

9732 発生工学的手法によるナトリウム利尿ペプチド過剰発現及び欠損マウスの開発と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意義の検討

助成研究者：中尾 一和 (京都大学 臨床病態医科学)
 共同研究者：小川 佳宏 (京都大学 臨床病態医科学)
 田村 尚久 (京都大学 臨床病態医科学)
 伊藤 裕 (京都大学 臨床病態医科学)
 斉藤 能彦 (京都大学 臨床病態医科学)

ナトリウム利尿ペプチドファミリーは心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP)、脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP)、C型ナトリウム利尿ペプチド (CNP)から構成され、血圧・水電解質代謝調節に関与すると考えられている。本研究では、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の解明と臨床応用に向けて、ナトリウム利尿ペプチド過剰発現及び欠損マウスの作製と解析を試みてきた。特に、BNPは主に心室から分泌される心臓ホルモンであり、心房から分泌されるANPと共に、膜型グアニル酸シクラーゼそのものであり、ANPとBNPの共通の受容体であるGC-Aを介して生物作用を発現すると考えられているが、ANPとGC-Aのノックアウトマウスは、それぞれ食塩感受性あるいは食塩非感受性高血圧を示し、食塩代謝においてBNPとANPが異なる意義を有する可能性が示唆される。本年度は、BNPの食塩代謝における生理的・病態生理的意義の解明を目的として、BNPノックアウトマウスを開発し表現型の解析を行った。

129/SvマウスBNP遺伝子の翻訳領域の大部分を含む第1、第2エクソンをネオマイシン耐性遺伝子で置換したターゲティングベクターを用いてBNPノックアウトマウスを作製した。BNPノックアウトマウスには外観上明らかな異常は認められなかったが、F2世代の個体の遺伝子型の分布を検討したところホモ接合体がメンデルの法則より推定される遺伝子型の分布と比較して有意に減少していた。ノーザンブロット解析にて、心房および心室におけるBNP遺伝子発現あるいはBNP濃度は、ヘテロ接合体で野生型の約50%に低下し、ホモ接合体では検出されなかった。9週齢の雄性ホモ接合体の心房におけるANP遺伝子発現は野生型と比較して有意な変化は認められなかったが、心室重量体重比の増大と心室におけるANP遺伝子発現の10倍以上の亢進が認められた。Tail-cuff法にて測定した血圧と脈拍はBNPノックアウトマウスと野生型の間に変化が認められず、8.0%高食塩食においても血圧の上昇は認められなかった。

以上、BNPノックアウトマウスの作製に成功した。BNPノックアウトマウスは、食塩代謝におけるBNPの生理的・病態生理的意義を解明する上で有用なモデル動物であると考えられた。

9732 発生工学的手法によるナトリウム利尿ペプチド過剰発現及び欠損マウスの開発と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意義の検討

助成研究者：中尾 一和 (京都大学 臨床病態医科学)
共同研究者：小川 佳宏 (京都大学 臨床病態医科学)
田村 尚久 (京都大学 臨床病態医科学)
伊藤 裕 (京都大学 臨床病態医科学)
斉藤 能彦 (京都大学 臨床病態医科学)

1. 研究目的

1984年に心臓より心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)が単離同定されたのに引き続き、1988年と1990年に相次いでブタ脳より脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)とC型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)が発見され、体液量血圧調節系としてのナトリウム利尿ペプチドファミリーの生理的・病態生理的意義が注目されるようになり、その臨床応用が期待されている。我々は既にANPとBNPがそれぞれ主に心房と心室から分泌される心臓ホルモンとして作用するのに対し、CNPは血管内皮細胞やマクロファージで産生される局所因子として作用することを証明し、ナトリウム利尿ペプチドファミリーが強力な利尿、ナトリウム利尿、降圧作用、血管平滑筋細胞増殖抑制作用により、心不全、心筋梗塞、高血圧、動脈硬化等の循環器疾患の病態形成に重要な役割を果たしている可能性を示してきた。

本研究は、発生工学的手法により、ナトリウム利尿ペプチド遺伝子過剰発現及び欠損マウスを作製し、ナトリウム利尿ペプチドファミリーの生理的・病態生理的意義の解明と臨床応用を目指すものである。

