

9336 ナトリウム利尿ペプチドファミリーの生理的並びに臨床的意義に関する研究

助成研究者:中尾 一和(京都大学 医学部)

共同研究者:伊藤 裕, 吉政 孝明(京都大学)

荒井 宏司, 菅 真一(京都大学)

小川 佳宏(京都大学)

ナトリウム利尿ペプチドファミリーはANP, BNP, CNPの3種類のリガンドから構成されるが、我々はANP, BNPがそれぞれ心房及び心室より分泌される心臓ホルモンであることを明らかにした。更に我々はそれまで神経ペプチドと考えられていたCNPが血管内皮細胞において合成分泌されていることを発見し、CNPが血管壁においてオートクリン/パラクリン因子として作用していることを提唱した。本研究は、ナトリウム利尿ペプチドファミリーの食塩代謝における意義を分子生物学的手法を用い明らかにし、更に食塩バランス異常に対するナトリウム利尿ペプチドファミリーの臨床応用を目指すものである。今回、ナトリウム利尿ペプチドファミリーの食塩代謝及び血圧維持における慢性調節作用を明らかにするためマウスBNP遺伝子及びcDNAをクローニングし、BNP遺伝子過剰発現トランスジェニックマウスを開発した。マウスBNP遺伝子は3つのエクソンと2つのイントロンより構成されており、翻訳開始点の約100塩基上流に典型的なTATAAA配列を認めた。このマウスBNP遺伝子を肝臓で発現の認められるserum amyloid Pのプロモーターに連結し、BNP遺伝子導入を行いBNP遺伝子を15~50コピー有するF₁トランスジェニックマウスを得た。BNPトランスジェニックマウスの肝臓では心室の約10倍に達するBNP mRNA発現を認め、血中BNP濃度は対照マウスの少なくとも10~100倍の上昇を認めた。BNPトランスジェニックマウスの血圧は106±1mmHgで、対照マウスの126±2mmHgより有意に低く、これらの結果よりBNPが慢性的に血圧調節に関与していることが明らかとなり、ナトリウム利尿ペプチドの長期投与の有効性が証明された。現在更にこのトランスジェニックマウスを用い、体液量調節、食塩代謝におけるナトリウム利尿ペプチドの意義について検討中である。我々はまた、ヒトBNP, CNP遺伝子のクローニングに成功し、ヒトBNP遺伝子5'隣接領域1.8kbをクロランフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)遺伝子に連結し、ラット新生仔培養心室細胞にトランスフェクションしその活性を検討することで、このヒトBNP遺伝子5'隣接領域が心室細胞において強力なプロモーター活性を有することを明らかにした。現在、食塩負荷時におけるナトリウム利尿ペプチド遺伝子発現亢進の分子機構について更に詳細に検討を続けている。

9336 ナトリウム利尿ペプチドファミリーの生理的並びに臨床的意義に関する研究

助成研究者:中尾 一和(京都大学 医学部)

共同研究者:伊藤 裕, 吉政 孝明(京都大学)

荒井 宏司, 菅 真一(京都大学)

小川 佳宏(京都大学)

【研究目的】

1984年、ヒト、ラット心臓の心房組織より強力な利尿・ナトリウム利尿・血管平滑筋弛緩作用を有する心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)が単離同定された後、1985年我々はいち早くこのANPが脳にも存在し、食塩嗜好性の抑制を含む中枢性の水電解質・血圧調節作用を有する神経ペプチドとしても作用している事を世界に先駆け証明した。この発見が端緒となり、1988年にはブタ脳より脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)、1990年には同じくブタ脳よりCタイプナトリウム利尿ペプチド(CNP)が発見され、体液量血圧調節に関与する心臓ホルモン及び神経ペプチドとしてのナトリウム利尿ペプチドファミリーの生理的、病態生理的意義が益々注目されるようになった。

我々は、ナトリウム利尿ペプチドファミリーの病態生理的意義の解明を目指し、分子生物学的手法を用いて各ナトリウム利尿ペプチド及びナトリウム利尿ペプチド受容体(少なくともANP-A, ANP-B及びC受容体の3種類が存在する)の体内各臓器における遺伝子発現を検討した。更に、心不全や高血圧症といった食塩負荷状態の認められる疾患において、心臓におけるANP及びBNP遺伝子発現が著しく亢進していることも証明した。また、我々は、ナトリウム利尿ペプチドに対する種々のモノクローナル抗体を調整し、これらを用いたラジオイムノアッセイ系及び中和実験系を確立し、内因性のナトリウム利尿ペプチドが上述した種々の病的状態において塩分排泄調節に実際に関与している事を明らかにした。さらにANPやBNPを心不全患者に投与する事で体内での異常な塩分貯留が是正され病態改善効果をもたらす事も報告し、ナトリウム利尿ペプチドの臨床応用面でも世界をリードしてきた。

