

ナトリウム利尿ペプチド系の臓器保護・再生における
意義とその分子機構

(課題番号 13671152)

平成 13 年度～平成 14 年度科学研究費補助金 (基盤研究(C)(2)) 研究成果報告書

平成 1 5 年 3 月



研究代表者 向山 政志
(京都大学医学研究科 講師)

科研

2002

357

は し が き

平成13年度から平成14年度の2年間、「ナトリウム利尿ペプチド系の臓器保護・再生における意義とその分子機構」という課題で科学研究費補助金「基盤研究(C)(2)」を交付していただき、研究を行いました。近年、糖尿病性腎症や慢性腎炎、腎硬化症やまた高血圧などの発症・進展に、血管作動性ホルモン・因子やその受容体によって構成される生体内情報伝達系の異常が密接に関与していることが次第に明らかになりつつあります。このうち、心臓血管ホルモンとして代表的なナトリウム利尿ペプチドファミリー (ANP、BNP、CNP) は、急性作用として強力な利尿・ナトリウム利尿・降圧・血管拡張作用を発揮しますが、その腎における慢性作用、さらに特に降圧療法を中心として臨床の場で重視される臓器傷害への保護という観点からの作用については明らかではありません。本研究では、ナトリウム利尿ペプチド系の特に腎での臓器保護における意義とその分子機構を解明し、ひいては臨床応用の可能性を目指すため、主に疾患モデル動物を用いて検討を行いました。

この補助金によって次の研究を行いました。まず、BNP を血中に過剰分泌するBNP 過剰発現マウス (BNP-Tg) を確立してその解析を行い、それを用いて腎炎モデルを作製しました。そして、過剰のBNP が腎炎の進行に対し組織学的にもまた腎機能的にもきわめて強力な抑制作用を発揮することを見出しました。さらに、腎間質線維化モデルおよび糖尿病性腎症モデルを作製して同様の解析を行い、BNP-Tg においていずれの腎疾患モデルでもきわめて有効に腎障害の進行が抑制されることを明らかにしました。そして、これらの機序を解明するため、培養細胞を含めて検討を行い、種々の腎障害において key pathway と考えられるレニン-アンジオテンシン系の亢進を介した TGF- β 、MCP-1 等の活性化に至る複数の経路が、ナトリウム利尿ペプチドによる cyclic GMP 系の活性化により強力に抑制されることを明らかにし、これらにより腎保護作用が発揮される可能性が考えられました。

このように科学研究費補助金によって、腎臓におけるナトリウム利尿ペプチド系の意義に関する独自の研究成果をあげることができたことを感謝しています。しかし臨床的な意義づけについてはいまだ不十分であり、残された問題も数多く、今後とも研究を続けたいと考えます。補助金交付の終了にあたり研究報告書をまとめさせていただきました。多くの方々のご批判とご指導をいただければ幸いです。

研究組織

研究代表者：向山 政志（京都大学医学研究科 講師）

研究経費

平成13年度 1,700 千円

平成14年度 1,400 千円

計 3,100 千円

研究協力者

申請書における研究組織は研究代表者1名のみになっておりますが、本研究は国立京都病院 菅原 照先生、京阪奈病院院長 田中一成先生、京都大学医学研究科 中尾一和教授をはじめ、多くの研究者のご指導およびご協力により遂行されました。ここに、氏名を記させていただきます。

