

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17727

研究課題名（和文）血管作動性ペプチドCNPの糖尿病腎症における病態生理学的意義の解明

研究課題名（英文）Pathophysiological role of CNP in diabetic nephropathy

研究代表者

延生 卓也（Ensho, Takuya）

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・流動研究員

研究者番号：70824613

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：糖尿病性腎症等の腎臓疾患は、腎臓間質における血管内皮障害に起因する炎症・線維化を主体とする病態である。一方、C型ナトリウム利尿ペプチド（CNP）は主に血管内皮細胞から産生され、抗炎症・線維化抑制作用が知られているが、腎障害における作用は不明であった。本研究では、血管内皮細胞特異的CNP過剰発現マウス（E-CNP）や腎臓由来線維芽細胞を用いて解析し、CNPが線維芽細胞の細胞分裂を抑えることにより、線維化病態の進行を抑制することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腎障害の発症メカニズムの一つに、肥満・糖尿病に起因する血管内皮障害があると考えられているが、慢性腎障害に対する血管内皮細胞の寄与については十分に解明されていない。本課題では、主に血管内皮細胞から産生されるCNPが、腎障害に反応して産生亢進する事に加え、血管内皮細胞から産生されるCNPが腎臓の線維化を抑制する事を見いだした。これらの結果は、腎障害の病態進行における血管内皮細胞の寄与を示しており、今後の創薬研究においてCNPとそれを産生する血管内皮細胞が重要な標的となりうることを提示した。

研究成果の概要（英文）：Renal diseases such as diabetic nephropathy are pathological conditions mainly composed of inflammation and fibrosis caused by vascular endothelial damage. C-type natriuretic peptide (CNP) is mainly produced from vascular endothelial cells and is known to have anti-inflammatory and antifibrotic effects, but its effect on nephropathy was unknown. This study analyzed the effects of CNP on nephropathy by using mice transgenic for endothelial-cell-specific overexpression of CNP (E-CNP) and kidney-derived fibroblasts. As a result, it was clarified that CNP ameliorated the progression of renal fibrosis by suppressing the cell division of fibroblasts.

研究分野：動物生理学

キーワード：C型ナトリウム利尿ペプチド 糖尿病腎症 生理活性ペプチド 炎症・線維化 血管内皮細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

C型ナトリウム利尿ペプチド(C-type natriuretic peptide; CNP)は、ブタ脳組織より、単離・同定された生理活性ペプチドであり、現在広く臨床応用されている心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)や脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)らと共に、ナトリウム利尿ペプチドファミリーを形成している(文献-1)。ANP、BNPが受容体(GC-A)を介し血中で作用する循環ホルモンに対し(文献-2)、CNPは血管内皮細胞等から分泌される局所因子と考えられており、特異的受容体(GC-B)を介すことで、血管内皮保護作用、抗炎症・抗線維化作用を示し動脈硬化や心肥大を改善することが報告されている(文献-3)。

最近では、申請者所属の研究室より、血管内皮細胞由来のCNPが肥満・糖尿病における脂肪組織の血管内皮保護作用や抗炎症作用、脂質および糖代謝改善作用を示すことが報告され(文献-4、5)、さらに肥満・糖尿病に起因する非アルコール性脂肪肝炎(NASH)における肝臓に対する抗炎症、抗線維化作用も見出している(文献-6)。

糖尿病の三大合併症の一つである糖尿病性腎症は新規透析導入患者に中で最も多い原因疾患であることから、臨床上大きな問題となっており、有効な治療法、予防法、早期診断法の確立は急務となっている。糖尿病性腎症をはじめとする慢性腎臓疾患は糸球体や間質における血管内皮障害に起因する線維化・炎症を主体とする病態であり、上述した血管作動性ペプチドCNPによる血管内皮保護、線維化抑制、抗炎症作用が期待される。

