

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09138

研究課題名(和文)心不全におけるBNP前駆体の血中濃度増加の分子機序の解明と臨床応用

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanism and clinical application of increased plasma level of BNP precursor in patients with heart failure

研究代表者

錦見 俊雄(Nishikimi, Toshio)

京都大学・医学研究科・非常勤講師

研究者番号：80291946

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトproBNP遺伝子をラット心筋細胞に遺伝子導入し、培養上清中のproBNP, total BNPを測定する事でプロセッシングを正確に評価する系を構築した。同時に種々の変異体を作成し、7カ所の糖鎖結合部位のどの部位がプロセッシングに関係するのかを評価した。切断部位に最も近いTh71までの距離と他の部位ではTh48が直接プロセッシング抑制に関係することを示した。慢性心不全の重症例ではproBNP/total BNP比率が軽症例よりも高く、cGMP/BNP比は低かった。BNP値が35000を越える症例を経験し、その機序を明らかにし、macro-proBNP血症と命名し世界で初めて報告した。

研究成果の概要(英文)：We introduced human proBNP gene into rat cardiac myocytes and assessed the processing of proBNP by measuring proBNP and total BNP levels using our developed chemiluminescent immunoassay in the culture medium. We also produced proBNP mutant and assessed the effect of each glycosylation site on the proBNP processing. We found that Th71 and Th48 directly inhibit the processing of proBNP, and that other five glycosylation sites were indirectly associated with the inhibition of processing of proBNP. We also showed that the proBNP/total BNP ratio was higher and cGMP/total BNP ratio was lower in severe chronic heart failure compared with mild chronic heart failure. We experienced a case of heart failure whose BNP level was more than 35000pg/mL. We elucidated the mechanism of it and first reported it in the world as a case of macro-proBNP.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心不全 BNP poBNP 前駆体 O型糖鎖修飾 プロセッシング 心筋細胞 macro-proBNP

1. 研究開始当初の背景

BNPは心不全における生化学マーカーとして世界的に普及し、臨床の場で必須の検査になっている。申請者も20年以上基礎的・臨床的にBNP研究を行いその臨床的有用性と意義について数十編の英文論文として発表してきた。BNPは有用な指標であるが問題点も存在する。その1つは、血中にはBNPの前駆体であるproBNPがBNPを上回るほど存在することが最近判明し、現在のBNP測定系はproBNPを交差して測る事である。申請者は前々回の科研費の支援を受け、この事実をゲル濾過法と免疫アッセイ法を組み合わせ示し、心不全患者ではproBNP/total BNP比率が広く分布する事を示した。しかしこの方法は時間と労力が多くかかる事ならびに、カラム処理後の回収率がやや低いために(60~70%)、正確な測定ができない可能性がある。そこで前回の科研費の支援を受け、proBNPと従来のtotal BNP (=proBNP+BNP32)を抽出なしで測定する免疫化学発光測定法を新規に開発し、これを用いて健常者、心不全、腎不全におけるproBNP/total BNP比率を報告した。本申請研究では、なぜ前駆体のproBNPがプロセッシングされずに分泌されるのか、その機序とproBNP/total BNP比率測定の臨床的意義とを合わせて検討した。

2. 研究の目的

最近の研究でproBNPのN端部分に7カ所の型糖鎖修飾がなされ、この糖鎖修飾がproBNPのプロセッシングに関係している可能性がCHO細胞やHEK細胞を用いた実験系で報告されている。しかしながら細胞により糖鎖修飾酵素の発現の種類は異なるために心筋細胞での検討が望まれる。申請者は、心筋細胞で糖鎖修飾が実際にproBNPのプロセッシングに関与するのか否か、しているならば7カ所のどの部分に関与しているのかを、ラット心筋細胞培養系にヒトproBNP遺伝子を導入する系を構築し、培養上清中のproBNPとtotal BNPを我々

の開発したproBNPとtotal BNP測定系を用いて正確に測り、proBNP/total BNP比率を算出し、プロセッシングの指標として用いて検討した。さらに慢性・急性心不全患者において血液を採取し、同じ測定系を用いて血液中のproBNPとtotal BNPを正確に測定し、proBNP/total BNP比率を算出し、この臨床的意義についても検討した。さらに血漿BNP濃度が3万5千pg/mLと著明に高い症例を経験し、そのメカニズムについても詳細に検討した。

