

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590956

研究課題名(和文) 腎臓におけるNa利尿ペプチド系のトランスレーショナルリサーチと探索的臨床応用

研究課題名(英文) Translational research and clinical application of the natriuretic peptide system in the kidney.

研究代表者 向山 政志(MUKOYAMA MASASHI)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：40270558

研究成果の概要(和文):Na利尿ペプチド(ANP・BNP・CNP)は強力な降圧利尿・RAA系抑制作用を有する心臓血管ホルモンである。腎臓関連領域におけるNa利尿ペプチド系の意義を検討した。

CNP過剰発現マウスは腎間質線維化モデルで保護効果を示した。ANP・BNP受容体(GC-A)欠損マウスにアルドステロンを負荷すると著しい蛋白尿とpodocyte傷害を認めた。また腹膜透析合併症として難治性の腹膜硬化症がある。ヒピテン誘発モデルでは腹膜線維化・癒着をきたすが、ANP投与やBNP過剰発現マウスでは癒着が軽減した。このように、Na利尿ペプチドはpodocyteを含む複数の作用点で腎保護作用を示すこと、腹膜透析合併症に対しても治療応用の可能性が示された。

研究成果の概要(英文):Natriuretic peptide family (ANP, BNP, and CNP) exert potent diuretic, natriuretic and vasorelaxing properties, as well as the inhibition of the renin-angiotensin-aldosterone system. We investigated the role of natriuretic peptides in renal disease and its complications.

1. Preparation of CNP-transgenic mice (CNP-Tg) and effects of CNP on renal injury:

CNP acts as a local hormone in the vessel, bone and kidney. Human SAP promoter-driven CNP-Tg exhibited enhanced bone growth as a result of excess circulating CNP. CNP-Tg showed ameliorated renal fibrosis and macrophage infiltration upon obstructive nephropathy model.

2. Role of GC-A (a receptor for ANP and BNP) and aldosterone in glomerular injury:

GC-A is expressed abundantly in renal tubules, but its role in glomerular injury is unknown. When GC-A knockout mice were subjected to aldosterone and high salt, massive proteinuria with marked podocyte injury was observed, which was alleviated with the MR antagonist, ARB or antioxidant.

3. Role of ANP and BNP in peritoneal sclerosis:

Peritoneal sclerosis is a serious complication in chronic peritoneal dialysis, but the effective treatment is not established yet. Subcutaneous ANP administration as well as chronic BNP excess in transgenic mice effectively ameliorated peritoneal adhesion in a mouse model of peritoneal sclerosis.

These results indicate that natriuretic peptides will have a various therapeutic potential in renal disease and related pathophysiological conditions.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：腎臓学

1. 研究開始当初の背景

近年、糖尿病をはじめとする生活習慣病の有病率増加とともに、腎不全患者は増加の一途をたどり、30万人近い患者が慢性維持透析を受けている。また最近、軽度から中等度の腎障害が独立した心血管イベントの危険因子であることが次々と示され、その機序が注目されている。同時に包括的概念としての慢性腎臓病 (CKD) という用語が定着し、その実態解明と患者1,300万人ともいわれる病態の把握へ向けて全国調査が進められている。これら進行性腎障害の病態解明と克服は、社会的・医療経済的にも極めて重要な課題であるが、現在その進行を抑制し、寛解・退縮せしめる有効な治療法開発の取り組みは不十分といわざるを得ない。

われわれはこれまで、Na利尿ペプチドファミリー (ANP、BNP、CNP) の病態生理的意義の解明を目的として、臨床・基礎両面からアプローチしてきた。臨床面では、心臓ホルモンとしてのANP・BNPが心不全、腎不全患者において著しく分泌亢進すること、その血中レベルが病態及び予後と深く関わることを世界に先駆けて示し (Mukoyama et al. *J Clin Invest* 1991他)、診断薬としての意義を確立するとともに、ANP・BNPを初めて心不全症例に投与して治療薬としての意義を明らかにするなど、今日の世界的な日常臨床応用への展開に貢献してきた。それと同時に、われわれはNa利尿ペプチド系の遺伝子改変動物の開発を通して、それらの生理的意義の解明を追及してきた。その結果、ANP・BNP受容体 (GC-A) 欠損マウスでの著しい高血圧と心肥大、BNP欠損マウスでの心室線維化を証明した (Tamura, Mukoyama et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000)。そして、BNP過剰発現マウス (BNP-Tg) を用いて、Na利尿ペプチドが腎摘腎不全や腎炎、及び糖尿病性腎症に対して腎保護作用をもたらすことを明らかにした (Kasahara,

