

ナトリウム利尿ペプチド系の体内恒常性維持および腎保護再生における意義とその分子機構

助成研究者：向山政志（京都大学 大学院医学研究科）

共同研究者：森 潔（京都大学 大学院医学研究科）

菅波孝祥（京都大学 大学院医学研究科）

慢性腎炎、糖尿病性腎症および高血圧性腎硬化症は末期腎不全に至る主要な原因であり、近年のわが国における透析患者数の急速な増加とあわせ、その克服は医学研究上重要課題である。近年、これらの疾患の病態に、心臓血管ホルモンと総称される新しい循環調節ホルモンの異常の関与が示唆され、特に進行性腎障害において共通基盤となる病態の理解とそれを基にした新たな治療法の開発が求められている。本研究では、循環調節ホルモンのうち特にナトリウム利尿ペプチドファミリー（ANP、BNP、CNP）の腎障害進展に及ぼす意義を明らかにするため、BNP 過剰分泌トランスジェニックマウス（BNP-Tg）を用いて種々の腎疾患モデルを作製し、ナトリウム利尿ペプチドの慢性作用の解明および臨床応用に向けて検討することを目的とした。

我々はすでに、腎不全摘腎不全モデルにおいて、過剰の BNP が慢性腎障害に対し腎保護的に働く可能性を示した。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および著しい糸球体・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強力に保護作用を示すことを証明した。このモデルにおいて、腎での TGF- β 1、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。

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、過剰の BNP が線維化に対し抑制的に働く成績を得た。この機序として、BNP-Tg において尿細管周囲髄質血流が有意に改善・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。さらに糖尿病性腎症モデルとして streptozotocin 糖尿病モデルを作製し、BNP-Tg において蛋白尿および腎組織像の明らかな改善、糸球体における TGF- β 1、細胞外基質発現の正常化を認めた。

このように、BNP の慢性過剰状態は、腎炎や間質線維化、および糖尿病性腎症の各腎疾患モデルにおける腎障害進展に対して、極めて有効に保護的作用を発揮することが明らかとなった。今後、ナトリウム利尿ペプチドおよび関連薬剤の臨床応用により、新たな腎疾患治療薬としての臨床的意義が期待できると考えられ、これらについて基礎、臨床両面からのより詳細な検討が注目される。

1 1

助成番号 0242

ナトリウム利尿ペプチド系の体内恒常性維持および腎保護再生における意義とその分子機構

助成研究者：向山政志 (京都大学 大学院医学研究科)

共同研究者：森 潔 (京都大学 大学院医学研究科)

菅波孝祥 (京都大学 大学院医学研究科)

1. 研究目的

慢性腎炎、糖尿病性腎症および高血圧性腎硬化症は末期腎不全に至る主要な原因であり、近年のわが国における透析患者数の急速な増加とあわせ、その克服は医学研究上重要課題である。近年、これらの疾患の発症および進展において、心臓血管ホルモンと総称される新しい循環調節ホルモンや、サイトカイン、増殖因子などに代表される *autocrine/paracrine* 調節因子の異常が密接に関与することが明らかになりつつあり、その解明は新たな治療法への応用へと展開する可能性を十分に秘めている。しかし、これらの共通のターゲットとしての慢性腎障害については、病態の解明がまだまだ不十分であり、一定の病期を過ぎたものではその進行をくい止める根本的治療法がなく、共通基盤となる病態の理解とそれを基にした新たな治療法の開発が求められている。

我々はこれまで、循環調節ホルモンのうち特にナトリウム利尿ペプチドファミリーの生理的・臨床的意義について研究を進めてきた。これら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) および C 型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) から成り、このうち ANP、BNP はそれぞれ主に心房、心室から分泌され、共通の受容体に働く (1)。そして強力な降圧利尿作用・血管拡張作用を発揮するとともに、多くの心血管系疾患の増悪因子と考えられるレニン アンジオテンシン系に対し強力な拮抗作用を示すことを我々は示してきた (1)。また、心不全や腎不全、高血圧に際して産生・分泌が亢進することを明らかにし (2-4)、病的状態での臓器保護的・代償的意義を示唆してきた。しかし、腎障害進展に及ぼす意義に関してはほとんど明らかでなく、慢性作用を含めその詳細はいまだ不明である。

