

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591041

研究課題名(和文) 循環調節ペプチド-脳性利尿ペプチド、アドレノメデュリン-の展開研究

研究課題名(英文) Translational research of circulation-regulated peptide using B-type natriuretic peptide and adrenomedullin

研究代表者

錦見 俊雄 (Nishikimi, Toshio)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・その他

研究者番号：80291946

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：B型ナトリウム利尿ペプチド(BNP)、アドレノメデュリン(AM)の展開研究を行った。現在の血中BNPはBNPはBNP-32とproBNP-108の総和でありこれを分離測定する系を新たに構築した。これを用いて健常者、心不全、腎不全で測定したところ、血中の約70%がproBNPであり、proBNP濃度は年齢とともに増加し、心不全では重症度とともに増加した。腎不全患者ではproBNPの総BNPに対する比率が高かった。AMの脂肪組織特異的なノックアウトマウスを作成した。脂肪組織におけるAMの遺伝子発現は低下していたが、正常食事下では体重、身長、脂肪量など明らかなフェノタイプの変化はなかった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the translational research of circulation-regulated peptide using B-type natriuretic peptide and adrenomedullin. We newly developed the immunofluorescent assay for proBNP and total BNP(=BNP32+proBNP). Using this immunofluorescent assay system we found that proBNP is about 70% of total BNP immunoreactivity. ProBNP level increases with age. ProBNP level is increased in heart failure in proportion to its severity. ProBNP/total BNP ratios are greater in chronic renal failure patients than in normal subjects. We successfully produced fat tissue specific deficient AM knockout mouse. The phenotype under normal diet reveals no differences compared with wild type mouse such as body weight, body height, and fat tissue amount.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：B型ナトリウム利尿ペプチド アドレノメデュリン 循環ペプチド 心不全 ノックアウトマウス proBNP 脂肪組織

## 1. 研究開始当初の背景

(1) BNPは現在心不全における生化学マーカーとして世界的に普及し、年間一億検体が世界中で測定されていると推定されており、臨床の場で必須の検査になっている。申請者も1990年代よりBNPの研究を開始し、左室肥大のマーカーになること、肺高血圧の右心機能や予後推定に有用であること、内因性のBNPが心肥大に対して抑制的に働くこと、心筋梗塞後のリモデリングの指標になること、不整脈源性右室心筋症の重症度の指標となること、非代償性心不全に対する距離を示す指標となること、心筋虚血で上昇すること、などを示してきた。BNPは有用な指標であるが、ばらつきが多く、年齢や性の影響も受けることなど問題点もいくつか存在する。その理由として血中に様々なBNPの分子型が存在することが最近判明した。特に前回の科研費の支援を受け、血中に前駆体proBNPが多く存在する事をゲル濾過法と免疫アッセイ法を組み合わせで示した。しかしながらこの方法は時間と労力が多くかかる上、血漿を抽出するときに回収率が60~70%のために、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測定法の構築を試み、これを用いて健常者、心不全、腎不全における測定を試みた。

(2) アドレノメデュリン(以下AM)に関しては1993年の発見以来、循環器系に高発現する事から、循環器疾患との関係に着目し、血中AM濃度が、循環器疾患の重症度の指標や予後の指標となる事を示してきた。さらにAMの作用機序から心不全、高血圧、腎障害などの病態に対して代償的に働き、AM投与は治療薬となる可能性を示してきた。また最近、AMが脂肪組織で高発現している事が判明し、前回の科研費の支援を受け脂肪細胞がAMを培養液中に高分泌している事や、AMがlipolysis作用を有する事を示した。しかしながらAMの脂肪組織における生体内での役割についてはいま

だ不明な点が多い。AMのノックアウトマウスはすでに世界で3施設から報告されており、胎生致死であることが明らかになっている。そこで、脂肪細胞特異的なAMのノックアウトマウスの作成をこころみ、その意義について検討を試みた。

## 2. 研究の目的

(1) 従来のBNPの測定系はproBNPを含む種々のものを交叉しているため、個別にしかも抽出なしに簡単に測定できる方法を試みた。さらに健常者や心不全、腎不全患者でproBNPの含まれる割合を検討した。