本研究は、1984年以来研究を続けてきた心臓ホルモン及び神経ペプチドとしてのナトリウム利尿ペプチドファミリーの食塩摂取(食塩嗜好性を含む)や食塩代謝における生理的並びに臨床的意義について、主に分子生物学的手法を用いて検討するものである。

平成4年度は、本研究助成金により、以下の実験成果を得た。

1) BNPトランスジェニックマウスの開発：我々は、分子生物学的手法を用いてナトリウム利尿ペプチドの体液量・血圧調節における生理的、臨床的意義を明らかにするため、BNPトランスジェニックマウスの開発に向けて、マウスでのBNP遺伝子のクローニングを試みその構造決定に成功した。その結果、マウスBNP遺伝子は3つのエクソンと2つのイントロンより構成され、ラットpreproBNPと78%の相同性を認めた。更にこのクローニングに成功したマウスBNP遺伝子を肝臓で発現のみられるSerum amyloid Pのプロモーターに結合し発現ベクターを作成しマウス卵母細胞に注入する事で、BNP導入遺伝子を数コピーより最高100コピーまでのコピー数を有するF₀世代マウスを得た。

2) ナトリウム利尿ペプチドファミリー (ANP, BNP, CNP) の遺伝子発現調節の解析：ナトリウム利尿ペプチド遺伝子発現調節機構を分子レベルで解明するため、5'隣接領域を含むヒトBNP遺伝子並びにヒトCNP遺伝子構造の決定を行った。その結果ヒトBNP遺伝子5'隣接領域1.8kbには、GATAAA配列、AP-1結合部位、CTrich領域等種々の遺伝子発現調節領域を認めた。一方ヒトCNP遺伝子は少なくとも2つのエクソン及び1つのイントロンよりなる事が明らかとなった。更に、その5'隣接領域には、ANP及びBNP遺伝子5'隣接領域には認められなかったinverted CCAATボックス、GCボックス、cAMP応答因子配列等を認め、ナトリウム利尿ペプチドがそれぞれ異なった遺伝子発現調節を受ける可能性が示唆された。

本年度は、上記実験結果に基づき、更に継代可能なBNPトランスジェニックマウスの系統確立と、同動物におけるBNP産生量の評価、更に食塩嗜好性、食塩排泄能、血圧調節能を検討し、ナトリウム利尿ペプチドの水電解質ホメオスタシス及び血圧維持における生理的・病態生理的意義の解明を目指した。更に、食塩摂取亢進及び過剰な食塩の体内貯留時における、心臓でのナトリウム利尿ペプチド遺伝子発現の代償的亢進の分子機構を明らかにするため、我々がクローニングに成功したヒトBNP遺伝子を用いて、培養心室筋細胞における遺伝子転写調節機構を解析した。

【研究方法及び結果】

1. ナトリウム利尿ペプチドファミリー遺伝子過剰発現動物の系統確立とその解析：

食塩摂取（食塩嗜好性）や食塩代謝におけるナトリウム利尿ペプチドファミリーの生理的意義や臨床応用を検討するためには、ナトリウム利尿ペプチドファミリーの過剰産生動物や欠損動物の開発は極めて有用な手段になる。我々は、本研究においてナトリウム利尿ペプチドファミリー遺伝子を過剰発現するトランスジェニックマウスの開発に成功し、その解析を行った。

1-1. マウスBNP導入遺伝子の構築とトランスジェニックマウスにおける導入遺伝子発現の解析

肝臓で発現するヒトserum amyloid P (SAP)のプロモーターにマウスBNP遺伝子翻訳領域

を連結し、肝臓における大量発現モデルの作製を試みた。導入遺伝子の発現を最大限にするため3'-非翻訳領域のATTTA反復配列を除去し、ウサギ β -globinのものを用いた（図1）。得られた導入遺伝子を、C57BL/6J受精卵の雄性前核にマイクロインジェクションした。その結果、導入遺伝子を15～50コピー有するF₁トランスジェニックマウス4系統を得た。

ノーザンブロット法にてトランスジェニックマウスの肝臓におけるBNP遺伝子発現を検討すると（図2）、複数の系統のトランスジェニックマウスの肝臓において明らかなBNP遺伝子発現が認められた。10週齢のBALB/cマウスの心室のBNPmRNA濃度と比較すると、約10倍に達した。肝臓の組織重量を考慮すると、トランスジェニックマウスの肝臓では、心室の100倍以上のBNPを産生しているものと考えられた。