2. 研究方法

2. 1 BNP遺伝子欠損マウス（ノックアウトマウス）の開発と解析

129/SvマウスBNP遺伝子をクローニングし、得られたBNP遺伝子の第1、第2エクソンをネオマイシン耐性遺伝子に置換したターゲティングベクター（図1）を用いてキメラマウス作製後、germline transmissionを確認した。これらの生殖キメラマウスを交配して得られるヘテロ接合体から更にホモ接合体（遺伝子欠損マウス、ノックアウトマウス）の作製を試みた。心臓におけるANP、BNP遺伝子発現はマウスANP、BNP cDNAをプローブとしてノーザンブロット法にて検討した。心臓におけるANP、BNP濃度はそれぞれの特異的ラジオイムノアッセイにて測定した。心臓重量を測定し、マウスの血圧・脈拍については、Tail-cuff法にて測定した。血圧の食塩感受性を0.7%標準食塩食あるいは8.0%高食塩食にて4週間飼育後に検討した。尿量と尿中ナトリウム排泄量についても検討した。

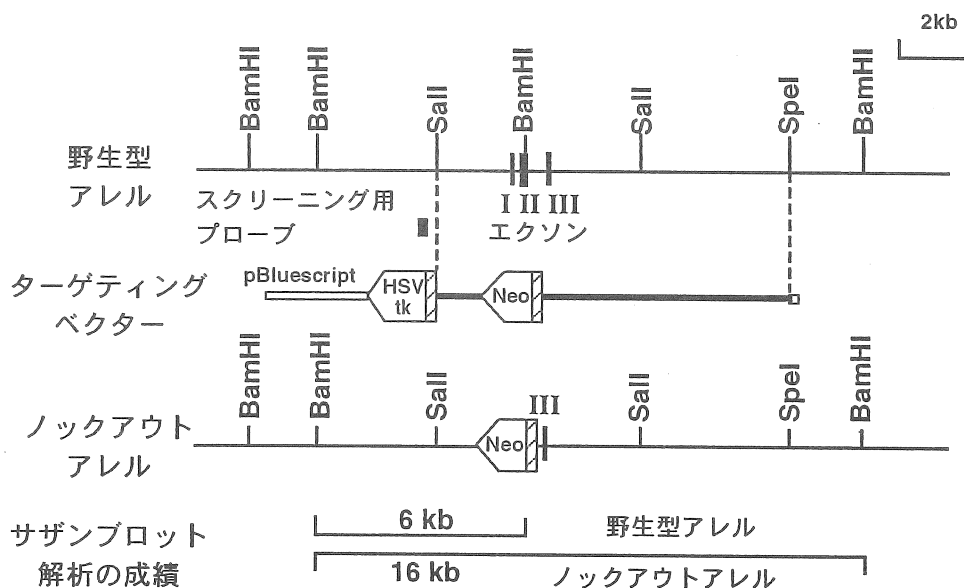


図1. マウスBNP遺伝子ターゲティングベクターの構築

3. 研究結果

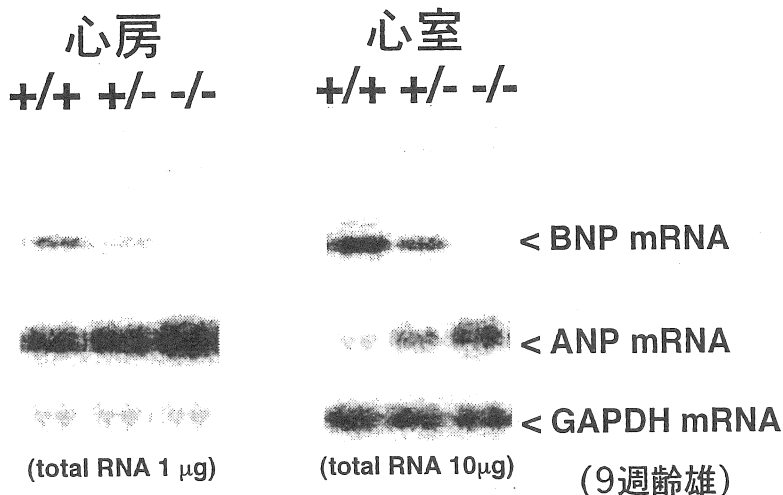
3. 1 BNP遺伝子欠損マウス（ノックアウトマウス）の開発と解析

今回作製したマウスBNP遺伝子ターゲティングベクターと相同組換えが生じた場合には、ノックアウトアレルでは翻訳領域の大部分を含む第1および第2エクソンがネオマイシン耐性遺伝子によって置換されることになる。相同組換え領域の5'-側のマウスBNP遺伝子プローブを用いたサザンブロット解析により、相同組換え体を同定し、野生型では6 kbのバンドのみが、ヘテロ接合体では16 kbと6 kbの2本のバンドが検出され、ホモ接合体では16 kbのバンドのみが検出された。