京都大学医学研究科臨床病態医科学

森 潔、笠原 正登、菅波 孝祥、槇野 久士、八幡 兼成、
永江 徹也、藤永有理子、吉本 明弘、横井 秀基、澤井 一智、
吉岡 徹朗、越川 真男

研究成果の概要

ナトリウム利尿ペプチド系の特に腎における臓器保護作用の解明を目的として検討し、以下の成績を得た。

1. 腎炎モデルにおける検討

我々はすでに、脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP) を肝臓より血中に過剰分泌する BNP 過剰発現マウス (BNP-Tg) を確立し (*J Clin Invest* 1994, *J Hypertens* 2001)、それを用いて腎垂全摘腎不全モデルを作製して、BNP が慢性腎障害に対し腎保護的に働く可能性を示した (*J Am Soc Nephrol* 2000)。今回、抗糸球体基底膜抗体をマウスに投与して進行性の増殖性腎炎を発症させたところ、野生型では高度の蛋白尿 (基礎値の 21 倍) および 12 週後には著しい糸球体・間質の傷害を呈したが、BNP-Tg ではほとんど無処置群と同程度であり、ナトリウム利尿ペプチドが免疫学的機序による腎障害の進行に対して保護的に働くことを証明した (*J Am Soc Nephrol* 2001)。このモデルにおいて、腎での TGF- β 、MCP-1 および ERK/MAP キナーゼの亢進が明らかに抑制されており、これらの機序が BNP-Tg での腎保護作用に関与すると考えられた。

2. 腎間質線維化モデルにおける検討

腎間質線維化は、種々の慢性腎疾患の final common pathway として重要であるが、一側尿管結紮による腎間質線維化モデルを作製して BNP-Tg での変化を検討したところ、過剰の BNP が線維化に対し抑制的に働く成績を得た。この機序を解明するために、FITC-dextran および Laser Doppler imaging を用いた腎髄質の尿細管周囲毛細血管 (PTC) 血流の検討、PECAM-1 染色による血管内皮細胞の解析を行い、BNP-Tg において線維化進行の際に PTC 血流が有意に改善・保持されることが腎保護作用に関与することを見出した。この際内皮細胞数は変化しないが、内皮由来因子の活性化を含めた機序が関与する可能性も考えられ、現在さらに検討を進めている。

3. 糖尿病モデルにおける検討

1型糖尿病モデルとして BNP-Tg を用いて streptozotocin 糖尿病モデルを作製し、腎機能および組織学的検討を行った。対照にて糖尿病発症4週後より顕著となった蛋白尿は BNP-Tg で16週の経過を通じ有意に (~50%) 抑制され、また16週後の腎組織像では糸球体腫大・メサンギウム基質増加の明らかな改善、糸球体における TGF- β 、collagen IV 発現の正常化を認めた。この機序として、培養メサンギウム細胞を用いて高糖下および PKC 刺激時の ERK/MAP キナーゼの活性化を検討し、BNP 添加が完全にそれらを抑制することを見出した。さらに2型糖尿病モデルにおける作用の有無とともに、臨床応用の可能性について予備的検討を行っている。

4. 培養細胞を用いた腎保護作用の機序の検討

これら腎障害モデルにおいて、アンジオテンシン II (AII) は炎症惹起性および腎硬化・線維化促進・細胞傷害性に働くと考えられる。ナトリウム利尿ペプチドによる腎保護作用の細胞内機序を明らかにするため、培養メサンギウム細胞を用いて AII による ERK/MAP キナーゼ活性化とその後の MCP-1、TGF- β 発現、それらの下流にある connective tissue growth factor や fibronectin 等の細胞外基質関連遺伝子の発現を解析した。ナトリウム利尿ペプチドおよびその second messenger である cyclic GMP の添加はいずれの因子に対しても強力な抑制作用を示し、これら複数の作用点における経路の抑制が作用して腎保護効果に関与すると考えられた (*J Am Soc Nephrol* 2001)。

