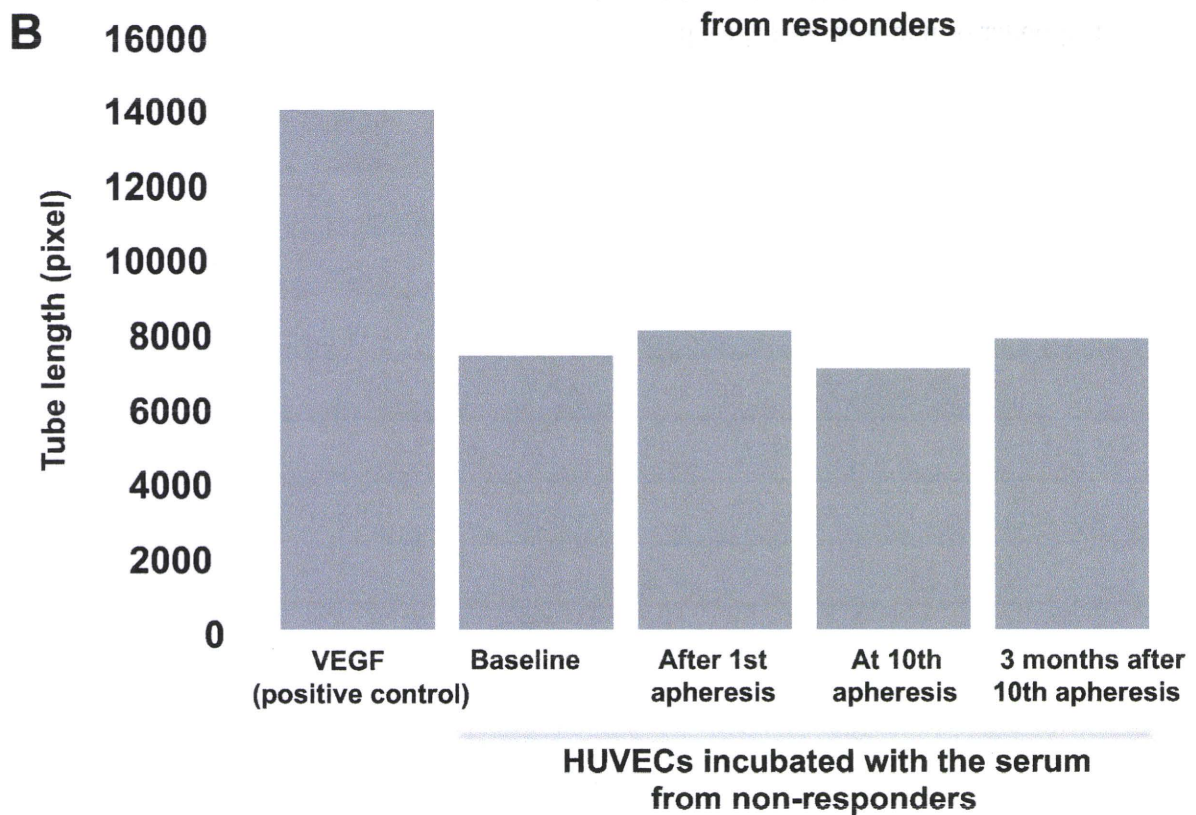
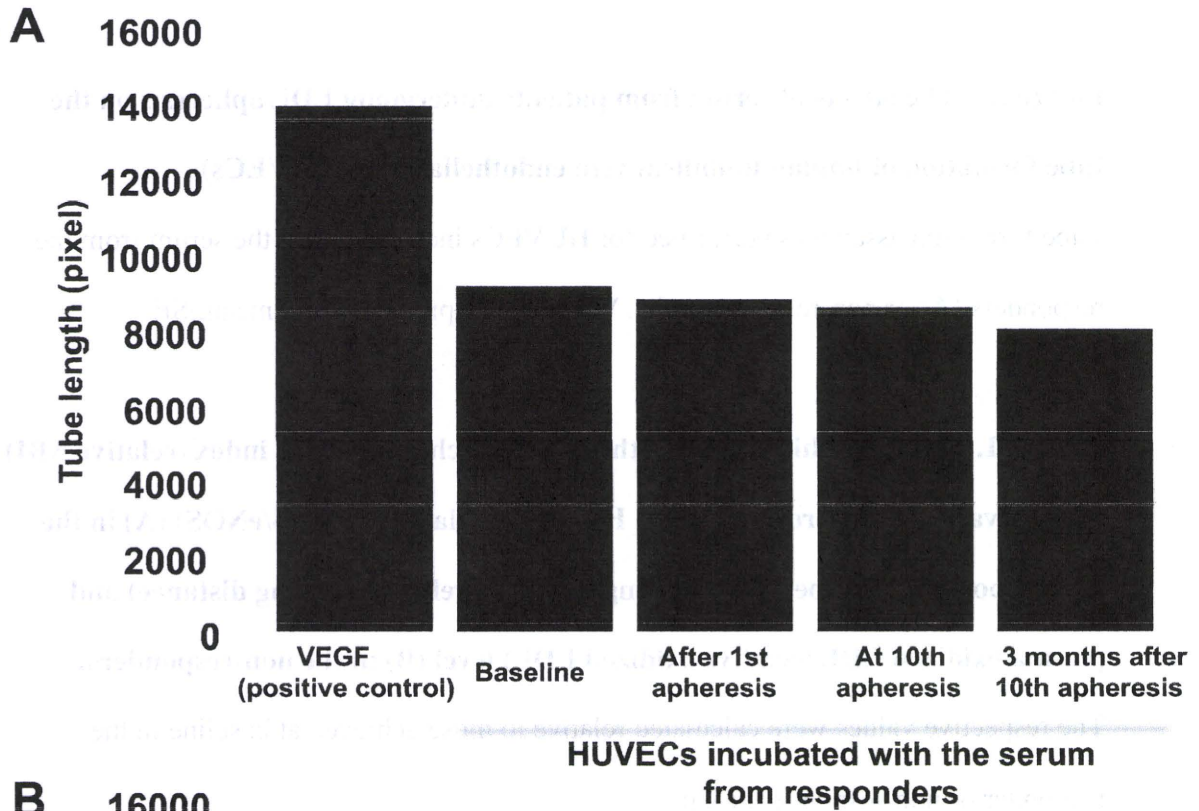
Figure I. The effects of serum from patients undergoing LDL apheresis on the tube formation of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs).

Tube formation assay was performed for HUVECs incubated with the serum from the responders (A) or non-responders (B). Values are expressed as the mean \pm SE.

Figure II. Relationships between the ankle-brachial pressure index (relative ABI) and activated eNOS protein level in HUVECs (relative p-eNOS/eNOS) (A) in the non-responders, and between walking distance (relative walking distance) and plasma oxidized LDL (relative oxidized LDL) level (B) in the non-responders.

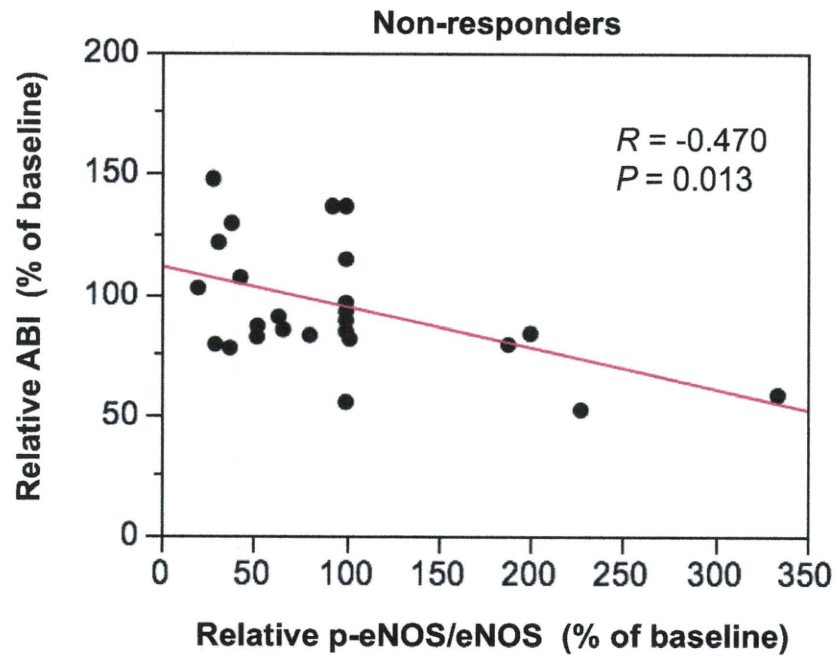
The respective values were calculated relative to those achieved at baseline in the responder or non-responder group.