3. 研究の方法

(1) 野生型ならびに、糖鎖付着部位のアミノ酸Thr、SerをAlaに置き換えた種々の変異体ヒトproBNP遺伝子を、培養新生児ラット心筋細胞にレンチウイルスを用いて遺伝子導入し、その培養上清を我々の最近開発したproBNP、total BNP(=proBNP+BNP32)測定系を用いて正確に0.4pMレベルまで測定し、proBNP/total BNP比率を算出し、糖鎖付着部位のプロセッシングに対する効果を評価した。

(2) 慢性心不全患者において冠静脈洞、静脈において血液採取を行い、上記の測定系でproBNP、total BNPを測定し、proBNP/total BNP比率を算出し、臨床データと比較検討した。

(3) BNP値が3万5千と著明に高い症例を経験し、その機序について生化学、分子生物学的手法を用いて検討した。

(4) 急性心不全患者を対象に入院時から経時的にproBNP、total BNPを測定し、proBNP/total BNP比率を算出し、その意義について検討した。

4. 研究成果

(1) 野生型ヒトproBNPをラット培養心筋細胞に遺伝子導入した時の培養上清中のproBNP/total BNP比率は約40%であった。ウイルスのタイターで培養上清のproBNP、total BNP濃度は変動するが、濃度にかかわらずproBNP/total BNP比率は約40%とほぼ一定であった。proBNPの切断部位に最も近いTh71を

Ala71に変えると、proBNP/total BNP比率は約20%とプロセッシングは増加した。そこで切断部位から最も近傍の糖鎖付着部位までの距離がプロセッシングに関係するとの仮説をたて、Th71をTh69、Th67と糖鎖の付着位置を切断部位から遠ざけていくと、プロセッシングは少しずつだが有意に増加した。すなわち、切断部位から最も近傍の糖鎖付着部位までの距離がプロセッシングを決定することが示唆された。また糖鎖付着部位全てをAlaで置換し、糖鎖付着をなくすとproBNP/total BNP ratioは約3% ~ とほぼ完全にproBNPはプロセッシングされた。すなわち、糖鎖の付着がプロセッシングに関与している事を初めて明らかにした。Th71をAla71に変えても約20%は切断されない。すなわち他の場所に結合する糖鎖の付着場所も重要である事を示している。そこで糖鎖付着部位を1つだけにして他の6カ所をAlaにする変異体を作製し、心筋細胞内に導入するとTh48とTh71のみがプロセッシングを抑制した。Th71とTh48の2カ所を同時にAlaに変えるとほぼ完全にproBNPはプロセッシングされた。これらの事からTh71、Th48の2カ所がproBNPのプロセッシング抑制に重要な働きを有する事が明らかになった。

(2) 慢性心不全において冠静脈洞の血中のproBNP/total BNP ratioを測定すると平均値は約40%であり、心不全の重症度が増すとproBNP/total BNP ratioは高くなった。この事から心不全の重症度とともに糖鎖修飾が増えて、proBNPのプロセッシングが抑制される事が示唆された。

(3) BNP濃度が約35000pg/mLと著明に高い症例を経験した。この患者のproBNP、total BNPを測定すると免疫活性の殆どがproBNPである事が確認できた。ゲル濾過法を行うとproBNPの免疫活性はIgG(約15kDa)よりも少し大きい位置に溶出したことから、IgGがproBNPに付着していると想定し、ポリエチレングリコールによる沈殿法を行い上清を測定

するとproBNP濃度は1.3%と大きく低下した。さらにprotein Gカラムを通すことでもproBNP濃度は3.3%と低下した。これらの結果からBNP免疫活性著明高値の原因としてproBNPにIgGが結合したmacro-proBNP血症によることが示唆された。これを証明するためにゲル濾過法をpH3のelution bufferにして行くとIgGははずれ、本来のproBNPの溶出位置にproBNPの免疫活性が移動した。これらの結果からproBNPにIgGが結合したmacro-proBNP血症と診断し、世界で初めての症例として報告した。

