

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 2 9 年 6 月 1 2 日現在

機関番号： 8 4 4 0 4

研究種目： 基盤研究(C) (一般)

研究期間： 2014 ~ 2016

課題番号： 2 6 4 6 1 1 0 0

研究課題名 (和文) 心臓ナトリウム利尿ペプチドを用いた新しい周産期心筋症治療法の開発

研究課題名 (英文) Development of a novel therapy for peripartum cardiomyopathy using natriuretic peptides

研究代表者

大谷 健太郎 (OTANI, KENTARO)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・上級研究員

研究者番号： 5 0 4 7 0 1 9 1

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) : これまでに我々は、内因性ナトリウム利尿ペプチド系を欠損したマウスが、授乳期に周産期心筋症様の心機能低下を伴う顕著な心肥大を呈することを見出した。本研究ではナトリウム利尿ペプチド系による授乳期心保護作用のメカニズムの解明と、周産期心筋症患者ゲノムを用いたナトリウム利尿ペプチド関連遺伝子の遺伝子多型解析を行った。その結果、授乳期のアルドステロンの過度の上昇が心肥大を惹起することが明らかとなり、かつ周産期心筋症患者では正常産婦に比し、ナトリウム利尿ペプチドクリアランス受容体遺伝子に遺伝子多型を有する割合が有意に多いことが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文) : In recent work, we demonstrated that mice lacking guanylyl cyclase-A (GC-A-KO), a receptor for atrial and brain natriuretic peptides, show severe postpartum cardiac hypertrophy. Interestingly, the postpartum cardiac hypertrophy in GC-A-KO was induced during lactation. The aim was to investigate the mechanisms underlying the lactation-induced cardiac hypertrophy in GC-A-KO. Additionally, we examined the single-nucleotide polymorphisms of natriuretic peptide-related genes in patients with peripartum cardiomyopathy (PPCM). Plasma aldosterone level was significantly elevated in lactating GC-A-KO. Furthermore, the administration of a specific mineralocorticoid receptor blocker during lactation significantly suppressed the cardiac hypertrophy in GC-A-KO. Therefore, aldosterone would be a cause of lactation-induced cardiac hypertrophy in GC-A-KO. In addition, genotype distribution of natriuretic peptide clearance receptor gene differed markedly between women with PPCM and their controls.

研究分野： 循環器内科学

キーワード： 周産期心筋症 ナトリウム利尿ペプチド 授乳 心肥大

1. 研究開始当初の背景

心房性・脳性ナトリウム利尿ペプチド (ANP・BNP)は、利尿・ナトリウム利尿・血管拡張・心臓リモデリング抑制・虚血組織における血管新生促進等の多彩な生理作用を有する、心臓で産生・分泌される循環ホルモンである (BBRC 1984;118:131-9, Nature 1988;332:78-81)。

近年行われた世界的規模のゲノムワイド解析により、ANP・BNP 関連遺伝子座における遺伝子変異が心血管疾患の強力なリスク因子であることが明らかにされた (Nature 2011;478:103-9)。また先般、ANP・BNP 関連遺伝子座における遺伝子変異が、妊娠高血圧症候群や子癰前症などの周産期疾患患者でも認められることが明らかとなり (Nature 2012;484:246-50)、周産期疾患とナトリウム利尿ペプチド系との関連が近年注目されている。しかし、周産期におけるナトリウム利尿ペプチド系の病態生理学的意義については、未だ不明な点が多い。

これまでに我々は、ANP・BNP の共通の受容体である Guanylyl Cyclase-A (GC-A)の遺伝子欠損マウス (GC-A-KO) の周産期における表現型解析を、血圧および心臓に焦点を絞って行ってきた。その結果、GC-A-KO では妊娠・産褥期間を通して血圧の有意な変動は認めなかったが、授乳期に周産期心筋症様の顕著な心機能低下を伴う心肥大・心線維化を呈することを明らかにした (血管 2014;37:93-7)。また、GC-A-KO では出産・授乳の反復により、野生型マウスに (WT) 比し、母獣生存率が顕著に低下することも明らかとなった。これらの結果は、ANP・BNP/GC-A 系が周産期、特に授乳期に心保護的な作用を有すること、および ANP・BNP/GC-A 系が周産期心筋症の治療標的となり得ることを示唆するものである。