Mukoyama et al. *J Am Soc Nephrol* 2000; Suganami, Mukoyama et al. *J Am Soc Nephrol* 2001, Makino, Mukoyama et al. *Diabetologia* 2006)。しかし、この腎保護作用の機序の詳細や、2種類の受容体 (GC-A、GC-B) のいずれを介する作用か、また各種病態での役割の違い、ひいてはヒト腎疾患での効果など、未だ不明な点も多く残されている。

一方、われわれの教室ではその生理的意義の追及の過程で、Na利尿ペプチド系、とくにCNP/GC-B系が生理的に必須の骨形成促進因子でもあることを発見した (Yasoda et al. *Nat Med* 2004 他)。本研究は、これらの研究成果をさらに発展させ、CNP/GC-B系を含めたNa利尿ペプチド系全体の意義について、種々の腎障害モデルと組み合わせ主に遺伝子改変動物を用いて分子レベルで解明するとともに、これまで有効な治療法に乏しかったCKDに対する臨床応用へと展開することを目的とするものである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、主に動物モデルを用いることにより、Na利尿ペプチド系の腎疾患における意義を明らかにすることである。すでにANP・BNP/GC-A系については糸球体保護に働くことを示してきたが、CNP/GC-B系については明らかでない。また、最近アルドステロンの腎障害作用が注目されているが、それとのクロストークも含め、腎保護における意義を明らかにする。

さらに、腎不全治療における種々の合併症についても検討を行う。特に、腹膜透析の重要な合併症のひとつである腹膜硬化症 (encapsulating peritoneal sclerosis: EPS) に対して、治療的意義を有するかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) CNP過剰発現マウスを用いた腎障害モデル

における検討

すでに Col2a1 promoter を用いて軟骨特異的 CNP-Tg マウスを確立したが、血中に過剰分泌されるモデルとして BNP-Tg と同様 SAP promoter を用いて、CNP-Tg マウス(SAP-CNP-Tg)を作製した。16 週齢の雄性 SAP-CNP-Tg マウスを用いて、腎間質線維化モデルである一側尿管結紮(UUO)を施し、経時的に腎組織像を解析した。各種遺伝子発現やマクロファージ浸潤の変化を検討した。

(2) ANP・BNP 受容体(GC-A)欠損マウスの腎病変の解析とアルドステロンの意義の検討

アルドステロンの腎障害作用に対して、Na 利尿ペプチド系が腎保護的な役割を担うという仮説を立て、ANP・BNP の受容体である GC-A を全身的に欠損(KO)したマウスにアルドステロン投与を行い、その血圧・尿・腎組織の評価を行った。

片腎摘後の野生型マウスおよび GC-A-KO マウスに対し、浸透圧ポンプによりアルドステロン(0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{分}$)の持続皮下注および 6% 高食塩食の投与を行い 4 週間にわたり観察し、腎機能・腎組織変化を検討した。さらに、ヒドララジン、MR 拮抗薬(スピロラクトン)、ARB(オルメサルタン)、抗酸化剤(tempol)の効果を検討した。

(3) Na 利尿ペプチドの腹膜保護作用に関する検討

ヒト SAP promoter を用いて血中に BNP を過剰分泌する BNP 過剰発現マウス(BNP-Tg)と野生型 C57BL/6J マウスの間での chlorhexidine gluconate(ヒピテン)による腹膜癒着に及ぼす差について検討した。また、ANP の持続皮下投与(1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{分}$)による癒着軽減効果についても検討した。0.1%ヒピテン溶液 0.3ml を週 3 回 4 週間投与し、腹膜癒着を惹起し、癒着スコアと各種遺伝子発現を検討した。

