

機関番号 : 14301

研究種目 : 基盤研究 (C)

研究期間 : 2008~2010

課題番号 : 20590837

研究課題名 (和文) 循環調節ペプチドを利用した診断・管理・治療に関するトランスレーショナルリサーチ

研究課題名 (英文) Translational research concerning diagnosis, management, and treatment in cardiovascular disease using vasoactive peptide

研究代表者

錦見 俊雄 (Nishikimi Toshio)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号 : 80291946

研究成果の概要 (和文) : B型ナトリウム利尿ペプチド(BNP)、アドレノメデュリン(AM)、細胞内シグナルである Rho-kinase について研究を行った。現在測定されている BNP は BNP-32 と proBNP-108 の総和であり、分離測定するとさらに心不全の情報が増す可能性を示した。AM は脂肪組織に高発現し、脂肪・糖代謝に関係している可能性を示した。Rho-kinase 阻害薬は種々の腎疾患モデルの治療に有用で、その分子機序を明らかにした。

研究成果の概要 (英文) : We investigated the pathophysiological significance of B-type natriuretic peptide (BNP), adrenomedullin, and Rho-kinase inhibitor.

We found that current BNP assay kit measures not only BNP-32, but also proBNP-108 and that measurement of both molecular forms provides more useful information in heart failure. We showed that AM mRNA is highly expressed in adipose tissue and that AM plays a role in lipid and glucose metabolism. Furthermore, we showed that Rho-kinase is activated in the kidney in renal disease and that Rho-kinase inhibitor is effective in treatment for various renal disease models via many mechanisms including inhibition of oxidative stress, inflammation, collagen production, etc.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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 : 臨床心血管病態学、ナトリウム利尿ペプチド、心不全、BNP、ANP、アドレノメデュリン、脂肪細胞、Rho-kinase 阻害薬、腎疾患

1. 研究開始当初の背景

(1) 申請者は 1993 年のアドレノメデュリン (以下 AM) の発見以来、AM が心臓など循環系の臓器に豊富に発現していることに注目し、循環器疾患に着目して研究を進めてきた。AM が心不全を中心とした循環器疾患の病態に対して血中、局所で増加し、病態を代償しているペプチドであるという結果を報告してきた。これまでの我々の成績を含めた研究結果から、AM は重症高血圧、心不全・心肥大などの病態において心臓、腎臓などの組織や血中で増加し、生体内で病態を代償する方向で働いているペプチドと考えられる。この仮説は他の研究室からのノックアウトマウスを用いた成績や、AM を循環器疾患のモデルに遺伝子治療した成績からも支持されてきた。我々も AM ノックアウトマウスとレニントランシジーンマウスを掛け合わせた成績から AM が腎保護、心保護に働く因子であることを確認した。これらの事から AM そのものを治療薬として使用できる可能性が示唆された。事実 AM を重症高血圧ラットモデルや心不全モデルに慢性投与すると、AM は血圧非依存性に腎障害を軽減し、心不全も改善することが明らかとなった。そこで、AM を心不全患者に短時間投与すると、血行動態やホルモン等が改善する事を示した。以上から急性心不全に長時間投与し、その効果を検討する事を試みた。

(2) 我々は肥満を伴う高血圧症例で血中 AM 濃度が高く、減量とともに AM は低下し、脂肪細胞からの AM の分泌の可能性を臨床的に示した。AM は脂肪細胞からも高発現することが他の研究室からも報告され、我々もこの事実を確認していた。また脂肪細胞由来のペプチドは心血管疾患の発症に強く関係することが明らかとなっている。そこで本研究では AM の脂肪細胞における新しい作用やその機序を明らかにすることで、アディポリサーチ領域における AM 研究の新しい展開を試みた。