我々はナトリウム利尿ペプチドの慢性作用を明らかにするため、BNP を肝臓より血中に過剰に分泌する BNP 過剰発現トランスジェニックマウス (BNP-Tg) を確立し、有意の降圧と心重量の低下を報告した (5, 6)。そして、このモデルを用いて、高度腎摘腎不全モデルを作製し、腎機能の改善とともに腎組織変化が顕著に抑制されることを

見出した(7)。本研究では、さらにナトリウム利尿ペプチドの腎保護再生における意義を明らかにすることを目的として、**BNP-Tg** マウスを用いて種々の腎疾患モデルを作製し、腎障害進展に及ぼすナトリウム利尿ペプチドの慢性作用とその機序について検討した。

2. 研究方法

2.1 腎炎モデルにおける検討

ヒト **serum amyloid P component promoter** を用いてマウス **BNP** 遺伝子を肝臓で過剰発現させた **BNP-Tg** を作製し (Fig. 1) (5)、約 20 コピーの **transgene** を有する **BNP-Tg**、および対照ノントランスジェニックマウス (**non-Tg**) を 9 11 週齢より用いた。ウサギ **IgG** で前感作後、ウサギに免疫して調製した抗マウス糸球体基底膜 (**GBM**) 血清 (**NTS**) を静注し、抗 **GBM** 腎炎を作製した (8)。コントロールとしては正常ウサギ血清を用いた。84 日間観察後に、腎組織像、尿中アルブミン排泄および腎機能について解析し、さらに **monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)**、**transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)** の遺伝子発現、および腎組織内での **ERK/MAP** キナーゼ活性について、**Northern blotting**、**Western blotting** にて検討した (9)。

2.2 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、対照 **non-Tg** と比較した。右尿管結紮 14 日後に両側腎重量を測定、腎組織像の検討とともに、**TGF- β 1** 発現について免疫染色を行った (7)。また、尿管結紮 7 日後、**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**) 血流の検討を行った (10)。

2.3 糖尿病モデルにおける検討

代表的な 1 型糖尿病モデルとして、**BNP-Tg** および **non-Tg** を用いて **streptozotocin** 誘発糖尿病モデルを作製した (11)。血糖測定とともに 16 週間観察後、尿中アルブミン排泄、腎機能および組織学的検討を行い、比較検討を行った。また腎組織内 **TGF- β 1**、**collagen IV** の遺伝子発現について、**Northern blotting** にて検討した。

2.4 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 (Ang II)** 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。また細胞増殖には **platelet-derived growth factor (PDGF)** の重要性も示唆されている (12)。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、培養ラットメサングウム細胞を用いて、PDGFによる細胞増殖、Ang IIによるERK/MAPキナーゼ活性化とMCP-1、TGF- β 1遺伝子発現、およびfibronectin等の細胞外基質関連遺伝子の発現を解析し、ナトリウム利尿ペプチドおよびsecond messengerであるcyclic GMP (8-Br-cGMP)の効果を検討した。

