

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08103

研究課題名(和文) BNP前駆体に結合する糖鎖の構造解析 増加の分子機序 心不全病態との関連の研究

研究課題名(英文) Study of sugar chains binding to BNP precursors; 1. Structure analysis, 2. Molecular mechanism, 3. relationship with heart failure condition

研究代表者

錦見 俊雄 (Nishikimi, Toshio)

京都大学・医学研究科・非常勤講師

研究者番号：80291946

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：現行の心不全のバイオマーカーであるBNPの測定系は前駆体proBNPを測り込み、proBNP+BNP (=total BNP)を示す。申請者は proBNP、total BNPの測定系を新たに作成し、proBNP/total BNP比の測定を可能にし、この比が慢性心不全の重症例で高いことを示した。急性心不全で検討すると軽症例でproBNP/total BNP比が低くなり、cGMP/BNPを上げて心不全を代償している新しい機序が判明した。急性心不全の治療中に腎機能が悪化し、予後不良に関係するがこのとき腎機能の悪化に先んじて NT-proBNP/mature BNP比が上昇することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性心不全の代償機構としてproBNP/total BNP比率を下げて代償することは新規の機序であり、今後の心不全の治療や診断に応用ができる可能性がある。proBNP/total BNP比率を決めているのはproBNPへの糖鎖修飾であり、糖鎖修飾の機序を解明することで心不全の患者の予後改善に結びつく可能性がある。急性心不全の治療中の腎機能悪化の早期発見の指標は、これまでたくさんの研究がなされてきたが、決定的なものはなかった。腎機能悪化を早期に予知するほど予防、治療のための介入も早くなり、心不全患者の予後の改善に結びつく可能性が高い。今回の研究で入院3日目に有意な変化が見出され期待できる。

研究成果の概要(英文)：The current assay for BNP system cross-reacts precursor proBNP, indicating that BNP means proBNP + BNP (= total BNP). The applicant created a new assay system for the proBNP and total BNP, which enabled the measurement of the proBNP / total BNP ratio and showed that this ratio was higher in severe chronic heart failure patients. When we examined the proBNP / total BNP ratio in acute heart failure, we found the proBNP / total BNP ratio was lower in mild heart failure, which make cGMP / BNP ratio increasing to compensate for heart failure. Deteriorating renal function during treatment for acute heart failure is well known sign for poor prognosis. Therefore, early detection is important. In this study, we found that the NT-proBNP / mature BNP ratio increased preceding to the deterioration of renal function in acute heart failure patients.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心不全 BNP proBNP 糖鎖修飾 分子型

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

BNPは心不全における生化学マーカーとして世界的に普及し、臨床の場で必須の検査になっている。申請者も20年以上基礎的・臨床的にBNP研究を行いその臨床的有用性と意義について数十編の英文論文として発表してきた。BNPは有用な指標であるが問題点も存在する。その一つは、血中にはBNPの前駆体であるproBNPがBNPを上回るほど存在し、現在のBNPの測定系はproBNPを交差して測ってしまう事である。

申請者はこれまで科研費の支援を受け、proBNP, total BNPを最初はゲル濾過法と免疫アッセイ法を組み合わせ示し心不全の重症例でこの比率が高くなることを示した。しかしこの方法は時間と労力が多くかかる事ならびに、回収率が低いために正確な測定ができない可能性がある。そこで新たにproBNPと従来のtotal BNPを抽出なしで測定する免疫測定法の構築を行い、これを用いて健常者、心不全、腎不全におけるproBNP/total BNP比率を報告した。またラット新生仔の培養心筋細胞にヒトproBNPを遺伝子導入し、変異体のproBNPも作成し、proBNPに7箇所付着する糖鎖修飾のプロセッシングに対する影響を、培養液中に分泌されるproBNP/total BNP比率をプロセッシングの指標として測定することで検討し、Th48とTh71に結合するO型糖鎖がプロセッシングに重要であることを示した。

### 2. 研究の目的

本研究では、proBNP/total BNP比率の臨床的意義を急性心不全で検討することを目的とした。また糖鎖の実態として、どのような糖鎖がどのように結合するのかについて、質量分析系などを用いた検討を行なった。さらに糖鎖修飾増加の機序も検討した。

### 3. 研究の方法

(1) 急性心不全患者を対象に入院時から経時的にproBNP、total BNPを測定し、proBNP/total BNP ratioを算出し、その意義について検討した。また急性心不全で入院中、腎機能が悪化するworsening renal functionの症例と、BNPの分子型と関係を検討した。

