

令和元年6月24日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09498

研究課題名(和文) O型糖転移酵素GALNTによる低活性型proBNP糖鎖修飾及び分泌制御機構の解明

研究課題名(英文) Evaluation for regulatory mechanism of glycosylation and secretion of less bioactive proBNP by O-linked glycosylation

研究代表者

中川 靖章 (NAKAGAWA, YASUAKI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：70452357

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：BNPは心臓から分泌され、心保護作用を持つペプチドであるが、血中にはその前駆体proBNPが存在し、その生理活性は極めて弱い。しかしながらこのproBNPの分泌機序については不明であった。本研究では、心臓に豊富に存在するmicroRNAであるmiR-30がO型糖転移酵素GALNT1とGALNT2の遺伝子発現発現を抑制的に制御することで、GALNT1及びGANT2によるproBNPの糖鎖修飾を調節調節することで糖鎖依存性のproBNPのプロセッシング・分泌を調節するというメカニズムが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、低活性のproBNP分泌メカニズムの一端が明らかとなり、これらの分子メカニズムを修飾することで、心不全の新たな診断法や、活性の強いBNPの分泌が促進されるような新たな心不全治療の開発につながる可能性が有る意義のある研究成果が得られたと考える。

研究成果の概要(英文)：BNP is secreted from the heart and is a cardioprotective peptide, but its precursor proBNP is present in the blood and its biological activity is extremely weak compared to BNP. However, the secretion mechanism of this proBNP was unknown. In this study, we suggested that miR-30, a microRNA abundant in the heart, regulates the gene expression of the O-linked glycosyltransferases, GALNT1 and GALNT2, in a repressive manner, thereby regulating the glycosylation of proBNP by GALNT1 and GANT2, and that miR-30-GALNT pathway is involved in the glycosylation-dependent regulation of the processing and secretion of proBNP.

研究分野：分子心臓病額

キーワード：糖鎖修飾 proBNP

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

BNP は心不全のバイオマーカーとして診断、重症度判定、治療効果判定、予後予測などに使用され、世界中の心不全のガイドラインにもその使用が推奨されているが、疾患や病態の鑑別などの点を含め未だ不十分な点も多い。BNP は主に心室から分泌されるホルモンの一種で、心筋への種々のストレスに応じて、まずホルモン前駆体である proBNP が心筋細胞内で産生され、これが細胞内でプロセシングされ活性型の BNP (1-32) が生成され血中に分泌されるが、proBNP も血中に循環し、特に重症心不全でその血中濃度が上昇すること (Nishikimi T, *Heart* 2010)、従来の BNP 測定法は proBNP にも交叉し血中 BNP 濃度の測定値は proBNP の血中濃度も含まれた値であること、proBNP の生理活性は BNP (1-32) に比して極めて弱いことなどが明らかとなってきており、心不全において proBNP が相対的に増加することは、血中 BNP 値に見合わない、BNP 作用不全を引き起こし、このことが心不全の病態形成に関与している可能性が考えられる。

proBNP から BNP へのプロセシング機序については、近年、proBNP の N 末端に存在する 7 カ所の O 型糖鎖結合部位のうち T71 に結合する糖鎖がプロセシングを抑制することが心筋細胞以外の細胞ですでに報告されていた (Semenov A, *Clin Chem* 2009) が、proBNP 糖鎖修飾の詳細な機序、制御機構、糖鎖の実態については未だ不明であった。

申請者は proBNP について、心筋細胞において、proBNP 切断部位と糖鎖結合部位との距離がプロセシング効率に関係すること (Nishikimi T, Nakagawa Y, *AJP* 2015) T71 に加え T48 の糖鎖もプロセシングの抑制に必須であること、O 型糖転移酵素の GALNT1,2 が proBNP への糖鎖付加を介して BNP へのプロセシングに関与していることを明らかとしてきた。また申請者は、心筋における GALNT1,2 の遺伝子発現調節機序について、心筋に豊富に存在する microRNA である miR-30 の標的配列が GALNT1,2 の 3' UTR に種を越えて存在することを見だし、miR-30 が GALNT1,2 の発現を制御している可能性が考えられ、更には、この miR-30-GALNTs 経路により proBNP の糖鎖修飾を介した proBNP プロセシング調節が行われている可能性も考えられる。

### 2. 研究の目的

本申請研究の目的は、心負荷や病的状態において、低活性型の proBNP 分泌が増加する機序について、proBNP の糖鎖修飾調節及びそれを介したプロセシング調節の分子メカニズムの詳細、特に miR-30-GALNT 経路が関与するかどうかについて、またその病態生理学的意義を明らかとすることで、新たな心疾患の診断法・治療法の開発の可能性を追求することである。