(4) 急性心不全の血漿proBNP、total BNPを測定しproBNP/total BNP ratioを測定すると軽症例ではproBNP/total BNP ratioは重症例より低くなっていた。またcGMP/BNP比率も高値であった。経時的变化では重症例ではproBNP/total BNP ratioは変動しなかったが、軽症例ではproBNP/total BNP ratioは徐々に増加した。以上の結果から、急性心不全ではproBNPのプロセッシングが亢進し代償的に働いている事が示唆された。

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10件)

1. Tomiyama H, Nishikimi T, 他5名. Longitudinal changes in late systolic cardiac load and serum NT-proBNP levels in healthy middle-aged Japanese men. *Am J Hypertens.* 2015;28:452-458 (査読有り)
2. Nishikimi T, Nakagawa Y, Minamino N, Kuwahara K, 他14名. Pro-B-type natriuretic peptide is cleaved intracellularly: impact of distance between O-glycosylation and cleavage sites. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2015;309:R639-R649 (査読有り)
3. Yamada C, Kuwahara K, Nakagawa Y, Nishikimi T, 他12名. The renin-angiotensin system promotes arrhythmogenic substrates and

lethal arrhythmias in mice with non-ischaemic cardiomyopathy. Cardiovasc Res.2016;109;162-173 (査読有り)

4. Nakao K, Kuwahara K, Nishikimi T, Nakagawa Y, 他16名 Endothelium-derived C-type natriuretic peptide contributes to blood pressure regulation by maintaining endothelial integrity. Hypertension 2017;69;286-296(査読有り)

5. Nakagawa Y, Nishikimi T, Kuwahara K, Minamino N, 他17名 MiR30-GALNT1/2 axis-mediated glycosylation contributes to the increased secretion of inactive human prohormone for brain natriuretic peptide (proBNP) from failing hearts. J Am Heart Assoc. 2017;5:e003601 (査読有り)

6. Nakagawa Y, Nishikimi T, Kuwahara K, 他7名 Macro-pro-B-type natriuretic peptide (proBNP) and hidden macro-N-terminal proBNP : Case report. Clinical Biochemistry. 2018: 52; 148-152 (査読有り)

7. Nishikimi T, Nakagawa Y. Adrenomedullin as a Biomarker of Heart Failure. Heart Fail Clin. 2018;14;49-55 (査読有り)

8. Takahama H, Nishikimi T, Nakagawa Y, Minamino N, 他11名 Ratio of pro-B-type natriuretic peptide (BNP) to total BNP is decreased in mild, but not severe, acute decompensated heart failure patients: A novel compensatory mechanism for acute heart failure. Int J Cardiol. 2018;259;165-171 (査読有り)

9. 錦見俊雄、中川靖章 . 心不全における血中 BNP分子型の多様性とその意義 : proBNP、BNP1-32、関連分子種、nonglycosylated-NT-BNP、glycosylated-NT-BNPについて .循環器内科2016;79;507-516 (査読無し)

10. 錦見俊雄. 分子標的薬と高血圧・循環器疾患. 腎臓内科・泌尿器科2016;4;82-89 (査読無し)

[学会発表](計33件、主なものを記す)

1. 錦見俊雄、中川靖章、桑原宏一郎 : BNP up to date、第79回日本循環器学会総会(招待講演)、2015/4/24-26、大阪市

2. 中川靖章、錦見俊雄、桑原宏一郎、他5名 : Secretion and metabolism of proBNP in patients with heart failure、第19回日本心血管内分泌代謝学会学術総会、2015/12/10-12、神戸市

3. 中川靖章、錦見俊雄、桑原宏一郎、他5名 : O型糖鎖修飾を介したヒトBNPプロセッシング調節に關与する糖転移酵素についての検討、第19回日本心血管内分泌代謝学会学術総会、2015/12/10-12、神戸市

4. 桑原宏一郎、中川靖章、錦見俊雄、他2名 : MiR30-GALNT axis-mediated regulation of glycosylation participates in the secretion of proBNP in failing hearts、第32回国際心臓学会日本部会 (ISHR 2015)、2015/12/10-12、神戸市