Supplemental Figure I

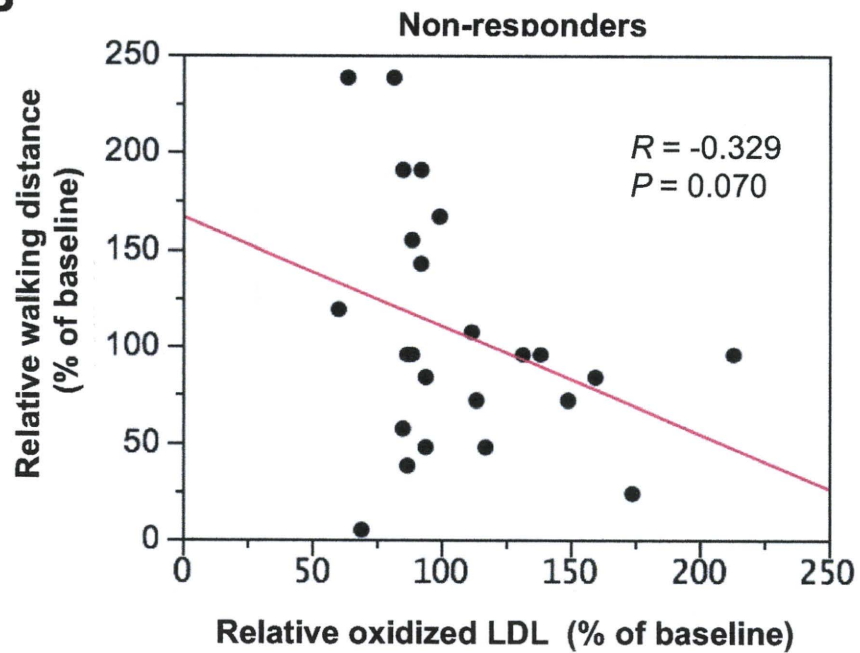


Supplemental Figure II

A



B



特集：腎とレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系

腎内アンジオテンシンⅡ受容体の分布と機能 —AT1, AT2, ATRAP—

出島 徹 涌井広道 増田真一郎 田村功一
梅村 敏

はじめに

アンジオテンシンⅡ(AngⅡ)は血行動態への作用と尿細管への作用を介して、腎臓の濾過機能調節に重要な役割を演じている。輸出入細動脈のいずれにおいてもAngⅡはAT1受容体を介して収縮を引き起こし、AT2受容体を介して収縮を減弱させるように働いている。しかしながら、AT1受容体結合後の血管収縮機序や収縮を抑制する内因性制御機構は両細動脈、さらには皮質と髄質で全く異なっている。このような違いにより輸出入細動脈に対するAngⅡの作用は均一でなくなるが、この不均一性が生理的・病態生理的に重要である。さらに興味深いことに、AngⅡは近位尿細管においてはAT1受容体の数をアップレギュレーションしNa再吸収を促進するが、血管系のAT1受容体はダウンレギュレーションし、過度の血管収縮は起こらず腎循環は保たれることになる。このような精巧な制御を介してAngⅡはNaバランスを保つように作動している。

本稿では、腎内AngⅡ受容体の分布と機能について概説し、さらにAT1受容体に直接結合して、その機能を制御している可能性の高い新規因子、ATRAP(angiotensinⅡ type 1 receptor-associated protein)に関して、その腎臓における働きについて述べる。

AT1受容体

AngⅡ受容体のクローニングは、アンジオテンシン研究者にとって長年の大きな課題であったが、1991年になり、

The intrarenal distribution and functional role of AT1 receptor, AT2 receptor, and ATRAP

横浜市立大学医学部循環器・腎臓内科学

Inagami, Alexanderらのグループにより、ウシ副腎、ラット平滑筋から発現クローニング法を用いて、AT1受容体のcDNAが得られ、AT1受容体が7回膜貫通型受容体であることが初めて明らかとなり^{1,2)}、このAT1受容体のクローニングにより、アンジオテンシン研究がさらに活性化された。

マウス、ラットでは異なる遺伝子に由来する、よく似たアイソフォームが存在することが証明され、AT1aおよびAT1b受容体と呼ばれている³⁾。両者の差異は、主に組織分布の差であり、AT1a受容体は肺、血管平滑筋、腎臓、肝臓、脳などで多く発現され、AT1b受容体は特に下垂体と副腎に多い。分子構造は、AT1a、AT1b受容体は共に359個のアミノ酸で構成され、7回膜貫通型受容体であり、主な差異はC末端部の18個のアミノ酸の相違である。AngⅡ、各種アゴニスト、アンタゴニストに対する結合様式にも差異は認められない。AT1a受容体欠損マウスでは傍糸球体細胞過形成、腎レニン発現亢進、収縮期血圧低下が認められるが、アンジオテンシンノーゲン欠損マウスのレベルまで血圧が低下せず⁴⁻⁶⁾、興味深いことに、AT1b受容体欠損マウスでの血圧は野生型と同じであるが⁷⁾、AT1a受容体、AT1b受容体のダブルノックアウトマウスでは、アンジオテンシンノーゲン欠損マウスのレベルまで血圧が低下し、AngⅡによる昇圧反応はみられなくなる⁸⁾。

腎臓におけるAT1受容体は主に近位尿細管、ヘンレ係蹄の上行脚の太い部分、糸球体、動脈脈管系、直細動脈、弓状動脈、および傍糸球体細胞に局在している⁹⁾。齧歯動物においては、AT1a受容体はすべてのネフロンセグメントに存在し、AT1b受容体は糸球体でのみAT1a受容体より発現量が多い¹⁰⁾。成熟した腎臓では、AT1a受容体はネフロンのいくつかのセグメントの管腔と側底膜に局在し、さら

に腎皮質と腎髄質の双方の微小血管, 輸入・輸出細動脈の平滑筋細胞, ヘンレの上行脚の上皮細胞, 近位尿細管の apical membrane (刷子縁膜側) と basolateral membrane (側基底膜側), メサンギウム細胞, 遠位尿細管, 集合管, および緻密斑細胞にも発現している^{11~13}。

以上のように, AT1 受容体は腎臓の尿細管, 糸球体, 動脈などに広く分布しているが, 尿管における AT1 受容体は, 尿管でのナトリウム再吸収の増加, 腎髄質血流の増加, および尿管細胞の肥大などにかかわっている。

一方, 腎糸球体においては, AT1 受容体を介した刺激がポドサイトのスリット膜構成分子であるネフリン発現の低下, スリット膜のバリアー機能の低下を引き起こし, 蛋白尿の増加に寄与している¹⁴。また, 微量アルブミン尿を伴う 2 型糖尿病ラットを用いた実験で, 腎内 Ang II がポドサイト異常やアルブミン尿の進行に関与しているとの報告がある¹⁵。

さらに, 機能ネフロンが減少すると残存ネフロンに過剰濾過が加わり, 糸球体高血圧になり, 蛋白濾過量増加, 内皮細胞障害, メサンギウム細胞増殖, メサンギウム基質増加が生じ, 糸球体硬化が進行する。

腎間質における線維芽細胞にも AT1 受容体は発現しており, 間質の線維化に関与する。また, Ang II の AT1 受容体を介した腎障害が, 血漿中の Ang II 濃度に依存せず, 腎間質中の Ang II 濃度に依存していることが確認されている¹⁶。

さらに, 腎臓における酸化ストレスに AT1 受容体に関与しているとの報告¹⁷や, Ang II の AT1 受容体を介した刺激が NADPH オキシダーゼを活性化し, 傍髄質ネフロンの太いヘンレ脚における $O_2^{\cdot-}$ 産生に寄与しているとの報告がある¹⁸。Wistar-Kyoto ラットの皮下に浸透圧ポンプを植え込み Ang II を負荷したところ, 腎皮質において NADPH オキシダーゼの細胞膜コンポーネントである p22phox の増加が認められた。これは, AT1 受容体活性化による NADPH オキシダーゼを介した活性酸素種の産生が関与しているものと考えられる。