### 3. 研究の方法

GALNT1 及び 2 の遺伝子発現調節への miR-30 が関与について、またこの miR-30-GALNT 経路による糖鎖修飾制御が、病的な心筋での proBNP のプロセシング・分泌調節に関与しているかどうかについて、以下の方法で検討した。

1) 培養心筋細胞に対する肥大刺激や、種々の心不全モデル動物における GALNT1,2 発現を定量的 RT-PCR 法、ウェスタンブロット法を用いて検討し、その発現調節機序を検討する。同時に miR-30 family 発現について定量的 RT-PCR にて検討する。

2) GALNT1 及び 2 に存在する miR-30 の認識部位に相同の配列を含む '非翻訳領域 (3' -UTR) を組み込んだレポーター遺伝子に対する miR-30 の作用についてレポーターアッセイにより検討する。

3) 新生仔ラット培養心筋細胞において、miR-30 の mimic や inhibitor による GALNT1 及び GALNT2 の発現への影響について、real time RT-PCR や Western blot 法を用いて検討する。

4) ヒト proBNP 遺伝子を導入した新生仔ラット培養心筋細胞において、miR-30 の mimic や inhibitor を作用させ、培養上清における proBNP/BNP 比 (特異的 proBNP 測定法を使用) を proBNP のプロセシング効率の指標として、これら microRNA の proBNP プロセシングへの作用を検討する。

5) マウスに miR-30 の inhibitor を投与して心臓での GALNT1 及び GALNT2 発現を検討する。

### 4. 研究成果

1) 心筋細胞への肥大刺激で、GALNT1 及び GALNT2 の遺伝子発現は増加する傾向にあり、蛋白発現は有意に増加した。また、このとき miR-30 の発現は有意に減少していた。また、心不全ラットモデルにおいて、GALNT1 及び GALNT2 の蛋白発現は有意に亢進していた。

2) GALNT1 及び 2 の 3' -UTR を組み込んだコンストラクトにおいて、miR-30 の mimic は有意にルシフェラーゼ活性を低下させ、また miR-30 認識部位に相同な配列に変異をいれた 3' -UTR を組み込んだコンストラクトでは miR-30 によるルシフェラーゼ活性オン低下を認めなかった。このことから miR-30 が GALNT1 及び GALNT2 遺伝子の 3' -UTR を介して、両者の遺伝子発現を抑制的に制御していることが示唆された。

3) 培養心筋細胞において、miR-30 の mimic を導入すると、GALNT1 及び GALNT2 の蛋白発現は有意に減少し、一方 miR-30 の inhibitor を導入すると GALNT1 及び GALNT2 の蛋白発現は有意に増加した。このことから、心筋細胞において miR-30 が GALNT1 及び GALNT2 の発現を確かに抑制的に制御していることが示された。

4) ヒト proBNP 遺伝子をレンチウイルスを用いて導入した心筋細胞に mir-30 の mimic を導入したところ、その培養上清中の proBNP/BNP 比は、control の micro-RNA を導入した者に比べて有意に低下し、miR-30 による GALNT1、及び GALNT2 の遺伝子発現抑制を介して proBNP の糖鎖修飾が減少することで proBNP のプロセッシングが促進された可能性が考えられた。

5) マウスに miR-30 の inhibitor を導入したところ、心臓において GALNT1 及び GALNT2 の発現が有意に増加し、生体内においても miR-30 による GALNT1,2 遺伝子発現の制御が行われていることが示唆された。

以上のことより、miR-30 が GALNT1,2 の発現を抑制的に制御し、それによる proBNP の糖鎖修飾調節を介して proBNP のプロセッシング・分泌が調節され、これにより低活性型の proBNP 分泌が制御されている可能性が示唆された。この成果は、これらの経路を標的とした新たな診断法、治療法の開発につながりうるものとする。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1) Kuwabara J, Kuwahara K(7人中2番目), Nakagawa Y(7人中5番目) et al. Cross-sectional study of the association between day-to-day home blood pressure variability and visceral fat area measured using the dual impedance method. PLoS One.2018 Nov.5;13(11):e0206945. Doi:10.1371/journal.pone.0206945. eCollection 2018

2) Kuwahara K, Nakagawa Y, Nishikimi T. Cutting edge of brain natriuretic peptide (BNP) research: the diversity of BNP immunoreactivity and its clinical relevance. Circ J 2018;82(10):2455-2461. Doi:10.1253/circj.CJ-18-0824.

