

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K09897

研究課題名(和文) 心臓ホルモンの生理作用を応用したメタボリックシンドロームの革新的治療法開発

研究課題名(英文) Development of innovative therapy of metabolic syndrome applying physiological effects of cardiac hormones

研究代表者

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：00443474

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：メタボリックシンドロームは、内臓脂肪の過剰蓄積を基盤とした生活習慣病リスクの集積状態である。一方、心臓は心房性ナトリウム利尿ペプチド(Atrial Natriuretic Peptide; ANP)・脳性ナトリウム利尿ペプチド(Brain Natriuretic Peptide; BNP)を産生・分泌し、共通の受容体であるGuanylyl Cyclase-A (GC-A)に結合して生理作用を発揮する。本研究により、生理的濃度のANPを健常マウスに短期間投与しても、代謝には影響を及ぼさないことが確認された。一方、血管内皮特異的GC-A欠損マウスでは、対照マウスに比べ代謝機能が低下していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心臓ホルモンであるANP・BNPが代謝機能を改善するという報告は存在するが、脂肪組織や骨格筋に対するANP・BNPの作用に注目したものが多く、本研究ではANP・BNPの共通受容体GC-Aが血管内皮に豊富に発現していることを示し、かつ内皮特異的GC-A欠損マウスでは耐糖能障害・熱産生量低下が生じていることも明らかにした。一方生理的濃度のANPを健常マウスに短期間投与しても代謝には影響を及ぼさないことが確認された。ANP・BNPの分解酵素阻害作用を有する薬剤は慢性心不全治療薬として世界で臨床応用されており、長期間の服用により血管内皮機能向上を介した代謝機能改善効果をもたらすことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Metabolic syndrome is an accumulation of risk for lifestyle-related diseases based on the excessive accumulation of visceral fat. On the other hand, the heart produce and secrete atrial natriuretic peptide (ANP) and brain natriuretic peptide (BNP), which bind to a common receptor, Guanylyl Cyclase-A (GC-A), a common receptor, to exert its physiological effects. The present study confirmed that short-term administration of physiological concentrations of ANP to healthy mice does not affect their metabolism. On the other hand, vascular endothelial-specific GC-A deficient mice showed impaired metabolic function compared to control mice.

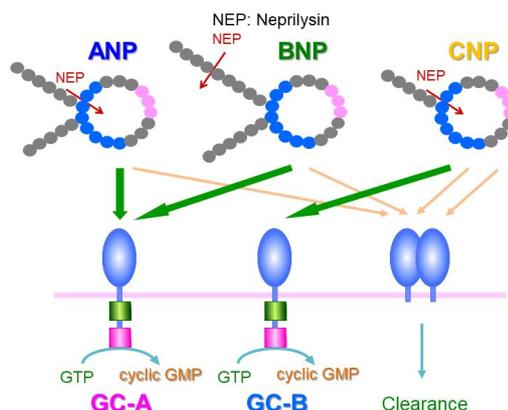
研究分野：循環器内科学

キーワード：メタボリックシンドローム 血管内皮 ANP BNP GC-A

## 1. 研究開始当初の背景

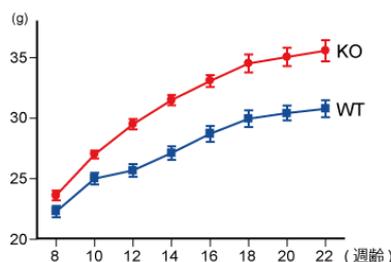
メタボリックシンドロームは、「内臓脂肪の過剰蓄積を基盤とした生活習慣病リスクの集積状態」と定義され、概念的には内臓脂肪型肥満を背景とした耐糖能異常・脂質異常症・血圧上昇などの病態が並行して進展した結果、心血管病・糖尿病・高血圧症・慢性腎臓病などの生活習慣病を発症するという一連の流れを指摘したものである。近年、脂肪細胞が単なるエネルギー備蓄細胞ではなく、多彩な生理活性物質(アディポサイトカイン)を産生・分泌することが明らかにされ、肥満病態との関連が研究されている。