AT2 受容体

AT2 受容体は 1993 年に一次構造が解明された 363 個のアミノ酸より構成される G 蛋白質共役型受容体 (G protein coupled receptor: GPCR) であるが, AT1 受容体とのアミノ酸配列の相同性は膜貫通領域を除くと低く, 全体として 34% に過ぎない。AT2 受容体は, 胎生期には種々の組織で

高い発現を認めるが, 出生後急速に減少し, 成熟個体では脳, 子宮などに発現を認めるものの, 正常の心血管系組織での発現は少ない¹⁹。しかしながら, 組織障害やモデリングなどの病的状態において再び発現が誘導されることが報告されており, 臓器障害の修復や再生に関与している可能性が考えられる²⁰。AT2 受容体の細胞内情報伝達機構については不明な点が多いが, AT1 受容体がさまざまな蛋白質リン酸化酵素を活性化するのに対して, AT2 受容体は mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) や SH2 domain-containing phosphatase-1 (SHP-1) などの蛋白質脱リン酸化酵素を G 蛋白質共役ないし非共役の機序で活性化して ERKs 活性を抑制する。また, 血管系の細胞において, AT2 受容体は Ang II 刺激による細胞内酸性化によりキニン産生酵素を活性化し, ブラジキニンや NO の産生を増加させ血管拡張をすることを考えられている。

生体の腎における AT2 受容体の発現については, 成体ラット腎による実験での報告には論議がある。当初, ラジオリガンド結合アッセイによる検討で, 成体ラット腎に AT2 受容体は存在しないといわれていたが, その後, 免疫組織染色法により, 少ないながらも糸球体および尿管に発現していることが示された²¹。さらに, マイクロダイセクション法および RT-PCR 法により, 腎内に広範囲に発現していることが明らかにされ²², AT2 受容体選択的リガンドによるオートラジオグラフィによっても発現が確認された²³。ヒト正常腎皮質における *in situ* hybridization での検討では, AT2 受容体の mRNA レベルでの発現量は, AT1 受容体の 1/10~1/8 程度であり, 特に小葉間動脈で高発現であった²⁴。

腎での AT2 受容体の機能はほとんど解明されていないが, ラット腎における AT2 受容体の活性化が Ang II により惹起される NADPH オキシダーゼを軽減することや¹⁷, AT2 受容体遺伝子欠損マウスに 5/6 腎摘出術を施行した慢性腎臓病 (chronic kidney disease: CKD) モデルでの検討において, 野生種のマウスと比較して, 血圧や糸球体容積, AT1 受容体およびレニン発現量, 内皮型一酸化窒素合成酵素 (endothelial nitric oxide synthase: eNOS) は同等であるにもかかわらず, AT2 受容体遺伝子欠損マウスでは, 腎機能の低下, 糸球体障害, 蛋白尿が高度であり, 死亡率も有意に高かったことなどが報告されている²⁵。これらのことは, 腎における AT2 受容体の活性化が, CKD の新たな治療標的となる可能性を示唆しており, 今後さらに研究が進むことが期待される。

また, AT2 受容体に結合する機能的蛋白がいくつか同定

されている。その一つである ATIP (AT2 receptor-interacting protein) は、ミトコンドリアで発現し抗腫瘍作用をもつ MTUS1 (mitochondrial tumor suppressor gene 1), および AT2 受容体の細胞膜への移動を促進している ATBP50 (AT2 receptor binding protein of 50 kDa) と同分子で、AT2 受容体の細胞増殖抑制作用を増強すると考えられている²⁶⁾。ATIP は AT2 受容体の発現と異なり、種々の臓器で広く発現しているため、AT2 受容体依存性および非依存性の作用があると考えられるが、実際に、生体内の腎においてどのような機能を果たしているかは不明である。また、同じく AT2 受容体の C 末端に結合する蛋白として同定された転写因子 promyelocytic zinc finger protein (PLZF) は、Ang II 刺激により AT2 受容体と結合し、核内に移動して p85 α PI3K 発現を増加させ、心肥大を促進する可能性が指摘されている²⁷⁾。しかしながら、PLZF の発現は組織特異的であり、心、肝、大腸などで認められるが腎では認められない。

ATRAP

近年、レニン・アンジオテンシン系の新規活性制御因子の探索において、AT1 受容体に直接結合して、その機能を制御している可能性の高い新規因子が発見され、ATRAP (angiotensin II type 1 receptor-associated protein) と命名された。

ATRAP はマウス腎から作製された cDNA ライブラリを用いて、AT1 受容体 C 末端の細胞質内ドメインを bait とする yeast two-hybrid system による遺伝子クローニングによって、AT1 受容体に特異的に結合する因子として同定された。マウス ATRAP cDNA は 483 塩基対から成り、検索による有意な相同性が認められる遺伝子は存在しなかった²⁸⁾。

マウス ATRAP アミノ配列からのコンピュータによる立体構造予測では、N 末端には細胞外ドメインがあり、3 回膜を貫通した後、C 末端側に細胞質内ドメインを持つ珍しい構造であることが推測された。また、AT1 受容体と ATRAP の欠変異体を用いての検討では、AT1 受容体の C 末端 (339-359) と ATRAP の C 末端 (110-120) 細胞質内ドメインをそれぞれ欠損させた場合に結合能が失われたことより、C 末端側同士が ATRAP と AT1 受容体の結合に重要であることが示唆された。また、ATRAP は AT1 受容体に特異的に結合し、AT2 受容体、エンドセリン ETB 受容体、あるいはカテコールアミン β_2 受容体などに結合能を持たないことも示されている。

表 腎における ATRAP と AT1 受容体の局所発現

	ATRAP		AT1R
	mRNA	Protein	Protein
Glomerulus			
Podocyte	++	-	+
Mesangial cell	+	-	+
Renal tubule			
Bowman's capsule	++	++	+
PCT	+	+	+
PST	+	++	++
MTAL	++	+	+
DCT	++	++	++
CCD	++	++	++
OMCD	++	++	+
IMCD	+	±	+
Vasculature (arcuate artery, interlobular arteries, intralobular arteries, eff. and aff.)			
Vascular endothelial cell	±	-	-
Vascular smooth muscle cell	±	-	++
Interstitial cell	±	-	+

PCT : proximal convoluted tubule 近位曲尿細管

PST : proximal straight tubule 近位直尿細管

DCT : distal convoluted tubule 遠位曲尿細管

CCD : cortical collecting duct 皮質集合管

OMCD : outer medullary collecting duct 髓質外層集合管

IMCD : inner medullary collecting duct 髓質内層集合管

eff. : efferent arterioles 輸出細動脈

aff. : afferent arterioles 輸入細動脈

ATRAP 蛋白の検出のために作製されたポリクローナル抗マウス ATRAP 抗体による Western blot 法による検討では、*in vitro* transcribed/translated ATRAP 蛋白、培養細胞に遺伝子導入された ATRAP 蛋白、細胞・組織内に発現している内在性 ATRAP 蛋白について、約 18 kDa の単一バンドの同定と吸収試験による消失が確認され、ATRAP 蛋白に由来する特異的なバンドの検出が可能となった²⁹⁾。また、このポリクローナル抗マウス ATRAP 抗体による免疫染色法と *in situ* hybridization 法により、マウス腎臓における ATRAP mRNA 遺伝子発現が明らかとなり、ATRAP は AT1 受容体と同様に尿細管を中心として広範囲に分布していることが確認された(表)。一方で、ヒト腎臓における ATRAP の分布や機能についての検討は、現在も不明な点が多く、全腎における Northern blot 法による RNA の検出の報告にとどまっている³⁰⁾。

細胞レベルの実験では、内在性の ATRAP や遺伝子導入

された ATRAP は主に滑膜小胞体やゴルジ体などの核周囲小胞膜上に存在し、細胞内に移動してきた AT1 受容体を持続的に捕捉することにより、結果として AT1 受容体の internalization を促進する。ATRAP を過剰発現させた心血管系細胞での検討では、Ang II 刺激による AT1 受容体の細胞内伝達応答とされる c-fos プロモータ活性化、TGF- β 産生亢進などの心肥大、動脈硬化反応の抑制が観察された^{31~33})。また *in vivo* では、全身性に ATRAP を過剰発現させたトランスジェニックマウスにおいて、血管障害による動脈硬化病変が軽減されたことが報告されている³⁴)。さらに、C57BL/6J マウスに対し塩分制限を 2 週間試みた *in vivo* 実験では、全腎における AT1 受容体の蛋白発現とともに ATRAP の蛋白発現が減少しており、尿細管における ATRAP 発現 Na 再吸収がかかわりを持つ可能性が示唆され、現在、尿細管細胞での機能解析を行っている。

