

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461620

研究課題名(和文)機能獲得変異型NPR-Bを応用した心不全治療戦略の確立

研究課題名(英文)Overexpression of constitutively active NPR-B inhibits cardiac hypertrophy

## 研究代表者

岡田 陽子 (OKADA, YOKO)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・招へい教員

研究者番号：30457022

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：機能獲得変異型MT-NPRB(以下MT)を、心筋細胞特異的に発現させるアデノ随伴ウイルスベクターを作製し、新生児ラット培養心筋細胞にMTを強制発現させたところ、cGMP濃度の上昇、PKG活性の上昇、心筋細胞肥大抑制効果を認めた。またイソプロテレノール持続注入による左室肥大モデルマウスに、作製したAAV-9ベクターを経静脈的に投与し、心臓特異的にMTを発現させたところ、MTを発現させたマウスではイソプロテレノールによる心筋細胞肥大効果が抑制され、さらに心機能の改善を認めた。以上から、機能獲得変異型NPR-Bの心筋細胞への強制発現は、心不全の新たな治療戦略になり得ると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have identified a novel missense mutation in the NPR-B gene (2647G>A; Val 883 Met) in a family case showing overgrowth and bone anomalies. Overexpression of this constitutively active NPR-B (MT) induced significant increase in intracellular cGMP levels without CNP binding. We investigated a hypothesis that overexpression of MT inhibits cardiac hypertrophy. To overexpress MT especially in heart, we used recombinant adeno-associated viral serotype-9 (rAAV-9) vectors. 10-week-old mice were subcutaneously implanted a miniosmotic pump that released isoproterenol. Tail vein injection of rAAV-9 vector was administered after the pump implantation. We investigate the heart body weight ratios (HW/BW), echocardiography, and histological analysis of heart (cell size .etc).As a result, overexpression of MT in heart inhibited ISO-induced cardiac hypertrophy compared to GFP control. MT-NPRB may be an additional therapeutic target in the treatment of cardiac hypertrophy.

研究分野：小児循環器

キーワード：NPR-B CNP cyclic GMP 心不全

1. 研究開始当初の背景

近年の心臓血管外科学および小児循環器学、新生児学の進歩により、先天性心疾患患者の90%が成人する時代となった。現在、小児期先天性心疾患患者は約40万人、成人期先天性心疾患患者も約40万人以上いると推定されており、今後成人先天性心疾患患者は確実に増加していく。それに伴い術後遠隔期における心不全が従来の心不全集団に加わり、心不全治療対象が拡大する事になる。一方、小児期発症心筋症の心不全も、小児循環器領域では重要な疾患で、その予後は著しく悪い。改正臓器移植法が施行され、2012年6月当院において国内初となる6歳未満の脳死患者からの心臓移植が行われたとはいえ、このようなケースは未だに稀であり、ドナーの出現はきわめて困難な状況である。また小児に使用可能な補助循環装置もほとんどないのが現状であり、小児の心不全に対する新たな治療法の開発が急務である。

最近我々は、骨の過形成を呈する一家系において、Cタイプナトリウム利尿ペプチド(CNP)の受容体(Natriuretic peptide receptor type-b: NPR-B)の機能獲得型変異体を世界で初めて発見し、報告した(PLoS One. 2012;7(8):e42180. Epub 2012 Aug 3.)。NPR-Bは、心臓や軟骨、血管などで発現し、リガンドであるCNPが結合すると、細胞内cGMPが増加することで、様々な細胞機能調節に関与している。我々の発見した変異型NPR-Bは、培養細胞に発現させると、リガンドであるCNPの非存在下においても細胞内cGMP濃度を約10,000倍に上昇させることが確認された。

細胞内cGMP濃度の上昇により、心筋において肥大化抑制や、線維化抑制、心筋apoptosisの抑制、虚血再灌流障害の軽減などが報告されており、phosphodiesterase5阻害薬や、NOの受容体であるsoluble guanylyl cyclase activatorなどが、心不全治療薬として注目されている。一方、我々の発見した変異型NPR-Bはparticulate guanylyl cyclaseを介してcGMPを上昇させ、その上昇効果は、既存の薬剤を遥かに凌ぐものであり、心不全に対して従来にない効果が期待できる。

2. 研究の目的

心不全における心室リモデリングには、心筋細胞の肥大と間質の線維化が重要であり、心不全に対する内科的治療戦略のターゲットとして注目されている。細胞内cGMPはcGMP依存性プロテインキナーゼ(PKG)の活性化を介して、心筋細胞肥大や間質線維化を抑制すると考えられている。我々が骨系統疾患の患者から発見したcGMP恒常産生型Na利尿ペプチド受容体変異株(NPR-B変異体)は、心筋初代培養細胞に発現させると、CNP投与やphosphodiesterase阻害薬と比較して、細胞内cGMPを数千倍に増加させることが確認できた。このNPR-B変異体を心不全モデルラットの心筋に発現させ、cGMP