1-2. マウスBNPに対するRIAの確立とトランスジェニックマウスにおけるBNP産生の検討

我々のクローニングの結果、マウスpreproBNPは121個のアミノ酸から成ると考えられ、疎水性に富むN端部アミノ酸は、シグナルペプチドと考えられた。更にC端部45アミノ酸の部位にラットBNPと同一のプロセシング部位が認められ、マウスBNPもラットBNPと同様、45アミノ酸から成ると考えられた。マウスBNPのC端部BNP[77-121]を合成し、ウシthyroglobulinとconjugateし、BALB/cマウスに免疫する事により、マウスBNPに対して高親和性を有する抗血清を得た。この抗血清を用いてマウスBNPに対し特異的RIAを開発した（図3）。このRIAの最小検出量は0.8fmol/tube、IC₅₀は20fmol/tubeであり極めて高感度であった。更にヒトANP、ラットANP、ヒトBNPに対する交差反応性は0.01%であり、このRIAはマウスBNPに特異的であった。このRIAを用いてマウスの肝臓内BNP濃度を測定したところ、対照マウスでは<0.16pmol/gであるのに対し、トランスジェニックマウスの肝臓では、14.2～72.8pmol/gのBNP様免疫活性が検出された。このBNP濃度はBALB/cマウスの心室内BNP濃度の約10倍に達するものであった。

1-3. トランスジェニックマウスの血中BNP濃度及びcGMP濃度の解析

トランスジェニックマウスの血中BNP濃度は、2～15pmol/mlに達し、対照マウス（<0.16pmol/ml）の約10～100倍と著しく上昇していた。血中BNP様免疫活性の分子型を高速ゲル濾過法にて検討すると大部分が45アミノ酸から成るマウスBNPであった。以上より、トランスジェニックマウスの肝臓で産生されたBNPは、45アミノ酸から成るマウスBNPにプロセシングされて血中に過剰分泌されることが明らかとなった。

ナトリウム利尿ペプチドのセカンドメッセンジャーであるcGMPの血中濃度を測定したところ、対照マウスに比較してトランスジェニックマウスでは約4倍に上昇していた。

1-4. トランスジェニックマウスの血圧の検討

トランスジェニックマウスの頸動脈よりカテーテルを挿入し、直接法にて血圧を測定した。図4にその1例を示す。このトランスジェニックマウスの平均血圧は106±1mmHgであり対照マウス（126±2mmHg）に比べ明らかに低値を示した。またこれらのマウスはいずれも熱ストレスに対して循環虚脱の状態になりやすく、体液量が減少傾向にあると考えられた。

2. ナトリウム利尿ペプチドファミリー遺伝子発現調節の解析

我々は既に、ナトリウム利尿ペプチドファミリーの体内分布、生合成、分泌調節等について検討し、体液量血圧調節に関与するホルモン及び神経ペプチドとしての意義を明らかにしてきた。すなわちANPは主として心房より、BNPは心室より生合成、分泌される心臓ホルモンである事を証明した。一方、CNPは脳、下垂体に分布する局所調節因子として作用すると考えられていたが、最近我々はこのCNPが血管内皮細胞より分泌されている事を明らかにし、CNPが血管内皮由来弛緩因子としても作用する可能性を明らかにしてきた。このようにナトリウム利尿ペプチドファミリーには組織特異的な遺伝子発現機構が存在する。我々は本研究において、食塩摂取によるナトリウム利尿ペプチドファミリー遺伝子発現亢進の分子機構の解明を目指し、昨年度の本研究により我々がその構造決定に成功したヒトBNP遺伝子の5'隣接領域約1.8kbを用い、その遺伝子転写機構について検討した。すなわちヒトBNP遺伝子5'隣接領域の5'端より順次欠失したDNA断片をchloramphenicol acetyltransferase (CAT)レポーター遺伝子に連結したfusion plasmidを構築し、培養新生仔ラット心室筋細胞にトランスフェクションし、その転写活性を検討した(図5)。その結果、ヒトBNP5'隣接領域1.8kb断片は培養心室筋細胞において高い転写活性を示した。更に、CT rich領域を含む-1288~-1095の約200bpを欠失するとその転写活性は3分の1に低下し、この部位が心室筋細胞における転写活性調節において重要な部位であることが明らかとなった。

【考察及び今後の課題】

1. これまで薬理学的手法を用いた種々の研究により、ナトリウム利尿ペプチドファミリーの食塩摂取及び食塩排泄における急性効果とその意義が指摘されてきた。しかしながら従来のアプローチでは、ナトリウム利尿ペプチドの、慢性状態における生理作用の検討は不可能であった。今回分子生物学的手法を用い、慢性的なナトリウム利尿ペプチド遺伝子過剰発現状態をin vivoで作出し、ナトリウム利尿ペプチドの生理的、臨床的意義の解明を試みた。本研究により我々はマウスにおけるBNP遺伝子の構造決定を行い、BNPトランスジェニックマウスの系統確立に成功した。また今回我々の決定したマウスBNPのアミノ酸構造をもとにマウスBNPに対し特異的なRIAを開発し、BNPトランスジェニックマウスでのBNP産生量、血中濃度を評価し得た。その結果、BNPトランスジェニックマウス肝臓において心臓におけるBNP産生量の100倍以上のBNP合成が認められ、更に血中BNP濃度も同様に対照マウスの10~100倍の上昇を示した。更に、この慢性的に生合成・分泌の亢進したBNPにより、実際にナトリウム利尿ペプチド受容体である膜型グアニル酸シクラーゼが活性化されること、及びその結果血圧の低下が認められることが明らかとなった。この血圧低下の機序は明らかではないが、血中cGMP濃度の上昇が認められることより、少なくとも一部はBNPが血管壁の膜型グアニル酸シクラーゼを直接活性化し、血管の弛緩を惹起するものと推定された。以上の結果より、BNPの慢性状態における血圧調節作用が証明された。更にBNPの降圧