5. Nakagawa Y, Nishikimi T, Kuwahara K, Minamino N、他6名 : Mir-30-GALNTs axis-mediated regulation in glycosylation and secretion of proBNP in the failing heart. 第80回日本循環器学会学術集会、2016/3/18-20、仙台市

6. Nakagawa Y, Nishikimi T, Kuwahara K、他2名 : MiR30-GALNTs axis-mediated O-glycosylation plays an important role in the increased secretion of unprocessed pro-brain natriuretic peptide by failing heart、Keystone symposia、2016/4/3-7、Snowbird, Utah, USA

7. 中川靖章、錦見俊雄、桑原宏一郎、南野直人、他8名 : miR30-GALNT経路によるO型糖鎖修飾を介したBNPプロセッシング調節が病的な心筋からのproBNP分泌亢進に寄与する、第53回日本臨床分子医学会学術集会、2016/4/15-16、東京

8. 中川靖章、錦見俊雄、桑原宏一郎、南野直人、他5名 : O型糖転移酵素 GALNT のBNPプロセッシング調節への關与、第89回日本内

分泌学会学術総会、2016/4/21-23、京都市

9. Kuwahara K, Nakagawa Y, Nishikimi T, Minamino N、他 3 名 : MiR30-GALNT1/2 axis-mediated glycosylation at threonine 48 and 71 plays an essential role in the increased secretion of unprocessed pro-brain natriuretic peptide by failing hearts、Heart Failure 2016、2016/5/21-24、Florence, Italy

10. 中川靖章、錦見俊雄、桑原宏一郎、南野直人、他 9 名 : miR30-GALNT 経路による O 型糖鎖修飾調節を介した病的心からの proBNP 分泌亢進機序、他 9 名 : 第 2 回国際心血管薬物療法学会日本部会 (J-ICPS)、2016/6/25-26、徳島市

11. Nakagawa Y, Nishikimi T, Kuwahara K、他 5 名 : Unprocessed proBNP secretion is regulated by MiR30-GALNTs axis dependent O-glycosylation in the pathological myocardium. AHA BCVS2016、2016/7/18-21、Phoenix, Arizona, USA

12. Nakagawa Y, Nishikimi T, Kuwahara K、他 9 名 . MiR30-GALNT1/2 axis-mediated O-glycosylation plays a critical role in the processing and secretion of pro-brain natriuretic peptide by failing myocardium. ESC2016/8/27-31、Rome, Italy

13. Nishikimi T, Nakagawa Y, Kuwahara K、他 4 名 : Endogenous plasma NT-BNP is glycosylated and undetectable with the current NT-BNP assay system、The 26th Scientific meeting of the International Society of Hypertension、2016/9/24-29、Seoul、Korea

14. Kuwahara K, Nakagawa Y, Nishikimi T, Minamino N、他 6 名 : MiR30-GALNT1/2 axis-mediated glycosylation regulates the increase in inactive human pro-BNP secretion from failing heart. The 26th Scientific meeting of the International Society of Hypertension、2016/9/24-29、Seoul、Korea

15. Takahama H, Nishikimi T, Nakagawa Y,

Minamino N、他 9 名 : Relationships of B-Type Natriuretic Peptides (BNP) Measured by Conventional Assay with proBNP(1-108) and N-Terminal proBNP(1-76) in Heart Failure Patients.第 20 回日本心不全学会、2016/10/6-8、札幌市

16. Nakagawa Y, Nishikimi T, Kuwahara K, Minamino N、他 6 名 : Secretion of proBNP is regulated by MiR30-GALNTs axis dependent O-linked glycosylation in the pathological myocardium. AHA Scientific Session 2016、2016/11/13-16、New Orleans, Louisiana, USA

17. Takashio S, Nishikimi T, Nakagawa Y, Minamino N、他 9 名 : Determining Factors and Prognostic Value of Plasma γ - Atrial Natriuretic Peptide Ratio in Patients With Heart Failure. AHA Scientific Session 2016、2016/11/13-16、New Orleans, Louisiana, USA

