

助成番号 9922

## ナトリウム利尿ペプチドシステム遺伝子欠損マウスを用いた食塩代謝におけるナトリウム利尿ペプチドシステムの意義の検討

助成研究者：中尾 一和 (京都大学 臨床病態医科学 第二内科)  
 共同研究者：小川 佳宏 (京都大学 臨床病態医科学 第二内科)  
 田村 尚久 (京都大学 臨床病態医科学 第二内科)  
 伊藤 裕 (京都大学 臨床病態医科学 第二内科)  
 斉藤 能彦 (京都大学 臨床病態医科学 第二内科)

【目的】我々は既に血中BNP濃度が著しく上昇する脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)過剰発現トランスジェニックマウス(BNP-Tg)マウスでは、著しい血圧低下と心重量減少が認められBNPの持続的な循環調節作用を明らかにし、高血圧や心肥大などの循環器疾患におけるBNPの治療薬としての可能性を示唆してきた。本研究ではBNPの循環調節作用がA型グアニル酸シクラーゼ(GC-A)のみを介するか否かを検討する目的でGC-A欠損(GC-A<sup>-/-</sup>)BNP-Tgマウスを作製し、表現型の検討を行った。【方法・結果】GC-Aヘテロ接合体ノックアウトマウス(GC-A<sup>+/-</sup>マウス)とBNP過剰発現トランスジェニックマウス(GC-A<sup>+/+</sup>/BNP-Tg)を交配することにより得られる4つの遺伝子型を有するマウス(GC-A<sup>+/+</sup>マウス、GC-A<sup>+/+</sup>/BNP-Tg(BNP-Tg)マウス、GC-A<sup>+/-</sup>マウス、GC-A<sup>+/-</sup>/BNP-Tg)を作製した。血中BNP濃度は、GC-A<sup>+/+</sup>マウスでは血中BNP濃度が大部分が検出感度以下であるのに対して、BNP-Tg及びGC-A<sup>+/-</sup>/BNP-Tgマウスでは約100倍に上昇していた。BNP-Tgマウスでは、GC-A<sup>+/+</sup>マウスに比較して有意に血圧と心臓重量体重比が低下していた。GC-A<sup>+/-</sup>/BNP-TgマウスではGC-A<sup>+/-</sup>マウスに比較して収縮期血圧、心臓重量体重比ともに若干低下傾向は認めるものの有意差は認められなかった。【結論】BNPの降圧および心肥大抑制作用はGC-Aのみを介することが証明された。本研究成果は、心臓ホルモンとしてのBNPの循環調節作用がGC-Aを介することを示すものであり、BNP/GC-A系の血圧・食塩代謝調節における意義が示唆される。



助成番号 9922

ナトリウム利尿ペプチドシステム遺伝子欠損マウスを用いた食塩代謝における  
ナトリウム利尿ペプチドシステムの意義の検討

助成研究者：中尾 一和 (京都大学 臨床病態医科学 第二内科)  
共同研究者：小川 佳宏 (京都大学 臨床病態医科学 第二内科)  
田村 尚久 (京都大学 臨床病態医科学 第二内科)  
伊藤 裕 (京都大学 臨床病態医科学 第二内科)  
斉藤 能彦 (京都大学 臨床病態医科学 第二内科)

## 1. 研究目的

ナトリウム利尿ペプチドシステムは、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)の3種類の内因性リガンドから成るナトリウム利尿ペプチドファミリーと、膜型グアニル酸シクラーゼ(GC)そのものであり、細胞内cGMP濃度を上昇させることにより細胞内情報伝達に関与するGCAおよびGCB、リガンドのクリアランスに関与するC受容体の3種類の受容体から構成される。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調節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、心筋梗塞症、高血圧症、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。

我々は、BNPの生理的、病態生理的意義を検討する目的でBNP過剰発現トランスジェニックマウス(BNP-Tg)マウスを作製し、BNP-Tgマウスにおいて、血圧低下と心重量減少とともに椎体・長管骨の伸長亢進を認め、ナトリウム利尿ペプチドが循環調節作用のみならず、