薬としての長期投与の有用性も示唆された。このマウスは、BNPの生理的・病態生理的意義の解明に極めて有用なモデルであると考えられ、今後この動物を用いて食塩嗜好性、食塩排泄能を検討し、ナトリウム利尿ペプチドの水電解質ホメオスターシス及び血圧維持における意義を明らかにしたいと考えている。

2. 本研究により、既に明らかにされているANPの遺伝子構造に加えて、ヒトのBNP, CNPの5'隣接領域を含む遺伝子構造が明らかになった。我々は、ANP, BNP, CNPが心臓、脳あるいは血管等体内各組織において異なる遺伝子発現調節を受けていること、更に、食塩摂取亢進及び過剰な食塩の体内貯留時に、心臓におけるナトリウム利尿ペプチド遺伝子発現の代償亢進が起こることを報告してきた。今回更に、得られたヒトBNP遺伝子5'隣接領域を用いて、ラット培養新生仔心室筋細胞においてその転写調節機構を検討した。その結果、我々のクローニングしたBNP遺伝子5'隣接領域が心室筋において強力なプロモーター活性を有すること及びその発現に重要なDNA領域をある程度同定した。今後更にfoot printing assay, gel shift assay及びSouth-Western analysis等により、転写調節DNA領域の確定とその活性化に關与するトランス因子のクローニングを計画中である。これらの検討を通じて食塩バランスの維持におけるナトリウム利尿ペプチドファミリー遺伝子発現調節機構を分子レベルで解明し、その臨床的意義を明らかにしていきたい。

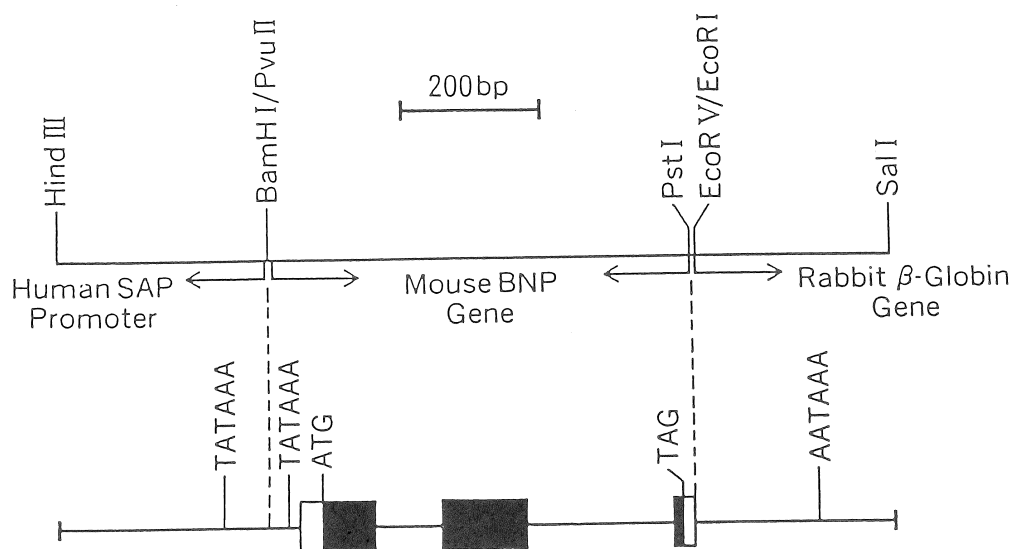


FIGURE 1: Schematic representation of the human SAP/mouse BNP fusion gene construct for BNP transgenic mice