一方、申請者が所属する国立循環器病研究センター研究所の前所長である寒川賢治博士らは、心臓が心房性ナトリウム利尿ペプチド(Atrial Natriuretic Peptide; ANP)・脳性ナトリウム利尿ペプチド(Brain Natriuretic Peptide; BNP)を産生・分泌することを明らかにした。ANP・BNPは、共通の受容体であるGuanylyl Cyclase-A(GC-A)に結合して、細胞内cyclic GMP濃度上昇をもたらすことで様々な生理作用を発揮する(下図)。現在ANPは急性心不全治療薬として、BNPは心不全重症度診断指標として日本で臨床応用されている。ANP・BNPはneprilysinという中性エンドペプチダーゼによって切断されて生理活性を失う。Neprilysin阻害効果を有するサクビト rilバルサルタンは、欧米で心不全治療薬として使われている内服薬である(2020年に日本でも慢性心不全治療薬として承認された)。本薬剤の登場は、将来的に急性疾患のみならず慢性的な疾患も、ANP・BNP/GC-A系の治療標的となりうることを示唆する。

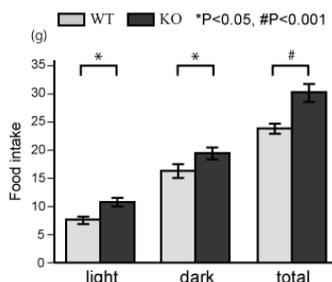


申請者らの予備検討により、GC-A欠損マウス(GC-A-KO)が普通食投与下において野生型マウス(WT)に比べ肥満傾向を示すことを発見した。追加検討の結果、GC-A-KOではWTに比較して摂食量は亢進し、熱産生量は低下していることが分かった(下図)。本結果は、ANP-GC-A系がメタボリックシンドロームの治療標的になり得る可能性を示唆する。

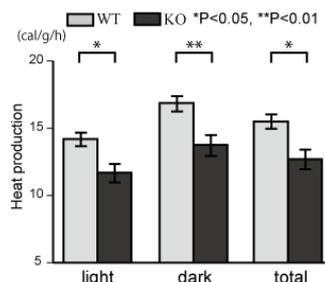
## 2. 研究の目的



<WT・GC-A-KOの、普通食投与下での体重推移>



<WT・GC-A-KOの摂食量>



<WT・GC-A-KOの熱産生量>

先行研究の結果をふまえて、「心臓ホルモンであるANP・BNPの生理作用を応用した、メタボリックシンドロームの革新的治療法を開発すること」が本研究の目的である。具体的には、以下の点について調べる。

### (1) GC-Aの遺伝子改変マウスを用いた検討

GC-A-KOマウスにおける耐糖能の評価を行う。またANPの代謝に及ぼす影響がどの細胞に存在するGC-Aを介したものを明らかにするため、細胞特異的なGC-A欠損マウスを用いた実験を行う。

### (2) 末梢静脈からのANP投与が、摂食量・酸素消費量・熱産生量に与える影響

野生型マウスにANPを経静脈的に投与し、生理食塩水投与群との間で、摂食量・酸素消費量・熱産生量等を比較検討する。

### (3) 末梢血管からのANP投与が、骨格筋・脂肪組織の代謝関連遺伝子発現に与える影響

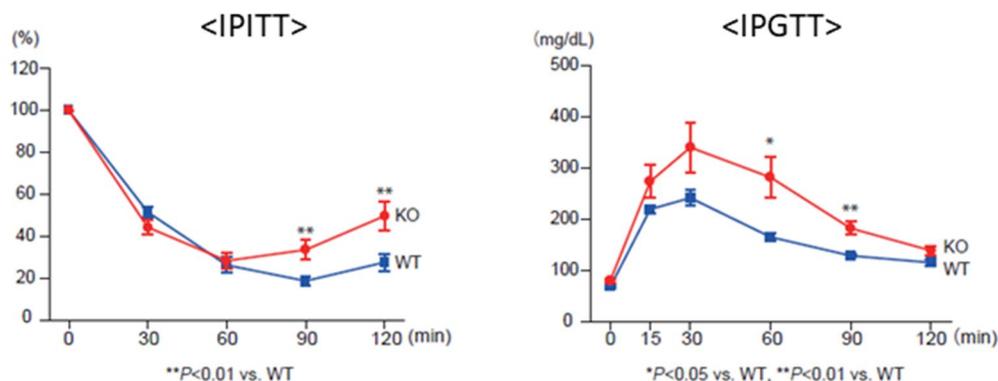
野生型マウスにANPを経静脈的に投与し、骨格筋におけるUCP3・PGC-1・GLUT4のmRNA発現量および褐色脂肪組織におけるUCP-1・PGC-1・PRDM16のmRNA発現量を調べる。