骨形成調節作用を有する可能性を示唆してきた。一方、ANPトランスジェニックマウス、GC-Aノックアウトマウスではそれぞれ食塩感受性高血圧、食塩非感受性高血圧を示すが骨格系の変化は報告はなかった。本研究では、BNPの循環調節作用がGC-Aのみを介するか否かを明らかにする目的で、GC-Aを欠損したBNP過剰発現トランスジェニックマウス(GC-A<sup>-/-</sup>/BNP-Tg)を作製し、表現型を解析した。

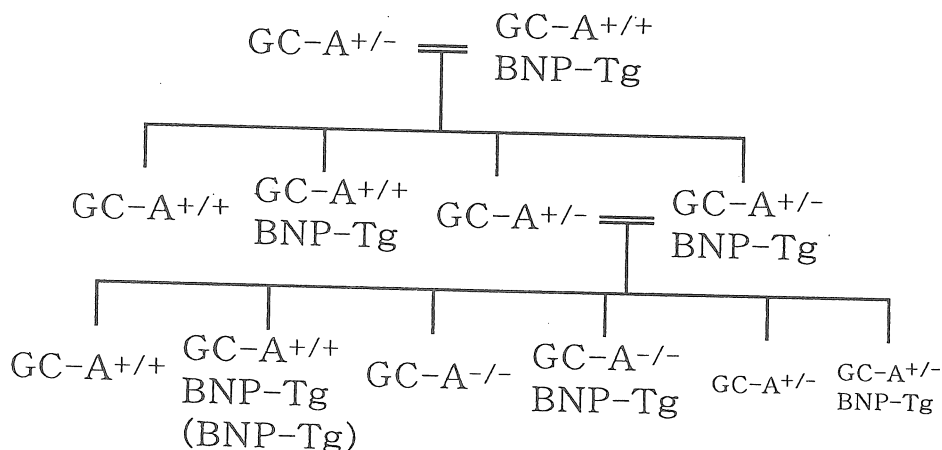


図1. GC-A<sup>-/-</sup>/BNP-Tgマウスの作製

## 2. 研究方法

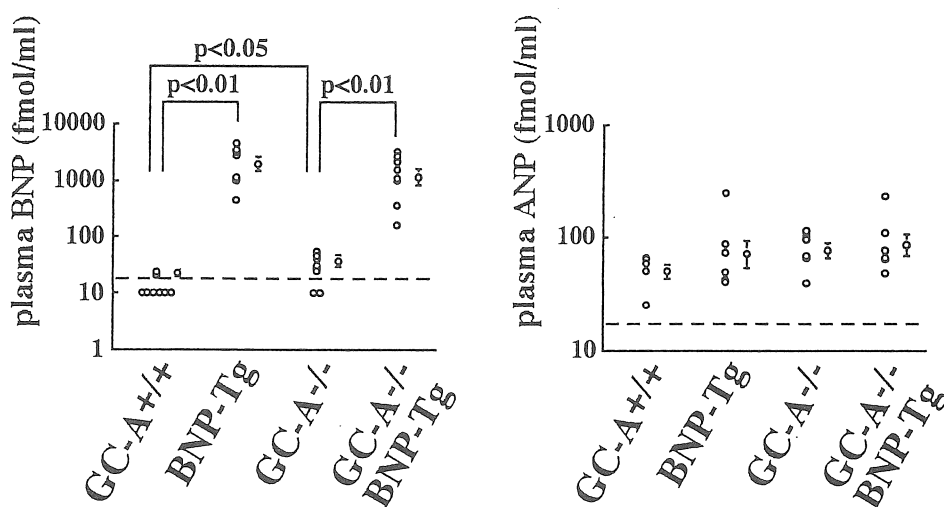
### GC-A<sup>-/-</sup>/BNP-Tgマウスの作製と解析

GC-Aヘテロ接合体ノックアウトマウス(GC-A<sup>+/-</sup>マウス)とBNP過剰発現トランスジェニックマウス(GC-A<sup>+/+</sup>/BNP-Tg)を交配することにより得られるGC-A<sup>+/+</sup>マウスとGC-A<sup>+/-</sup>/BNP-Tgを交配し、4つの遺伝子型を有するマウス; GC-A<sup>+/+</sup>マウス、GC-A<sup>+/+</sup>/BNP-Tg(BNP-Tg)マウス、GC-A<sup>-/-</sup>マウス、GC-A<sup>-/-</sup>/BNP-Tgを作製した(図1)。血漿中BNPとANP濃度測定は既報のマウスBNPおよびANP特異的ラジオイムノアッセイを用いて測定した。血圧測定はTail-cuff法(BP-98A, Softron Corp.)により5ヶ月齢雄性マウスを用いて施行した。5ヶ月齢雄性マウスの尿、血漿、心室組織中のcGMPをトリクロロ酢酸にて抽出しラジオイムノアッセイにてcGMP濃度を測定した。

## 3. 研究結果

3. 1 GC-A<sup>+</sup>/BNP-Tgマウスの血漿中BNPおよびANP濃度

マウスBNPまたはANP特異的ラジオイムノアッセイにてマウスの血中BNPおよびANP濃度を測定した(図2)。血中BNP濃度は、GC-A<sup>+/+</sup>マウスでは血中BNP濃度が大部分が検出感度以下であるのに比較してBNP-Tgマウスでは約100倍に上昇していた。GC-A<sup>+</sup>マウスの血中BNP濃度はRIAの検出濃度の約2倍で、GC-A<sup>+/+</sup>マウスに比較して有意に上昇していたが、GC-A<sup>+</sup>/BNP-TgマウスではBNP濃度がBNP-Tgマウスと同程度まで上昇し、GC-A<sup>+</sup>マウスの約50倍に達していた。血中ANP濃度は、各遺伝子型の間で有意差は認められなかった。



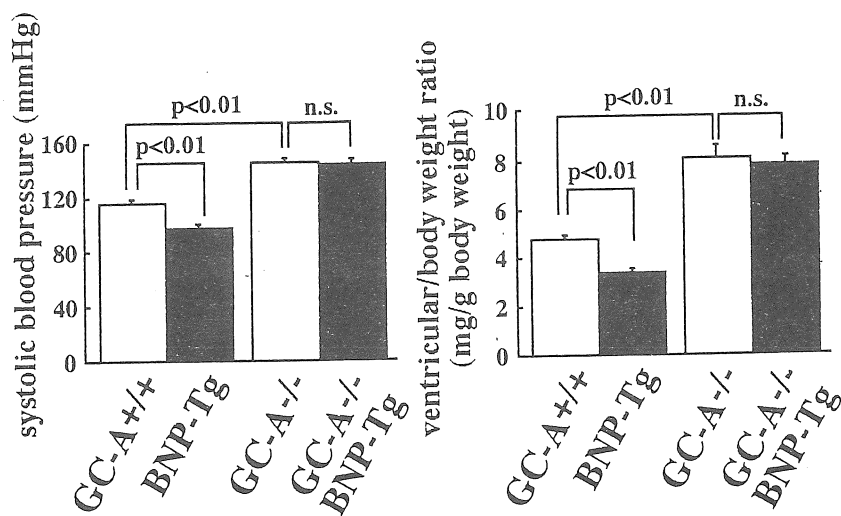
(5-months-old males, n=6-8, mean±S.E.)

図2. GC-A<sup>+</sup>/BNP-Tgマウスの血漿中BNPおよびANP濃度

3. 2 GC-A<sup>+</sup>/BNP-Tgマウスの収縮期血圧および心臓重量体重比

tail-cuff法により5ヶ月雄性マウスの収縮期血圧と心臓重量体重比を検討した(図3)。既報と

同様に、GC-AノックアウトマウスではGC-A<sup>+/+</sup>マウスに比較して有意に血圧上昇と心臓重量体重比の増加を認めた。BNP-Tgマウスでは、GC-A<sup>+/+</sup>マウスに比較して有意に血圧と心臓重量体重比が低下していたが、GC-A<sup>-/-</sup>/BNP-Tgマウスでは、GC-A<sup>-/-</sup>マウスに比較して収縮期血圧、心臓重量体重比ともに若干低下傾向は認めるものの有意差は認められなかった。

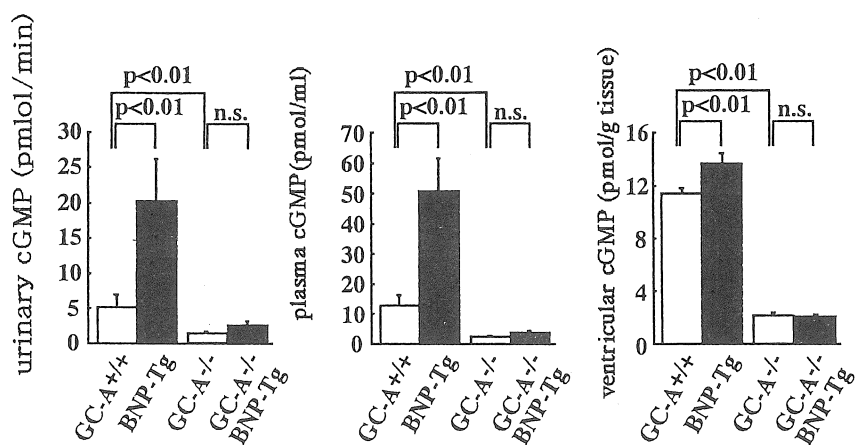


(5-month-old males, n=6, mean ± S.E.)

図3. GC-A<sup>-/-</sup>/BNP-Tgマウスの収縮期血圧および心臓重量体重比

### 3. 3 GC-A<sup>-/-</sup>/BNP-Tgマウスにおける尿中、血漿中および心室組織中cGMP濃度

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の濃度をラジオイノムノアッセイにて測定した。腎臓由来のcGMPと考えられる尿中cGMP排泄量、血管由来のcGMPと考えられる血漿中cGMP濃度および心室組織中cGMP濃度を測定した(図4)。GC-A<sup>+/+</sup>マウスに比較して、BNP-Tgマウスの尿中cGMP排泄量および血中cGMP濃度が約4倍に有意に上昇し、GC-A<sup>-/-</sup>マウスにおいては、GC-A<sup>+/+</sup>マウスの約1/5に低下していた。GC-A<sup>-/-</sup>/BNP-Tgマウスの尿中および血中cGMP濃度は、GC-A<sup>-/-</sup>マウスと比較して、若干上昇傾向は認められるが有意差は認められなかった。



(5-month-old males, n=6, mean ± S.E.)

図4. GC-A<sup>+</sup>/BNP-Tgマウスにおける尿中、血漿中、心室組織中cGMP濃度

#### 4. 考察

以上の成績を要約すると、1) BNP-Tgマウスの収縮期血圧および心臓重量体重比は、GC-A<sup>+/+</sup>マウスに比較して有意に低下していたが、GC-A<sup>+</sup>/BNP-Tgマウスでは、GC-A<sup>+</sup>マウスと比較して変化は認められなかった。2) 尿中cGMP排泄量および血中cGMP濃度がBNP-Tgマウスにおいて、GC-A<sup>+/+</sup>マウスに比較して尿中cGMP排泄量および血中cGMP濃度が約4倍に上昇していたが、GC-A<sup>+</sup>/BNP-Tgマウスにおいて、GC-A<sup>+</sup>マウスと比較して、尿中cGMP排泄量および血中cGMP濃度に有意な上昇は認められなかった。以上より、BNPの降圧作用、利尿作用と抗心室肥大作用はいずれもGC-Aを介することによることが証明された。米国のグループにより既にANPノックアウトマウスは食塩感受性高血圧を、GC-Aノックアウトマウスは食塩非感受性高血圧を呈することが報告されており、ANP/GC-A系が血圧調節食塩代謝に重要な役割を果たすことが証明されている。本研究成果は、心臓ホルモンとしてのBNPの循環調節作用がやはりGC-Aを介することを示したものであり、BNP/GC-A系の血圧調節・食塩代謝における意義が示唆される。

#### 5. 今後の課題

従来より、GC-Aノックアウトマウスを用いた検討により、血圧の食塩感受性におけるGC-Aの病態生理的意義が証明されてきた。本研究によりBNPの循環調節作用がGC-Aを介す

ることが明らかになったので、今後、血圧の食塩感受性におけるBNPの意義を明らかにする必要があると考えられる。

## 【文 献】

1. T. Tanaka, H. Itoh, K. Doi, Y. Fukunaga, K. Hosoda, M. Shintani, J. Yamashita, T.-H. Chun, M. Inoue, K. Masatsugu, N. Sawada, T. Saito, G. Inoue, H. Nishimura, Y. Yoshimasa, and K. Nakao.  
**Down-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  expression by inflammatory cytokines and its reversal by thiazolidinediones.**  
Diabetologia 42: 702-710, 1999.
2. R. Ishibashi, I. Tanaka, M. Kotani, S. Muro, M. Goto, A. Sugawara, M. Mukoyama, Y. Sugimoto, A. Ichikawa, S. Narumiya, and K. Nakao.  
**Roles of prostaglandin E receptors in mesangial cells under high-glucose conditions.**  
Kidney Int. 56: 589-600, 1999.
3. K. Kuwahara, Y. Saito, M. Harada, M. Ishikawa, E. Ogawa, Y. Miyamoto, I. Hamanaka, S. Kamitani, N. Kajiyama, N. Takahashi, O. Nakagawa, I. Masuda, and K. Nakao.  
**Involvement of cardiotrophin-1 in cardiac myocyte-nonmyocyte interactions during hypertrophy of rat cardiac myocytes in vitro.**  
Circulation 100: 1116-1124, 1999.
4. M. Ishikawa, Y. Saito, Y. Miyamoto, M. Harada, K. Kuwahara, E. Ogawa, O. Nakagawa, I. Hamanaka, N. Kajiyama, N. Takahashi, I. Masuda, T. Hashimoto, O. Sakai, T. Hosoda, and K. Nakao.  
**Heart-specific increase in cardiotrophin-1 gene expression precedes**



- establishment of ventricular hypertrophy in genetically hypertensive rats.**  
J. Hypertens. 17: 807-816, 1999.
5. M. Nakayama, H. Yasue, M. Yoshimura, Y. Shimasaki, K. Kugiyama, H. Ogawa, T. Motoyama, Y. Saito, Y. Ogawa, Y. Miyamoto, and K. Nakao.  
**A T-786-C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm.**  
Circulation 99: 2864-2870, 1999.
6. K. Mori, Y. Ogawa, K. Ebihara, N. Tamura, K. Tashiro, T. Kuwahara, M. Mukoyama, A. Sugawara, S. Ozaki, I. Tanaka, and K. Nakao.  
**Isolation and characterization of CA XIV, a novel membrane-bound carbonic anhydrase from mouse kidney.**  
J. Biol. Chem. 274: 15701-15705, 1999.
7. K. Kuwahara, Y. Saito, O. Nakagawa, I. Kishimoto, M. Harada, E. Ogawa, Y. Miyamoto, I. Hamanaka, N. Kajiyama, N. Takahashi, T. Izumi, R. Kawakami, N. Tamura, Y. Ogawa, and K. Nakao.  
**The effects of the selective ROCK inhibitor, Y27632, on ET-1-induced hypertrophic response in neonatal rat cardiac myocytes: Possible involvement of Rho/ROCK pathway in cardiac muscle cell hypertrophy.**  
FEBS Lett. 452: 314-318, 1999.
8. K. Chin, K. Shimizu, T. Nakamura, N. Narai, H. Masuzaki, Y. Ogawa, M. Mishima, T. Nakamura, K. Nakao, and M. Ohi.  
**Changes in intra-abdominal visceral fat and serum leptin levels in patients with obstructive sleep apnea syndrome following nasal continuous positive airway pressure therapy.**  
Circulation 100: 706-712, 1999.

9. H. Masuzaki, Y. Ogawa, M. Aizawa-Abe, K. Hosoda, J. Suga, K. Ebihara, N. Satoh, H. Iwai, G. Inoue, H. Nishimura, Y. Yoshimasa, and K. Nakao.  
**Glucose metabolism and insulin sensitivity in transgenic mice overexpressing leptin with lethal *yellow agouti* mutation: Usefulness of leptin for the treatment of obesity-associated diabetes.**  
Diabetes 48: 1615-1622, 1999.
10. N. Satoh, Y. Ogawa, G. Katsuura, Y. Numata, T. Tsuji, M. Hayase, K. Ebihara, H. Masuzaki, K. Hosoda, Y. Yoshimasa, and K. Nakao.  
**Sympathetic activation of leptin via the ventromedial hypothalamus: Leptin-induced increase in catecholamine secretion.**  
Diabetes 48: 1787-1793, 1999.
11. Y. Ogawa, H. Masuzaki, K. Hosoda, M. Aizawa-Abe, J. Suga, M. Suda, K. Ebihara, H. Iwai, N. Matsuoka, N. Satoh, H. Odaka, H. Kasuga, Y. Fujisawa, G. Inoue, H. Nishimura, Y. Yoshimasa, and K. Nakao.  
**Increased glucose metabolism and insulin sensitivity in transgenic skinny mice overexpressing leptin.**  
Diabetes 48: 1822-1829, 1999.
12. K. Ebihara, Y. Ogawa, G. Katsuura, Y. Numata, H. Masuzaki, N. Satoh, M. Tamaki, T. Yoshioka, M. Hayase, N. Matsuoka, M. Aizawa-Abe, Y. Yoshimasa, and K. Nakao.  
**Involvement of agouti-related protein, an endogenous antagonist of hypothalamic melanocortin receptor, in leptin action.**  
Diabetes 48: 2028-2033, 1999.
13. S. Yura, Y. Ogawa, N. Sagawa, H. Masuzaki, H. Itoh, K. Ebihara, M. Aizawa-Abe, S. Fujii, and K. Nakao.  
**Accelerated puberty and late-onset hypothalamic hypogonadism in female transgenic skinny mice overexpressing leptin.**  
J. Clin. Invest. 105: 749-755, 2000.

14. N. Tamura, Y. Ogawa, H. Chusho, K. Nakamura, K. Nakao, M. Suda, M. Kasahara, R. Hashimoto, G. Katsuura, M. Mukoyama, H. Itoh, Y. Saito, I. Tanaka, H. Otani, M. Katsuki, and K. Nakao.

**Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide.**

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 4239-4244, 2000.

15. M. Aizawa-Abe, Y. Ogawa, H. Masuzaki, K. Ebihara, N. Satoh, H. Iwai, N. Matsuoka, T. Hayashi, K. Hosoda, G. Inoue, Y. Yoshimasa, and K. Nakao.

**Pathophysiological role of leptin in obesity-related hypertension.**

J. Clin. Invest. 105: 1243-1252, 2000.

16. M. Kasahara, M. Mukoyama, A. Sugawara, H. Makino, T. Suganami, Y. Ogawa, M. Nakagawa, K. Yahata, M. Goto, R. Ishibashi, N. Tamura, I. Tanaka, and K. Nakao.

**Ameliorated glomerular injury in mice overexpressing brain natriuretic peptide with renal ablation.**

J. Am. Soc. Nephrol. in press, 2000.

## Genetic Models Revealed That Brain Natriuretic Peptide Regulates Cardiovascular Homeostasis Via Guanylyl Cyclase-A

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 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.

Brain natriuretic peptide (BNP), a cardiac hormone produced primarily by the ventricle, is thought to be involved in a variety of homeostatic processes via its cognate receptor, guanylyl cyclase-A (GC-A). We previously created transgenic mice with elevated plasma BNP concentrations (BNP-transgenic mice) and demonstrated that they exhibit reduced blood pressure and cardiac weight accompanied by a significant elevation of plasma cGMP concentrations. To address whether BNP regulates cardiovascular homeostasis solely via GC-A, we have produced BNP-transgenic mice lacking GC-A (BNP-Tg/GC-A<sup>-/-</sup> mice) and examined their cardiovascular phenotypes. Plasma BNP concentrations in BNP-Tg and BNP-Tg/GC-A<sup>-/-</sup> mice ( $2734 \pm 480$  and  $1941 \pm 295$  fmol/ml, respectively) were markedly elevated relative to GC-A<sup>+/+</sup> and GC-A<sup>-/-</sup> mice ( $<20$  and  $39.2 \pm 7.0$  fmol/ml, respectively). No significant difference in plasma BNP concentration was noted between BNP-Tg and BNP-Tg/GC-A<sup>-/-</sup> mice. The GC-A<sup>-/-</sup> mice were hypertensive with cardiac hypertrophy relative to wildtype littermates, which is not alleviated by overexpression of BNP in BNP-Tg/GC-A<sup>-/-</sup> mice. This study therefore provides genetic evidence that BNP reduces blood pressure and cardiac weight through GC-A. The BNP-Tg/GC-A<sup>-/-</sup> mice provide the first experimental model demonstrating that BNP plays a role in cardiovascular homeostasis via GC-A.