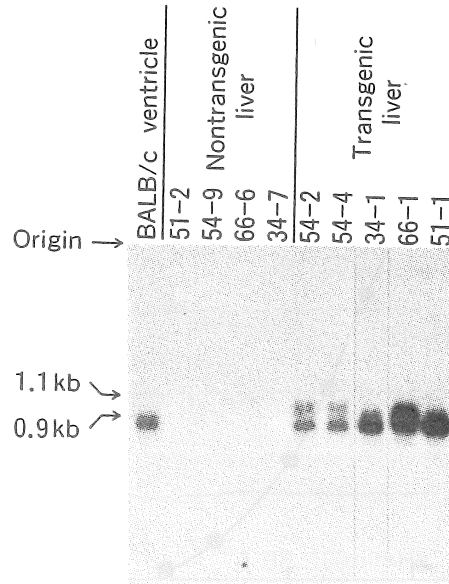


FIGURE 2: Northern blot analysis of BNP mRNA expression in BNP transgenic mice

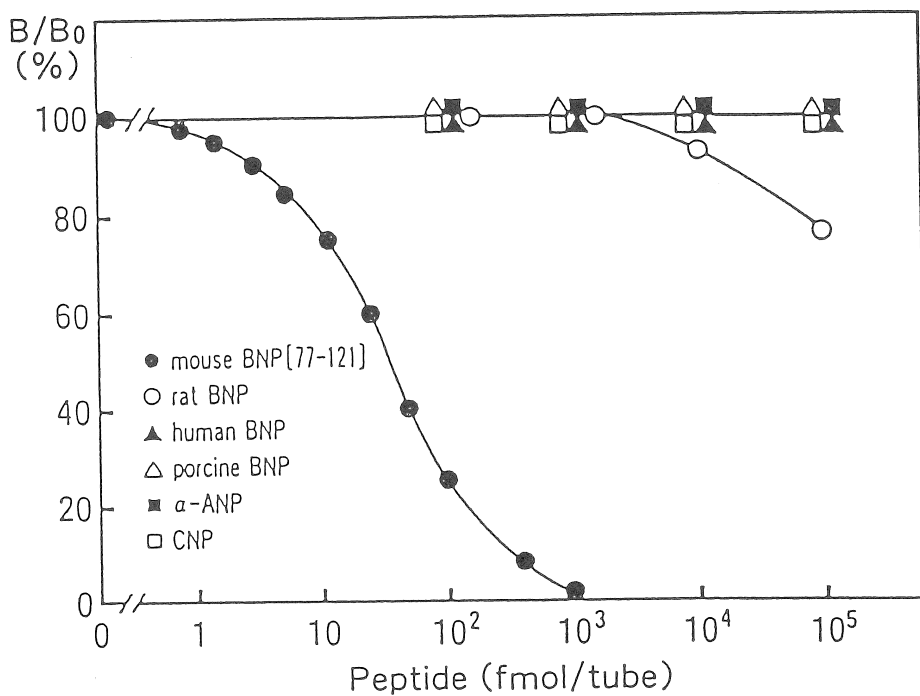
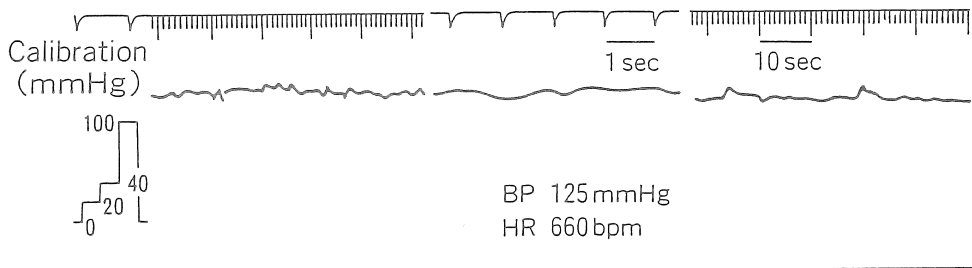


FIGURE 3: Standard curve of mouse BNP and cross reactivity profiles of various natriuretic peptides in the radioimmunoassay for mouse BNP

(A) Nontransgenic



(B) Transgenic

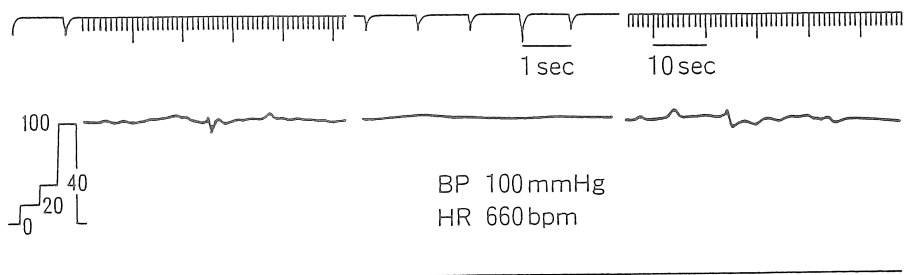


FIGURE 4: Recording chart of blood pressure by direct measurement in control and BNP transgenic mice