3) Nakagawa Y, Kuwahara K, Nishikimi T. Atrial and brain natriuretic peptides: Hormones secreted from the heart. Peptides.2019 Jan;111:18-25. Doi:10.1016/j.peptides.2018.05.012.

4) Takahama H, Nishikimi T(15人中3番目), Nakagawa Y(15人中6番目), et al. 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;258:165-171. Doi:10.1016/j.ijcard.2017.12.047.

5) Nishikimi T, Nakagawa Y. Adrenomedullin as a Biomarker of Heart Failure. *Heart Fail Clin*. 2018 Jan;14(1):49-55. doi: 10.1016/j.hfc.2017.08.006.

6) Nakagawa Y, Nishikimi T, Kuwahara K(10人中8番目), et al. Macro-pro-B-type natriuretic peptide (proBNP) and hidden macro-N-terminal proBNP: Case report. Clin Biochem.2018 Feb;52:148-152. Doi: 10.1016/j.clinbiochem.2017.10.019.

7) Nakagawa Y, Nishikimi T, Kuwahara K, et al. MiR30-GALNT1/2 axis-mediated glycosylation contributes to the increased secretion of inactive human pro-BNP from failing hearts. *J Am Heart Assoc*. 2017;6:e003601. Doi: 10.1161/JAHA.116.003601.

8) Nakao K, Kuwahara K, Nishikimi T, Nakagawa Y, et al. Endothelium-derived C-type natriuretic peptide contributes to blood pressure regulation by maintaining endothelial integrity. *Hypertension*. 2017;62(2):286-296. Doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.08219.

9) Yamada C, Kuwahara K, Yamazaki M, Nakagawa Y, Nishikimi T, et al. The rennin-angiotensin system promotes arrhythmogenic substrates and lethal arrhythmias in mice with non-ischemic cardiomyopathy. *Cardiovasc Res*. 2016 Jan 1;109(1):162-73. Doi:10.1093/cvr/cvv248.

10) 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, BNP [ 1-32 ] 関連分子種, nonglycosylated-NT-BNP, glycosylated-NT-BNP について. 循環器内科, 2016, 79: 510-516

〔図書〕(計 1 件)

1) T. Nishikimi, K. Kuwahara, Y. Nakagawa, K. Kangawa, and K. Nakao. Endocrinology of the Heart in Health and Disease. Chapter 2 Adrenomedullin. Edit by Jonathan C. Schisler, Charles H. Lang, Monte S. Willis. Publisher; Elsevier Science Imprint: Academic Press pp.41-58 2016. ISBN: 9780128031117

〔学会発表〕(計 52 件)

### 国際学会

< Keystone symposia 2016.4.3-4.7 Snowbird, Utah, USA >

1) Nakagawa Y, Nishikimi T, Kuwahara K, et al. MiR30-GALNTs axis-mediated O-glycosylation plays an important role in the increased secretion of unprocessed pro-brain natriuretic peptide by failing heart

<Heart Failure 2016 2016.5.21-24 Florence, Italy>

2)Kuwahara K, Nakagawa Y, Nishikimi T, Kangawa K, Minamino N, Nakao K, Kimura T.  
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

<AHA BCVS2016 Jul 18-21.2016 Phoenix, Arizona, USA >

3)Nakagawa Y, Nishikimi T, Kuwahara K, et al Unprocessed proBNP secretion is regulated by  
MiR30-GALNTs axis dependent O-glycosylation in the pathological myocardium..

<Hypertension Seoul 2016, The 26<sup>th</sup> Scientific meeting of the International Society of  
Hypertension 2016.9.24-29 Seoul, Korea >

4)Toshio Nishikimi, Yasuaki Nakagawa, Koichiro Kuwahara,etal. Endogenous plasma NT-BNP  
is glycosylated and undetectable with the current NT-BNP assay system

5)Kuwahara K, Nakagawa Y, Nishikimi T, et al. MiR30-GALNT1/2 axis-mediated glycosylation  
regulates the increase in inactive human pro-BNP secretion from failing heart.

<AHA Scientific Session 2016 2016.11.13-16 New Orleans, Louisiana, USA >

6)Nakagawa Y, Nishikimi T, Kuwahara K, et al. Secretion of proBNP is regulated by  
MiR30-GALNTs axis dependent O-linked glycosylation in the pathological myocardium.