研究発表

(1) 英文原著

1. T. Suganami, M. Mukoyama, A. Sugawara, K. Mori, T. Nagae, M. Kasahara, K. Yahata, H. Makino, Y. Fujinaga, Y. Ogawa, I. Tanaka and K. Nakao.
Overexpression of brain natriuretic peptide in mice ameliorates immune-mediated renal injury.
J. Am. Soc. Nephrol. **12** (12): 2652-2663, 2001.
2. M. Nakagawa, I. Tanaka, M. Mukoyama, S. Suga, Y. Ogawa, N. Tamura, R. Ishibashi, M. Goto, O. Nakagawa, A. Sugawara and K. Nakao.
Monoclonal antibody against brain natriuretic peptide and characterization of brain natriuretic peptide-transgenic mice.
J. Hypertens. **19** (3): 475-483, 2001.
3. T. Suganami, I. Tanaka, M. Mukoyama, M. Kotani, S. Muro, K. Mori, M. Goto, R. Ishibashi, M. Kasahara, K. Yahata, H. Makino, A. Sugawara and K. Nakao.
Altered growth response to prostaglandin E2 and its receptor signaling in mesangial cells from stroke-prone spontaneously hypertensive rats.
J. Hypertens. **19** (6): 1095-1103, 2001.
4. T. Saito, H. Itoh, T.-H. Chun, Y. Fukunaga, J. Yamashita, K. Doi, T. Tanaka, M. Inoue, K. Masatsugu, N. Sawada, S. Sakaguchi, H. Arai, M. Mukoyama, K. Tojo, T. Hosoya and K. Nakao.
Coordinate regulation of endothelin and adrenomedullin secretion by oxidative stress in endothelial cells.
Am. J. Physiol. **281** (3): H1364-H1371, 2001.
5. H. Yokoi, A. Sugawara, M. Mukoyama, K. Mori, H. Makino, T. Suganami, T. Nagae, K. Yahata, Y. Fujinaga, I. Tanaka and K. Nakao.
Role of connective tissue growth factor in profibrotic action of transforming growth factor- β : A potential target for preventing renal fibrosis.
Am. J. Kidney Dis. **38** (4) [Suppl. 1]: S134-S138, 2001.
6. M. Mukoyama, A. Sugawara, T. Nagae, K. Mori, H. Murabe, H. Itoh, I. Tanaka and K. Nakao.
Role of adrenomedullin and its receptor system in renal pathophysiology.
Peptides **22** (11): 1925-1931, 2001.
7. M. Goto, M. Mukoyama, A. Sugawara, T. Suganami, M. Kasahara, K. Yahata, H. Makino, S. Suga, I. Tanaka and K. Nakao.
Expression and role of angiotensin II type 2 receptor in the kidney and mesangial cells of spontaneously hypertensive rats.
Hypertens. Res. **25** (1): 125-133, 2002.
8. H. Yokoi, M. Mukoyama, A. Sugawara, K. Mori, T. Nagae, H. Makino, T. Suganami, K. Yahata, Y. Fujinaga, I. Tanaka and K. Nakao.
Role of connective tissue growth factor in fibronectin expression and tubulointerstitial fibrosis.
Am. J. Physiol. Renal Physiol. **282** (5): F933-F942, 2002.

9. H. Makino, I. Tanaka, M. Mukoyama, A. Sugawara, K. Mori, S. Muro, T. Suganami, K. Yahata, R. Ishibashi, S. Ohuchida, T. Maruyama, S. Narumiya and K. Nakao.
Prevention of diabetic nephropathy in rats by prostaglandin E receptor EP1-selective antagonist.
J. Am. Soc. Nephrol. **13** (7): 1757-1765, 2002.
10. A. Yoshimoto, K. Mori, A. Sugawara, M. Mukoyama, K. Yahata, T. Suganami, K. Takaya, H. Hosoda, M. Kojima, K. Kangawa and K. Nakao.
Plasma ghrelin and desacyl ghrelin concentrations in renal failure.
J. Am. Soc. Nephrol. **13** (11): 2748-2752, 2002.
11. H. Makino, M. Mukoyama, A. Sugawara, K. Mori, T. Suganami, K. Yahata, Y. Fujinaga, H. Yokoi, I. Tanaka and K. Nakao.
Roles of connective tissue growth factor and prostanoids in early streptozotocin-induced diabetic rat kidney: The effect of aspirin treatment.
Clin. Exp. Nephrol. **7** (1): 33-40, 2003.
12. K. Sawai, K. Mori, M. Mukoyama, A. Sugawara, T. Suganami, M. Koshikawa, K. Yahata, H. Makino, T. Nagae, Y. Fujinaga, H. Yokoi, T. Yoshioka, A. Yoshimoto, I. Tanaka and K. Nakao.
Angiogenic protein Cyr61 is expressed by podocytes in anti-Thy-1 glomerulonephritis.
J. Am. Soc. Nephrol. **14** (5): 1154-1163, 2003.