周産期心筋症は、心疾患既往のない健常女性が産褥期に心機能低下を来とし、心不全を発症する母体間接死原因の上位疾患である。原因は諸説考えられているが、現時点では特定されておらず、治療も対症療法に限られているのが現状である。本研究を通して周産期心筋症の病態が明らかとなり、かつ周産期心筋症に対するナトリウム利尿ペプチドの治療的意義が明らかになれば、その意義は大きい。

2. 研究の目的

本研究の目的は、内因性 ANP・BNP/GC-A

系の周産期における心保護作用のメカニズムを解明し、ナトリウム利尿ペプチド系を標的とした周産期心筋症の新たな治療法開発の可能性について検討することである。

3. 研究の方法

本研究では 10 週齢の雌性マウスを用い、心重量などの解析は未妊娠時あるいは授乳 2 週目に行った。

(1)細胞特異的 GC-A 欠損マウスを用いた検討

これまでの GC-A 完全欠損マウスを用いた検討から、ANP・BNP/GC-A 系が授乳期に心保護的に作用することが明らかとなった。しかし、GC-A は血管内皮細胞や心筋細胞など、様々な細胞において発現していることが知られており、どの細胞における ANP・BNP/GC-A 系が授乳期の心保護作用をもたらしているかは不明である。そこで、Cre/LoxP システムを用いて作製した細胞特異的 GC-A 欠損マウスを用い、GC-A-KO における授乳期心肥大変化が、どの細胞における ANP・BNP/GC-A 系の破綻によって惹起されるかについて検討を行った。

(2)GC-A-KO の授乳期心肥大におけるレニン - アンジオテンシン - アルドステロン (RAAS)系の関与

従来、ANP・BNP/GC-A 系は RAAS 系による心臓リモデリングに対して抑制的に作用することが知られている。そこで、GC-A-KO における授乳期心肥大・心機能低下への RAAS 系の関与を明らかにするため、アンジオテンシン II type1a 受容体(AT1a)及びミネラルコルチコイド受容体(MR)遺伝子欠損マウスを用い、授乳期における心臓の形態学的解析を行った。MR 遺伝子完全欠損マウスは胎性致死となるため、Cre/LoxP システムを用いて血管内皮・心筋・神経・腎臓構成細胞などで細胞特異的に MR 遺伝子を欠損したマウスを作製し、検討を行った。

(3)血中アルドステロン濃度への授乳の影響

未妊娠および授乳 2 週目の WT および GC-A-KO の下大静脈より採血を行い、血漿を分離した後、血漿アルドステロン濃度を ELISA(Enzo Life Sciences 社)により定量評価した。

(4)選択的アルドステロン拮抗薬の投与による検討

授乳期にのみ選択的アルドステロン拮抗薬（エプレレノン）を投与することで、GC-A-KO の授乳期心肥大が抑制され得るか否か検討を行った。WT および GC-A-KO に出産直後よりエプレレノン含有餌(1.25g/kg)あるいはコントロール餌を投与した。2 週間後、tail cuff 法による血圧測定(ソフトロン社、BP-98A)および心重量測定を行った。心重量は脛骨長にて標準化し、比較検討を行った。

(5)周産期心筋症患者ゲノムを用いたナトリウム利尿ペプチド関連遺伝子の多型解析

周産期心筋症患者 22 例および正常産婦 35 例の血液から得られた DNA 検体を用い、近年、高血圧や心肥大の発症と関連する事が報告されているナトリウム利尿ペプチドクリアランス受容体(*Npr3*)の遺伝子変異について検討を行った。一塩基多型(Single Nucleotide Polymorphism; SNP)を含む領域を PCR 法にて増幅し、続いて BigDye Terminator Ver. 3.1 (Thermo Fisher 社)を用いた PCR 法にてシーケンス対象部位を増幅し、ジェネティックアナライザー(ABI3130XL, Thermo Fisher 社)にてシーケンスを行った。