<ESC Congress 2017 2017.8.26-30 in Barcelona, Spain >

7)Nishikimi T, Nakagawa Y, Kinoshita H, Moriuchi K, Inazumi H, Kuwahara K, et al. O-linked  
oligosaccharide attachment underestimates N-terminal proBNP-76 (NT-proBNP) levels in  
heart failure(HF) and chronic renal failure (CRF) on hemodialysis (HD)

8)Kozai C, Minami T, Nishikimi T, Nakagawa Y, Nakao K, Kuwahara K, Koike K, Kimura T.  
Adipocyte-derived adrenomedullin suppresses age-and obesity-related increase in blood  
pressure

<Scientific Session 2017 2017.11.11-15 Anaheim, CA, USA >

9)Takahama H, Nishikimi T(15人中5番目), Nakagawa Y(15人中6番目) et al. Impact of  
continuous reduction in B-type natriuretic peptide bioactivity during hospitalization  
in patients with advanced heart failure.

10)Takahama H, Nishikimi T(13人中4番目), Nakagawa Y(13人中5番目), et al. 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

<ISH(Internal Society of Hypertension) 2018 Scientific Meeting. 2018.9.20-23, Baijing >

11)Nishikimi T, Nakagawa Y et al, Pro-B type natriuretic peptide (BNP) to total BNP  
ratio is involved in the pathophysiology of acute and chronic heart failure: elucidation  
of molecular mechanism.

**国内学会**

<第80回 日本循環器学会学術集会 2016.3.18-20 仙台 >

12)Yamagami S, Nakagawa Y(16人中11番目), Kuwahara K(16人中13番目), et al. Survival  
prospects of Patients with Pulmonary Artery Hypertension Referred for Lung  
Transplantation

13)Kinoshita H, Kuwahara K(11人中2番目), Nakagawa Y(11人中7番目) et al. Pulmonary  
Edema in Patients with Connective Tissue Disease-Associated Pulmonary Arterial  
Hypertension receiving Pulmonary Vasodilator Therapies

14)Yamada C, Kuwahara K, Kinoshita H, Nakagawa Y, Nishikimi T, T. Kimura, K. Nakao  
Renin-angiotensin system promotes arrhythmogenic remodeling in mice with heart failure  
and sudden arrhythmic death.

15)Nakagawa Y, Nishikimi T, Kuwahara K, et al. Mir-30-GALNTs axis-mediated regulation in  
glycosylation and secretion of proBNP in the failing heart

16)中川靖章 ファイアサイドセミナー27「BNP; too high, too low」

<第53回 日本臨床分子医学会学術集会 2016.4.15-16 東京 >

17)中川靖章、錦見俊雄、桑原宏一郎 (他9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89回 日本内分泌学会学術総会 2016.4.21-23 京都 >

18)中川靖章(他8名) O型糖転移酵素 GALNT の BNP プロセッシング調節への関与

<第5回 日本高血圧学会 臨床高血圧フォーラム 5月14-15日、東京 >

19)栗原純子, 桑原宏一郎(15名中2番目), 中川靖章(15名中8番目) デュアルインピーダンス  
法により計測された内臓脂肪面積と自宅血圧の日間変動指標との関連の検討

<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 >

20)中川靖章(他11名) miR30-GALNT経路によるO型糖鎖修飾調節を介した病的な心筋からのproBNP

分泌亢進機序 最優秀研究奨励賞(基礎)

<Molecular Cardiovascular Conference II 2016 2016.9.3-4 東京>

21)中川靖章(他8名)病的な心筋からの脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体proBNP分泌はmiR-30-GALNT経路により制御されている

<第26回 日本循環薬理学会 松本 2016.12.2>

22)中川靖章(他8名) miR-30-GALNT1,2経路による糖鎖修飾調節が病的な心筋からのproBNP分泌に関与する

23)稲住英明、桑原宏一郎、栗原佳宏、中川靖章、錦見俊雄(他5名)G蛋白サブユニットG<sub>o</sub>の発現亢進が拡張型心筋症モデルマウスにおける心機能低下に関与する

<第20回日本心血管内分泌代謝学会総会(CVMW2016) 2016.12.16-17 東京>

24)中川靖章(他8名)病的な心筋におけるmiR30-GALNT経路による糖鎖修飾を介したproBNP分泌制御  
Regulatory mechanism of proBNP secretion via miR-30-GALNT-axis-dependent glycosylation in pathological cardiomyocytes

<The81st Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society 2017.3.17-19 金沢>

25)Cho K, Kuwahara K(14名中3番目), Nishikimi T(14名中4番目), Nakagawa Y(14名中11番目)他, Adipocyte-derived adrenomedullin suppresses age-and obesity-related increase in blood pressure

26)Kinoshita H, Yasuaki Nakagawa(10名中7番目)他 Prediction of poor outcome after PAH targeted therapy in pulmonary arterial hypertension patients with lung disease

27)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)