おわりに

腎内 Ang II 受容体の分布と機能、さらに AT1 受容体結合性機能制御因子 ATRAP の腎臓における機能について概説した。今後は、AT1 受容体および AT2 受容体への Ang II 受容体結合性機能制御因子の分子レベルでの作用機序および生体機能についての解析、さらには生体における AT1 受容体と AT2 受容体との相互作用における Ang II 受容体結合性機能制御因子の機能的役割、および病態生理学的意義の検討を含めた詳細な研究の進展も注目される。

文献

- Sasaki K, Yamano Y, Bardhan S, Iwai N, Murray JJ, Hasegawa M, Matsuda Y, Inagami T. Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor. *Nature* 1991; 351: 230-233.
- Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK, Runge MS, Bernstein KE. Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature* 1991; 351: 233-236.
- de Gasparo M, Husain A, Alexander W, Catt KJ, Chiu AT, Drew M, Goodfriend T, Harding JW, Inagami T, Timmermans PB. Proposed update of angiotensin receptor nomenclature. *Hypertension* 1995; 25: 924-927.
- Ito M, Oliverio MI, Mannon PJ, Best CF, Maeda N, Smithies O, Coffman TM. Regulation of blood pressure by the type 1A angiotensin II receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 3521-3525.
- Sugaya T, Nishimatsu S, Tanimoto K, Takimoto E, Yamagishi T, Imamura K, Goto S, Imaizumi K, Hisada Y, Otsuka A, Uchida H, Sugiura M, Fukuta K, Fukamizu A, Murakami K. Angiotensin II type 1a receptor-deficient mice with hypotension and hyperreninemia. *J Biol Chem* 1995; 270: 18719-18722.
- Tanimoto K, Sugiyama F, Goto Y, Ishida J, Takimoto E, Yagami K, Fukamizu A, Murakami K. Angiotensinogen-deficient mice with hypotension. *J Biol Chem* 1994; 269: 31334-31337.
- Chen X, Li W, Yoshida H, Tsuchida S, Nishimura H, Takimoto F, Okubo S, Fogo A, Matsusaka T, Ichikawa I. Targeting deletion of angiotensin type 1B receptor gene in the mouse. *Am J Physiol* 1997; 272: F299-304.
- Tsuchida S, Matsusaka T, Chen X, Okubo S, Niimura F, Nishimura H, Fogo A, Utsunomiya H, Inagami T, Ichikawa I. Murine double nullizygotes of the angiotensin type 1A and 1B receptor genes duplicate severe abnormal phenotypes of angiotensinogen nullizygotes. *J Clin Invest* 1998; 101: 755-760.
- Tufro-McReddie A, Harrison JK, Everett AD, Gomez RA. Ontogeny of type 1 angiotensin II receptor gene expression in the rat. *J Clin Invest* 1993; 91: 530-537.
- Bouby N, Hus-Citharel A, Marchetti J, Bankir L, Corvol P, Llorens-Cortes C. Expression of type 1 angiotensin II receptor subtypes and angiotensin II-induced calcium mobilization along the rat nephron. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8: 1658-1667.
- Paxton WG, Runge M, Horaist C, Cohen C, Alexander RW, Bernstein KE. Immunohistochemical localization of rat angiotensin II AT1 receptor. *Am J Physiol* 1993; 264: F989-F995.
- Harrison-Bernard LM, Navar LG, Ho MM, Vinson GP, el-Dahr SS. Immunohistochemical localization of ANG II AT1 receptor in adult rat kidney using a monoclonal antibody. *Am J Physiol* 1997; 273: F170-F177.
- Miyata N, Park F, Li XF, Cowley AW Jr. Distribution of angiotensin AT1 and AT2 receptor subtypes in the rat kidney. *Am J Physiol* 1999; 277: F437-F446.
- Suzuki K, Han GD, Miyauchi N, Hashimoto T, Nakatsue T, Fujioka Y, Koike H, Shimizu F, Kawachi H. Angiotensin II type 1 and type 2 receptors play opposite roles in regulating the barrier function of kidney glomerular capillary wall. *Am J Pathol* 2007; 170: 1841-1853.
- Nishiyama A, Nakagawa T, Kobori H, Nagai Y, Okada N, Konishi Y, Morikawa T, Okumura M, Meda I, Kiyomoto H, Hosomi N, Mori T, Ito S, Imanishi M. Strict angiotensin blockade prevents the augmentation of intrarenal angiotensin II and podocyte abnormalities in type 2 diabetic rats with microalbuminuria. *J Hypertens* 2008; 26: 1849-1859.
- Nishiyama A, Seth DM, Navar LG. Angiotensin II type 1 receptor-mediated augmentation of renal interstitial fluid angiotensin II in angiotensin II-induced hypertension. *J Hypertens* 2003; 21: 1897-1903.
- Chabrashvili T, Kitiyakara C, Blau J, Karber A, Aslam S, Welch WJ, Wilcox CS. Effects of ANG II type 1 and 2 receptors on oxidative stress, renal NADPH oxidase, and SOD

- expression. *Am J Physiol* 2003 ; 285 : R117-R124.
18. Mori T, Cowley AW Jr. Angiotensin II-NAD(P)H oxidase-stimulated superoxide modifies tubulovascular nitric oxide cross-talk in renal outer medulla. *Hypertension* 2003 ; 42 : 588-593.
 19. Matsubara H. Pathophysiological role of angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular and renal diseases. *Cir Res* 1998 ; 83 : 1182-1191.
 20. de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 2000 ; 52 : 415-472.
 21. Wang ZQ, Millatt LJ, Heiderstadt NT, Siragy HM, Johns RA, Carey RM. Differential regulation of renal angiotensin subtype AT1A and AT2 receptor protein in rats with angiotensin-dependent hypertension. *Hypertension* 1999 ; 33 : 96-101.
 22. Miyata N, Park F, Li XF, Cowley AW Jr. Distribution of angiotensin AT(1) and AT(2) receptor subtypes in the rat kidney. *Am J Physiol* 1999 ; 46 : F437-F446.
 23. Cao Z, Kelly DJ, Cox A, Casley D, Forbes JM, Martinello P, Dean R, Gilbert RE, Cooper ME. Angiotensin type 2 receptor is expressed in the adult rat kidney and promotes cellular proliferation and apoptosis. *Kidney Int* 2000 ; 58 : 2437-2451.
 24. Matsubara H, Sugaya T, Murasawa S, Nozawa Y, Mori Y, Masaki H, Maruyama K, Tsutsumi Y, Shibasaki Y, Moriguchi Y, Tanaka Y, Iwasaka T, Inada M. Tissue-specific expression of human angiotensin II AT1 and AT2 receptors and cellular localization of subtype mRNAs in adult human renal cortex using *in situ* hybridization. *Nephron* 1998 ; 80 : 25-34.
 25. Benndorf RA, Krebs C, Hirsch-Hoffmann B, Schwedhelm E, Cieslar G, Schmidt-Haupt R, Steinmetz OM, Meyer-Schwesinger C, Thaiss F, Haddad M, Fehr S, Heilmann A, Helmchen U, Hein L, Ehmke H, Stahl RA, Böger RH, Wenzel UO. Angiotensin II type 2 receptor deficiency aggravates renal injury and reduces survival in chronic kidney disease in mice. *Kidney Int* 2009 ; 75 : 1039-1049.
 26. Li JM, Mogi M, Tsukuda K, Tomochika H, Iwanami J, Min LJ, Nahmias C, Iwai M, Horiuchi M. Angiotensin II-induced neural differentiation via angiotensin II type 2(AT2) receptor MMS2 cascade involving interaction between AT2 receptor-interacting protein and Src homology 2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase 1. *Mol Endocrinol* 2007 ; 21 : 499-511.
 27. Senbonmatsu T, Saito T, Landon EJ, Watanabe O, Price E Jr, Roberts RL, Imboden H, Fitzgerald TG, Gaffney FA, Inagami T. A novel angiotensin II type 2 receptor signaling pathway. *EMBO J* 2003 ; 22 : 6471-6482.
 28. Daviet L, Lehtonen JY, Tamura K, Griese DP, Horiuchi M, Dzau VJ. Cloning and characterization of ATRAP, a novel protein that interacts with the angiotensin II type 1 receptor. *J Biol Chem* 1999 ; 274 : 17058-17062.
 29. Tsurumi Y, Tamura K, Tanaka Y, Koide Y, Sakai M, Yabana M, Noda Y, Hashimoto T, Kihara M, Hirawa N, Toya Y, Kiuchi Y, Iwai M, Horiuchi M, Umemura S. Interacting molecule of AT1 receptor, ATRAP, is colocalized with AT1 receptor in the mouse renal tubules. *Kidney Int* 2006 ; 69 : 488-494.
 30. Wang W, Huang Y, Zhou Z, Tang R, Zhao W, Zeng L, Xu M, Cheng C, Gu S, Ying K, Xie Y, Mao Y. Identification and characterization of AGTRAP, a human homolog of murine Angiotensin II Receptor-Associated Protein (Agtrap). *Int J Biochem Cell Biol* 2002 ; 34 : 93-102.
 31. Tanaka Y, Tamura K, Koide Y, Sakai M, Tsurumi Y, Noda Y, Umemura M, Ishigami T, Uchino K, Kimura K, Horiuchi M, Umemura S. The novel angiotensin II type 1 receptor(AT1R)-associated protein ATRAP downregulates AT1R and ameliorates cardiomyocyte hypertrophy. *FEBS Lett* 2005 ; 579 : 1579-1586.
 32. Azuma K, Tamura K, Shigenaga A, Wakui H, Masuda S, Tsurumi-Ikeya Y, Tanaka Y, Sakai M, Matsuda M, Hashimoto T, Ishigami T, Lopez-Illasaca M, Umemura S. Novel regulatory effect of angiotensin II type 1 receptor-interacting molecule on vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 2007 ; 50 : 926-932.
 33. Tamura K, Tanaka Y, Tsurumi Y, Azuma K, Shigenaga A, Wakui H, Masuda S, Matsuda M. The role of angiotensin AT1 receptor-associated protein in renin-angiotensin system regulation and function. *Curr Hypertens Rep* 2007 ; 9 : 121-127.
 34. Oshita A, Iwai M, Chen R, Ide A, Okumura M, Fukunaga S, Yoshii T, Mogi M, Higaki J, Horiuchi M. Attenuation of inflammatory vascular remodeling by angiotensin II type 1 receptor-associated protein. *Hypertension* 2006 ; 48 : 671-676.