### 3. 研究の方法

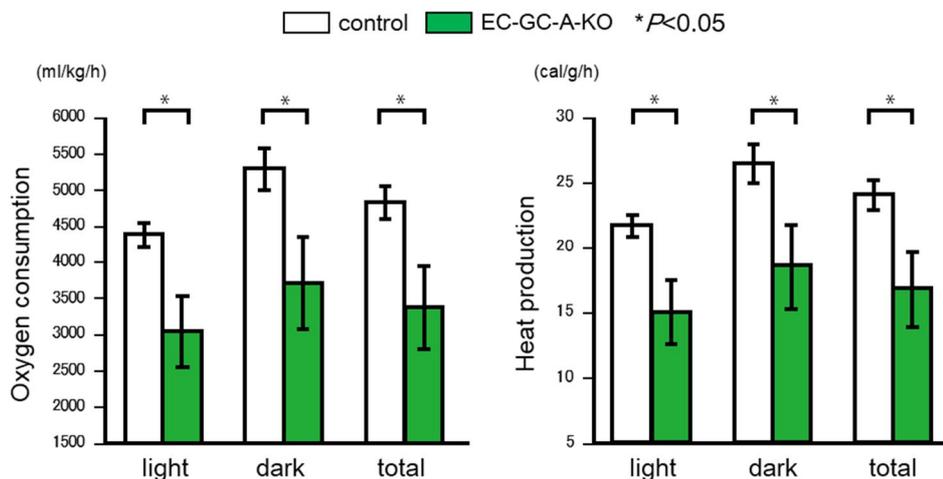
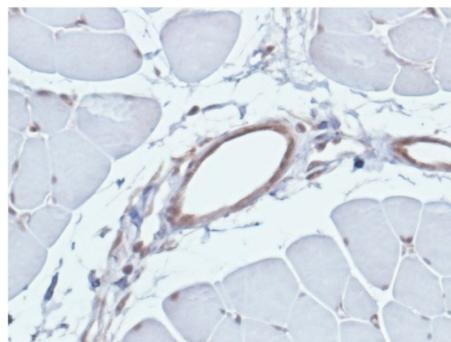
- (1) WT・GC-A-KO における耐糖能評価は、普通食投与下において IPITT・IPGTT にて行う。ANP の代謝に及ぼす影響がどの細胞に存在する GC-A を介したものを調べる為に、GC-A の免疫組織染色を行う。その上で、GC-A が豊富に発現している細胞特異的に GC-A 遺伝子を欠損させたマウスを作製し、小動物総合モニタリングシステムで摂食量・酸素消費量・熱産生量を調べるほか、普通食投与下において IPITT・IPGTT を行って耐糖能を評価する。
- (2) 野生型マウスへの ANP 投与に際しては、alzet 社製浸透圧ミニポンプに生理食塩水に溶解した ANP を充填し、生理食塩水を満たした頸静脈用カテーテルをミニポンプに接続したものを右頸静脈に留置する。0.2  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  で ANP を投与し、小動物総合モニタリングシステムで摂食量・酸素消費量・熱産生量を調べる。
- (3) 末梢血管からの ANP 投与が、脂肪組織の熱産生関連遺伝子発現に与える影響については、(2)でデータ取得が終了したマウスを sacrifice し、骨格筋・褐色脂肪組織のサンプリングを行い、RNA を抽出後に cDNA 合成を行って、定量 PCR に供する。