4. 研究成果

(1) CNP 過剰発現マウスを用いた腎障害モデル

における検討

SAP-CNP-Tg マウスおよび対照 C57BL/6J マウスに UUO を施し、間質線維化モデルでの検討を行った。尿管結紮 3 日、7 日および 14 日後において、non-Tg マウスでは患側腎の著しい線維化の亢進がみられたが、CNP-Tg マウスでは有意の改善を認めた。同様に腎組織 MCP-1、TGF- β 1 遺伝子発現も抑制ないし抑制傾向を認め、さらに間質へのマクロファージ浸潤も CNP-Tg マウスにおいて著しく抑制された。

(2) ANP・BNP 受容体(GC-A)欠損マウスの腎病変の解析とアルドステロンの意義の検討

GC-A-KO マウスは、基礎状態では腎臓に明らかな機能的・組織学的異常を示さなかった。しかし、アルドステロン負荷後、血圧は野生型と比べ 30mmHg 以上と著しく上昇した。尿中アルブミン排泄は野生型ではわずかな上昇であったのに対し、GC-A-KO マウスでは投与前のおよそ 300 倍である約 20,000 $\mu\text{g}/\text{mgCr}$ とネフローゼレベルへの上昇を認めた。腎組織では、野生型アルドステロン投与群で軽度の糸球体腫大、メサンギウム拡大、間質線維化が観察され、いずれも KO マウスでその変化は顕著であった。さらに、KO マウスでは podocyte の MAP キナーゼ(ERK、p38MAPK)の活性化を伴っていた。この尿蛋白増加や腎組織変化は、KO マウスへのヒドララジン投与により正常レベルまで降圧しても軽減されなかったが、MR 拮抗薬、ARB、抗酸化剤で改善を認めた。In vitro では、アルドステロンによる ERK、p38 MAPK のリン酸化を ANP は抑制した。

これらのことから、Na 利尿ペプチド系がアルドステロンによる糸球体傷害に対して保護的に作用していることが示唆された。さらにその関係因子の同定について、マイクロアレイによる網羅的解析を行い、プロテアーゼ、成長因子、糖代謝に関連する遺伝子、細胞周期関連遺伝子などが同定された。

(3) Na 利尿ペプチドの腹膜保護作用に関する検

討

BNP-Tg にヒビテンを投与した腹膜硬化症モデルでは、対照に比して明らかに腹膜癒着が軽減することを見出した。同時に、IL-1 β や TNF- α 発現、CD3 陽性 T 細胞数が明らかに抑制された。ANP 持続投与モデルでも同様の結果であった。さらに、壁側腹膜の GeneChip の結果同定された大きく変動を示す 56 個遺伝子 (*Egr2*, *Cxcl1*, *wisp1*, *Mmp14*, *Ptn*) について、遺伝子発現や機能解析を進めている。

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 7 件)

1. Fujii T, Komatsu Y, Yasoda A, Kondo E, Yoshioka T, Nambu T, Kanamoto N, Miura M, Tamura N, Arai H, Mukoyama M, Nakao K: Circulating C-type natriuretic peptide (CNP) rescues chondrodysplastic CNP knockout mice from their impaired skeletal growth and early death. *Endocrinology* 151: 4381-4388, 2010 (査読有)
2. Yokoi H, Kasahara M, Mukoyama M, Mori K, Kuwahara K, Fujikura J, Arai Y, Saito Y, Ogawa Y, Kuwabara T, Sugawara A, Nakao K. Podocyte-specific expression of tamoxifen-inducible Cre recombinase in mice. *Nephrol Dial Transplant* 25: 2120-2124, 2010(査読有)
3. Nakao K, Yasoda A, Ebihara K, Hosoda K, Mukoyama M: Translational research of novel hormones: Lessons from animal models and rare human diseases to common human diseases. *J Mol Med* 87: 1029-1039, 2009 (査読有)
4. Kake T, Kitamura H, Adachi Y, Yoshioka T, Watanabe T, Matsushita H, Fujii T, Kondo E, Tachibe T, Kawase Y, Jishage K, Yasoda A,

Mukoyama M, Nakao K: Chronically elevated plasma C-type natriuretic peptide level stimulates skeletal growth in transgenic mice. *Am J Physiol Endocr Metab* 297: E1339-E1348, 2009 (査読有)