腎障害を合併した高血圧患者における ARB/利尿薬合剤の有用性—基底血圧および自律神経活動と Health-Related QOL の変化について—

岡野 泰子 戸谷 義幸 東 公一 矢花 眞知子
田村 功一 梅村 敏

Effects of combination therapy with losartan/hydrochlorothiazide on the relationships between base blood pressure, autonomic function, and health-related QOL

Yasuko OKANO, Yoshiyuki TOYA, Kouichi AZUMA, Machiko YABANA, Kouichi TAMURA,
and Satoshi UMEMURA

Medical Science and Cardiorenal Medicine, Yokohama City University
School of Medicine, Kanagawa, Japan

要 旨

腎障害を合併する高血圧患者では、より厳格な降圧が必要とされる一方、夜間血圧の重要性が報告されている。慢性腎臓病では、腎機能低下により、血圧日内リズムが non-dipper 型に変化することが知られている。今回、高血圧患者に ARB/利尿薬合剤(ロサルタン 50 mg/ヒドロクロロチアジド 12.5 mg)を投与し、基底血圧、自律神経活動、Health-Related QOL (HRQOL) の変化およびその関連について検討した。当科受診中の高血圧患者 10 例(男 3 例、女 7 例; 平均年齢 67.6 歳)を対象とし、ARB/利尿薬合剤の治療を行った。約 3 カ月間の投与前後で非観血的携帯型血圧計 TM2425 (A & D 社)による血圧日内変動(睡眠時基底血圧)と 24 時間心拍変動により自律神経機能と脈波伝播速度(PWV)を測定した。また HRQOL の評価のために SF-36 と血液・尿生化学検査を行った。ARB/利尿薬合剤内服後、基底収縮期血圧、24 時間交感神経活動はそれぞれ有意に低下を示した(114±5 vs. 100±3 mmHg, $p<0.03$), (1.48±0.8 vs. 0.94±0.2, $p<0.02$)。総コレステロールはそれぞれ有意に増加を示した($p<0.01$)。HRQOL のスコアは、有意に改善を認めた($p<0.05$)。今回の症例では、ARB/利尿薬合剤投与により昼間血圧よりも基底血圧と交感神経活動を有意に低下させた。

We reported on the relationship between base blood pressure (BP), autonomic function and health-related quality of life (HRQOL) in healthy adults. The aim of the present study was to examine the relationship between the antihypertensive effects, autonomic function, and HRQOL following the treatment of hypertensive subjects with losartan/hydrochlorothiazide in hypertensives. In the 10 hypertensive patients treated with angiotensin receptor blockers for more than 1 month, combination therapy with losartan/hydrochlorothiazide was conducted for 3 months after the cessation of treatment with angiotensin receptor blockers. Either immediately before the onset of combination therapy or 3 months after the treatment, 24-h ambulatory BP and pulse wave velocity (PWV) were measured. Sympathetic nervous activity (ratio of low frequency to high frequency component : LF/HF) and parasympathetic nervous activity (high frequency component : HF) were calculated by heart rate variability. Quality of life (HRQOL) was assessed by the Medical Outcome Study Short-Form 36-Item Health Survey (SF-36). All of the participants completed the study. Losartan/hydrochlorothiazide combination therapy reduced base BP (from 114±5 to 100±3 mmHg; $p<0.03$) and 24-h LF/HF (from 1.48±0.18 to 0.94±0.20; $p<0.02$). However, heart rates and PWV were not influenced by losartan/hydrochlorothiazide treatment. The

HRQOL scores improved during the study ($p < 0.05$). These findings indicated that losartan/hydrochlorothiazide was associated with an improvement in base BP relative to daytime BP, autonomic function and HRQOL.

Jpn J Nephrol 2010; 52: 939-944.

Key words: base blood pressure, combination therapy, health-related QOL

緒言

本邦の慢性腎臓病 (CKD) 患者数は増加し、2008 年末の時点での透析患者数は 28 万 2 千人に達している (日本透析医学会統計調査委員会)。透析患者の抑制には CKD の早期予防が必要であり、CKD の発症・進展・増悪因子である高血圧の血圧管理が必須である^{1,2)}。CKD ではより厳格な降圧が必要とされているが、臨床治療においては血圧がコントロールされている割合は十分であるとは言えない³⁾。

近年、夜間血圧の重要性が報告されており、腎機能低下により血圧日内リズムが non-dipper 型に変化することが知られている^{4,5)}。今回用いた 24 時間血圧計 (TM2425) は、血圧日内変動や心電図も同時記録が可能で、心拍数より推定できる再現性の高い睡眠時の血圧最小値 (基底血圧) も推定できるため、血圧の指標として有用であると考えられている⁶⁾。基底血圧は、若年者において尿中 Na 排泄量は昼間血圧とは相関を示さないが、基底血圧と相関を示すことが報告されている⁷⁾。また基底血圧は、高血圧患者において昼間血圧よりも細動脈病変や心肥大とより相関が高いことが認められている⁸⁾。

われわれは、基底血圧および自律神経活動と健康関連 QOL の関係について検討してきた。その結果、健常者において、基底血圧および自律神経活動は健康関連 QOL と相関関係を示すことを報告してきた⁹⁾。

今回われわれは、ARB 単独では降圧効果が不十分な高血圧患者を対象として、ARB と低用量利尿薬合剤の有用性について、基底血圧および自律神経活動と健康関連 QOL の関係について検討した。

対象および方法

1. 対象

対象は横浜市立大学医学部附属病院内科外来に通院中の高血圧患者のうち、ARB 単剤の標準用量 (ロサルタン 50 mg, カンデサルタン 8 mg, パルサルタン 80 mg, テルミサルタン 40 mg, オルメサルタン 20 mg) を 1 カ月以上投与中の患者で、ARB 単独治療で効果不十分な高血圧患者 10 例