28)中川靖章 ファイアサイドセミナー17(2017.3.18) BNPを識る、そして病態を読む

<第54回日本臨床分子医学会学術集会 2017.4.14-15 東京>

29)趙晃済、桑原宏一郎、南丈也、錦見俊雄、南野直人、中川靖章、他6名 脂肪由来のアドレノメデュリンは加齢および肥満に伴う血圧上昇を抑制する

<第21回心血管内分泌代謝学会(CVMW2017) 2017.12.8-10 大阪>

39)中川靖章 (他10名) マクロproBNP血症の一例

<脳心血管抗加齢研究会 2017年12月16日-17日 大阪>

31)趙晃済、桑原宏一郎、錦見俊雄、中川靖章、(他9名)アドレノメデュリンは加齢や肥満に伴う高血圧を抑制する

<第82回 日本循環器学会学術集会 H30年3月23-25日 大阪>

32)Nakagawa Y, Nishikimi T,(他8名) プレナリーセッション 心不全の革新的予防戦略  
Revolutional Strategy for Heart Failure Prevention

Possibility of proBNP measurement as a new methods for evaluating the heart disease

<第55回日本臨床分子医学会学術集会 平成30年4月13日-14日 京都>

33)稲住英明、桑原宏一郎、栗原佳宏、中川靖章(他7名). G蛋白サブユニットG<sub>o</sub>のCa<sup>2+</sup> handling 恒常性および心収縮能維持における意義の解明.

<第91回 日本内分泌学会学術集会 平成30年4月26日-28日 宮崎>

34)中川靖章、錦見俊雄(他9名) BNP異常高値の原因がmacro-proBNP血症であった症例

<第22回日本心血管内分泌代謝学会学術総会 平成30年4月28日-29日 宮崎>

35)稲住英明、桑原宏一郎、栗原佳宏、中川靖章(他6名)心不全モデルマウスにおけるG蛋白サブユニットG<sub>o</sub>の発現亢進はCa<sup>2+</sup> handlingの異常をきたし心収縮能低下に関与する.

<第2回日本循環器学会基礎研究フォーラム 2018年9月22日-23日 奈良>

36)Inazumi H, Kuwahara K, Kuwabara Y, Nakagawa Y, Kinoshita H, Moriuchi K, Yanagisawa H, Oya M, Nishikimi T, Kurebayashi N, Yamada M, Nakao K, Kimura T. Increased G<sub>o</sub> expression underlies cardiac dysfunction accompanied with abnormal Ca<sup>2+</sup> handling.

<第22回日本心不全学会学術集会 平成30年10月11日-13日 東京>

37)木下秀之、柳澤洋、森内健治、稲住英明、中川靖章、桑原宏一郎、陳豊史、伊達洋至、木村剛 ハートチームシンポジウム2 重症心不全に対する心臓移植、補助人工心臓を目指した医療連携の現状と課題

肺移植実施施設からみた病診・病病連携の重要性

38)木下秀之、柳澤洋、森内健治、稲住英明、中川靖章、桑原宏一郎、陳豊史、伊達洋至、木村剛 パネルディスカッション2 近年の肺高血圧症診療における肺移植術の位置づけ

肺動脈性肺高血圧症に対する肺移植術における循環器内科の役割

39)木下秀之、柳澤洋、森内健治、稲住英明、加藤貴雄、中川靖章、桑原宏一郎、陳豊史、伊達洋至、木村剛 パネルディスカッション4 肺高血圧症に伴う得心不全の診断と治療

他

〔図書〕(計 1 件)

1)T. Nishikimi, K. Kuwahara, Y. Nakagawa, K. Kangawa, and K. Nakao  
Endocrinology of the Heart in Health and Disease. Chapter 2 Adrenomedullin. Edit by  
Jonathan C. Schisler, Charles H. Lang, Monte S. Willis. Publisher;Elsevier Science  
Imprint:Academic Press pp.41-58 2016. ISBN:9780128031117

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

京都大学医学部附属病院 循環器内科 心血管内分泌代謝グループ

<http://kyoto-u-cardio.jp/kisokenkyu/cat236/>

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：桑原宏一郎

ローマ字氏名： KUWAHARA KOICHIRO

所属研究機関名：信州大学

部局名：学術研究院医学系

職名：教授

研究者番号(8桁)：30402887

研究分担者氏名：錦見俊雄

ローマ字氏名： NISHIKIMI TOSHIO

所属研究機関名：京都大学

部局名：医学研究科

職名：非常勤講師

研究者番号(8桁)：80291946

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：南野 直人

ローマ字氏名：MINAMINO NAOTO

所属研究機関名：国立研究開発法人 国立循環器病研究センター

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。