マウスを用いた動物実験は、実験動物愛護に充分配慮し、かつ動物実験計画書を国立循環器病研究センター動物実験委員会に提出し、承認を受けた上で実施した。遺伝子解析は、「ヘルシンキ宣言に基づく倫理原則」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、ならびに本邦における法的規制要件を遵守するとともに、国立循環器病研究センター倫理委員会の承認を得て、患者または家族への十分な説明の後、書面による同意を得た上で実施した。また、患者登録施設においても同様に倫理委員会の承認、書面による同意を得た上で実施した。

4. 研究成果

(1)複数の細胞における ANP・BNP/GC-A 系が授乳期の心保護作用に関与する

細胞特異的 GC-A 欠損マウスを用い、授乳期における心重量を比較検討したところ、血管内皮細胞(*Tie2-Cre*)、心筋細胞(*αMHC-Cre*)、遠位側尿管細胞(*AQP2-Cre* & *CLC-LB-Cre*)で GC-A を欠損させたマウスにおいて、授乳期心肥大変化が有意に亢進することが明らかとなった。このことから、GC-A-KO における授乳期心肥大変化は、複数の細胞におけ

る ANP・BNP/GC-A 系の破綻によって惹起されることが明らかとなった。

(2)アンジオテンシン II は GC-A-KO における授乳期心肥大とは無関係である

AT1a 遺伝子完全欠損マウスおよび Cre/LoxP システムを用いて作製した種々の細胞特異的 AT1a 遺伝子欠損マウスを用い、授乳期の心重量を WT と比較検討した。その結果、授乳期の心肥大変化はいずれの遺伝子欠損マウスにおいても WT とほぼ同程度であった。この結果より、GC-A-KO における授乳期心肥大へのアンジオテンシン II/AT1a の関与は少ないと考えられた。

(3)神経細胞特異的 MR 遺伝子欠損マウスは授乳期の心肥大変化が小さい

細胞特異的 MR 遺伝子欠損マウスを用い、授乳期の心重量の比較検討を行った。その結果、神経細胞特異的(*Nestin-Cre*)に MR 遺伝子を欠損させたマウスでは、授乳期の心肥大変化が他の細胞特異的 MR 遺伝子欠損マウスに比し、有意に抑制されていることが明らかとなった。このことから、授乳期の心肥大変化に神経におけるアルドステロン/MR 系が関与している可能性が示唆された。

(4)授乳は血漿アルドステロン濃度を増加させる

未妊娠の WT と GC-A-KO の間では、血漿アルドステロン濃度に有意な差は認めなかった。しかし、授乳 2 週目の GC-A-KO の血漿アルドステロン濃度は、WT に比し有意に高値であった。また、出産直後に仔を強制離乳することにより、GC-A-KO における血漿アルドステロン濃度の上昇は消失した。このことから、GC-A-KO では授乳によりアルドステロンの分泌が有意に亢進することが明らかとなった。

(5)授乳期のエプレレノン投与は GC-A-KO における授乳期心肥大を有意に抑制する

産後 2 週間に亘ってエプレレノンを投与したが、WT、GC-A-KO とともに、収縮期血圧の有意な低下は認められなかった。ところが、授乳 2 週目の GC-A-KO 母獣の心重量は、コントロール餌投与群に比し、エプレレノン含有食投与群で有意に低値であった。