### 4. 研究成果

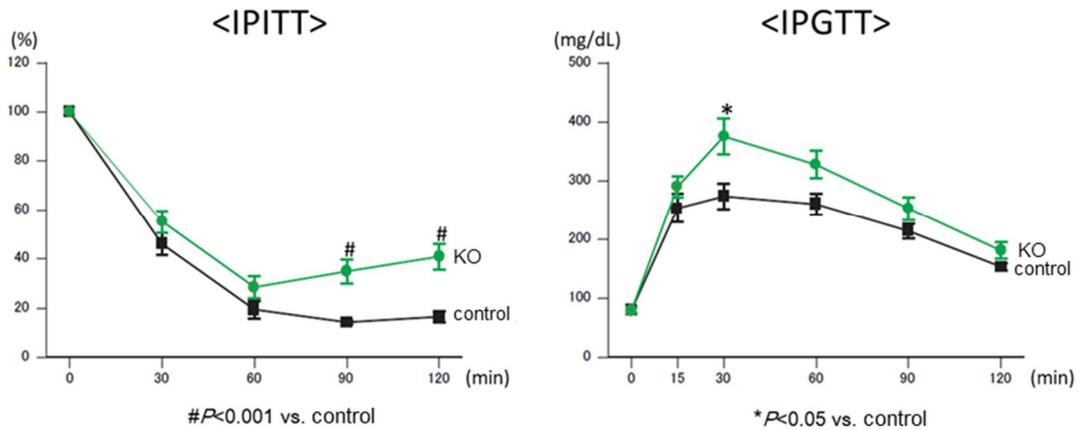
- (1) WT・GC-A-KO における耐糖能評価を、普通食投与下で IPITT・IPGTT にて行った結果、GC-A-KO では IPITT・IPGTT のいずれにおいても、WT と比較して耐糖能低下を認めた。



次にマウス GC-A モノクローナル抗体を用いて、Wistar ラット骨格筋パラフィン包埋切片にて免疫組織染色を行った。その結果、右図のように骨格筋には GC-A の発現をほとんど認めなかったが、血管、特に血管内皮に豊富な GC-A の発現を認めた。この結果を受けて、次に血管内皮特異的 GC-A 欠損マウスを作製し、代謝機能を評価することとした。結果、摂食量は対照マウスと同程度であったが、下図のように酸素消費量・熱産生量は対照マウスと比較し、血管内皮特異的 GC-A 欠損マウス(EC-GC-A-KO)では有意に低い値を示した。

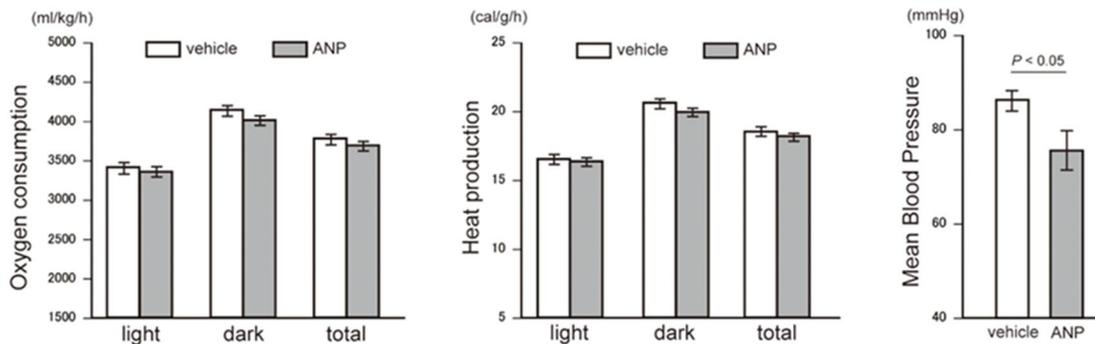


さらに普通食投与下で IPITT・IPGTT を行って耐糖能を評価したところ、血管内皮特異的 GC-A 欠損マウスでは、IPITT・IPGTT のいずれにおいても、対照マウスと比較して耐糖能低下を認めた。

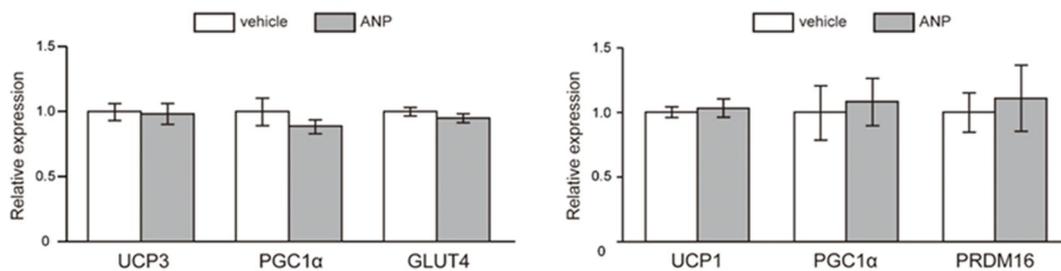


これら一連の結果は、長期に渡る GC-A の欠損、特に血管内皮における GC-A の欠損が個体の代謝機能低下をもたらすことを示す。ANP には血管拡張作用・血管内皮透過性亢進作用があり、骨格筋をはじめとする臓器血流の増加に伴う耐糖能向上をもたらしたと考察される。では短期的な ANP 投与は個体の代謝機能に影響を及ぼすのだろうか？この点を明らかにするため、次の実験を行った。