2. 研究の目的

肥満・糖尿病に起因する血管内皮障害は、慢性腎臓疾患の発症メカニズムの一つと考えられている。しかし、血管内皮細胞障害の糖尿病性腎症に対する寄与について十分に解明されていない。そこで本課題では、腎臓疾患における血管内皮作動性ペプチドCNPの病態生理学的意義および薬理学的作用を解明し、腎臓疾患の新規治療薬や診断薬開発の手がかりをつかむことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 様々な腎障害モデルの腎臓におけるCNP発現の検討

各種腎障害モデル(ストレプトゾシン(STZ)誘発性糖尿病性腎症モデル・NASH誘発性腎障害モデル・腎線維化モデル・腎虚血再灌流モデル)を作出し、腎臓におけるCNP mRNA発現変動をリアルタイムPCR法にて解析した。さらに腎線維化モデルにおいては、片側の尿管を結紮するUUOモデルを作出し、2日後の腎臓より、磁気細胞分離法を用いて血管内皮細胞を分離し、CNP mRNA発現をリアルタイムPCR法にて解析した。

(2) 血管内皮細胞特異的CNP過剰発現マウス(tie2 promoter, E-CNP)を用いた腎臓線維化に対するCNPの作用の検討

E-CNPを用いて血管内皮細胞から産生されるCNPの糸球体病変および間質の線維化に対する作用を2つの腎障害モデル(NASH誘発性腎障害モデル・腎線維化モデル)を用いて評価した。NASH誘発性腎障害モデルを用いた解析では、40週間high-fat, high-fructose, high-cholesterol dietを給餌することでモデルを作出し、腎臓障害について血中マーカーの測定に加え、組織学的評価を行った。なお組織学的評価については、腎臓を4%PFAで固定した後、切片を作製し、糸球体径の測定及び間質の線維化病変をマッソントリクローム染色にて評価した。腎線維化モデルを用いた解析では、モデル作出後4日および7日の腎臓について組織学的な評価に加え、線維化マーカーのSMA mRNA発現を解析することで線維化を評価した。

(3) CNP による線維化抑制作用の機序解明のに向けた腎臓皮質領域の RNA-seq 解析

野生型マウスと E-CNP のコントロール及び線維化モデルの腎臓皮質領域をレーザーマイクロダイセクションにより顕微鏡下で分離し、腎臓皮質領域特異的な RNA-seq を行った。得られた結果については、2 種類のパスウェイ解析 (Gene Set Enrichment Analysis, DAVID を用いたパスウェイ解析) を行い評価した。

(4) 培養線維芽細胞に対する CNP の作用の検討

ラット腎臓線維芽細胞 NRK49F とマウスの腎臓から調製した初代線維芽細胞を用いて CNP の作用を解析した。具体的には、これら細胞における GC-B mRNA 発現を確認した後、CNP に対する応答性については GC-B の細胞内セカンドメッセンジャーである cGMP の産生とさらに下流の VASP のリン酸化を指標として評価した。また細胞分裂に対する作用については BrdU の取り込みを指標として評価した。

4. 研究成果

(1) 腎障害モデルにおける CNP 発現変動

各種腎障害モデル (STZ 誘発性糖尿病性腎症モデル・NASH 誘発性腎障害モデル・腎線維化モデル・腎虚血再灌流モデル) を作出し、腎臓における CNP 発現変動を解析した。その結果、腎線維化モデルでは、モデル作出後 2 日をピークとし、その後緩やかに低下する CNP 発現変動が認められた。そのほか、腎虚血再灌流モデルにおいては、モデル作製後かなり早期において一過性の発現上昇が認められるなど、複数の腎障害モデルにおいて CNP 発現の上昇が認められた。

CNP は血管内皮細胞から産生される局所因子であり、炎症性刺激等により発現が誘導されることが報告されている。そこで、炎症が惹起される腎障害下でも同様に血管内皮細胞の CNP 発現が上昇していると予想し、腎線維化モデルにおける血管内皮細胞 CNP 発現を解析した。その結果、血管内皮細胞における CNP 発現が有意に上昇していた。