(2) 脂肪細胞は多くのAMを分泌する事ならびにlipolysis作用を有することを報告したが生体内での意義については不明である。そこで脂肪細胞特異的なAMをノックアウトマウスの作成を行った。

## 3. 研究の方法

(1) BNPの測定系に関してtotal BNPは従来のC端とリング構造を認識するモノクローナル抗体を用いた。proBNPに関してはC端のモノクローナル抗体は同じものを用い、N端を認識する抗体はN端10-20に対する市販の抗体(Hytest)を用いた。測定系は96wellプレートを使用し、C端の抗体は現在、BNP測定に使用されているように固相化に用いた。N端10-20に対する抗体はALPを用いた標識に用い、リング抗体も同様にALPを用いた標識に用いた。CDP/Eを加えて化学発光強度をWallac 1420 Arvo sx, (PerkinElmer, Inc., MA)で測定した。健常者、心不全患者、腎不全患者でtotal BNP, proBNPの測定を行い、total BNPの免疫活性中、proBNPが含まれる%を示す指標であるproBNP/total BNP比も算出した。

(2) AMの遺伝子は4つのexonからなり、第2 exonにPAMPが、第4 exonにAMがコードされ、2つの生理活性ペプチドが1つの遺伝子に存在し、またPAMPとAMは異なる生理活性を有する。

まずAM floxedマウスの作製を行った。具体的にはAM遺伝子の第4 exonのAMをコードする領域の上流にloxP配列を挿入し、AM遺伝子コード領域の下流にFRT-neo-FRT-loxP配列を挿入する構造のターゲティングベクターを作製し、C57BL/6由来ES細胞にターゲティングベクターを導入し、相同組み替えES細胞の選別を行い、キメラマウスを作製し、F1マウスを得た。その後、FLPマウスと交配し、FRT-neo-FRTを欠損させてfloxed AMマウスを得た。そしてhomozygous floxed AMマウスの作製も行った。また脂肪細胞に特異的に発現するaP2をプロモーターに用いてCreリコンビナーゼを脂肪細胞に特異的に発現したマウスとの交配し、AMを脂肪細胞で特異的に欠損したマウスを作製した。

#### 4. 研究成果

(1) この測定系の最低検出限界値は0.05 fmol/mLで、CV値(<15%)のワークrangalは0.4-250 fmol/mLであった。ヒト正常者血漿(0.2 pM)にglycosylated proBNPを加えて回収をみた回収率は90-101%と良好であった。intra-assay CV値は5.2%-8.0%、inter-assay CV値は5.3-7.4%と良好であった。この測定系を用いて実際に健常者110人で検討したところ、従来のtotal BNP値に比してproBNP値の割合は60~70%にある症例がほとんどであった。proBNPも年齢とともに増加し、total BNPと同じ動きを示した。心臓カテーテルで動脈と静脈を検討したところ動脈よりも静脈でproBNP/total BNP比率は高くなっていた。重症の心不全患者でproBNP/total BNP比率の比率が著しく高い症例が観察されたが、平均のproBNP/total BNP比率は60~70%であった。この比率は腎不全患者で増加していた。

(2) 脂肪組織での遺伝子発現はPAMPの発現は野生型と変わらず、AMの遺伝子発現のみが約20%と低下を認めた。体重の増加、大きさ、摂食量、脂肪のつき方など一見した表現系に野生型に比べて大きな差はなかった。今後高

脂肪食負荷を行い、体重、脂肪量、血中のT-Cho、TG、FFA、血糖値、インスリン値、インスリン抵抗性、組織学的検討(脂肪細胞のサイズなど)、免疫組織学的検討(浸潤する細胞T細胞、マクロファージの同定など)、脂肪組織における各種遺伝子発現(PEPCK, AP2, Glut4, LPL, adiponectin, leptin)などを測定し野生型と比較検討予定である。