- (2) 浸透圧ミニポンプ植え込み 7 日後から 5 日間、小動物総合モニタリングシステムにて代謝データを取得し、その後血圧測定を行った。結果、下図のように平均血圧は有意に低下しており、ANP の血圧低下作用は認められたが、酸素消費量・熱産生量は vehicle 群と同程度だった。



- (3) (2)のデータ取得後、マウスを sacrifice して骨格筋と褐色脂肪組織における代謝に寄与する遺伝子発現検討を行った。結果、どちらにおいても vehicle 群と ANP 群の間に有意な差は認めなかった（下図）。



本研究により、生理的濃度の ANP を健常マウスに短期間投与しても、代謝には影響を及ぼさないことが確認された。高脂肪食投与により肥満したマウスに ANP を投与すると、異なる結果が得られるかもしれない。一方、血管内皮特異的 GC-A 欠損マウスでは、対照マウスに比べ代謝機能が低下していた。ANP は血管内皮保護作用を有するため、本マウスでは内皮機能障害が生じていた可能性がある。生活習慣病等で血管内皮機能が低下した患者において、長期間に渡って内皮 ANP-GC-A 系を活性化することで耐糖能障害が改善する可能性はあると思われるが、モデル動物等を用いた検討においても、さらなるデータの蓄積が必要である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Otani K, Tokudome T, Kamiya CA, Mao Y, Nishimura H, Hasegawa T, Arai Y, Kaneko M, Shioi G, Ishida J, Fukamizu A, Osaki T, Nagai-Okatani C, Minamino N, Ensho T, Hino J, Murata S, Takegami M, Nishimura K, Kishimoto I, Miyazato M, Harada-Shiba M, Yoshimatsu J, Nakao K, Ikeda T, Kangawa K.	4. 巻 141
2. 論文標題 Deficiency of cardiac natriuretic peptide signaling promotes peripartum cardiomyopathy-like remodeling in the mouse heart.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Circulation	6. 最初と最後の頁 571-588
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/CIRCULATIONAHA.119.039761	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Otani K, Tokudome T, Kamiya CA, Mao Y, Nishimura H, Hasegawa T, Arai Y, Kaneko M, Shioi G, Ishida J, Fukamizu A, Osaki T, Nagai-Okatani C, Minamino N, Ensho T, Hino J, Murata S, Takegami M, Nishimura K, Kishimoto I, Miyazato M, Harada-Shiba M, Yoshimatsu J, Nakao K, Ikeda T, Kangawa K.	4. 巻 141
2. 論文標題 Deficiency of cardiac natriuretic peptide signaling promotes peripartum cardiomyopathy-like remodeling in the mouse heart.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Circulation	6. 最初と最後の頁 571-588
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/CIRCULATIONAHA.119.039761	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tokudome T, Otani K, Miyazato M, Kangawa K	4. 巻 111
2. 論文標題 Ghrelin and the heart.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Peptides	6. 最初と最後の頁 42-46
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.peptides.2018.05.006.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tokudome T, Kangawa K	4. 巻 95
2. 論文標題 Physiological significance of ghrelin in the cardiovascular system.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci	6. 最初と最後の頁 459-467
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2183/pjab.95.032.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Miyazaki T, Otani K, Chiba A, Nishimura H, Tokudome T, Watanabe-Takano H, Matsuo A, Ishikawa H, Shimamoto K, Fukui H, Kanai Y, Yasoda A, Ogata S, Nishimura K, Minamino N, Mochizuki N	4. 巻 122
2. 論文標題 A new secretory peptide of natriuretic peptide family, osteocrin, suppresses the progression of congestive heart failure after myocardial infarction.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Circulation Research	6. 最初と最後の頁 742-751
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/CIRCRESAHA.117.312624	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Bae CR, Hino J, Hosoda H, Son C, Makino H, Tokudome T, Tomita T, Hosoda K, Miyazato M, Kangawa K	4. 巻 8
2. 論文標題 Adipocyte-specific expression of C-type natriuretic peptide suppresses lipid metabolism and adipocyte hypertrophy in adipose tissues in mice fed high-fat diet.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2093
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-20469-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kitamura H, Nakano D, Sawanobori Y, Asaga T, Yokoi H, Yanagita M, Mukoyama M, Tokudome T, Kangawa K, Shirakami G, Nishiyama A.	4. 巻 129
2. 論文標題 Guanylyl Cyclase A in both renal proximal tubular and vascular endothelial cells protects the kidney against acute injury in rodent experimental endotoxemia models.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anesthesiology	6. 最初と最後の頁 296-310