昨年度に報告したBNP過剰発現トランスジェニックマウスでは、体幹、四肢、指趾の著明な伸長が認められたが、BNPノックアウトマウスでは、明らかな外観上の奇形は認められなかった。F2世代の個体の4週齢における遺伝子型の分布を検討したところ、メンデルの法則より推定されるものと比較して有意にホモ接合体が少なく（表1）、BNP遺伝子の発生期における意義が示唆された。

表1. 4週齢のBNPノックアウトマウスF2個体における遺伝子型の分布

遺伝子型	+/+	+/-	-/-	χ^2 検定
雄	23	39	16	N.S.
雌	31	41	12	p<0.05
合計	54	80	28	p<0.05

9週齢のBNPノックアウトマウスの心臓におけるANPとBNP遺伝子発現をノーザンブロット解析にて検討した（図2）。心房および心室におけるBNP遺伝子発現は、ヘテロ接合体においては野生型の約50%であり、ホモ接合体においては検出されなかった。心房におけるANP遺伝子発現は有意の変化は認められなかったが、心室では野生型と比較して、ヘテロ接合体では約5倍の、ホモ接合体では10倍以上のANP遺伝子発現の亢進が認められた。



+/+ : 野生型, +/- : ヘテロ接合体, -/- : ホモ接合体(ノックアウトマウス)

図2. BNPノックアウトマウスの心臓におけるANPおよびBNP遺伝子発現

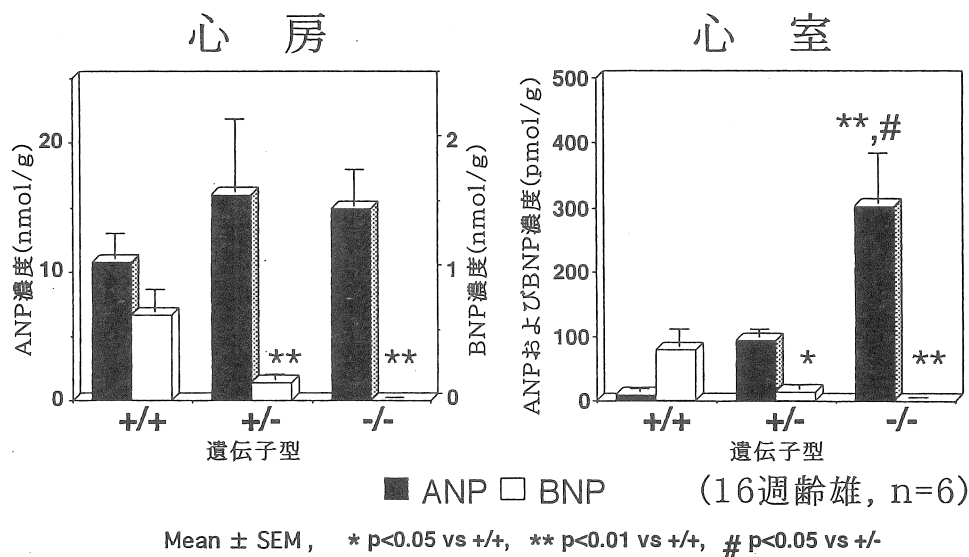


図3. BNPノックアウトマウスの心臓におけるANPおよびBNP濃度

16週齢のマウスの心臓におけるANP、BNP濃度について測定した(図3)。心房および心室のBNP濃度はヘテロ接合体では野生型の約20%であり、ホモ接合体においては測定感度以下であった。一方、ANP濃度は、心房では有意の変化は認められなかったが、心室では野生型と比較して、ヘテロ接合体では約10倍、ホモ接合体では約30倍に著しく上昇していた。6週齢雄の野生型マウスとBNPノックアウトマウスの心臓形態を比較した。BNPノックアウトマウスでは心臓