を著増させることにより心筋肥大抑制効果、心線維化抑制効果を検討し、CNP-NPR-B系を応用した心不全治療薬開発の基盤とする事を本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(in vitro) 野生型NPR-B(WT)機能獲得変異型NPR-B(MT)およびGFPを、新生児ラット初代培養心筋細胞に発現させ、既知の肥大誘導刺激であるAngiotensin、Endothelin-1、Isoproterenolを加え、細胞内cGMPの動態と心筋細胞肥大の程度を検討した。さらに結果をPDE5阻害薬であるSildenafilの効果と比較した。またIsoproterenol持続注入による左心肥大モデルマウスを作製し、アデノ随伴ウイルスベクターによるin vivo遺伝子導入を試みた。

(in vivo) 皮下埋込み型浸透圧ポンプを用いたIsoproterenol持続注入による左心不全モデルマウスを作製した。9型アデノ随伴ウイルスベクター(AAV-9ベクター)を用いて、機能獲得変異型NPR-B(MT)野生型NPR-B(WT)およびGFPを、それぞれ心筋細胞特異的に発現させることで、変異型NPR-Bによる心不全予防効果・心不全治療効果についてそれぞれ検討した。検討に際しては、心エコーによる心機能、免疫組織染色による心筋肥大・線維化、組織におけるcyclic GMP濃度を検討した。

4. 研究成果

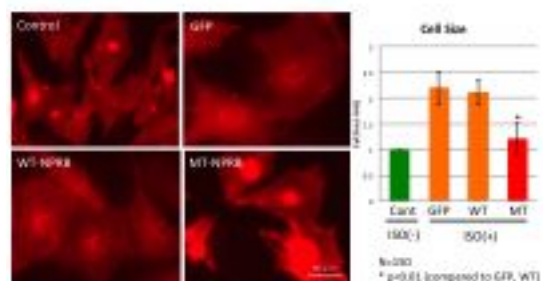
1. AAV9ベクターの作成

日本医科大学(島田教授)より提供して頂いたアデノ随伴ウイルスベクターtype9をもとに、-MHCをpromoterとし、機能獲得変異型MT-NPRB、野生型WT-NPRBおよびGFPを、それぞれ心筋細胞特異的に発現させるウイルスベクター(以下AAV-9ベクター)を作製した。作製したAAV-9ベクターをマウスの尾静脈から経静脈的に投与しGFPを強制発現させたところ、心臓以外の肝臓・腎臓・脾臓・脳・肺・骨格筋といった臓器ではGFPの発現を認めず、in vivoにおいても心臓に特異的なGFPの発現が確認された。

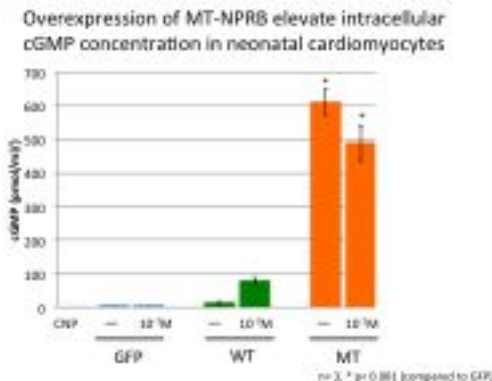
2. 培養心筋細胞に対する肥大化抑制効果

AAV-9ベクターを用いて、新生児ラットより分離した初代培養心筋細胞に対しMT-NPRBを発現させたところ、心筋細胞肥大抑制効果を認めた(Cell size: GFP 2.2±0.4, WT 2.1±0.4, MT 1.2±0.3 (±SD, -fold vs control))。

Overexpression of MT-NPRB by rAAV-9 vector inhibits ISO-induced cardiomyocyte hypertrophy



また、MT-NPRB を発現させた心筋細胞において、cGMP 濃度の上昇 (GFP  $0.5 \pm 0.1$ , WT  $12.5 \pm 0.3$ , MT  $611.5 \pm 75.2$  ( $\pm$ SD, pmol/ml, without CNP)), PKG 活性の上昇 (WT  $1.2 \pm 0.1$ , MT  $1.9 \pm 0.1$  ( $\pm$ SD, -fold vs GFP)) を認めた。