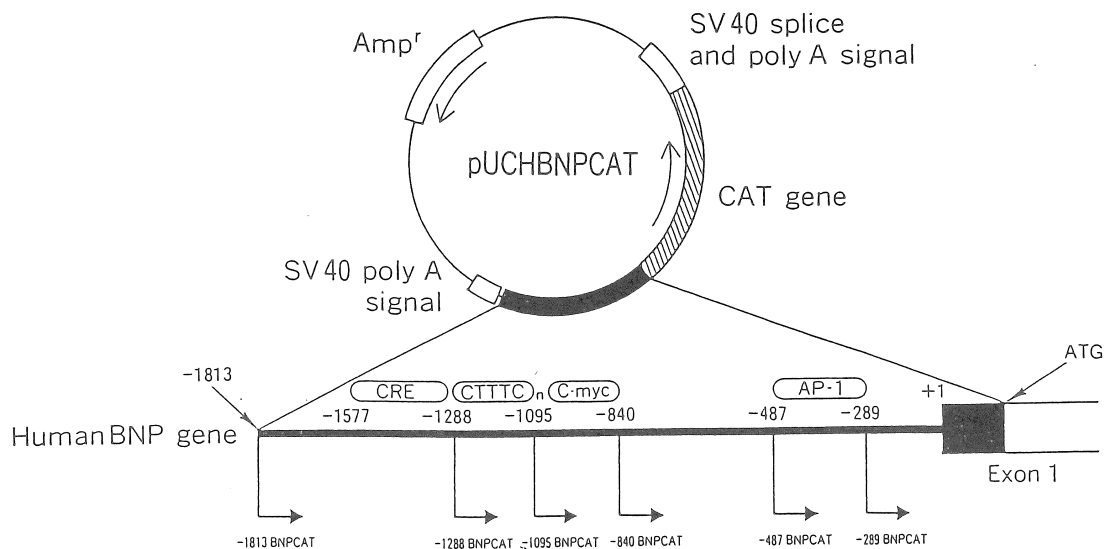


FIGURE 5: Diagrammatic representation of the BNP promoter/CAT fusion plasmid containing 5'-flanking region of human BNP gene with various lengths.

【文献】 <英文> 93年度

1. Y. Ogawa, H. Itoh, N. Tamura, S. Suga, T. Yoshimasa, M. Uehira, S. Matsuda, S. Shiono, H. Nishimoto, and K. Nakao.
Molecular cloning of the complementary DNA and gene that encode mouse brain natriuretic peptide and generation of transgenic mice that overexpress the brain natriuretic peptide gene.
J. Clin. Invest. 93: 1911-1921, 1994.
2. S. Suga, H. Itoh, Y. Komatsu, Y. Ogawa, N. Hama, T. Yoshimasa, and K. Nakao.
Cytokine-induced C-type natriuretic peptide (CNP) secretion from vascular endothelial cells. — Evidence for CNP as a novel autocrine/paracrine regulator from endothelial cells —.
Endocrinology 133: 3038-3041, 1993.
3. E. Morita, H. Yasue, M. Yoshimura, H. Ogawa, M. Jougasaki, T. Matsumura, M. Mukoyama and K. Nakao.
Increased plasma levels of brain natriuretic peptide in patients with acute myocardial infarction.
Circulation 88: 82-91, 1993.
4. G. Shirakami, K. Nakao, Y. Saito, T. Magaribuchi, M. Mukoyama, H. Arai, K. Hosoda, S. Suga, K. Mori and H. Imura.
Low doses of endothelin-1 inhibit atrial natriuretic peptide secretion.
Endocrinology 132: 1905-1912, 1993.
5. K. Hasegawa, H. Fujiwara, K. Doyama, T. Fujiwara, S. Suga, M. Mukoyama, K. Nakao, H. Imura and S. Sasayama.
Ventricular expression of brain natriuretic peptide in hypertrophic cardiomyopathy.
Circulation 88: 372-380, 1993.
6. I. Kishimoto, K. Nakao, S. Suga, K. Hosoda, T. Yoshimasa, H. Itoh and H. Imura.
Down-regulation of clearance receptor by natriuretic peptides via ANP-B receptor in vascular smooth muscle cells.
Am. J. Physiol. 265: H1373-H1379, 1993.
7. H. Itoh, N. Sagawa, M. Hasegawa, A. Okagaki, K. Inamori, Y. Ihara, T. Mori, Y. Ogawa, S. Suga, M. Mukoyama, K. Nakao and H. Imura.
Brain natriuretic peptide is present in the human amniotic fluid and is secreted from amnion cells.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 76: 907-911, 1993.
8. T. Kaneko, G. Shirakami, K. Nakao, I. Nagata, O. Nakagawa, N. Hama, S. Suga, S. Miyamoto, H. Kubo, O. Hirai, H. Kikuchi, and H. Imura.
C-type natriuretic peptide (CNP) is the major natriuretic peptide in human cerebrospinal fluid.
Brain Research 612: 104-109, 1993.
9. G. Shirakami, H. Itoh, S. Suga, Y. Komatsu, N. Hama, K. Mori, and K. Nakao.
Central action of C-type natriuretic peptide on vasopressin secretion in conscious rats.
Neuroscience Letters 159: 25-28, 1993.