(2) E-CNP を用いた CNP の腎線維化に対する作用とそのメカニズム

腎臓血管内皮細胞における CNP 発現が腎線維化モデルにおいて上昇したことより、血管内皮細胞が産生する CNP に着目し、血管内皮細胞特異的 CNP 過剰発現マウス以下 E-CNP を用いて解析した。E-CNP の腎臓血管内皮細胞において、CNP 発現が顕著に上昇していることを確認した後、NASH 誘発性腎障害モデルを作出し、腎臓に対する作用を評価した。その結果、野生型マウスにおいて、血中 BUN や CRE 値の上昇は認められなかったが、糸球体肥大に加え、尿細管萎縮、腎臓間質の線維化を示す腎硬化症に類似した病変が認められた。さらに、E-CNP においては糸球体肥大の抑制及び腎臓間質の繊維化が抑制されていた。

そこで、腎臓間質の繊維化抑制作用に着目し、腎線維化モデルを用いて CNP の作用を解析した。組織学的解析の結果、腎線維化モデル作成後 4 日、7 日の両日において、線維化陽性エリアの割合が野生型マウスに比べ E-CNP において有意に減少していた。加えて線維化マーカーである SMA mRNA 発現も E-CNP において有意に抑制されており、E-CNP では腎臓の繊維化が抑制されることが明らかとなった。

(3) CNP による線維化抑制作用の機序解明のに向けた腎臓皮質領域の RNA-seq 解析

腎臓における線維化の進行には炎症シグナルやコラーゲンをはじめとした細胞外基質産生、低酸素応答など様々なメカニズムが関わっている事が知られている。そこで、CNP による線維化抑制作用のメカニズム解明の向け、主な線維化領域である腎臓皮質領域における RNA-seq 解析を行った。その結果、2 種類のパスウェイ解析において共通して、当初予想していた炎症や細胞外基質に関連する因子群ではなく、細胞周期に関わる遺伝子群 (PLK1, Ccnb2, Esp11 等) の発現

が E-CNP において減少していることが示された。

(4) 培養線維芽細胞に対する CNP の作用

先の RNA-seq 解析の結果より、CNP による線維化抑制作用は腎臓線維芽細胞の増殖抑制によると推測し、2 種類の腎臓由来線維芽細胞（ラット腎臓線維芽細胞 NRK49F とマウスの腎臓から調製した初代線維芽細胞）を用いて CNP の作用を解析した。その結果、両種の腎臓由来線維芽細胞は共に GC-B 発現を認めた。さらに、それら細胞に対する CNP 刺激が GC-B の細胞内セカンドメッセンジャー cGMP の容量依存的な産生亢進や、さらにその下流の VASP がリン酸化を亢進させたことより、腎臓線維芽細胞が CNP の標的細胞であると考えられた。そこでこれら細胞の細胞増殖に対する CNP の作用について、BrdU 取り込みを指標として評価したところ、CNP はこれら線維芽細胞の細胞増殖を有意に抑制した。加えて、先の RNA-seq 解析にて変動した細胞分裂関連因子（PLK1、Ccnb2、Esp11）の mRNA 発現を解析したところ、増殖刺激によるこれら遺伝子の発現上昇は、CNP 添加により有意に抑制された。

(5) 結語

腎臓血管内皮細胞の CNP 発現が腎障害下において上昇することを見出した。その病態生理学的意義を探るため E-CNP を用いて病態を解析した結果、E-CNP は腎臓線維化抑制作用を呈した。そのメカニズム解明に向け RNA-seq 解析と腎臓由来線維芽細胞を用いた検討を実施し、血管内皮細胞から産生された CNP が線維芽細胞の分裂を抑制することにより腎臓線維化抑制作用を示すことを明らかにした。これらの結果は、腎障害の病態進行における血管内皮細胞の寄与を示しており、今後の創薬研究において CNP とそれを産生する血管内皮細胞が重要な標的となることを提示した。