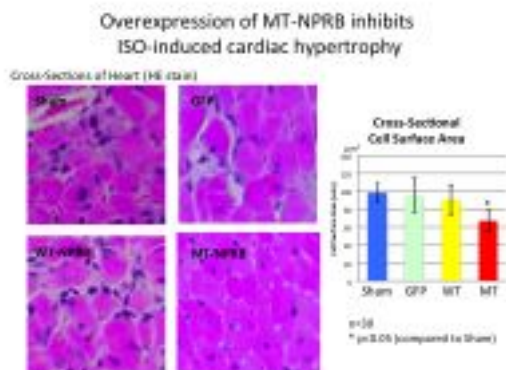
Sildenafil との比較においては、細胞内 cGMP 濃度は数百倍 ( $130 \pm 69.2$  ( $\pm$ SD, -fold vs Sildenafil)) に上昇し、Sildenafil と同等程度の心筋細胞肥大抑制効果を認めた。

### 3. イソプロテレノール持続投与による心不全モデルラットの作製

10 週齢のオスの C57B6J マウスの頸部に、皮下埋め込み型浸透圧ポンプ (Alzet1002) を埋め込み、イソプロテレノール 30mg/kg/day を 7 日間持続投与する事により、左室肥大モデルマウスを作成した。作製したモデルマウスでは、心筋細胞は約 1.5 倍に肥大し (Cell size;  $1.54 \pm 0.59$  ( $\pm$ SD, -fold compared to control))、胎児性遺伝子発現も上昇していた (ANP/GAPDH ( $\pm$ SD, -fold): GFP,  $2.51 \pm 0.35$ ; WT,  $2.66 \pm 0.27$ ; MT,  $1.13 \pm 0.25$ )

### 4. イソプロテレノール持続投与による心不全モデルラットに対する心筋肥大抑制効果

左室肥大モデルマウスに、AAV-9 ベクターを用いて心臓特異的に GFP、WT-NPRB、MT-NPRB をそれぞれ発現させたところ、心重量/体重比に有意差はなく、MT-NPRB を発現させたマウスでは、Isoproterenol による心筋細胞肥大効果が抑制された (Cross sectional cell surface area; Sham  $99 \pm 7$ , GFP  $96 \pm 9$ , WT  $91 \pm 10$ , MT  $67 \pm 10$  ( $\pm$ SD,  $\mu$ m<sup>2</sup>))



さらに、MT-NPRB を発現させたマウスにおいて心機能の改善を認めた (Fraction

Shortning ( $\pm$ SD, %); Sham  $28 \pm 2$ , GFP  $26 \pm 3$ , WT  $26 \pm 2$ , MT  $34 \pm 5$ )

以上から、AAV-9 ベクターを用いた機能獲得変異型 NPR-B の心筋細胞への強制発現は、心不全の新たな治療戦略になり得ると考えられる。しかし、強制発現による副作用など、その臨床応用に際しては、更なる検討が必要である。

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

B 型ナトリウム利尿ペプチド受容体 (NPR-B) の機能獲得型変異体による心肥大抑制効果の検討

馬殿洋樹, 桂木慎一, 那波伸敏, 石田秀和, 鳥越史子, 髭野亮太, 三原聖子, 成田淳, 高橋邦彦, 小垣滋豊, 大園恵一. 第 24 回日本小児心筋疾患学会, 2015 年 10 月 24 日 (大阪)

B 型ナトリウム利尿ペプチド受容体 (NPR-B) の機能獲得型変異体による心不全治療戦略

馬殿洋樹, 那波伸敏, 鳥越史子, 三原聖子, 石井良, 市森裕章, 高橋邦彦, 岡田陽子, 小垣滋豊, 大園恵一. 第 50 回日本小児循環器学会学術集会, 2014 年 7 月 3 日-5 日 (岡山)

機能獲得変異型 NPR-B による心不全治療戦略

馬殿洋樹, 髭野亮太, 那波伸敏, 石井良, 市森裕章, 内川俊毅, 高橋邦彦, 岡田陽子, 小垣滋豊, 大園恵一. 第 49 回日本小児循環器学会学術集会, 2013 年 7 月 13 日 (東京)

Constitutively Active NPR-B (Type-B Human Natriuretic Peptide Receptor) Inhibits Cardiomyocyte Hypertrophy and Cardiac Fibroblast Fibrosis.

Baden H, Nawa N, Ishida H, Takahashi K, Kogaki S, Yabushita-Okada Y, Ichimori H, Ishii R, Mihara S, Higeno R, Miura K, Ozono K. American Heart Association, Scientific Sessions 2013, 2013.11.16-20 (Dallas)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:

番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岡田 陽子 (OKADA, Yoko)  
大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・  
招へい教員  
研究者番号：30457022

### (2) 研究分担者

小垣 滋豊 (KOGAKI Shigetoyo)  
大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・  
講師  
研究者番号：00311754

### (3) 連携研究者

高橋 邦彦 (TAKAHASHI Kunihiro)  
大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・  
招へい教員  
研究者番号：10610230