(3) BNP に関しては現在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 1990 年代初期からこの課題に取り組み、BNP が高血圧性左室肥大のマーカーになること、肺高血圧の右心機能のマーカーや予後推定に有用であること、内因性の BNP が心肥大に対して抑制的に働くこと、心筋梗塞後のリモデリングの指標になること、不整脈源性右室心筋症の重症度の指標となること、非代償性心不全に対する距離を示す指標となること、心筋虚血で上昇すること、などを示してきた。BNP は有用な指標であるが、ばらつきが多く、年齢や性の影響も受けることなど問題点もいくつか有する。その理由として血中に様々な BNP の分子型が存在していることが指摘され

ているが、未だ心房と心室に於ける分子型、processing 様式、processing 酵素など、不明な点も多い。そこで血中、心房、心室に於ける BNP 分子の processing と病態に於ける変化、また processing 酵素の意義について検討し、BNP 分子型の測定や治療への応用などを検討することを試みた。

(4) Rho-kinase と腎疾患については、2004 年に最初に報告した。その後も Rho-kinase 高血圧性腎障害との関係について検討し、腎臓内における Rho-kinase 活性の増加とその阻害薬が腎障害の改善に有効であることを示して来た。その普遍性や機序についてはまだ不明な点があり、これについても検討を行った。

2. 研究の目的

(1) 実臨床の現場で AM が本当に急性心不全の患者に有効か、どのような作用を有するのかを検討した。

(2) ラットで前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞に分化誘導する系を構築し、この過程における AM やナトリウム利尿ペプチド受容体の遺伝子発現、AM やナトリウム利尿ペプチド投与の分化に与える影響、成熟脂肪細胞における脂質・糖代謝について検討した。

(3) 心不全患者、健常者における BNP の免疫活性が示す意味や分子型、心不全の患者における分子型のパターンと重症度が関係するのかを検討した。

(4) Rho-kinase 阻害薬の効果の一因に NO の遺伝子発現の増加が報告されている。そこで、L-NAME で NO を阻害した腎障害ラットモデルで Rho-kinase 阻害薬が有効かどうかどうかを検討した。さらに、Rho-kinase 阻害薬と ACE 阻害薬との追加併用効果についても検討した。

3. 研究の方法

(1) 今回、ヒト急性心不全患者 7 例を対象にスワン-ガンツカテーテル挿入下に AM+hANP を 12 時間投与し、その後 hANP を 12 時間投与にスイッチし、血行動態、ホルモン、酸化ストレス指標等を経時的に測定し、その変化について詳細に検討した。

(2) ラット脂肪前駆細胞の培養系において、脂肪細胞において AM の意義について検討するためにメEDIUM中の AM の分子型をイムノラジオメトリック法で測定した。また RT-PCR 法にて脂肪細胞内の AM とその受容体 CRLR、RAMP2, 3 の遺伝子発現について検討した。AM の生理的意義についてブドウ糖取り込み促進作用や、脂肪分解作用を検討した。この機序について、細胞内シグナルについても検討した。心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) の脂肪細胞に対する作用についても

同様に検討した。

(3) 健常者、心房細動患者、心不全患者を対象に血漿を抽出後、ゲル濾過し、各分画をBNPキットで測定し、proBNP-108とBNP-32を測定した。臨床指標との関係についても検討した。剖検並びに手術時に採取した心筋、心房組織を抽出後、上記と同様にBNP-32とproBNP-108を測定した。

(4) L-NAME投与SHRを用いて、Rho-kinase阻害薬を投与し、その腎保護効果について検討した。またその機序についても、各種遺伝子発現、酸化ストレス指標、組織学的検討等を行った。また既に確立されているACE阻害薬とRho-kinase阻害薬との腎臓線維化抑制機序についても検討した。腎臓線維化モデルは尿管結紮モデル(UUO)を用いた。

4. 研究成果

(1) AM+hANPは心拍出量を増加し、体血管抵抗、肺血管抵抗を減少させた。また血中BNP、酸化ストレス指標の改善も認めた。ANP単独に切り替えると、上記の指標の悪化が認められた。特に、AMを投与すると末梢血管抵抗低下作用が強く、心拍出量増加作用が強かった。尿量に関しては変化がなかった。以上の結果から、AM+hANPはhANP単独治療よりも有効である可能性が示唆された。これらの結果から心拍出量が低下し、末梢血管抵抗が増加した重症例に、AM+hANP投与は有効で、カテコラミン投与を逃れる、もしくは量を減らせる事が将来可能になる事が示唆される。今後AM+hANP投与は急性心不全の新しい治療法になることが期待される。