(2) BNP値が3万5千と著明に高い症例を経験し、その機序について生化学、分子生物学的手法を用いて検討し、proBNPのN端部分にIgGが結合し、巨大分子を構成し、そのため代謝を受けにくくなっていて(受容体に結合できず、腎臓からは濾過されず、neprilysinなどからも抵抗性)血中に蓄積し著明な高濃度を呈していたことを明らかにした。この症例の血漿を精製し、質量分析にかけ、糖鎖構造を明らかにすることを目指した。その前にヒトproBNPをChinese Hamster Ovarian細胞に導入し、糖鎖修飾されたproBNPの生成物を比較的大量に得られたのでまず、質量分析にかけて解析を行なった。

(3) ヒトproBNP遺伝子を新生仔培養rat心筋細胞に導入し、これに成長因子や低酸素刺激を加えて、メディウム中に分泌されたtotal BNP、proBNPを測定し、processingの指標として測定し、これらの影響について検討した。

### 4. 研究成果

(1) 急性心不全患者では入院時のproBNP/total BNP比率で4分位に分けると、Q4の患者は、BMIが低く、血圧が低く、total BNPが高く、心エコーでの左室拡張末期径が大きく心不全の

重症度が高い傾向を示した。これは我々が慢性心不全で報告した重症例の特徴と一致していた。またtotal BNPが高い心不全の重症群では低い群と比べてproBNP/total BNP比率が高く、cGMP/log(total BNP)が低下していた。proBNP/total BNP比率が高い群では低い群に比べてcGMP/log(total BNP)が低下していた。つまり心不全が重症化すると、proBNP/total BNP比率が高くなり、cGMP/log (total BNP)が低下し、心不全を代償できなくなる可能性が考えられた。また臨床経過ではtotal BNPの高い重症群と、低い軽症群では両群ともに経過とともにtotal BNPは低下したが、入院時のproBNP/total BNP比率は重症群では経過とともに変わらず一定であったが、軽症群では入院時のproBNP/total BNP比率が重症群に比べて低くなっており経過とともに増加し、差は無くなった。すなわち、軽症群では急性心不全時にproBNP/total BNP比率を低くしてmature BNPを増やして、cGMPを上げる代償機序が働くと推察された。

(2) Worsening renal function(WRF)はeGFRが退院前までに20%以上低下する群と定義した。WRF(+)群ではWRF(-)群に比べて血圧が高めでeGFRが高めだったが他に2群間に有意な差は認めなかった。フロセミドの使用量はWRF(+)群でWRF(-)群に比べて有意に多かった。BNPの分子型の経時的変化ではNT-BNPは2群で差はなく経過とともに低下したが、mature BNP, total BNPともにWRF(+)群でWRF(-)群に比べて全体の経過を通じて低い値をとった。その結果、NT-proBNP/mature BNP比率がWRF(+)群で3日目から有意に増加した。また血中のcGMP濃度は3日目でWRF(+)群で有意に増加した。これらの結果からproBNP/mature BNP比率がWRF(+)群で有意に3日目から増加することは、mature BNPが腎臓局所で消費され、cGMP濃度の産生を示し、その後のWRFを予知する指標となることが示唆された。

(3) ヒトproBNPをChinese Hamster Ovarian細胞に導入し、糖鎖修飾したproBNPを得て、HPLCなどにて精製後Acquity UPLC M-ClassシステムSynaptG2-Siハイブリッド型質量分析型で解析を行なった。トリプシン処理によりフラグメントに切断し、配列中に1残基のみ糖鎖結合が存在するペプチドを解析のターゲットとし、それぞれの質量分析を行い、ソフトウェアを用いて解析した。結果はまずペプチドにGalNAcが1-3個結合、それにGalactoseが1-2個結合、そしてシアル酸が1-2個結合する非常に多様性のある結果であった。ヒトの血中のproBNPに結合する糖鎖の検討も行なった。我々が以前に報告したmacro proBNP血症は、血中BNP濃度が約35000pg/mLで、高値の理由はproBNPのN端部分にIgGが結合しているため、proteaseなどの代謝を受けず、受容体にも結合できず、腎臓からも濾過されないため高くなったものと考えられている。この血漿をIgGのカラムでtrapし濃縮後、ゲル濾過、HPLC、Sep-pacなどで精製し質量分析にかけた。しかしながら有意なシグナルは出ずに解析できなかった。現在、血漿の精製過程を見直し、患者さんから提供してもらった血漿をpoolingしており、さらなる解析を目指しているところである。