<引用文献>

- [1] T. Sudoh, N. Minamino, K. Kangawa, H. Matsuo, C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 168 (1990) 863-870.
- [2] Y. Saito, I. Kishimoto, K. Nakao, Roles of guanylyl cyclase--a signaling in the cardiovascular system, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 89 (2011) 551-556.
- [3] A.J. Moyes, R.S. Khambata, I. Villar, K.J. Bubb, R.S. Baliga, N.G. Lumsden, F. Xiao, P.J. Gane, A.S. Rebstock, R.J. Worthington, M.I. Simone, F. Mota, F. Rivilla, S. Vallejo, C. Peiro, C.F. Sanchez Ferrer, S. Djordjevic, M.J. Caulfield, R.J. MacAllister, D.L. Selwood, A. Ahluwalia, A.J. Hobbs, Endothelial C-type natriuretic peptide maintains vascular homeostasis, *J. Clin. Invest.*, 124 (2014) 4039-4051.
- [4] C.R. Bae, J. Hino, H. Hosoda, Y. Arai, C. Son, H. Makino, T. Tokudome, T. Tomita, T. Kimura, T. Nojiri, K. Hosoda, M. Miyazato, K. Kangawa, Overexpression of C-type Natriuretic Peptide in Endothelial Cells Protects against Insulin Resistance and Inflammation during Diet-induced Obesity, *Sci. Rep.*, 7 (2017) 9807.
- [5] C.R. Bae, J. Hino, H. Hosoda, C. Son, H. Makino, T. Tokudome, T. Tomita, K. Hosoda, M. Miyazato, K. Kangawa, Adipocyte-specific expression of C-type natriuretic peptide suppresses lipid metabolism and adipocyte hypertrophy in adipose tissues in mice fed high-fat diet, *Sci. Rep.*, 8 (2018) 2093.
- [6] C.R. Bae, J. Hino, H. Hosoda, M. Miyazato, K. Kangawa, C-type natriuretic peptide (CNP) in endothelial cells attenuates hepatic fibrosis and inflammation in non-alcoholic steatohepatitis, *Life Sci.*, 209 (2018) 349-356.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakahara Keiko, Maruyama Keisuke, Ensho Takuya, Mori Kenji, Miyazato Mikiya, Kangawa Kenji, Uemura Ryoko, Sakoda Hideyuki, Nakazato Masamitsu, Murakami Noboru	4. 巻 521
2. 論文標題 Neuromedin U suppresses prolactin secretion via dopamine neurons of the arcuate nucleus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 521 ~ 526
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.10.156	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Otani Kentaro, Tokudome Takeshi, Ensho Takuya, Hino Jun, Miyazato Mikiya, Kangawa Kenji, et al.	4. 巻 141
2. 論文標題 Deficiency of Cardiac Natriuretic Peptide Signaling Promotes Peripartum Cardiomyopathy-Like Remodeling in the Mouse Heart	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Circulation	6. 最初と最後の頁 571 ~ 588
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/CIRCULATIONAHA.119.039761	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 ENSHO Takuya, MARUYAMA Keisuke, QATTALI Abdul Wahid, YASUDA Masahiro, UEMURA Ryoko, MURAKAMI Noboru, NAKAHARA Keiko	4. 巻 81
2. 論文標題 Comparison of glucose tolerance between wild-type mice and mice with double knockout of neuromedin U and neuromedin S	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1305 ~ 1312
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.19-0320	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田口史門、延生卓也、森 健二、宮里幹也、寒川賢治、丸山圭介、村上 昇、中原桂子
2. 発表標題 ニューロメジンS前駆体中の新規ペプチド (NSRP) の生理機能の探索
3. 学会等名 第162回 日本獣医学会 (茨城)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 延生 卓也、日野 純、白井 学、細田 洋司、森 健二、南野 直人、宮里 幹也、寒川 賢治
2. 発表標題 血管内皮細胞由来C型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)は腎臓疾患による腎線維化を抑制する
3. 学会等名 第93回 日本内分泌学会学術総会 (Web開催)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------