(2) 脂肪細胞はAMの活性型と非活性型の両分子を分泌していたが、分化が進むと活性型の分泌が増加した。AMの分泌量は今まで報告されている細胞よりも多かった。RT-PCR法では脂肪細胞内のAMとその受容体CRLR、RAMP2,3は脂肪細胞において高発現していた。AMの生理的意義ではAMはブドウ糖取り込み促進作用や、脂肪分解作用を認めた。

AMの作用の細胞内シグナルについても検討したところ、AMは細胞内cAMPを用量依存性に増加させ、ウエスタンブロット解析ではPKA、ERK、Aktのリン酸化も認めた。またAMのブドウ糖取り込み作用はwortmanninで抑制され、脂肪分解作用はKT-2735もしくはU0126で抑制された。またイソプロテレノールとAMは脂肪分解作用に対して相加的に働き、max濃度でも相加的であった。さらに脂肪細胞の分化時にAMを添加すると、脂肪細胞の分化は促進された。以上の結果から、脂肪細胞はAMを活潑に分泌しており、AMは脂肪分化、脂肪分解、ブドウ糖取り込み作用等を有し、その細胞内機序は異なることが示唆された。

脂肪細胞にはナトリウム利尿ペプチド受

容体AとCが高発現していた。脂肪細胞においてANPはcGMPを用量依存性に増やし、脂肪分解作用を有し、PKGの拮抗薬で抑制された。一方C受容体のリガンドではcAMP低下作用を有し、脂肪分解を抑制した。この作用はGi蛋白の抑制薬で認められなくなった。このように脂肪細胞においてANPは2つの受容体を介して、別の細胞内機序で2方向性に脂肪分解を調節していることが示された。

(3) 健常者、心房細動においてproBNP-108の占める割合は約40~50%。一方、心不全患者ではproBNP-108の占める割合は広く分布していた。特に心室負荷症例でproBNP-108の占める割合は高く、proBNP-108の占める割合と総BNP値は正相関した。心房組織ではBNP-32が主要な分子型であったが、心室組織ではproBNP-108が主要な分子型であった。心不全悪化時にBNP総量とともにproBNP-108の縮める割合も増加し、心不全が改善すると、BNP総量とともにproBNP-108の縮める割合が低下した。以上の結果から、ヒト血中にはBNP-32だけでなく、proBNP-108も多く含まれ、この比率が増加する事は心室負荷の増加を示し、心不全の質的なマーカーになる事が示唆された。

(4) L-NAME投与SHRでは蛋白尿を認め、組織では腎障害も強く、TGF- β 、collagen I、collagen III、TNF- α 、MCP-1などの発現も強く、尿中のcGMPは低かった。fasudilは腎障害や、これらの指標をわずかに改善した。一方、L-NAME投与後fasudilの改善は概ね良好であった。

UUO群では腎臓の線維化とともに、酸化ストレスを示すDHE陽性面積、筋線維芽細胞への分化を示すalpha-smooth muscle actin(SMA)陽性面積、マクロファージ・単球の浸潤を示すF4/80-陽性面積が増加し、TGF- β 、collagen I、collagen III、TNF- α 、MCP-1などのmRNA発現の増加を伴っていた。Imidaprilとfasudilは腎臓の線維化を有意に抑制し、上記の指標を抑制し、その効果はほぼ同様であった。Imidaprilとfasudilの併用では、さらに線維化が抑制され、DHE陽性面積、alpha-smooth muscle actin(SMA)陽性面積、F4/80-陽性面積、TGF- β 、collagen I、collagen III、TNF- α 、MCP-1の遺伝子発現もさらに改善した。

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13件)

1. Nishikimi T, 他2名 *Current Biochemistry, Molecular Biology, and Clinical Relevance of Natriuretic Peptides* 2011 *J Cardiol.*

2011;57:131-40. (査読無し)

2. Nishikimi T, 他 2 名 Diverse Molecular Forms of Plasma B-type Natriuretic Peptide in Heart Failure. *Curr Heart Fail Rep* 2011;8:140-6 (査読有り)

3. Nishikimi T, 他 14 名 Diversity of Molecular Forms of Plasma Brain Natriuretic Peptide in Heart failure –Different proBNP-108 to BNP-32 Ratios in Atrial and Ventricular Overload– *Heart*. 2010;96:432-9(査読有り)

4. Takeda Y, Nishikimi T, 他 3 名 Beneficial effects of a combination of Rho-kinase inhibitor and ACE inhibitor on tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction. *Hypertens Res.* 2010;33:965-73 (査読有り)

5. Shibasaki I, Nishikimi T, 他 9 名. Greater expression of inflammatory cytokines, adrenomedullin, and natriuretic peptide receptor-C in epicardial adipose tissue in coronary artery disease. *Regul Pept.* 2010;165:210-217 (査読有り)

6. Nishikimi T, 他 5 名 Stimulatory and Inhibitory regulation of lipolysis by the NPR-A/cGMP/PKG and NPR-C/G(i) pathways in rat cultured adipocytes. *Regul Pept.* 2009;153:56-63. (査読有り)

7. Nishikimi T, 他 11 名 Natriuretic peptide/natriuretic peptide receptor-A (NPR-A) system has inhibitory effects in renal fibrosis in mice. *Regul Pept.* 2009;154:45-53 (査読有り)

8. Nishikimi T, 他 10 名 Effects of Long-Term Intravenous Administration of Adrenomedullin plus Human Atrial Natriuretic Peptide Therapy in Acute Decompensated Heart Failure: a pilot study. *Circ J* 2009;73:892-898 (査読有り)

9. Koshikawa S, Nishikimi T, 他 3 名 Fasudil, a Rho-kinase inhibitor, reverses L-NAME exacerbated severe nephrosclerosis in

spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 2008;26:1837-48. (査読有り)

10. Iemura-Inaba C, Nishikimi T, 他 4 名 Role of adrenomedullin system in lipid metabolism and its signaling mechanism in cultured adipocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008;295:R1376-84. (査読有り)

11. 小林直彦, 錦見俊雄 Dahl 心不全モデルラット 日本臨床 67, 569-577, 2009 (査読無し)

12. 錦見俊雄, 循環器領域への新しい遺伝子改変マウス作成技術の応用 日本臨床 67, 685-689, 2009 (査読無し)

13. 錦見俊雄 心血管病の診断と治療におけるバイオマーカーの有用性- BNP - メビオ 26, 24-32, 2009 (査読無し)

[学会発表] (計 30 件、主なものを記す)

1. 竹田陽介, 錦見俊雄 他 6 名. 心不全患者における血中糖鎖付加 N-terminal-proBNP 濃度および糖鎖修飾率の解析 日本心臓血管動物質学会 2011/2/4 香川

2. Takeda Y, Nishikimi T, 他 4 名 Molecular form of Brain Natriuretic Peptide (BNP) Secreted from Cultured Atrial and Ventricular Myocytes and its Processing System 日本心不全学会 2010/10/9 東京

3. Nishikimi T 他 7 名 Role of Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) in Lipid Metabolism and Intracellular Signaling Mechanism in Cultured Adipocytes: Comparison with Adrenomedullin (AM) 23rd International Society of Hypertension 2010/9/26-30 Vancouver, カナダ

4. Nishikimi T 他 9 名 Molecular form of Brain Natriuretic Peptide (BNP) Secreted from Cultured Atrial and Ventricular Myocytes and its Processing System 23rd International Society of Hypertension 2010/9/26-30, Vancouver, カナダ

5. Takeda Y, Nishikimi T, 他 3 名、Molecular

form of Brain Natriuretic Peptide (BNP) Secreted from Cultured Atrial and Ventricular Myocytes and its Processing System International Society for Heart Research 2010/5/13-15, Kyoto

6. Takeda Y, Nishikimi T, 他 5 名、Analysis of Circulating Glycosylated N-terminal-proBNP in Patients with Chronic Renal Failure (CRF) International Society for Heart Research 2010/5/13-15, Kyoto

7. Nishikimi T, Diversity of molecular forms of plasma brain natriuretic peptide (BNP) in heart failure (HF)-different proBNP-108 to BNP-32 ratios ub atrial and ventricular overload- International Symposium on Cardiovascular Endocrinology and Metabolism (CVEM)2010, 2010/3/31-4/1, Nara, Japan

8. 錦見俊雄, 血中 BNP と NT-proBNP の存在様式とその意義. 第 74 回日本循環器学会総会・学術集会 ランチョンセミナー 2010/3/5-7, 京都市

9. 錦見俊雄, BNP の基本的性質と最近の知見 第 74 回日本循環器学会総会・学術集会 Fireside Seminar 2010/3/5-7, 京都市

10. Nishikimi T, 他 8 名 Beneficial effects of combination of ACE inhibitor and Rho-kinase inhibitor on tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction AHA Scientific Sessions 2009, 2009/11/14-18, Orlando, U.S.A.

11. 竹田陽介、錦見俊雄 他 7 名 慢性腎不全患者における O 型糖鎖付加 N-terminal-proBNP (O-glyNT-BNP) 濃度の解析 第 57 回日本心臓病学会学術集会 2009/9/18-20, 札幌市

12. Nishikimi T, 他 9 名 Diversity of molecular forms of BNP in heart failure -difference of molecular form of BNP in atrial and ventricular overload-. 第 73 回日本循環器学会総会 2009/3/20-22, 大阪市

13. 田所寿剛、錦見俊雄、他 7 名 心不全モ

デルラットにおける心房及び心室の ANP と BNP の分子型の変化 第 12 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会 2008/11/28-29, 熊本市
14. 錦見俊雄 心不全のリスクと BNP -生活習慣病を含めて 第 11 回日本栓子検出と治療学会シンポジウム 2008/10/31-11/1, 倉敷市

15. Ishimura K, Nishikimi T, 他 6 名 Molecular forms of BNP and ANP and gene expression of processing enzyme in atrium and ventricle in heart failure rat. 第 12 回日本心不全学会学術集会 2008/10/16-18, 東京

16. 家村周子、錦見俊雄、他 7 名 Dahl 食塩感受性高血圧ラットモデルにおける、心肥大、心不全期でのナトリウム利尿ペプチド (ANP、BNP) の分子型と意義 第 31 回日本高血圧学会総会 2008/10/9-11, 札幌市

17. 錦見俊雄他 1 4 名. 心不全における血中 BNP の分子型とその意義. 第 56 回日本心臓病学会学術集会パネルディスカッション. 2008/9/8-10, 東京

18. Tadokoro K, Nishikimi T, 他 8 名 Natriuretic peptide/natriuretic peptide receptor-A (NPR-A) system has inhibitory effects in renal fibrosis in unilateral ureteral obstruction (UUO) model. 22nd Scientific Meeting of the International Society of Hypertension. 2008/6/14-19, Berlin, Germany

19. Karasawa T, Nishikimi T, 他 10 名 Intravenous administration of adrenomedullin (AM) is effective in acute heart failure as a therapeutic drug. 22nd Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, 2008/6/14-19, Berlin, Germany

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: BNP による診断法

発明者: 錦見俊雄 他 2 名

権利者: 同上

種類：心臓の医療に関する

番号：2009-197382

出願年月日：2009.8.27

国内外の別：国内外

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・内分泌代謝内
科・准教授

研究者番号：80291946

(2) 研究分担者

なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

南野 直人 (Minamino Naoto)

国立循環器病センター研究所や栗部・部長

研究者番号：50124839