10. N. Hama, H. Itoh, G. Shirakami, S. Suga, Y. Komatsu, T. Yoshimasa, I. Tanaka, K. Mori, and K. Nakao.
Detection of C-type natriuretic peptide (CNP) in human circulation and marked increase of plasma CNP level in septic shock patients.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 198: 1177-1182, 1994.
11. N. Hama, H. Itoh, S. Suga, Y. Komatsu, T. Yoshimasa, and K. Nakao.
A monoclonal antibody to C-type natriuretic peptide — Preparation and application to radioimmunoassay and neutralization experiment—.
J. Endocrinol. in press 1994.
12. H. Itoh, N. Sagawa, M. Hasegawa, A. Okagaki, K. Inamori, Y. Ihara, T. Mori, S. Suga, M. Mukoyama, G. Shirakami, K. Nakao and H. Imura.
Brain natriuretic peptide levels in the umbilical venous plasma are elevated in fetal distress.
Biology of the Neonate 64: 18-25, 1993.
13. H. Itoh, N. Sagawa, T. Mori, M. Mukoyama, K. Nakao and H. Imura.
Plasma brain natriuretic peptide level in pregnant women with pregnancy-induced hypertension.
Obstetrics & Gynecology 82: 71-77, 1993.
14. Y. Shimada, M. Imamura, T. Tobe, G. Shirakami, and K. Nakao.
The influence of thoracic duct resection on postesophagectomy hemodynamics: An analysis of changes of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide.
Recent Advances in Diseases of the Esophagus 668-672, 1993. (Springer-Verlag)
15. G. Shirakami, T. Magaribuchi, K. Shingu, S. Suga, S. Tamai, K. Nakao, and K. Mori.
Positive end-expiratory pressure ventilation decreases plasma atrial and brain natriuretic peptide levels in humans.
Anesth Analg 77: 1116-1121, 1993.
16. H. Itoh, K. Nakao and H. Imura.
Natriuretic peptide system in the brain and its implication in central cardiovascular regulation.
In Central Neural Mechanisms in Cardiovascular Regulation volume 2 edited by G. Kunos and J. Ciriello. Birkhauser Publishers, Boston pp 266-279, 1993.

<邦文> 93年度

1. 白神豪太郎、中尾一和、斉藤能彦、森 健次郎、井村裕夫
高血圧と血管内皮由来収縮因子(EDCF)
血管と内皮 vol.3 No.1: 7-15, 1993.

2. 小松弥郷、中尾一和、伊藤 裕、菅 真一、小川佳宏、井村裕夫
血管壁ナトリウム利尿ペプチド
ランセット日本語版 vol.3 No.2: 622, 1993.
3. 伊藤 裕、中尾一和
ナトリウム利尿ペプチド研究の最近の展開
Modern Physician 13: 37-42, 1993.
4. 伊藤 裕、菅 真一、小松弥郷、中尾一和
血管内皮由来ペプチド性弛緩因子としてのC型ナトリウム利尿ペプチド
— 血管壁ナトリウム利尿ペプチド系の存在
Modern Medicine 30: 364-373, 1993.
5. 菅 真一、伊藤 裕、小川佳宏、田中一成、中尾一和
ナトリウム利尿ペプチドファミリーの血中濃度測定とその臨床的意義
SRL宝函 vol.17 No.1: 37-43, 1993.
6. 伊藤 裕、菅 真一、小川佳宏、田中一成、中尾一和
ナトリウム利尿ペプチド系の分子生物学と分子薬理
日本臨床 vol.51 No.6: 140-148, 1993.
7. 河野昌雄、辻 哲男、井上 健、山内 晃、三崎敦司、植 京子、上田 章、
藤島雅代、伊賀野憲一、中尾一和、井村裕夫
ヒト血漿中Brain Natriuretic Peptide (hBNP)のImmunoradiometric Assay
核医学技術 vol.13 No.1: 1-6, 1993.
8. 伊藤 裕、中尾一和
心肥大・心不全とナトリウム利尿ペプチドファミリー
医学のあゆみ vol.165 No.10: 739-744, 1993.
9. 小川佳宏、伊藤 裕、中尾一和
ナトリウム利尿ペプチド (ANP, BNP) の臨床的意義
Medicina vol.30 No.6: 1118-1120, 1993.
10. 伊藤 裕、菅 真一、小川佳宏、小松弥郷、中尾一和
脳内ナトリウム利尿ペプチドとその受容体 — 中枢性血圧・体液調節における意義 —
神経研究の進歩 vol.37 No.3: 517-530, 1993.