重量の変化や心肥大は認められなかった。

BNPノックアウトマウスの収縮期血圧を、0.7%標準食塩食あるいは8.0%の高食塩食において測定し、野生型およびヘテロ接合体と比較した（図4）。標準食塩食あるいは8.0%高食塩食のいずれにおいてもBNPノックアウトマウスと野生型あるいはヘテロ接合体の血圧には有意な差は認められなかった。更に、BNPノックアウトマウスにおける尿量と尿中ナトリウム排泄量を検討した（図5）。野生型とヘテロ接合体あるいはホモ接合体では0.7%標準食塩食と比較して、8.0%高食塩食では尿量、尿中ナトリウム排泄量ともに約10倍に増加していたが、遺伝子型の間には有意の差は認められなかった。

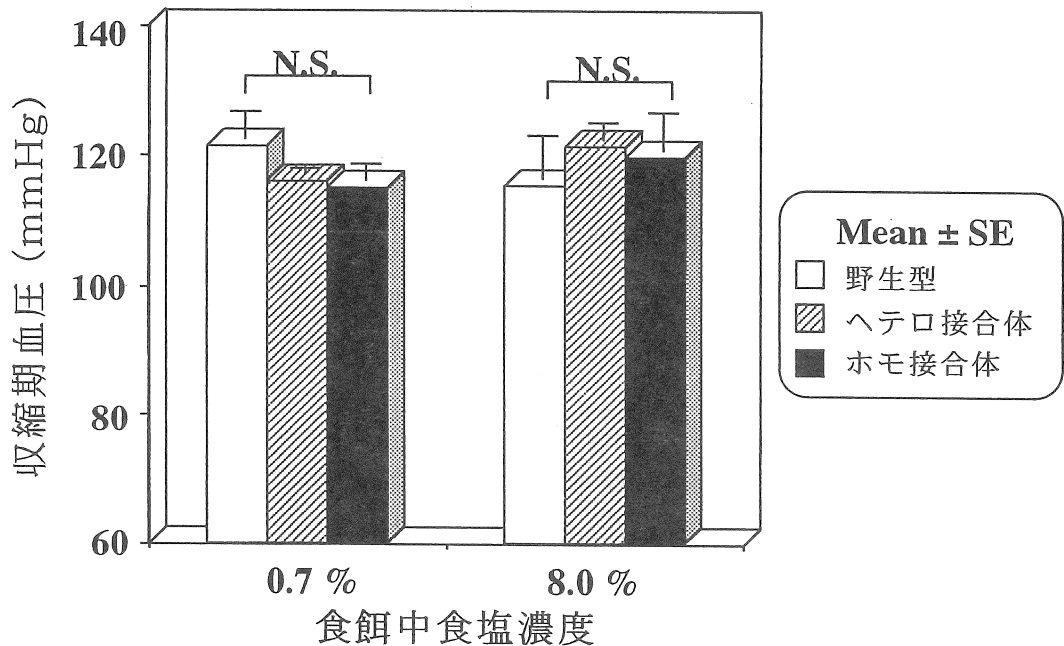
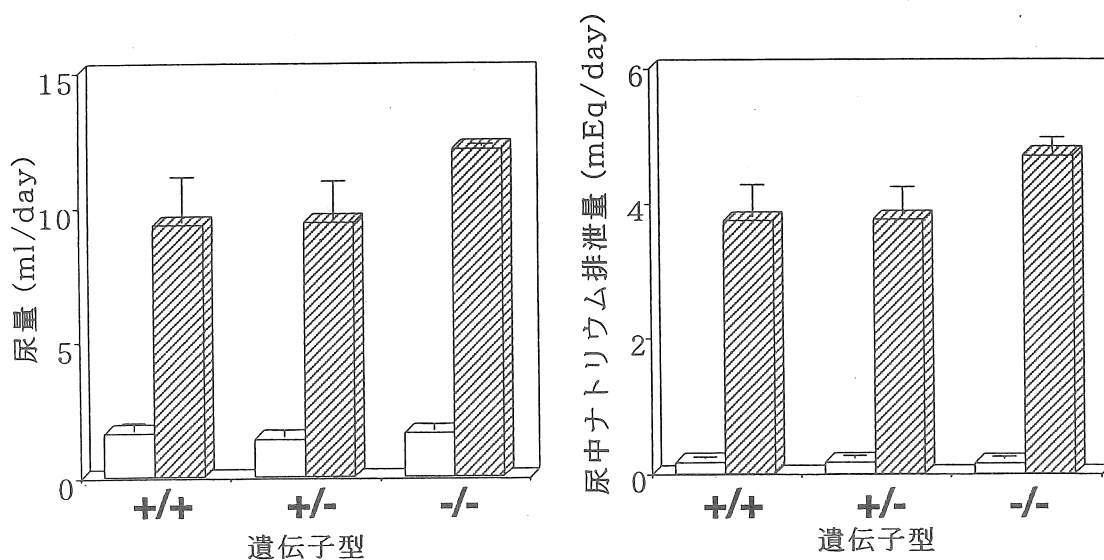