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/ALN.0000000000002214.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishikane S, Hosoda H, Nojiri T, Tokudome T, Mizutani T, Miura K, Akitake Y, Kimura T, Imamichi Y, Kawabe S, Toyohira Y, Yanagihara N, Takahashi-Yanaga F, Miyazato M, Miyamoto K, Kangawa K	4. 巻 154
2. 論文標題 Angiotensin II promotes pulmonary metastasis of melanoma through the activation of adhesion molecules in vascular endothelial cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical Pharmacology	6. 最初と最後の頁 136-147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bcp.2018.04.012.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kato Y, Mori K, Kasahara M, Osaki K, Ishii A, Mori KP, Toda N, Ohno S, Kuwabara T, Tokudome T, Kishimoto I, Saleem MA, Matsusaka T, Nakao K, Mukoyama M, Yanagita M, Yokoi H.	4. 巻 7
2. 論文標題 Natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A pathway counteracts glomerular injury evoked by aldosterone through p38 mitogen-activated protein kinase inhibition.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 46624
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep46624	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Bae CR, Hino J, Hosoda H, Arai Y, Son C, Makino H, Tokudome T, Tomita T, Kimura T, Nojiri T, Hosoda K, Miyazato M, Kangawa K.	4. 巻 7
2. 論文標題 Overexpression of C-type Natriuretic Peptide in Endothelial Cells Protects against Insulin Resistance and Inflammation during Diet-induced Obesity.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9807
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-10240-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Bae CR, Hino J, Hosoda H, Son C, Makino H, Tokudome T, Tomita T, Hosoda K, Miyazato M, Kangawa K.	4. 巻 8
2. 論文標題 Adipocyte-specific expression of C-type natriuretic peptide suppresses lipid metabolism and adipocyte hypertrophy in adipose tissues in mice fed high-fat diet.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2093
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-20469-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計8件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 徳留 健
2. 発表標題 Deficiency of cardiac natriuretic peptide signaling promotes peripartum cardiomyopathy-like remodeling in the mouse heart
3. 学会等名 第85回日本循環器学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 徳留 健
2. 発表標題 ナトリウム利尿ペプチド研究の最前線
3. 学会等名 第84回日本循環器学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 徳留 健
2. 発表標題 内因性心臓ナトリウム利尿ペプチドが摂食およびエネルギー代謝に及ぼす影響についての検討
3. 学会等名 第42回日本高血圧学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 徳留 健
2. 発表標題 周産期心筋症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
3. 学会等名 第7回臨床高血圧フォーラム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 徳留 健
2. 発表標題 組織特異的AT1a受容体ノックアウトマウスを用いた血圧制御の解析
3. 学会等名 第54回高血圧関連疾患モデル学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 徳留 健
2. 発表標題 Atrial natriuretic peptideによる血圧調節のメカニズム解析
3. 学会等名 第41回日本高血圧学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 徳留 健
2. 発表標題 Atrial natriuretic peptide exerts hypotensive effect via regulator f G-protein signaling 2-mediated endothelial hyperpolarization
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 徳留 健
2. 発表標題 心房性ナトリウム利尿ペプチドによる血圧調節のメカニズム解析
3. 学会等名 第53回高血圧関連疾患モデル学会学術総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 周産期心筋症治療剤	発明者 大谷健太郎, 徳留 健, 神谷千津子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP/2020/40927	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

http://www.ncvc.go.jp/res/divisions/biochemistry/  
国立循環器病研究センター研究所 生化学部  
http://www.ncvc.go.jp/res/divisions/biochemistry/  
国立循環器病研究センター研究所 生化学部  
http://www.ncvc.go.jp/res/divisions/biochemistry/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大谷 健太郎  (Otani Kentaro)  (50470191)	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   (84404)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------