#### 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18件)

1. Nishikimi T, Minamino N, Nakao K. Diverse molecular forms of plasma B-type natriuretic peptide in heart failure. *Curr Heart Fail Rep.* 2011;8:140-6. (査読有り)
2. Nishikimi T, Kuwahara K, Nakao K. Current biochemistry, molecular biology, and clinical relevance of natriuretic peptides. *J Cardiol.* 2011;57:131-40. (査読有り)
3. Hata L, Kuwahara K, Nakagawa Y, Nishikimi T, 他12名. Zinc-finger protein 90 negatively regulates neuron-restrictive silencer factor-mediated transcriptional repression of fetal cardiac genes. *J Mol Cell Cardiol.* 2011;50:972-81. (査読有り)
4. Nishikimi T, Kuwahara K, Nakagawa Y, 他7名. The effect of glycosylation on plasma N-terminal proBNP-76 levels in patients with heart or renal failure. *Heart.* 2012;98:152-61. (査読有り)
5. Maisel AS, Minamino N, Nishikimi T, 他12名. Japanese-Western consensus meeting on biomarkers. *Int Heart J.* 2011;52:253-65. (査読有り)
6. Kuwahara K, Nishikimi T, Nakao K. Transcriptional regulation of the fetal

- cardiac gene program. *J Pharmacol Sci.* 2012;119:198-203. (査読有り)
7. Nishikimi T. Do plasma levels of brain natriuretic peptide (BNP) and N-terminal proBNP (NT-proBNP) increase in diastolic dysfunction as well as in systolic dysfunction? *Circ J.* 2012;76:2540-1. (査読有り)
8. Minami T, Kuwahara K, Nakagawa Y, Nishikimi T, 他 1 8 名. Reciprocal expression of MRTF-A and myocardin is crucial for pathological vascular remodelling in mice. *EMBO J.* 2012;31:4428-40. (査読有り)
9. Nishikimi T, Kuwahara K, Nakagawa Y, Minamino N, 他 2 名. Complexity of molecular forms of B-type natriuretic peptide in heart failure. *Heart.* 2013;99:677-9. (査読有り)
10. Nishikimi T, Kuwahara K, Nakagawa Y, Minamino N, 他 1 3 名. Direct immunochemiluminescent assay for proBNP and total BNP in human plasma proBNP and total BNP levels in normal and heart failure. *PLoS One.* 2013;8:e53233. (査読有り)
11. Kuwabara Y, Kuwahara K, Nakagawa Y, Nishikimi T, 他 1 3 名. Increased expression of HCN channels in the ventricular myocardium contributes to enhanced arrhythmicity in mouse failing hearts. *J Am Heart Assoc.* 2013;2:e000150. (査読有り)
12. Nishikimi T, Kuwahara K, Nakagawa Y, 他 2 名. Adrenomedullin in cardiovascular disease: a useful biomarker, its pathological roles and therapeutic application. *Curr Protein Pept Sci.* 2013;14:256-67. (査読有り)
13. Yasuno S, Kuwahara K, Nakagawa Y, Nishikimi T, 他 7 名. Angiotensin II type 1a receptor signalling directly contributes to the increased arrhythmogenicity in cardiac hypertrophy. *Br J Pharmacol.* 2013;170:1384-95. (査読有り)
14. Wetzel-Strong SE, Nishikimi T, 他 3 名. Epicardial-derived adrenomedullin drives cardiac hyperplasia during embryogenesis. *Dev Dyn.* 2014;243:243-56. (査読有り)
15. 錦見俊雄. 心疾患のバイオマーカーとしてのBNPの意義—基礎的・臨床的観点から— . *日本臨床* 70:774-784, 2012
16. 錦見俊雄. BNP、ANPと高血圧. *血圧* 19: 884-889, 2012
17. 錦見俊雄. 降圧薬としてのエンドセリン拮抗薬、PDE 5 阻害薬—治療抵抗性高血圧におけるエンドセリン拮抗薬、PDE 5 阻害薬の可能性— *循環器内科* 72, 515-520, 2012
18. 錦見俊雄. ストローマとナトリウム利尿ペプチド - 急性心筋梗塞の病態生理的意義と臨床応用 - *循環器内科* 74, 174-180, 2013
- [学会発表](計 41 件 主なものを記す)
1. Nishikimi T, Minamino N, Kuwahara K, Nakagawa Y, 他 5 名 . Analysis of circulating glycosylated N-terminal proBNP and nonglycosylated N-terminal proBNP in patients with heart failure (HF) and chronic renal failure (CRF) on hemodialysis. *European Society of Cardiology 33rd Annual Congress*, 2011/8/27-31, Paris, France
2. 錦見俊雄 : 高血圧性左室肥大・潜在性心機能低下のサロゲートマーカーとしての血漿 BNP 測定の意義と問題点, 第 34 回日本高血圧学会総会 (Up to Date)、2011/10/20-22、宇都宮市