(6)周産期心筋症患者では *Npr3* 遺伝子に高率に一塩基多型を認める

周産期心筋症患者および正常産婦の DNA

検体を用い、Npr3 遺伝子の遺伝子座(SNP ID: rs1173766 および rs1173771)を精査したところ、どちらの遺伝子座においても、正常産婦群に比し、周産期心筋症患者群で Minor allele のホモ接合体の割合が有意に高値であった。また、正常産婦群・周産期心筋症患者群ともに、一方の遺伝子座において SNP(ホモ接合体)を有する場合には、他方の遺伝子座においても同様に SNP を有していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Yoshihara F, Tokudome T, Kishimoto I, Otani K, Kuwabara A, Horio T, Kawano Y, Kangawa K. Aggravated renal tubular damage and interstitial fibrosis in mice lacking guanylyl cyclase-A (GC-A), a receptor for atrial and B-type natriuretic peptides. *Clin Exp Nephrol* 2015;19: 197-207. 査読有
2. Nojiri T, Hosoda H, Tokudome T, Miura K, Ishikane S, Otani K, Kishimoto I, Shintani Y, Inoue M, Kimura T, Sawabata N, Minami M, Nakagiri T, Funaki S, Takeuchi Y, Maeda H, Kidoya H, Kiyonari H, Shioi G, Arai Y, Hasegawa T, Takakura N, Hori M, Ohno Y, Miyazato M, Mochizuki N, Okumura M, Kangawa K. Atrial natriuretic peptide prevents cancer metastasis through vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112:4086-91. 査読有
3. Tokudome T, Kishimoto I, Shindo T, Kawakami H, Koyama T, Otani K, Nishimura H, Miyazato M, Kohno M, Nakao K, Kangawa K. Importance of endogenous atrial and brain natriuretic peptides in murine embryonic vascular and organ development. *Endocrinology* 2016;157:358-67. 査読有

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 大谷健太郎、徳留 健、岸本一郎、山原研一、中尾一和、寒川賢治. 内因性心臓ナトリウム利尿ペプチド系による授乳期心保護作用のメカニズム解析. 第 87 回日本内分泌学会学術集会. 2014. 4/24-/26. 福岡.
2. 大谷健太郎、徳留 健、岸本一郎、中尾一和、寒川賢治. 授乳期心肥大におけるアルドステロン系の関与. 第 18 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会. 2014.

11/21-11/22. 横浜.

3. 大谷健太郎、徳留 健、岸本一郎、中尾一和、寒川賢治. 授乳期心肥大におけるアルドステロン系の関与. 第 44 回日本心臓血管作動物質学会. 2015.2/6-2/7. 高松.
4. 大谷健太郎、徳留 健、岸本一郎、中尾一和、寒川賢治. 授乳はアルドステロン/ミネラルコルチコイド系を活性化し心臓リモデリングを来す. 第 88 回日本内分泌学会学術総会. 2015.4/23-4/25. 東京.
5. 徳留 健、大谷健太郎、岸本一郎、西村博仁、河野雅和、寒川賢治. 細胞特異的 Mineralocorticoid Receptor ノックアウトマウスの表現型解析. 第 51 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会. 2015. 10/30-10/31. 大阪.
6. 大谷健太郎、徳留 健、岸本一郎、西村博仁、寒川賢治. 心臓ナトリウム利尿ペプチドシグナルの欠損は授乳期に産褥心筋症を惹起する. 第 51 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会. 2015. 10/30-10/31. 大阪.
7. 大谷健太郎、徳留 健、神谷千津子、西村博仁、岸本一郎、寒川賢治. 周産期心筋症患者ゲノムにおけるナトリウム利尿ペプチド関連遺伝子の多型性解析. 第 21 回日本心血管内分泌代謝学会. 2016. 12.16-17. 東京.

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕

第 51 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会 ベストポスター賞受賞

大谷健太郎、徳留 健、西村博仁. 周産期心筋症の遺伝子解析結果. 第 2 回周産期心筋症ミーティング. 2016.3.19. 仙台.

大谷健太郎、徳留 健、西村博仁. 周産期心筋症の遺伝子解析結果. 第 3 回周産期心筋症ミーティング. 2016.7.17. 富山.

大谷健太郎、徳留 健、神谷千津子、西村博仁、池田智明. 周産期心筋症発症における内因性ナトリウム利尿ペプチド系の関与. 第 4 回周産期心筋症ミーティング. 2017.3.18. 金沢.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大谷 健太郎 (OTANI KENTARO)
国立研究開発法人 国立循環器病研究センター研究所 上級研究員
研究者番号： 5 0 4 7 0 1 9 1

(2)研究分担者

徳留 健 (TOKUDOME TAKESHI)
国立研究開発法人 国立循環器病研究センター研究所 室長
研究者番号： 0 0 4 4 3 4 7 4

(3)研究協力者

神谷 千津子 (KAMIYA CHIZUKO)
国立研究開発法人 国立循環器病研究センター 医師
研究者番号： 1 0 5 5 1 3 0 1

西村 博仁 (NISHIMURA HIROHITO)
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： 3 0 7 3 9 7 3 5