5. Kasahara M, Mori K, Satoh N, Kuwabara T, Yokoi H, Shimatsu A, Sugawara A, Mukoyama M, Nakao K: Reduction in urinary excretion of neutrophil gelatinase-associated lipocalin by angiotensin receptor blockers in hypertensive patients. *Nephrol Dial Transplant* 24: 2608-2609, 2009 (査読有)

6. Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M, Kasahara M, Yokoi H, Saito Y, Yoshioka T, Ogawa Y, Imamaki H, Kusakabe T, Ebihara K, Omata M, Satoh N, Sugawara A, Barasch J, Nakao K: Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels reflect damage to glomeruli, proximal tubules, and distal nephrons. *Kidney Int* 75: 285-294, 2009 (査読有)

7. Nagae T, Mori K, Mukoyama M, Kasahara M, Yokoi H, Suganami T, Sawai K, Yoshioka T, Koshikawa M, Saito Y, Ogawa Y, Kuwabara T, Tanaka I, Sugawara A, Kuwahara T, Nakao K: Adrenomedullin inhibits connective tissue growth factor expression, extracellular signal-regulated kinase activation and renal fibrosis. *Kidney Int* 74: 70-80, 2008 (査読有)

[学会発表] (計 6 件)

1. Yokoi H, Kasahara M, Mori K, Kuwabara T, Imamaki H, Kawanishi T, Koga K, Ishii A, Mori K, Kato Y, Sugawara A, Mukoyama M, Nakao K: Atrial natriuretic peptide prevents peritoneal adhesion formation with inhibiting macrophage and CD3-positive cell infiltration. 第 43 回米国腎臓学会学術集会、2010 年 11 月 18 日、デンバー、アメリカ

2. Mukoyama M, Mori K, Kasahara M, Yokoi H, Ogawa Y, Kuwabara T, Nakao K: Renoprotective role of natriuretic peptide family in various nephropathy models and its potential to clinical application. 第 12 回アジア太平洋腎臓学会、2010 年 6 月 7 日、ソウル、韓国

3. Ogawa Y, Mukoyama M, Yokoi H, Kasahara M, Mori K, Yoshioka T, Saito Y, Kuwabara T, Imamaki H, Kawanishi T, Koga K, Ishii A, Kishimoto I, Sugawara A, Nakao K: Natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A signaling exerts antagonistic effects on the local renin-angiotensin- aldosterone system in kidney. 国際腎臓学会 Nexus Symposium 2010、2010 年 4 月 16 日、京都

4. Mukoyama M, Mori K, Kasahara M, Yokoi H, Nakao K: Role of cardiovascular hormones in renal disease. 第 14 回国際内分泌学会(シンポジウム)、2010 年 3 月 29 日、京都

5. Mukoyama M, Ogawa Y, Yokoi H, Kasahara M, Mori K, Yoshioka T, Saito Y, Kuwabara T, Imamaki H, Kishimoto I, Sugawara A, Nakao K: Protective effects of natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A signaling on aldosterone-induced glomerular injury. 2009 年世界腎臓学会、2009 年 5 月 25 日、ミラノ、イタリア

6. Ogawa Y, Mukoyama M, Yokoi H, Kasahara M, Mori K, Yoshioka T, Saito Y, Kuwabara T, Imamaki H, Sugawara A, Nakao K: Protective effect of atrial natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A signaling on aldosterone-induced renal injury. 第 41 回米国腎臓学会学術集会、2008 年 11 月 6 日、フィラデルフィア、アメリカ

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称:腹膜癒着防止用医薬組成物

発明者:中尾一和、横井秀基、向山政志、笠原正登、森 潔、古谷真優美

権利者:国立大学法人京都大学、第一三共株式会社

種類:特許

番号:特願 2010-51171

出願年月日:平成 22 年 3 月 8 日

国内外の別:国内

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/med2/index-jp.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

向山 政志(MUKOYAMA MASASHI)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号:40270558

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

森 潔(MORI KIYOSHI)

京都大学・医学研究科・特定准教授

研究者番号:60343232