(男性 3 例, 女性 7 例, 平均年齢 67.6 歳) を対象とした。

原疾患の内訳は、糖尿病性腎症 8 例, 腎硬化症 1 例であった。CKD ステージは 2~3 であった。上記疾患の確定診断は、臨床経過、血液・尿検査所見などを総合的に勘案した。ただし、痛風既往歴のある患者もしくは高尿酸血症がある患者 (8.0 mg/dL 以上)、重篤な腎障害 (sCr > 2.0 mg/dL) を有する患者、重篤な肝障害 (γ -GTP または ALT が正常上限の 3 倍以上) を有する患者、両側性腎動脈狭窄、内分泌性二次性高血圧患者、悪性高血圧患者、心房細動などのコントロール不良な不整脈をもつ患者、妊婦および妊娠の可能性のある患者などはあらかじめ登録症例から除外した。

本研究は横浜市立大学倫理委員会で承認され、対象患者には本研究の目的、内容、方法などを説明し、文書による同意を得た。

2. 方法

1 カ月以上の ARB 単独治療期の後、ARB/利尿薬合剤 (ロサルタン 50 mg/ヒドロクロチアジド 12.5 mg) の治療を開始した。合剤は毎朝食後 1 日 1 回、同時に経口投与とし、少なくとも 3 カ月以上投与を継続した。降圧薬以外の薬剤を服用している場合は、試験期間中を通してその内容を変更しないものとした。合剤治療切り替え直前と切り替え 3 カ月後に、portable multibiomedical recorder (TM2425, A & D 社: 東京) を用い、24 時間以上、コトコフ法とオシロメトリック法により 30 分おきに血圧を測定した。なお、日常活動および睡眠時間は、行動記録表に記入してもらった。その睡眠時間の血圧最小値を基底血圧とした。基底血圧は、HR frequency histogram の最低限界値 (1% 下限値) によって最小心拍数 (HR_o) を決定し、推計学的に HR_o 値に対応させ決定した。実際には、コンピュータで自動的に HR_o に対応する基底血圧を求めた⁶⁾。また夜間降下度は、[(昼間平均 SBP - 夜間平均 SBP) / 昼間平均 SBP] × 100 (%) とした。血圧測定精度は AAMI (Association of the Advancement of Medical Instruction) の勧告の基準を満たしている。心電図は、3 電極法にて心拍数の 1 分ごとの記録と 1 時間ごとの心電図波形の記録を行った。また、心電図記録よりマキシマムエントロピー法にて 24 時間で 48 区

間において RR 周波数解析を行いパワースペクトルを求め、そのうち 0.04~0.15 Hz を低周波成分 (low frequency component: LF) とし、0.15~0.4 Hz を高周波成分 (high frequency component: HF) とした。HF は副交感神経活動を表わし、LF/HF は交感・副交感神経活動のバランスまたは交感神経活動を表わす¹⁰⁾。TM2425 によりこれらを求め、自律神経活動の指標とした。さらに、血圧脈波測定装置 (日本コーリン社) を用いて脈波伝播速度 (PWV) を測定し、左右の計測値の平均値を解析に用いた。

合剤治療切り替え直前と切り替え 3 カ月後に採血を行い、白血球数、赤血球数、血小板数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、総コレステロール、トリグリセライド、HDL コレステロール、ALT、AST、 γ -GTP、血清クレアチニン、Na、K、Cl、尿酸、BUN などを測定した。1 日尿ノルエピネフリン (NE)、Na 排泄量・総蛋白は、24 時間蓄尿し測定した。24 時間尿を用いて測定された尿中 Na 排泄量から昼間と夜間に分けてそれぞれ塩分摂取量を算出した。なお、各被検者に睡眠時間を行動記録表に記入してもらい、就寝から起床時までの排尿を夜間、それ以外を昼間に分類した。

HRQOL の評価は SF-36 のアンケート調査表に自己記入させた。SF-36 は PF (身体機能)、MH (心の健康)、RP (日常役割機能: 身体)、RE (日常役割機能: 精神)、BP (体の痛み)、GH (全体的健康感)、VT (活力)、SF (社会生活機能) の 8 項目により、身体機能から精神状態にわたる計 36 問から成り立っている。対象者の SF-36 の回答は、8 つのサブ・スケールに分類して 100 点満点に転化して集計した。なお多次元スケールであるため、全体の合計点としての算出はしていない。今回の研究では、日本語版 SF-36 (version 1.2) を用いた^{11,12)}。

統計解析は、解析ソフト StatView-J5 を用い、数値は平均値±標準誤差で示し、切り替え前および 3 カ月後の各種データを Student の paired *t*-test を用い検定した。いずれも危険率が 5%未満を統計学的有意差とした。

結 果

試験期間中、特に副作用の出現はなく、脱落症例はなかった。

ARB 単独治療期の外来血圧 (切り替え前 1 カ月の平均値) は $151.8 \pm 1.9 / 84.6 \pm 1.9$ mmHg であった。ARB/利尿薬合剤 (ロサルタン 50 mg/ヒドロクロロチアジド 12.5 mg) の治療に切り替え、3 カ月後には $138.2 \pm 6.3 / 78.7 \pm 4.0$ mmHg に低下した。

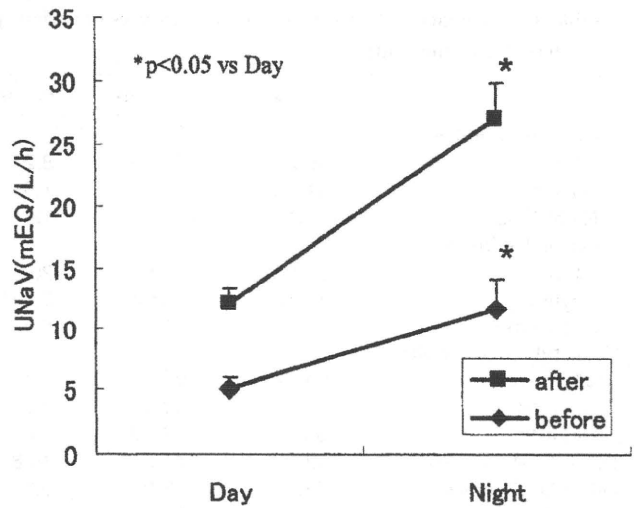


Fig. 1. Effects of losartan/hydrochlorothiazide on day-to-night changes in urinary excretion rate of sodium (UNaV) in hypertensive patients

ARB 単独治療期の 24 時間血圧は $146.1 \pm 3.1 / 75.1 \pm 3.1$ mmHg、日中血圧は $151.1 \pm 2.8 / 78.1 \pm 3.3$ mmHg、夜間血圧は $139.5 \pm 4.9 / 69.9 \pm 3.2$ mmHg であった。ARB/利尿薬合剤切り替え 3 カ月後には、24 時間血圧は $134.1 \pm 5.0 / 90.7 \pm 3.7$ mmHg、日中血圧 139.2 ± 6.6 mmHg、夜間血圧 $123.1 \pm 6.6 / 63.6 \pm 3.4$ mmHg であった。24 時間平均脈拍数は、ARB 単独治療が 68.3 ± 1.8 拍/分、ARB/利尿薬合剤治療が 67.0 ± 1.8 拍/分であり、有意差はなかった。24 時間・夜間の LF/HF は、ARB/利尿薬合剤療法期に有意な減少を認め、夜間 HF は有意な増加を認めた。昼間 LF/HF・24 時間・昼間 HF は有意差を認めなかった。

尿中 Na 排泄量は、ARB/利尿薬合剤療法期に有意な増加を認めた (Fig.). PWV は、単独治療期が $1,930.2 \pm 132.1$ cm/秒、ARB/利尿薬合剤療法期が $1,815.3 \pm 132.9$ cm/秒であり有意差はなかった。ABI は、単独治療期が 1.17 ± 0.03 、ARB/利尿薬合剤療法期が 1.15 ± 0.02 であり有意差はなかった (Table 1)。

両期における血液検査値は Table 2 に示している。総コレステロールは、ARB/利尿薬合剤療法期で有意差が認められた。脂質代謝指標 (HDL コレステロール、TG)、糖代謝指標 (血糖、HbA1c)、肝機能指標 (AST、ALT)、腎機能 (クレアチニン、尿酸、BUN)、電解質 (Na、K)、白血球、赤血球は両期において有意差は認められなかった。

HRQOL の指標は ARB 単独治療期と ARB/利尿薬合剤療法期で RP (日常役割機能: 身体) に有意差が認められた。PF (身体機能)、MH (心の健康)、RE (日常役割機能: 精

Table 1. Comparison between changes in measures of various parameters during the study