(2) 邦文原著

1. 向山政志、笠原正登、菅波孝祥、森 潔、菅原 照、中尾一和
Na 利尿ペプチドの腎保護作用とその機序：遺伝子操作マウスを用いた検討
心臓 **33** (1): 51-54, 2001.
2. 向山政志、菅原 照、永江徹也、森 潔、中尾一和
アドレノメデュリン受容体と心血管系および腎疾患
循環器科 **49** (6): 485-490, 2001.
3. 横井秀基、向山政志、菅原 照、森 潔、永江徹也、槇野久士、菅波孝祥、
八幡兼成、越川真男、藤永有理子、澤井一智、吉本明弘、吉岡徹朗、田中一成、
中尾一和
Connective tissue growth factor (CTGF) の腎間質線維化における意義
Therapeutic Research **23** (5): 819-823, 2002.
4. 菅波孝祥、向山政志、菅原 照、森 潔、永江徹也、槇野久士、笠原正登、
八幡兼成、藤永有理子、小川佳宏、田中一成、中尾一和
ナトリウム利尿ペプチドの抗糸球体基底膜抗体腎炎（抗 GBM 腎炎）における保
護作用
Pharma Medica **20** (6): 126-128, 2002.

5. 横井秀基、向山政志、中尾一和
Connective tissue growth factor (CTGF) の線維化における役割
医学のあゆみ 201 (12): 911-913, 2002.
6. 菅波孝祥、向山政志、森 潔、槇野久士、永江徹也、八幡兼成、藤永有理子、
菅原 照、中尾一和
高血圧性腎硬化症および糖尿病性腎症進展におけるプロスタグランジン E 受容体
サブタイプの意義
血圧 10 (3): 277-280, 2003.
7. 横井秀基、向山政志、菅波孝祥、中尾一和
Connective tissue growth factor (CTGF) と線維化
臨床免疫 39 (4): 403-408, 2003.

(3) 邦文書籍

1. 向山政志、菅原 照、森 潔、槇野久士、田中一成、中尾一和
糖尿病性腎症におけるプロスタノイドの役割
酒井 紀 監修、佐中 孜、塩之入 洋、山口 裕、山田 明 編：
腎と透析（増刊号） 糖尿病性腎症のすべて
東京医学社，東京：186-191, 2001.

(4) 学会発表

2nd International Congress on Uremia Research (Nara) 4.26-28, 2001.

1. H. Yokoi, A. Sugawara, M. Mukoyama, et al.: Role of connective tissue growth factor in profibrotic action of transforming growth factor- β : a potential target for preventing renal fibrosis.
2. H. Makino, A. Sugawara, M. Mukoyama, et al.: Roles of connective tissue growth factor and prostanoids in early diabetic nephropathy in rats.
3. K. Yahata, K. Mori, M. Mukoyama, et al.: Loss of klotho gene expression as a possible cause of malnutrition and hyperphosphatemia in uremic condition.

34th Annual Meeting of the American Society of Nephrology (San Francisco, USA) 10.14-17, 2001.

1. T. Suganami, K. Mori, M. Mukoyama, et al.: Prostaglandin E receptor EP1 subtype-selective antagonist attenuates renal injury in rat model of malignant hypertension.
2. A. Yoshimoto, K. Mori, A. Sugawara, et al.: Increased plasma ghrelin concentrations in renal failure.
3. M. Koshikawa, K. Mori, A. Sugawara, et al.: Role of mitogen-activated protein kinases and connective tissue growth factor in transforming growth factor- β -induced fibronectin expression in podocytes.
4. K. Sawai, K. Mori, M. Mukoyama, et al.: Cyr61 is a podocyte-specific gene upregulated in anti-Thy-1 glomerulonephritis and induced by TGF- β .
5. H. Yokoi, M. Mukoyama, A. Sugawara, et al.: Role of connective tissue growth factor in TGF- β -induced fibronectin expression through the JNK pathway and in tubulointerstitial fibrosis.
6. K. Yahata, K. Mori, M. Mukoyama, et al.: Disruption of klotho gene leads to abnormal bone and energy homeostasis.
7. H. Makino, M. Mukoyama, A. Sugawara, et al.: Overexpression of brain natriuretic peptide in mice ameliorates diabetic nephropathy.