(3) 新生仔培養rat心筋細胞においてコントロールと比べてPDGF、LIFを添加してproBNP/total BNP比を検討したところ、PDGFでは10ng/mlの濃度で有意差は出ないものの増加傾向を認めしたが、LIFでは10ng/mL、100ng/mlまで濃度を上げててもproBNP/total BNP比は変化しなかった。また10%の低酸素刺激下での培養を行なったが、proBNP/total BNP比は正常酸素群と比べて変化はなかった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Takahama H, Nishikimi T, Takashio S, Hayashi T, Nagai-Okatani C, Asada T, Fujiwara A, Nakagawa Y, Amano M, Hamatani Y, Okada A, Amaki M, Hasegawa T, Kanzaki H, Nishimura K, Yasuda S, Kangawa K, Anzai T, Minamino N, Izumi C	4. 巻 8
2. 論文標題 Change in the NT-proBNP/Mature BNP Molar Ratio Precedes Worsening Renal Function in Patients With Acute Heart Failure: A Novel Predictor Candidate for Cardiorenal Syndrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Am Heart Assoc	6. 最初と最後の頁 e011468
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/JAHA.118.011468	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 Masuta K, Funatsuki K, Inoue Y, Masud I, Nishikimi T, Nakagawa Y, Horii K, Nishi H, Irgarashi M, Ota N	4. 巻 9
2. 論文標題 A Mixture of Glycosylated proBNP and BNP-32 Is a Suitable Calibrator for BNP Immunoassays	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Open Journal of Clinical Diagnostics	6. 最初と最後の頁 51-63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4236/ojcd.2019.92004	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 Nishikimi T, Nakagawa Y	4. 巻 7
2. 論文標題 Dose impaired processing of pro-B-type (or brain) natriuretic peptide cause decreased plasma BNP levels in obese heart failure patients?	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ann Transl Med	6. 最初と最後の頁 S221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21037/atm.2019.08.56	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 Takashio S, Takahama H, Nishikimi T, Hyashi T, Nagai-Okatani C, Matuso A, Nakagawa Y, Amano M, Hamatani Y, Okada A, Amaki M, Hasegawa T, Kanzaki H, Yasuda S, Kangawa K, Anzai T, Minamino N, Izumi C	4. 巻 6
2. 論文標題 Superiority of proatrial natriuretic peptide in the prognostic power in patients with acute decompensated heart failure on hospital admission: comparison With B-type natriuretic peptide and other natriuretic peptide forms	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Open Heart	6. 最初と最後の頁 e001072
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/openhrt-2019-001072	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 錦見俊雄、中川靖章	4. 巻 8
2. 論文標題 心不全診療におけるBNP解釈のピットフォール - BNPを課題浄化もしくは過小評価する病態 -	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Heart view	6. 最初と最後の頁 28-36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Nishikimi T, Nakagawa Y.	4. 巻 14
2. 論文標題 Adrenomedullin as a Biomarker of Heart Failure.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Heart Fail Clin.	6. 最初と最後の頁 49-55
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.hfc.2017.08.006	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 Takahama H, Takashio S, Nishikimi T, Nakagawa Y.他11名	4. 巻 111
2. 論文標題 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.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Cardiol	6. 最初と最後の頁 18-25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijcard.2017.12.047	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 Nakagawa Y, Nishikimi T, Sakai H, Ohno S, Kinoshita H, Inazumi H, Moriuchi K, Kuwahara K, Horie M, Kimura T.	4. 巻 52
2. 論文標題 Macro-pro-B-type natriuretic peptide (proBNP) and hidden macro-N-terminal proBNP: Case report.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clin Biochem	6. 最初と最後の頁 148-152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clinbiochem.2017.10.019.	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 Kuwahara K, Nakagawa Y, Nishikimi T.	4. 巻 82
2. 論文標題 Cutting Edge of Brain Natriuretic Peptide (BNP) Research - The Diversity of BNP Immunoreactivity and Its Clinical Relevance.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Circ J	6. 最初と最後の頁 2455-2461
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-18-0824	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 Nakagawa Y, Nishikimi T, Kuwahara K.	4. 巻 111
2. 論文標題 Atrial and brain natriuretic peptides: Hormones secreted from the heart	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Peptides	6. 最初と最後の頁 18-25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.peptides.2018.05.012	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 Tamamura Y, Matsuura M, Shiba S, Nishikimi T	4. 巻 15