3. 研究結果

3.1 腎炎モデルにおける検討

BNP-Tgはnon-Tgに比し基礎値において、100倍以上の血中BNP濃度の上昇(2980 ± 570 vs. <16.0 fmol/ml)とともに、有意の降圧(86.2 ± 1.2 vs. 101.7 ± 0.8 mmHg)、著明な尿中cGMPの増加(65.6 ± 10.0 vs. 2.5 ± 0.4 pmol/min)を示した(Fig. 2)。腎炎惹起84日目において、non-Tg腎炎群ではコントロールnon-Tgに比し、顕著な糸球体細胞数の増加($+42 \pm 3\%$)、メサングウム領域の拡大($+93 \pm 9\%$)や尿細管上皮の変性、間質線維化などを認めたが、BNP-Tg腎炎群では各々変化は明らかに軽度($+9 \pm 3\%$ 、 $+13 \pm 4\%$)であった(Fig. 3)。また、non-Tg腎炎群では高度の蛋白尿(14日目をピークに基礎値の約21倍)が84日目まで持続し、腎機能低下と血清アルブミン低下を認めたのに対し、BNP-Tg腎炎群では一過性の蛋白尿(基礎値の約4倍まで)を認めたのみであった(Fig. 4)。蛍光抗体法によるウサギ、マウスIgGや補体C3の糸球体基底膜への沈着に関しては、BNP-Tgとnon-Tgの間に明らかな差を認めなかった。しかしながら、腎炎による腎障害進展に重要な役割を果たすマクロファージ浸潤や、MCP-1、TGF- β 1遺伝子発現は、BNP-Tgにおいてnon-Tgに比し有意に抑制されていた(Fig. 5)。さらに、MCP-1、TGF- β 1発現誘導に重要なERK/MAPキナーゼのリン酸化は、腎炎惹起後、non-Tgにおいて明らかに亢進を認めたが、BNP-Tgで有意の抑制を認めた(Fig. 5)。これらの腎保護作用においてBNPによる降圧作用の影響を除外する目的で、ヒドララジン投与モデルを作製した。ヒドララジン投与によるBNP-Tgと同程度の降圧は、腎組織像、腎機能、蛋白尿のいずれにおいても有意な改善を示さなかった(Fig. 6)。

3.2 腎間質線維化モデルにおける検討

尿管結紮14日後、健側と比べた患側腎の重量変化はnon-Tg($-28.9 \pm 7.5\%$)と比較して、BNP-Tgでは軽度の変化にとどまった($-10.0 \pm 4.7\%$)。組織学的にはnon-Tgにおいて尿細管上皮の変性、脱落、結合組織の増生が高度に認められたのに対し、BNP-Tgでは軽度の変化は認めたもののnon-Tgに比べ明らかに尿細管・間質の構築が保たれ、線維化スコアにおいても明らかに改善を認めた(Fig. 7)。同様にTGF- β 1発現もBNP-Tgで有意に抑制された。この機序を解明するために、FITC-dextranおよびLaser Doppler

imaging を用いた腎髄質の毛細血管 (PTC) 血流の検討を行ったところ、BNP-Tg において線維化進行の際に PTC 血流が有意に改善・保持されることを見出した。

3.3 糖尿病モデルにおける検討

糖尿病発症後、血糖値は 400 500 mg/dl に維持され、non-Tg、BNP-Tg とも差異は認めなかった。しかし、対照にて糖尿病発症 4 週間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 70%) 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を認めた (Fig. 8)。腎での TGF- β 1、collagen IV 発現も、対照では 3 4 倍に亢進を認めたが、BNP-Tg ではほとんど亢進を認めなかった。この機序として、培養ラットメサンギウム細胞を用いて高糖刺激時の ERK/MAP キナーゼの活性化を検討し、BNP 添加が強力にそれを抑制することを見出した。

3.4 培養細胞を用いた腎保護作用の機序の検討

培養ラットメサンギウム細胞において、Ang II による TGF- β 1、fibronectin 等の細胞外基質関連遺伝子の発現の亢進は、同時に添加したナトリウム利尿ペプチドおよびその second messenger である cGMP 投与にて明らかに抑制され、また PMA で誘導した MCP-1 発現も有意に抑制された (Fig. 9)。また、PDGF 添加による細胞増殖や、Ang II および PDGF による ERK/MAP キナーゼ活性化も、ナトリウム利尿ペプチドおよび cGMP の投与にて強力に抑制され (Fig. 10)、これら複数の作用点における抑制により、腎保護作用を発揮すると考えられた。

4. 考 察

最近、腎炎、糖尿病性腎症など種々の腎障害モデルやまたヒト腎疾患において、腎におけるレニン アンジオテンシン系の活性化が生じ、TGF- β や MCP-1 の誘導を介して腎障害を進行させることが示され、臨床的にも注目を集めている (8, 13)。