3. 錦見俊雄、中川靖章、桑原宏一郎、南野直人、他1名: ヒト血漿における proBNP、total BNP 直接測定法の確立—健康者、心不全患者での検討—、第35回日本高血圧学会、2012/9/22-24、名古屋

4. Nishikimi T、Nakagawa Y、Kuwahara K、Minamino N、他8名. Direct immunoassay for proBNP and total BNP in human plasma - proBNP and total BNP levels in healthy and heart failure patients. 24th International Society of Hypertension, 2012/9/30-10/4, Sidney, Australia

5. 錦見俊雄、中川靖章、桑原宏一郎、南野直人、他2名: proBNP、total BNP 直接化学発光測定法の確立—心不全患者における検討— 第60回日本心臓病学会学術集会、2012/9/14-16、金沢

6. 錦見俊雄 : BNP revisited, 第16回日本心血管内分泌学会(ワークショップ)、2012/11/23-24. 東京

7. 錦見俊雄 : BNP 関連ペプチドの最新知見 The76th Annual Scientific Meeting of The Japanese Circulation(ランチョンセミナー)、2012/3/16-18, Fukuoka, Japan

8. 錦見俊雄. ナトリウム利尿ペプチド BNP、ANP の最新知見とその臨床応用. 日本自動分析学会(ランチョンセミナー) 2013/10/12, 横浜

9. 錦見俊雄. B型ナトリウム利尿ペプチド研究の最前線. 日本高血圧学会総会(シンポジウム) 2013/10/23-25. 大阪

10. Toshio Nishikimi, Yasuaki Nakagawa, Naoto Minamino, Koichiro Kuwahara, 他9名. O-glycosylated Pro B-type Natriuretic Peptide is Cleaved intracellularly By Furin in Ventricular Myocytes and Atrial Myocytes : Importance of the Distance Between the O-glycosylation Sites and Cleaved Sites. American Heart Association Annual Meeting.

2013/11/15-18. Dallas, USA

11. 錦見俊雄. 心不全における BNP 前駆体 proBNP の病態生理的意義. 日本心血管内分泌代謝学会(イブニングセミナー)、2013/11/22-23. 大阪

12. Toshio Nishikimi, Yasuaki Nakagawa, Naoto Minamino, Koichiro Kuwahara, 他9名. Molecular mechanism of lower processing rate in human proBNP: importance of the distance between the O-glycosylation and cleavage sites. 日本循環器学会総会 2014/3/21-23. 東京

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

取得状況(計1件)  
名称: proBNP-108 の新規用途  
発明者: 錦見俊雄、他1名  
権利者: 錦見俊雄、他2名  
種類:  
番号: 特許 5362487  
取得年月日: 平成25年9月13日  
国内外の別: 日本、米国

〔その他〕  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

錦見俊雄 (Nishikimi Toshio)

京都大学医学部附属病院・内分泌代謝内科  
・准教授

研究者番号: 80291946

### (2) 研究分担者

桑原宏一郎 (Kuwahara Koichiro)

京都大学医学部附属病院・内分泌代謝内科  
・講師

研究者番号: 30402887

中川靖章 (Nakagawa Yasuaki)

京都大学医学部附属病院・内分泌代謝内科  
・助教

研究者番号: 70452357

### (3) 連携研究者

南野直人 (Minamino Naoto)

国立循環器病研究センター研究所・薬理  
部・部長

研究者番号: 50124839