2. 論文標題 Heart failure assessed based on plasma B-type natriuretic peptide (BNP) levels negatively impacts activity of daily living in patients with hip fracture.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0237387
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0237387	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13件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Hideaki Inazumi, Koichiro Kuwahara, Yoshihiro Kuwabara, Yasuaki Nakagawa, Hideyuki Kinoshita, Kenji Moriuchi, Hiromu Yanagisawa, Toshio Nishikimi, Kazuwa Nakao, Takeshi Kimura
2. 発表標題 Increased G $\alpha$ expression plays a pivotal role in the progression of heart failure by impairing Ca $^{2+}$ handling
3. 学会等名 BCVS2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Inazumi H, Kuwahara K, Kuwabara Y, Nakagawa Y, Kinoshita H, Moriuchi K, Yanagisawa H, Nishikimi T, Oya M, Yamada M, Kashihara T, Kurebayashi N, Sugihara M, Nakao K, Kimura T.
2. 発表標題 Increased Gao expression underlies cardiac dysfunction and lethal arrhythmias accompanied with abnormal Ca <sup>2+</sup> handling
3. 学会等名 European Society of Cardiology2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 稲住英明 桑原宏一郎 柴原佳宏 中川靖章 木下秀之 森内健史 柳澤洋 錦見俊雄 大矢未来 山田充彦 柏原俊英 呉林なごみ 中尾一和 木村剛
2. 発表標題 抑制性G蛋白サブユニットG <sub>o</sub> の発現亢進はCa <sup>2+</sup> handlingの異常を介して心不全進展にかかわる
3. 学会等名 第56回日本臨床分子医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森内健史 木下秀之 中川靖章 西田基宏 森泰生 中村一文 錦見俊雄 稲住英明 柳澤洋 大矢未来 中尾一和 桑原宏一郎 木村剛
2. 発表標題 TRPC3/TRPC6チャネルを標的とした新規肺高血圧症治療の検討
3. 学会等名 第4回J-ISCN年次学術集会 国際心血管薬物療法学会日本部会 (J-ISCN)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Inazumi H, Kuwahara K, Kuwabara Y, Nakagawa Y, Kinoshita H, Moriuchi T, Yanagisawa H, Nishikimi T, Oya M, Yamada M, Kashihara T, Kurebayashi N, Sugihara M, Nakao K, Kimura T.
2. 発表標題 Increased expression of G <sub>o</sub> plays a pivotal role in the progression of heart failure by impairing Ca <sup>2+</sup> homeostasis
3. 学会等名 第36回国際心臓研究学会日本部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nishikimi T, Nakagawa Y,他9名
2. 発表標題 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
3. 学会等名 27th Scientific Meeting of the International-Society-of-Hypertension (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 稲住英明、桑原宏一郎、柴原佳宏、中川靖章、木下秀之、錦見俊雄、呉林なごみ、山田充彦、柏原俊英、中尾一和、木村剛
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第55回日本臨床分子医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 稲住英明、桑原宏一郎、柴原佳宏、中川靖章、木下秀之、錦見俊雄、呉林なごみ、山田充彦、中尾一和、木村剛
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第91回日本内分泌学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroyuki Takahama,Seiji Takashio, Toshio Nishikimi, 他14名
2. 発表標題 Impact of the superior predicting ability of pro-atrial natriuretic peptide level on admission for future clinical adverse events in patients with acute heart failure: Comparison with B-type natriuretic peptide level measured using conventional assay
3. 学会等名 American Heart Association's annual Scientific Sessions meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 Nishikimi T
2. 発表標題 How do you interpret the value of BNP or NT-proBNP after ARNI therapy in heart failure patients ? Lessons from PARADIGM-HF study
3. 学会等名 第84回 日本循環器学会学術集会総会 TOPICS
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 錦見俊雄、中川靖章
2. 発表標題 心不全におけるアドレノメデュリンとST2-病態生理学的役割とバイオマーカーとしての意義
3. 学会等名 第24回日本心不全学会学術集会 シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 錦見俊雄、中川靖章、南野直人、高濱博之
2. 発表標題 BNP分子型の病態生理的意義
3. 学会等名 第24回日本心血管内分泌代謝学会 シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Inazumi H, Kuwahara K, Kuwabara Y, Nakagawa Y, Kinoshita H, Moriuchi K, Yanagisawa H, Nishikimi T, Oya M, Yarnada M, Kashihara T, Kurebayashi N, Sugihara M, Nakao K, Kimura T.
2. 発表標題 NRSF-GNAO1-CaMK2 axis exacerbates cardiac remodeling and progresses heart failure by impairing Ca <sup>2+</sup> homeostasis
3. 学会等名 ESC Congress 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都大学医学部付属病院循環器内科 心血管内分泌代謝グループ  
<http://kyoto-u-cardio.jp/kisokenkyu/endocrine/>

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	中川 靖章  (Nakagawa Yasuaki)  (70452357)	京都大学・医学研究科・助教    (14301)	

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
---------	---------