12th International Vascular Biology Meeting (Karuizawa) 5.12-16, 2002.

1. M. Mukoyama, T. Suganami, K. Mori, et al.: Amelioration of renal injury in rat model of malignant hypertension by selective blockade of prostaglandin E receptor EP1 subtype.

26th International Congress of Internal Medicine (Kyoto) 5.26-30, 2002.

1. M. Mukoyama, A. Sugawara, K. Mori, et al.: Ameliorated renal injury in transgenic mice overproducing brain natriuretic peptide with nephropathy.

84th Annual Meeting of The Endocrine Society (San Francisco, USA) 6.19-22, 2002.

1. H. Makino, M. Mukoyama, A. Sugawara, et al.: Oversecretion of brain natriuretic peptide in transgenic mice ameliorates diabetic nephropathy.

19th Meeting of the International Society of Hypertension (Prague, Czech) 6.23-27, 2002.

1. T. Suganami, I. Tanaka, M. Mukoyama, et al.: Pathophysiological role of prostaglandin E receptor EP1 subtype during the progression of renal injury in rat model of malignant hypertension.
2. A. Yoshimoto, K. Mori, M. Mukoyama, et al.: Role of circulating ghrelin in renal failure.

4th International Symposium on Podocyte Biology (Niigata) 9.19-20, 2002.

1. K. Sawai, K. Mori, M. Mukoyama, et al.: Podocytes express angiogenic factor cysteine-rich protein 61 (Cyr61, CCN1) in anti-Thy-1 glomerulonephritis.
2. M. Koshikawa, K. Mori, A. Sugawara, et al.: Role of mitogen-activated protein kinases and connective tissue growth factor in transforming growth factor- β -induced fibronectin expression in podocytes.

35th Annual Meeting of the American Society of Nephrology (Philadelphia, USA) 11.1-4, 2002.

1. T. Nagae, M. Mukoyama, K. Mori, et al.: Role of adrenomedullin and its receptor system in rat obstructive nephropathy and tubulointerstitial fibrosis.
2. T. Suganami, M. Mukoyama, K. Mori, et al.: Role of prostaglandin E receptor EP1 activation in the progression of diabetic nephropathy and hypertensive renal injury in rats.
3. K. Yahata, K. Mori, M. Mukoyama, et al.: Abnormal calcium and phosphorus handling and renal stanniocalcin expression in *klotho*-deficient mice.
4. M. Koshikawa, K. Mori, M. Mukoyama, et al.: Role of connective tissue growth factor and its intracellular signaling in podocytes.
5. H. Yokoi, M. Mukoyama, A. Sugawara, et al.: TGF- β 1 induces fibronectin expression in renal fibroblasts through connective tissue growth factor (CTGF)-JNK dependent pathway.
6. H. Makino, M. Mukoyama, A. Sugawara, et al.: Chronic excess of brain natriuretic peptide in transgenic mice ameliorates diabetic nephropathy by inhibiting high glucose-induced TGF- β expression.
7. A. Yoshimoto, M. Mukoyama, T. Suganami, et al.: Protective effects of brain natriuretic peptide on peritubular capillary and interstitial fibrosis in obstructive nephropathy.
8. M. Koshikawa, K. Mori, M. Mukoyama, et al.: Role of mitogen-activated protein kinases in extracellular matrix production in adriamycin nephropathy and cultured podocytes.
9. K. Sawai, K. Mori, M. Mukoyama, et al.: Gene expression profile of podocytes involved in glomerular regeneration of anti-Thy-1 glomerulonephritis.
10. K. Sawai, K. Mori, M. Mukoyama, et al.: The angiogenic factor cysteine-rich protein 61 (CYR61, CCN1) is overexpressed in podocytes during glomerular regeneration.

3rd International Symposium on Adrenomedullin and PAMP (Osaka) 11.21, 2002.

1. M. Mukoyama, H. Itoh, K. Nakao: Role of adrenomedullin and its receptor system in vascular and renal remodeling.