11. 小松弥郷、伊藤 裕、菅 真一、小川佳宏、荒井宏司、岸本一郎、中川 修、
浜 典男、田村尚久、高屋和彦、宮本恵宏、吉政孝明、松田捷彦、池田 義、
伴 敏彦、中尾一和
ヒト血管におけるC型ナトリウム利尿ペプチド（CNP）の遺伝子発現
— 血管壁ナトリウム利尿ペプチド系の存在 —
Therapeutic Research vol.14 No.8: 9-13, 1993.
12. 荒井宏司、吉政孝明、伊藤 裕、小川佳宏、高屋和彦、田村尚久、中尾一和
血管作動性物質とその受容体の遺伝子構造 — ナトリウム利尿ペプチドと
エンドセリン —
BIOMedica vol.8 No.13: 29-33, 1993.
13. 小川佳宏、伊藤 裕、菅 真一、吉政孝明、中尾一和
心疾患におけるナトリウム利尿ペプチドおよび受容体遺伝子発現
Cardiac Practice vol.4 No.4: 41-47, 1993.
14. 小川佳宏、中尾一和
心房性ナトリウム利尿ペプチドとエンドセリン
最新内科学大系 15 : 295-302, 1993.
15. 小川佳宏、伊藤 裕、吉政孝明、荒井宏司、中尾一和
ナトリウム利尿ペプチドとエンドセリンおよびそのレセプターの分子生物学
Molecular Medicine vol.30 No.11: 1414-1424, 1993.
16. 吉政孝明、菅 真一、岸本一郎、伊藤 裕、中尾一和
ナトリウム利尿ペプチド受容体
荻原俊男、中川雅夫、日和田邦男編「Key Word 1994-95 循環系」pp174-175
先端医学社（東京）1993.
17. 吉政孝明、伊藤 裕、中尾一和
高血圧と動脈硬化 — 血管内皮由来収縮因子と弛緩因子 —
北 徹編「動脈硬化の分子医学」pp147-164
羊土社（東京）1993.
18. 中川 修、伊藤 裕、中尾一和
ナトリウム利尿ペプチドファミリー
荻原俊男、中川雅夫、日和田邦男編「Key Word 1994-95 循環系」pp176-177
先端医学社（東京）1993.

Natriuretic Peptide Family —
Physiological Significance and Clinical Implication

Kazuwa Nakao,
Hiroshi Itoh, Takaaki Yoshimasa, Hiroshi Arai, Shin-ichi Suga
Second Division, Department of Medicine
Kyoto University School of Medicine

Summary

Natriuretic peptide family, which possesses potent diuretic, natriuretic and vasorelaxing properties, is now recognized to be composed of atrial natriuretic peptide (ANP), brain natriuretic peptide (BNP) and C-type natriuretic peptide (CNP). We have elucidated that ANP and BNP are the cardiac hormone mainly secreted from the atrium, and the ventricle, respectively. We have also discovered that CNP first recognized as the neuropeptide is produced in endothelial cells and considered to be an autocrine/paracrine regulator in the vascular wall. The aim of this study is to elucidate clinical significance of natriuretic peptide family in salt handling mechanism using molecular biology technique, and seek for the clinical application of natriuretic peptide family in salt homeostasis. To elucidate the significance of natriuretic peptide family in chronic regulation of salt handling and blood pressure, we isolated mouse BNP gene and cDNA and tried to generate BNP gene over-expressing transgenic mice. Mouse BNP gene contains three exons and two introns. Typical TATAAA sequence exists about 100 base pairs upstream of the translation initiation site. By microinjecting the expression vector which contained cloned mouse BNP gene linked to human serum amyloid P promoter into mouse male pronucleus of fertilized egg, we succeed in obtaining several F1 transgenic mice with various copy numbers of BNP gene (15 ~ 50 copies). Northern blot analysis revealed that mouse BNP mRNA was abundantly expressed in the liver in the BNP transgenic mice. The BNP mRNA concentration in the liver was ten-times higher than that in the ventricle. We established the radioimmunoassay specific to mouse BNP and examined the plasma level of BNP in the transgenic mice. The plasma BNP concentration in the transgenic mice was 2-15 pmol/ml, which was at least 10 to 100 times higher than the control mice (less than 0.16 pmol/ml). Blood pressure of the transgenic mice determined by the direct measurement was 106 ± 1 mmHg, which was significantly lower than that of the control mice (126 ± 2 mmHg). These findings indicate that BNP can chronically exert biological action to modulate blood pressure and body fluid homeostasis, and support the long term effectiveness of natriuretic peptide family for clinical application. The significance of natriuretic peptide family in salt handling is now under investigation, using the transgenic mice. We also succeed in cloning human BNP and CNP genes. In 1.8 kb 5'-flanking sequences of the cloned human BNP gene were linked upstream to the bacterial chloramphenicol acetyltransferase (CAT) gene, and their promoter activities were assayed in cultured neonatal rat ventricular cardiocytes. The 1.8 kb promoter region showed a high-level CAT activity. When the CT-rich sequences (-1288 to -1196) were deleted, the high-level activity was reduced to approximately 30%. The results revealed that the 1.8 kb human BNP promoter region contains DNA sequences important for ventricular expression of the BNP gene. Further study is on-going to elucidate the molecular mechanism responsible for the up-regulation of gene expression of natriuretic peptide family in sodium loading.