図4. 標準食塩食および高食塩食におけるBNPノックアウトマウスの収縮期血圧



□ 0.7%食塩食 ▨ 8%食塩食 (20週齢雄)

図5. 標準食塩食および高食塩食におけるBNPノックアウトマウスの尿量と尿中ナトリウム排泄量

4. 考察

BNP遺伝子欠損マウス(ノックアウトマウス)の開発に成功した。ANPノックアウトマウスでは食塩感受性の血圧上昇が、ANPとBNPの共通の受容体であるGC-Aのノックアウトマウスでは食塩非感受性の血圧上昇と心肥大が認められる。BNPノックアウトマウスにおいては有意の血圧上昇も明らかな心肥大も認められなかったが、心室における著明なANP遺伝子発現亢進とANP濃度の上昇が認められた。ANPは心肥大の分子マーカーとして広く用いられているが、ANP遺伝子の発現亢進は、心肥大の結果として生じるのではなく心肥大を生じさせるのと同じ分子機構によって引き起こされることが知られている。一方、我々は既に、エンドセリン添加による培養心室筋細胞肥大モデルにおいて、BNP遺伝子発現がANP遺伝子発現よりも急速に、*c-fos*等の*immediate early gene*と同様に早期より亢進することを報告している。また、急性心筋梗塞患者において血中ANP濃度の上昇が認められない早期から血中BNP濃度に著しい上昇が認められることを報告してきた。今回の成績は、心室におけるBNP欠損が心室負荷に対する

早期の代償機転に障害をもたらし、ANP 遺伝子発現の亢進を生じさせている可能性を示唆している。今後の検討により、心臓局所におけるBNPの意義が明らかになることが期待される。

ANPノックアウトマウスでは高食塩食においてのみ高血圧の発症に伴い心肥大が発症し、心筋線維化は報告されていないが、GC-Aのノックアウトマウスにおいては、6カ月齢以降において著明な心肥大と心筋線維化を生じるという報告と、6カ月齢までに鬱血性心不全あるいは大動脈解離を生じて死亡するという報告がある。この表現型の差はBNPの作用の有無により生じている可能性があり、BNPノックアウトマウスにおいても加齢に伴う変化を検討する必要がある。

5. 今後の課題

BNPノックアウトマウスの心室において、 β -MHCや α -skeletal actinなどの心肥大マーカーや、レニン・アンジオテンシン系の遺伝子発現の変化の有無について検討する。6カ月齢あるいは1年齢以上のBNPノックアウトマウスの心血管系の表現型の解析を進める。一方、胎生期あるいは新生仔期におけるBNPの意義を検討する。また、大動脈縮窄による心室の圧負荷モデルを用いて、心室負荷時におけるBNPの病態生理的意義を個体レベルで検討する。さらに、高血圧モデルとして広く用いられているDOCA-salt高血圧モデルをBNPノックアウトマウスを用いて作製し、ミネラルコルチコイド過剰状態における水・電解質代謝バランスの維持に対するBNPの役割を検討し、高血圧と食塩代謝におけるBNPの病態生理的意義を明らかにする。