ナトリウム利尿ペプチドはこれまでに、心保護作用や急性腎不全における予後の改善などの報告があるが (1, 14)、腎障害に対する長期的な作用に関しては不明の点が多い。抗 GBM 腎炎は、抗血清処置後抗 GBM 抗体の糸球体基底膜への沈着が生じ、内皮細胞傷害や浸潤細胞の集積をきたす免疫学的機序を介する腎炎モデルとして古くから知られている。今回の検討で、BNP-Tg においては、腎炎モデルにおける腎障害に対して、組織学的にも腎機能的にも著しい改善が認められた。この際、MCP-1、TGF- β 1 の発現抑制とそれに続くマクロファージ浸潤、腎線維化抑制が、BNP-Tg 腎炎群における改善に重要な役割を果たしていると考えられた。

また、腎間質線維化モデルにおいて、BNP-Tg で明らかな抑制が認められた。この際、

髄質での毛細血管 (PTC) 血流の保持・改善を認め、BNP の腎保護作用を説明するひとつの機序である可能性が考えられた。さらに、糖尿病性腎症モデルにおいても、BNP-Tg で明らかな改善が認められた。

これらは共通の分子基盤として、局所における TGF- β や MCP-1 の誘導が重要と考えられている (13)。とくにナトリウム利尿ペプチドの作用部位の一つとして、メサンギウム細胞が挙げられる。メサンギウム細胞増殖は糸球体腎炎のみならず種々の腎疾患で認められ、疾患の進展に重要な役割を果たすが、ナトリウム利尿ペプチドはメサンギウム細胞増殖に対して強力な抑制作用を示す。また、腎炎や糖尿病性腎症の際のメサンギウム細胞における TGF- β 1 発現誘導や ERK/MAP キナーゼの活性化に対しても、ナトリウム利尿ペプチドは明らかな抑制作用を示す。さらに、*in vitro* では、ANP はマクロファージの TNF- α 産生を抑制すると報告されており、炎症細胞に対するナトリウム利尿ペプチドの作用も考えられる。しかし、その詳細な機序の解明には、さらに BNP 欠損マウス、GC-A 欠損マウスなどの他のナトリウム利尿ペプチド系遺伝子操作動物を用いた検討を含め、今後さらなる検討が必要と思われる。

5. 今後の課題

BNP の慢性過剰状態は、腎炎や間質線維化、および糖尿病性腎症の各腎疾患モデルにおける腎障害進展に対して、極めて有効に保護的作用を発揮することが明らかとなった。今後、ナトリウム利尿ペプチドおよび関連薬剤の臨床応用により、新たな腎疾患治療薬としての臨床的な意義が期待できると考えられ、これらについて基礎、臨床両面からのより詳細な検討が注目される。

6. 参考文献

- 1) Nakao K, Ogawa Y, Suga S, et al. Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system. I: Natriuretic peptides. *J Hypertens* 10:907-912, 1992.
- 2) Mukoyama M, Nakao K, Saito Y, et al. Increased human brain natriuretic peptide in congestive heart failure. *N Engl J Med* 323:757-758, 1990.
- 3) Mukoyama M, Nakao K, Saito Y, et al. Human brain natriuretic peptide, a novel cardiac hormone. *Lancet* 335:801-802, 1990.
- 4) Mukoyama M, Nakao K, Hosoda K, et al. Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans: evidence for an exquisite dual natriuretic peptide system, atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide. *J Clin Invest* 87:1402-1412, 1991.
- 5) Ogawa Y, Itoh H, Tamura N, et al. 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

- 6) Nakagawa M, Tanaka I, Mukoyama M, et al. Monoclonal antibody against brain natriuretic peptide and characterization of brain natriuretic peptide-transgenic mice. *J Hypertens* 19:475-483, 2001.
- 7) Kasahara M, Mukoyama M, Sugawara A, et al. Ameliorated glomerular injury in mice overexpressing brain natriuretic peptide with renal ablation. *J Am Soc Nephrol* 11:1691-1701, 2000.
- 8) Hisada Y, Sugaya T, Yamanouchi M, et al. Angiotensin II plays a pathogenic role in immune-mediated renal injury in mice. *J Clin Invest* 103:627-635, 1999.
- 9) Suganami T, Tanaka I, Mukoyama M, et al. Altered growth response to prostaglandin E2 and its receptor signaling in mesangial cells from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 19:1095-1103, 2001.
- 10) Yamahara K, