

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790660
 研究課題名（和文）
 末梢動脈疾患におけるナトリウム利尿ペプチド系の意義の検討と治療応用
 研究課題名（英文）
 Investigation on the Significance of Natriuretic Peptide System in Peripheral Arterial Diseases and its Therapeutic Application
 研究代表者
 朴 貴典 (PARK KWIJUN)
 京都大学・医学研究科・非常勤講師
 研究者番号：20437221

研究成果の概要（和文）：

糖尿病状態が末梢動脈におけるナトリウム利尿ペプチド(NP)受容体(NPR)発現に与える影響の検討を試みたが、ラット等より大型の動物を用いた検討が必要と考えられた。マウスに対する心房性 NP (ANP)投与において、高用量では血圧低下に伴う交感神経活性化の危険があることが明らかになった。高脂肪食で肥満、耐糖能障害を惹起した場合に、ANP と脳性 NP (BNP)の生物作用発揮に関与する受容体であるグアニル酸シクラーゼ(GC)-A の mRNA 発現が低下し、NP のクリアランスに関与する NPR-C の mRNA 発現が上昇して、ANP と BNP の生物作用が減弱する可能性のあることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

We tried to investigate the influence of diabetic status on the expression of natriuretic peptide receptors (NPRs) in the peripheral artery, but it was suggested that investigations using larger animals such as rats would be needed to address this issue. It was suggested that atrial natriuretic peptide (ANP) administration at a high dose in mice would result in the activation of sympathetic nervous system in response to the blood pressure decrease by ANP. In the skeletal muscle in mice with the high-fat diet-induced obesity and impaired glucose tolerance, mRNA expression of guanylyl cyclase (GC)-A, the signaling receptor for ANP and brain natriuretic peptide, was decreased and that of NPR-C, the clearance receptor for NPs, was increased as compared with mice fed normal chow, indicating that obesity and impaired glucose tolerance would suppress the signaling of NP system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
〇〇年度	2,000,000	600,000	2,600,000
〇〇年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：ナトリウム利尿ペプチド、末梢動脈疾患、受容体、遺伝子発現、治療法

1. 研究開始当初の背景

糖尿病の合併症の中で、糖尿病足病変は下肢切断の主要な原因として注目されている。糖尿病足病変は閉塞性動脈硬化症 (arteriosclerosis obliterance: ASO) と糖尿病性神経障害などを基盤とするが、その半数は下肢 ASO により生じるとされている。また、冠動脈以外の大動脈およびその分枝の狭窄、閉塞、動脈瘤疾患が末梢動脈疾患 (peripheral arterial disease: PAD) としてまとめられ、有効な治療法の開発が急がれている。

動脈硬化症においては、一酸化窒素 (nitric oxide: NO) の産生及び作用の低下による血管機能障害が知られている。血管内皮細胞由来の NO は可溶性グアニル酸シクラーゼ (guanylyl cyclase: GC) と結合し、細胞内 cGMP 濃度上昇を介して cGMP 依存性プロテインキナーゼ (cGMP-dependent protein kinase: cGK) I を活性化することで、血管拡張作用、接着因子発現抑制 (白血球接着抑制)、増殖因子・遊走因子発現調節、血小板凝集抑制などの作用を発揮し、血管壁再構築と血管新生を制御している。動脈硬化症の原因となる高血糖、腎不全、高 LDL-コレステロール血症などの病態は、心血管疾患の発症リスクと相関することが知られ、内因性 NO 合成酵素 (NO synthase: NOS) 阻害物質である asymmetric dimethylarginine (ADMA) の産生増加・蓄積が認められる。また、内皮型 NOS (eNOS) は通常、二量体として存在するが、動脈硬化症などの病的状況下や酸化ストレスの亢進した状況下では、この二量体形成に重要な tetrahydrobiopterin 濃度低下により eNOS uncoupling が生じ、NO 産生障害、活性酸素種の産生増加が認められるようになり、動脈硬化症における血管機能障害において重要な要素となっている。

ナトリウム利尿ペプチド (natriuretic peptide: NP) 系は、心臓ホルモンである心房性 NP (atrial NP: ANP) と脳性 NP (brain NP: BNP)、そして血管や軟骨の局所因子である C 型 NP (C-type NP: CNP) の 3 つのリガンドと、NP receptor (NPR)-A、NPR-B、NPR-C の 3 つの受容体から構成される。NPR-A と NPR-B は細胞膜に存在する GC そのものであり、それぞれ GC-A、GC-B と呼ばれ、これらにより NP は NO と同様に細胞内 cGMP 濃度を上昇させ cGK 経路などを賦活化することで生理作用を発揮する。一方 NPR-C は GC 活性を持たず、NP のクリアランスや Gi を介したシグナル伝達に関与するとされる。従って、NP 系活性化は NO 系の機能低下を補うことが期待される。

研究代表者らは、ストレプトゾトシン腹腔内投与にて血糖 250 以上の糖尿病状態を 16 週間以上持続させた C57BL/6J マウスにおいて、正常血糖マウスと比較して、大腿動脈結紮・切除による下肢 ASO モデルにおける血流回復が低下することを明らかにした。また、ASO モデル作成直後より、遺伝子組換えヒト ANP (hANP) を $2.2 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ で 4 週間持続腹腔内投与することにより、虚血組織内での毛細血管密度を増加させることで血流回復が促進することを確認し、上記の糖尿病マウスでは、hANP 投与により、生理食塩水を持続腹腔内投与した正常血糖マウスと同等まで血流回復が改善することを見いだした。この知見に基づき、糖尿病や腎不全を合併する下肢 PAD 患者 13 名に対して hANP の持続静脈内投与を行い、ankle-brachial index の上昇と臨床症状の回復を確認している。

2. 研究の目的

NP 系の活性化は PAD の治療に有効と考えられるが、心不全など血中 ANP 濃度が上昇する疾患において GC-A の NP 受容体としての機能の低下を示唆する報告もあり、PAD において NP 系情報伝達が障害されている可能性も残る。本研究は PAD における NP 系の変化を検討し、その調節により、新たな治療法開発の基盤を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 末梢動脈組織における NPR 発現の検討

正常血糖マウスとストレプトゾトシン腹腔内投与により 16 週間糖尿病状態としたマウスから大腿動脈を摘出し、RNA を抽出して real-time RT-PCR 法にて NP 受容体 (GC-A, GC-B, NPR-C) の mRNA 発現の検討を試みた。

(2) マウスに対する hANP 投与量最適化

8 週齢雄の C57BL/6J マウスを用いて、マイクロ浸透圧ポンプ (model 1002D, Alzet) を腹腔内に埋め込み、生理食塩水あるいは carperitide (hANP、第一三共) を 1.5 または $3.0 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ で持続腹腔内投与し、血圧、脈拍、尿中カテコラミン排泄量を検討した。血圧と脈拍の測定は、投与開始 1 週間後に尾動脈カフ法による非観血的血圧測定装置

(MK-2000ST, Muromachi Kikai) により行った。尿中カテコラミン排泄量は、マウス用代謝ケージ (シナノ製作所) を用いて 24 時間蓄尿し、HPLC 法にて測定した。

(3) 代謝異常の NPR 発現に対する影響の検討

通常食 (F-2、船橋農場) あるいは高脂肪食 (45 kcal%fat: D12451、Research Diet) で 8 週齢から 6 週間飼育した C57BL/6J マウス雄

から大腿四頭筋を摘出し、RNAを抽出して real-Time PCR法により GC-A と NPR-C の mRNA 発現を検討した。

4. 研究成果

(1) 末梢動脈組織における NPR 発現の検討

PAD モデル作製のためマウスに大腿動脈結紮・切除を行なう際に切除される動脈組織の利用を予定したが、RNA および蛋白の回収量が予想よりも少なく、技術的な再検討が必要と考えられた。蛋白発現や NP 受容体機能の検討を行うには、ラットなどより大型の動物モデルを用いた実験系の構築が必要と考えられた。

(2) マウスに対する hANP 投与量最適化

hANP の投与量を $3 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ とすると、血中 hANP 濃度は $150 \text{ pg}/\text{ml}$ 前後に上昇し、生理食塩水投与群と比較して血圧が有意に低下した。尿中アドレナリンおよびノルアドレナリン排泄量が生理食塩水投与群と比較して増加しており、血圧低下による交感神経系の活性化が生じているものと考えられた。また、有意の体重減少が認められた。hANP 投与量を $1.5 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ とした場合は、血中 hANP 濃度は $40 \text{ pg}/\text{ml}$ 前後にとどまり、血圧低下は認められるものの $3 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ の場合よりも小さく、生理食塩水投与群と比較して尿中カテコラミン排泄量の有意の増加は認められなかった。PAD の治療においてはその基盤となる代謝異常のコントロールも重要であるが、NP の用量設定にあたっては、NP の血圧低下作用に反応した交感神経系の活性化によりインスリン抵抗性を惹起しないような注意が必要と考えられた。

(3) 代謝異常の NPR 発現に対する影響の検討

高脂肪食で飼育したマウスでは、内蔵脂肪の蓄積、脂肪肝、腹腔内投与糖負荷試験で検討した耐糖能の障害が認められた。高脂肪食で飼育したマウスでは、通常食で飼育したマウスと比較して GC-A の mRNA レベルは低下し、NPR-C の mRNA レベルは上昇していた。この成績は、少なくとも骨格筋においては、肥満を基盤とした糖・脂質代謝障害により、ANP、BNP/GC-A 系のシグナル伝達が抑制されることを示唆している。ANP、BNP/GC-A/cGKI 系が脂肪細胞での中性脂肪分解と骨格筋での脂肪酸燃焼を促進することが解明されているが、代謝異常による ANP、BNP/GC-A 系の抑制により悪性サイクルが形成される可能性もある。また、同様の変化が血管壁 NPR 系にも生じているのであれば、メタボリックシンドロームにおける血管病変の増悪因子となりうると考えられた。今後、更なる検討が必要である。

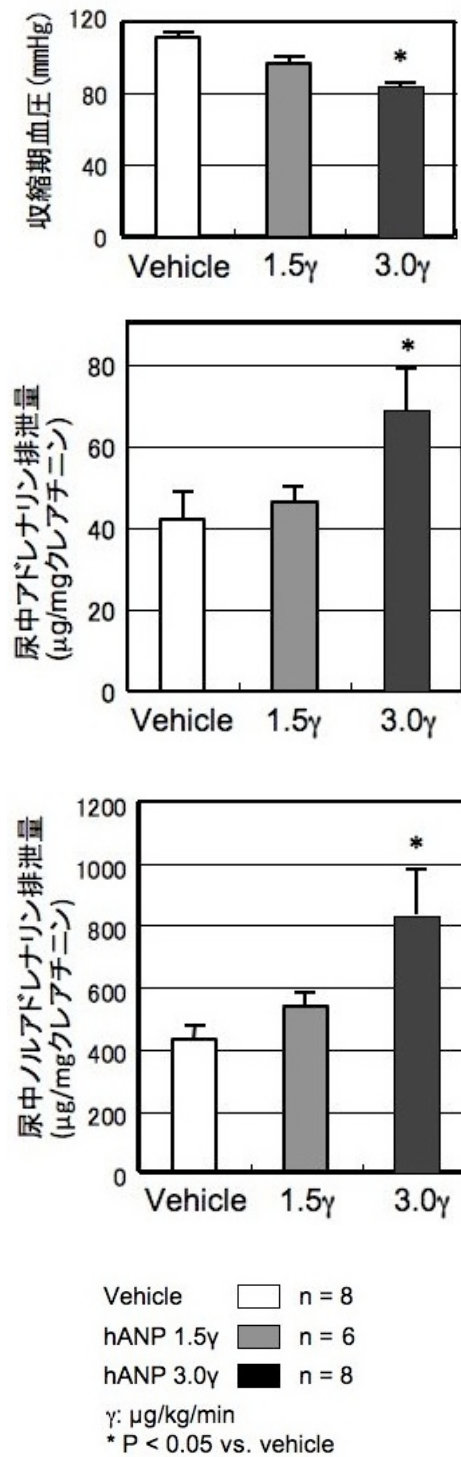


図 1. hANP 投与による血圧と尿中カテコラミン排泄量の変化

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2件)

- ① Takuhiro Sonoyama, Naohisa Tamura, Kazutoshi Miyashita, Kwijun Park, Naofumi Oyamada, Daisuke Taura, Megumi Inuzuka, Yasutomo Fukunaga, Masakatsu Sone, Kazuwa Nakao. Inhibition of hepatic damage and liver fibrosis by brain natriuretic peptide. FEBS Lett. (査読有) 583: 2067-2070, 2009.
- ② Kwijun Park, Hiroshi Itoh, Kenichi Yamahara, Masakatsu Sone, Kazutoshi Miyashita, Naofumi Oyamada, Naoya Sawada, Daisuke Taura, Megumi Inuzuka, Takuhiro Sonoyama, Hirokazu Tsujimoto, Yasutomo Fukunaga, Naohisa Tamura, Kazuwa Nakao. Therapeutic potential of atrial natriuretic peptide administration on peripheral arterial diseases. Endocrinology (査読有) 149: 483-491, 2008.

[学会発表] (計2件)

- ① Kwijun Park, Hiroshi Itoh, Kenichi Yamahara, Kazutoshi Miyashita, Naofumi Oyamada, Naoya Sawada, Daisuke Taura, Megumi Inuzuka, Takuhiro Sonoyama, Hirokazu Tsujimoto, Yasutomo Fukunaga, Naohisa Tamura, Kazuwa Nakao. Therapeutic significance of atrial natriuretic peptide on peripheral arterial disease. 14th International Congress of Endocrinology. 2010年3月27日, Kyoto, Japan.
- ② Takuhiro Sonoyama, Naohisa Tamura, Kazutoshi Miyashita, Kwijun Park, Naofumi Oyamada, Daisuke Taura, Megumi Inuzuka, Katsutoshi Kojima, Kyoko Honda, Yasutomo Fukunaga, Masakatsu Sone, Akihiro Yasoda, Hiroshi Arai, Kazuwa Nakao. Therapeutic potential of brain natriuretic peptide for liver fibrosis. 14th International Congress of Endocrinology. 2010年3月27日, Kyoto, Japan.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

朴 貴典 (PARK KWIJUN)

京都大学・医学研究科・非常勤講師

研究者番号：20437221

(2) 研究協力者

① 田村 尚久 (TAMURA NAOHISA)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：40314207

② 園山 拓洋 (SONOYAMA TAKUHIRO)

京都大学・医学研究科・大学院生