	Baseline	3 months	%change	p value
Systolic BP (mmHg)				
24-h	146±3	134±5	8.2	<0.05
Daytime	151±3	139±7	7.9	<0.05
Night-time	140±5	123±7	12.1	<0.03
Diastolic BP (mmHg)				
24-h	75±3	90±4	-20	NS
Daytime	78±3	74±4	5.1	NS
Night-time	70±3	64±3	8.6	NS
Heart rate (beats/min)				
24-h	68±2	67±2	1.5	NS
Daytime	63±2	69±2	-9.5	NS
Night-time	63±2	62±3	1.6	NS
Office SBP (mmHg)	158±4	141±7	10.8	NS
Office DBP (mmHg)	79±5	75±4	5.1	NS
Base SBP (mmHg)	114±5	100±3	12.3	<0.03
Base DBP (mmHg)	54±2	51±2	5.6	NS
LF/HF (ratio)				
24-h	1.48±0.18	0.94±0.20	36.5	<0.02
Daytime	3.20±1.54	0.10±0.21	96.9	NS
Night-time	1.24±0.17	0.78±0.21	37.1	<0.04
HF (sec/sqμHz)				
24-h	15.3±1.5	11.2±2.0	26.8	NS
Daytime	12.3±0.9	10.6±1.7	13.8	NS
Night-time	21.1±2.7	12.1±3.0	42.7	<0.05
Pulse wave velocity (cm/s)				
Right	1,919±123	1,802±118	6.1	NS
Left	1,942±141	1,828±148	5.9	NS
Mean	1,930±132	1,815±133	6.0	NS

Values are expressed as mean±SE. SBP : systolic blood pressure, DBP : diastolic blood pressure, LF : low frequency, HF : high frequency

Table 2. Comparison between changes in clinical parameters during the study

	Baseline	16 week	%change	p value
Fasting blood glucose (mg/dL)	109±6	91±9	-16.5	NS
Blood urea nitrogen (mg/dL)	14±1	15±2	-7.1	NS
Serum creatinine (mg/dL)	0.72±0.06	0.78±0.1	-8.3	NS
Serum uric acid (mg/dL)	5±1	6±1	-20	NS
Hematocrit (%)	47±8	38±1	19.1	NS
Serum AST (U/L)	29±6	31±6	-6.9	NS
Serum ALT (U/L)	30±8	32±9	-6.7	NS
Serum total cholesterol (mg/dL)	202±13	214±13	-5.9	<0.01
Serum triglycerides (mg/dL)	179±13	198±29	-10.6	NS
Physical functioning (PF)	76.0±7	81.7±6	-7.5	NS
Role physical (RP)	65.0±13	80.2±9	-23.4	<0.03
Bodily pain (BP)	59.1±10	62.6±9	-5.9	NS
General health (GH)	56.2±7	56.0±7	-0.36	NS
Vitality (VT)	57.7±10	58.9±9	-2.1	NS
Social functioning (SF)	73.8±11	75.0±11	-7.7	NS
Role emotional (RE)	86.7±10	70.4±15	18.8	NS
Mental health (MH)	67.2±8	72.4±9	-7.7	NS

Values are expressed as mean±SE.

AST : aspartate aminotransferase, ALT : alanine aminotransferase

神), BP(体の痛み), GH(全体的健康感), VT(活力), SF(社会生活機能)に有意差は認められなかった。

考 察

今回の検討より, ARB 単独では降圧効果が不十分な高血圧患者において, ARB/利尿薬合剤投与により夜間収縮期血圧および再現性の高い睡眠時の血圧最小値である基底血圧・交感神経活動は有意に低下した。また, HRQOL の指標である日常役割機能: 身体は有意に改善を示した。

近年, 多くの研究で夜間血圧の重要性が指摘されている。夜間血圧下降のない日内変動異常 non-dipper 型は, 脳, 心臓, 腎臓の全標的臓器障害が進行しており, 心血管リスクが高いことが明らかにされている^{13,14}。また, 本態性高血圧患者において non-dipper 型のほうが dipper 型より腎機能障害が速く進行することも報告されている¹⁵。CKD では腎機能障害が進行するほど血圧の夜間降圧が障害され non-dipper 型となるといわれている^{16,17}。今回使用した TM2425 から得られる再現性の高い夜間睡眠時基底血圧は, 心拍数が低く安定している深い睡眠中に計測されるので, 日中の身体的・精神的活動に影響を与えない個人の血圧の代表値として報告されている⁶。基底血圧は, 昼間血圧よりも心肥大とより相関が高いことが報告されており, non-dipper 型の夜間血圧と臓器障害の関係を反映している⁶⁻⁸。今回の研究の結果, 高血圧患者において, ARB/利尿薬合剤投与後に基底血圧は 24 時間・昼間収縮期血圧よりも有意な低下を示した。また, 夜間収縮期血圧は昼間収縮期血圧よりも有意な低下を示した。

24 時間・夜間の交感神経活動は, ARB/利尿薬合剤投与後により有意な減少を認めた。尿中 Na 排泄量は, ARB/利尿薬合剤投与により有意な増加を認めた。一般に, 腎臓への交感神経活動が亢進すると, α_1 受容体を介して尿細管での Na 再吸収が増加し, 尿中 Na 排泄は減少する¹⁸。腎交感神経は β_1 受容体を介してレニンを分泌し, アルドステロンも遠位尿細管での Na

再吸収を増加させる。レニンにより産生されるアンジオテンシンII (AII)は細動脈を収縮させるほか、延髄腹外側の吻側領域(RVLM)ニューロンなどの中枢神経や末梢交感神経末端に作用して交感神経活動を亢進させることが報告されている¹⁹⁾。交感神経活動の低下しているヒトほど尿中Na排泄量は多く、交感神経活動が高いヒトは尿中Na排泄量が少ないことが示されている²⁰⁾。佐方らは、Dahl食塩感受性高血圧ラット(DSSラット)を用いて、腎交感神経活動と血圧の関係を検討した。その結果、DSSラットの高Na群は低Na群と比較して、血圧・腎交感神経活動は有意に高値を示していた²¹⁾。今回の結果から、ARB/利尿薬合剤投与後に交感神経活動は低下し、夜間尿中Na排泄量は昼間尿中Na排泄量よりも増加していることが明らかとなった。

腎臓と血圧は密接な関係があり、腎保護の観点から、24時間の血圧のみではなく夜間の血圧管理が重要であることが示されている⁴⁾。食塩感受性の患者に低塩食を実施したところ、夜間血圧が低下し、non-dipper型からdipper型へ回復が認められた²²⁾、腎におけるNa排泄が血圧日内変動に大きく影響していると考えられる。本研究では、夜間・基底血圧は、ARB/利尿薬合剤投与後により有意な減少を認めた。さらに、ARB/利尿薬合剤投与により血圧日内変動がnon-dipper型からdipper型に変化した症例においては、尿中Na排泄量も投与後に増加を示していた。腎機能が低下することによりNa排泄障害が生じ、血圧の塩分感受性が亢進し、日中の塩分排泄障害による代償的夜間の圧利尿の亢進が生じ、夜間降圧障害が起こることが考えられている^{23,24)}。これらの結果から、Na再吸収を抑制して降圧に働くチアジド系利尿薬を含む合剤は有用であると考えられる。

心理的ストレスが持続すれば、食塩摂取量や食物摂取行動の変動を介して慢性的にも血圧に影響する可能性がある。食塩摂取量の変動において、異種ラットを加えて心理的ストレスを加えることにより、遺伝的高血圧ラットでは食塩摂取量の増加が認められた²⁵⁾。食塩感受性ラットモデルでは、高食塩摂取により安静時のみならず刺激に対する反応として交感神経活動の活動性を亢進させることが報告されている²⁶⁾。また、健常者32例においてコンピュータプログラムを用い心理的ストレスを加えたところ、食塩感受性群において血圧上昇反応は食塩抵抗性群と比較して有意に大きかった²⁷⁾。中年公務員384例において、24時間尿中Na排泄量と血圧上昇度の関係を検討したところ、高食塩状態においてストレス度が高くなるに伴い血圧上昇が増