文 献

1. M. Kotani, I. Tanaka, Y. Ogawa, T. Usui, N. Tamura, K. Mori, S. Narumiya, T. Yoshimi, and K. Nakao.
Structural organization of the human prostaglandin EP3 receptor subtype gene (PTGER3).
Genomics 40: 425-434, 1997.
2. T.-H. Chun, H. Itoh, Y. Ogawa, N. Tamura, K. Takaya, T. Igaki, J. Yamashita, K. Doi, M. Inoue, K. Masatsugu, R. Korenaga, J. Ando, and K. Nakao.
Shear stress augments expression of C-type natriuretic peptide and adrenomedullin.
Hypertension 29: 1296-1302, 1997.
3. J. Yamashita, H. Itoh, Y. Ogawa, N. Tamura, K. Takaya, T. Igaki, K. Doi, T.-H. Chun, M. Inoue, K. Masatsugu, and K. Nakao.
Opposite regulation of Gax homeobox expression by angiotensin II and C-type natriuretic peptide.
Hypertension 29: 381-387, 1997.
4. N. Watanabe, P. Madaule, T. Reid, T. Ishizaki, G. Watanabe, A. Kakizuka, Y. Saito, K. Nakao, B. M. Jockusch, and S. Narumiya.
p140mDia, a mammalian homolog of Drosophila diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin.
EMBO J. 16: 3044-3056, 1997.
5. M. Goto, M. Mukoyama, S. Suga, T. Matsumoto, M. Nakagawa, R. Ishibashi, M. Kasahara, A. Sugawara, I. Tanaka, and K. Nakao.
Growth-dependent induction of angiotensin II type 2 receptor in rat mesangial cells.
Hypertension 30: 358-362, 1997.

6. Y. Sasaki, T. Takahashi, I. Tanaka, K. Nakamura, Y. Okuno, O. Nakagawa, S. Narumiya, and K. Nakao.
Expression of prostacyclin receptor in human megakaryocytes.
Blood 90: 1039-1046, 1997.
7. J. Hiraoka, K. Hosoda, Y. Ogawa, K. Ikeda, Y. Nara, H. Masuzaki, K. Takaya, K. Nakagawa, T. Mashimo, M. Sawamura, R. J. Koletsky, Y. Yamori, and K. Nakao.
Augmentation of *obese (ob)* gene expression and leptin secretion in obese spontaneously hypertensive rats (obese SHR or Koletsky rats).
Biochem. Biophys. Res. Commun. 231: 582-585, 1997.
8. N. Matsuoka, Y. Ogawa, K. Hosoda, J. Matsuda, H. Masuzaki, T. Miyawaki, A. Azuma, K. Natsui, H. Nishimura, Y. Yoshimasa, S. Nishi, D. B. Thompson, and K. Nakao.
Human leptin receptor gene in obese Japanese subjects: evidence against either obesity-causing mutations or association of sequence variants with obesity.
Diabetologia 40: 1204-1210, 1997.
9. H. Masuzaki, Y. Ogawa, N. Sagawa, K. Hosoda, T. Matsumoto, H. Mise, H. Nishimura, Y. Yoshimasa, I. Tanaka, T. Mori, and K. Nakao.
Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans.
Nature Med. 3: 1029-1033, 1997.
10. M. Harada, H. Itoh, O. Nakagawa, Y. Ogawa, Y. Miyamoto, K. Kuwahara, E. Ogawa, T. Igaki, J. Yamashita, I. Masuda, T. Yoshimasa, I. Tanaka, Y. Saito, and K. Nakao.
Significance of ventricular myocytes and nonmyocytes interaction during cardiocyte hypertrophy: Evidence for endothelin-1 as a paracrine hypertrophic factor from cardiac nonmyocytes.
Circulation 96: 3737-3744, 1997.

11. K. Yoshimine, M. Horiuchi, S. Suzuki, K. Kobayashi, J. Md. Abdul, M. Masuda, M. Tomomura, Y. Ogawa, H. Itoh, K. Nakao, M. Osame, and T. Saheki.
Altered expression of atrial natriuretic peptide and contractile protein genes in hypertrophied ventricle of JVS mice with systemic carnitine deficiency.
J. Mol. Cell. Cardiol. 29: 571-578, 1997
12. H. Itoh, S. Suga, Y. Ogawa, Y. Komatsu, N. Tamura, T. Igaki, J. Yamashita, T. Ikeda, K. Doi, T-H Chun, M. Inoue, K. Matsuda, T. Yoshimasa, M. Ueda, T. Ban, and K. Nakao.
Significance of vascular natriuretic peptide system in vascular remodeling in humans and its application to gene therapy.
Atherosclerosis 811: 533-541, 1997.
13. G. Shirakami, H. Segawa, K. Shingu, Y. Saito, T. Magaribuchi, K. Nakao, and K. Mori.
The effects of atrial natriuretic peptide infusion on hemodynamic, renal, and hormonal responses during gastrectomy.
Anesth. Analg. 85: 907-912, 1997.
14. K. Doi, H. Itoh, T. Ikeda, K. Hosoda, Y. Ogawa, T. Igaki, J. Yamashita, T-H. Chun, M. Inoue, K. Masatsugu, K. Matsuda, K. Ohmori, and K. Nakao.
Adenovirus-mediated gene transfer of C-type natriuretic peptide causes G1 growth inhibition of cultured vascular smooth muscle cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 239: 889-894, 1997.
15. H. Michibata, M. Mukoyama, I. Tanaka, S. Suga, M. Nakagawa, R. Ishibashi, M. Goto, K. Akaji, Y. Fujiwara, Y. Kiso, and K. Nakao.
Autocrine/paracrine role of adrenomedullin in cultured endothelial and mesangial cells.
Kidney Int. 53: 979-985, 1998
16. M. Suda, Y. Ogawa, K. Tanaka, N. Tamura, A. Yasoda, T. Takigawa, M. Uehira, H. Nishimoto, H. Itoh, Y. Saito, K. Shiota, and K. Nakao.
Skeletal overgrowth in transgenic mice that overexpress brain natriuretic