18. 中川靖章、錦見俊雄、桑原宏一郎、南野直人、他 5 名 : miR-30-GALNT1,2 経路による糖鎖修飾調節が病的心筋からの proBNP 分泌に關与する、第 26 回 日本循環薬理学会、2016/12/2、松本市

19. 中川靖章、錦見俊雄、桑原宏一郎、南野直人、他 5 名 : 病的心筋における miR30-GALNT 経路による糖鎖修飾を介した proBNP 分泌制御、第 20 回日本心血管内分泌代謝学会総会、2016/12/16-17、東京

20. Nishikimi T, Nakagawa Y, Kuwahara K、他 5 名 : O-linked oligosaccharide attachment underestimates N-terminal proBNP(NT-proBNP) levels in heart failure (HF) and chronic renal failure (CRF) on hemodialysis (HD)、The 81st Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society、2017/3/17-19、金沢市

21. Nishikimi T, Nakagawa Y, Kuwahara K、他 5 名 : O-linked oligosaccharide attachment underestimates N-terminal proBNP-76 (NT-proBNP) levels in heart failure(HF) and chronic renal failure (CRF) on hemodialysis

(HD). ESC Congress 2017、2017/8/26-30, Barcelona, Spain

22. Nakagawa Y, Nishikimi T, Kuwahara K、他 7 名 : A case of Macro-pro-B-Type Natriuretic Peptide (proBNP)、第 21 回日本心不全学会学術集会 2017/10/12-14、秋田市

23. Takahama H, Nishikimi T, Nakagawa Y, Minamino N、他 11 名 : Impact of continuous reduction in B-type natriuretic peptide bioactivity during hospitalization in patients with advanced heart failure、AHA Scientific Session 2017、2017/11/12-14、Anaheim, California, USA

24. Takahama H, Nishikimi T, Nakagawa Y, Minamino N、他 9 名 : Molar ratio of N-terminal fragment of pro-B-type natriuretic peptide(BNP) to proBNP predicts occurrence of acute kidney injury in patients with acute heart failure. AHA Scientific Session 2017、2017/11/12-14、Anaheim, California, USA

25. 中川靖章、錦見俊雄、桑原宏一郎、他 8 名 : マクロ proBNP 血症の一例、第 21 回心血管内分泌代謝学会、2017/12/8-10、大阪市

26. Takahama H, Nishikimi T, Nakagawa Y, Minamino N、他 11 名 : Association of ratio of proBNP to total BNP with heart failure severity: A novel compensatory mechanism for acute heart failure. 第 82 回日本循環器学会学術集会、2018/3/23-25、大阪市

27. Takahama H, Nishikimi T, Nakagawa Y, Minamino N、他 12 名 : ProBNP ratio to total BNP predicts future cardiac reverse remodeling in acute heart failure patients with reduced ejection fraction. 第 82 回日本循環器学会学術集会、2018/3/23-25、大阪市

28. 中川靖章、錦見俊雄、桑原宏一郎、他 8 名 : Possibility of proBNP measurement as a new evaluation method for heart disease. 第 82 回日本循環器学会学術集会、2018/3/23-25、大阪市

〔図書〕(計 1 件)

Nishikimi T, Kuwahara K, Nakagawa Y、他 2 名 : Chapter 2, ADRENOMEDULLIN, Endocrinology of the Heart in Health and Disease: Integrated, Cellular, and Molecular Endocrinology of the Heart, Editors: Jonathan Schisler, Charles Lang, Monte Willis, Page 41-58, Academic Press, 1st Edition, 2016

〔産業財産権〕
特になし

〔その他〕
ホームページ等
<http://kyoto-u-cardio.jp/kisokenkyu/cat236/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

錦見俊雄 (Nishikimi Toshio)
京都大学医学部附属病院・循環器内科・非常勤
講師
研究者番号 : 80291946

(2)研究分担者

桑原宏一郎 (Kuwahara Koichiro)
信州大学医学部・循環器内科・教授
研究者番号 : 30402887

中川靖章 (Nakagawa Yasuaki)
京都大学医学部附属病院・循環器内科
・助教
研究者番号 : 70452357

(3)連携研究者

南野直人 (Minamino Naoto)
国立循環器病研究センター・オミックスセ
ンター・センター長
研究者番号 : 50124839