加した²⁸⁾。今回のわれわれの結果は、高血圧患者において、ARB/利尿薬合剤投与により、尿中のNa排泄量は低下し、HRQOLの指標である日常役割機能：身体は有意な改善を認めた。ARBと低用量利尿薬の合剤は海外ではすでに多くの臨床で使用されており、わが国でもいくつかの配合剤が開発されている。配合剤の利点は、利尿薬に認められる副作用がほとんどみられないことである。さらに、配合剤は剤形を単純化することにより、服薬のコンプライアンスを高めることができる。今回の研究においても、副作用の軽減、服薬コンプライアンスの効果によりHRQOLの改善に影響を及ぼすことが考えられる。

今回の結果より、ARB単独では降圧効果が不十分な高血圧患者を対象として、ARBと低用量利尿薬合剤投与により基底血圧とHRQOLの指標は有意に改善を示した。これらの背景には、われわれは健常者において基底血圧および自律神経活動とHRQOLの関係について検討してきた。その結果、基底血圧および自律神経活動はHRQOLと相関関係を示すことを報告してきた。これらの指標を用いてわれわれは、高血圧患者においてARBが基底血圧および自律神経活動とHRQOLの関係に及ぼす影響を検討してきた。この結果において、基底血圧とHRQOLの指標は有意に改善を示した。今後、症例数を増やしてCa拮抗薬/ARBとARB/低用量利尿薬合剤の比較を検討する予定である。

おわりに

本研究において、ARBでは降圧効果が不十分な高血圧患者において、ARB/利尿薬合剤投与により夜間血圧の重要な指標である基底血圧および交感神経活動は有意に低下を示し、夜間尿中Na排泄量は有意に増加を示した。HRQOLの指標である日常役割機能の身体は有意に改善を認めた。今後、ARBでは降圧効果が不十分な高血圧患者において、基底血圧および自律神経活動と尿中Na排泄量、HRQOLの指標を測定することは、臨床治療において重要であると考えられる。

謝辞

稿を終えるにあたり、ご協力、ご指導いただきました横浜市立大学大学院医学研究科情報システム予防医学の柘久保修先生に深く感謝の意を表します。

文献

1. Walker WG, Neaton JD, Cutler JA, Newirth R, Cohen JD. Renal function change in hypertensive members of the multi-

- ple risk factor intervention trial. Racial and treatment effects. The MRFIT Research Group. *J Am Med Assoc* 1992 ; 268 : 3085-3091.
2. Grag AX, Clark WF, Haynes RB, House AA. Moderate renal insufficiency and the risk of cardiovascular mortality : results from the NHANES I. *Kidney Int* 2002 ; 61 : 1486-1494.
 3. Hozawa A, Ohkubo T, Yamagata A, et al. HIPOP-OHP Research Group. Awareness and treatment of hypertension and hypercholesterolemia in Japanese workers : the-high risk and population strategy for occupational health promotion (HIPOP-OHP) study. *Hypertens Res* 2007 ; 30 : 921-928.
 4. Timio M, Venanzi S, Lolli S, Lippi G, Guerrini E. Non-dipper hypertensive patients and progressive renal insufficiency : a 3-year longitudinal study. *Clin Nephrol* 1995 ; 43 : 382-387.
 5. Lurbe E, Redon J, Kesani A, Pascual JM, Tacons J, Alvarez V, Bathe D. Increase in nocturnal blood pressure and progression to microalbuminuria in type I diabetes. *N Engl J Med* 2002 ; 347 : 797-805.
 6. Tochikubo O, Hishiki S, Miyajima E, Ishii M. Statistical base value of 24-h blood pressure distribution in patients with essential hypertension. *Hypertension* 1998 ; 32 : 430-436.
 7. Nishijima K, Tochikubo O. Relation between sodium intake and blood pressure during sleep in young men. *Hypertens Res* 2003 ; 26 : 135-140.
 8. Tochikubo O, Miyajima E, Shigemasa T, Ishii M. Relation between body fat-corrected ECG voltage and ambulatory blood pressure in patients with essential hypertension. *Hypertension* 1999 ; 33 : 1159-1163.
 9. Okano Y, Tochikubo O, Umemura S. Relationship between base blood pressure during sleep and health-related quality of life in healthy adults. *J Hum Hypertens* 2007 ; 21 : 135-140.
 10. Pomeranz B, Macaulay RJB, Caudill MA, Kutz I, Adam D, Gordon D, Kilborn KM, Barger AC, Shannon DC, Cohen RJ, Benson H. Assessment of autonomic function in humans by heart rate spectral analysis. *Am J Physiol* 1985 ; 248 : H151-H153.
 11. Fukuhara S, Bito S, Green J, Hisao A, Kurokawa K. Translation, adaptation, and validation of the SF-36 health survey for use Japan. *J Clin Epidemiol* 1998 ; 11 : 1045-1053.
 12. Fukuhara S, Ware JE, Kosinski M, Wada S, Gandek B. Psychometric and clinical tests of validity of the Japanese SF-36 health survey. *J Clin Epidemiol* 1998 ; 11 : 1037-1044.
 13. Sokolow M, Werdegar D, Kain HK, Hinman AT. Relationship between level of blood pressure measured casually and by portable and severity of complications in essential hypertension. *Circulation* 1996 ; 34 : 279-298.
 14. Perloff D, Sokolow M, Cowan R. The prognostic value of ambulatory blood pressure. *JAMA* 1983 ; 249 : 2792-2798.
 15. Timio M, Venanzi S, Lolli S, Lippi G, Verdura C, Monarca C, Guerrini E. Non-dipper hypertensive patients and progressive renal insufficiency : a 3-year longitudinal study. *Clin Nephrol* 1995 ; 43 : 382-387.
 16. Portaluppi F, Montanari L, Vergnani L, Tarroni G, Cavallini AR, Gilli P, Bagni B, degli Uberti EC. Loss of the nocturnal increase in plasma concentration of atrial natriuretic peptide in hypertensive chronic renal failure. *Cardiology* 1992 ; 80 : 312-323.
 17. Timio M, Lolli S, Verdura C, Monarca C, Merante F, Guerrini E. Circadian blood pressure changes in patients with chronic renal insufficiency : A prospective study. *Ren Fail* 1993 ; 15 : 231-237.
 18. Saruta T, Kumagai H. The sympathetic nervous system in hypertension and renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1996 ; 5 : 72-79.
 19. Ferrario CM, Averill DB. Do primary dysfunctions in neural control of arterial pressure contribute to hypertension? *Hypertension* 1991 ; 18(Suppl I) : I 38- I 51.
 20. Campese VM, Romoff MS, Massry SG, Levitan D, Saglikes Y, Friedler RM. Abnormal relationship between sodium intake and sympathetic nervous system activity in salt sensitive patients with essential hypertension. *Kidney Int* 1982 ; 21 : 371-378.
 21. Sakata K, Kumagai H, Onami T, Osaka M, Matsuura T, Imai M, Saruta T. Potentiated sympathetic nervous and renin-angiotensin systems reduce nonlinear correlation between sympathetic activity and blood pressure in conscious spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 2002 ; 106 : 620-625.
 22. Uzu T, Kimura G. Diuretics shift circadian rhythm of blood pressure from nondipper to dipper in essential hypertension. *Circulation* 1999 ; 100 : 1635-1638.
 23. Fujii T, Uzu T, Nishimura M, Takeji M, Kuroda S, Nakamura S, Inenaga T, Kimura G. Circadian rhythm of natriuresis is disturbed in non-dipper type of essential hypertension. *Am J Kidney Dis* 1999 ; 33 : 29-35.
 24. Fukuda M, Munemura M, Usami T, Nakao N, Takeuchi O, Kamiya Y, Yoshida A, Kimura G. Nocturnal blood pressure is elevated with natriuresis and proteinuria as renal function deteriorates in nephropathy. *Kidney Int* 2004 ; 65 : 621-625.
 25. Ely DL. Overview of dietary sodium effects on and interactions with cardiovascular and neuroendocrine functions. *Am J Physiol* 1997 ; 65(Suppl) : S594-S605.
 26. Leenen FHH, Ruzicka M, Huang BS. The brain and salt-sensitive hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2002 ; 4 : 129-135.
 27. Deter HC, Buchholz K, Schorr U, Schächinger H, Turan S, Sharma AM. Psychophysiological reactivity of salt-sensitive normotensive subjects. *J Hypertens* 1997 ; 15 : 839-844.
 28. Staessen JA, Poulter NR, Fletscher AE, Markowe HL, Marmot MG, Shipley MJ, Bulpitt CJ. Psycho-emotional stress and salt intake may interact to raise blood pressure. *J Cardiovasc Risk* 1994 ; 1 : 45-51.