peptide.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 2337-2342, 1998.

17. S. Suga, H. Itoh, Y. Komatsu, H. Ishida, T. Igaki, J. Yamashita, K. Doi, T-H. Chun, T. Yoshimasa, I. Tanaka, and K. Nakao.

Regulation of endothelial production of C-type natriuretic peptide by interaction between endothelial cells and macrophages.

Endocrinology . 95: 2337-2742, 1998.

18. A. Yasoda, Y. Ogawa, M. Suda, N. Tamura, K. Mori, Y. Sakuma, H. Chusho, K. Shiota, K. Tanaka, and K. Nakao.

Natriuretic peptide regulation of endochondral ossification: Evidence for possible roles of C-type natriuretic peptide/guanylyl cyclase-B pathway.

J. Biol. Chem. 273: 11695-11700, 1998.

Generation of Mice that Overexpress or Lack Natriuretic Peptide Family
and Its Significance in the Regulation of Salt Metabolism

Kazuwa Nakao, Yoshihiro Ogawa, Naohisa Tamura, Hiroshi Itoh, and Yoshihiko Saito
Department of Medicine and Clinical Science
Kyoto University Graduate School of Medicine

Summary

Natriuretic peptide family consists at least three structurally-related endogenous ligands, atrial natriuretic peptide (ANP), brain natriuretic peptide (BNP), and C-type natriuretic peptide (CNP). These peptides can influence body fluid homeostasis and blood pressure control by their potent natriuretic, diuretic, vasorelaxant, and vascular growth inhibitory activities. To examine the physiologic and pathophysiologic significance of natriuretic peptide family in cardiovascular regulation, we have tried to generate mice that overexpress or lack natriuretic peptide family.

To investigate the roles of BNP in the regulation of salt metabolism, we generated mice deficient in BNP and examined their cardiovascular phenotypes. A targeting vector was constructed in which the first and second exons of the 129/Sv mouse BNP gene were replaced by the neomycine resistance gene and was introduced into ES cells by the electroporation method. Homologous recombinants identified by genomic Southern blot analysis were injected into B6 mouse blastocysts, and chimeras generated were bred to B6 or 129/Sv females. Gene expressions of ANP and BNP were evaluated by Northern blot analysis. Plasma and cardiac concentrations of ANP and BNP were measured by radioimmunoassays specific for ANP and mouse BNP, respectively. Systolic blood pressure was measured by the tail-cuff method.

We obtained BNP-deficient (-/-) mice derived from three different recombinant ES cell clones. In hearts from -/- mice, neither BNP mRNA nor BNP-like immunoreactivity were detected. As compared with +/+ mice, ANP gene expression in the ventricle were augmented by 10-fold in -/- mice, which was observed as early as two days after birth. Plasma and ventricular ANP concentrations were also increased by 5- and 30- fold in -/- mice, respectively, as compared with +/+ mice. No significant differences in systolic blood pressure were observed among +/+, +/-, and -/- mice on either standard (0.7% NaCl)- or high (8.0% NaCl)- salt diet.

We succeeded in the generation of BNP-deficient mice. The present study will provide insight into the physiologic and pathophysiologic roles of BNP in the regulation of salt metabolism.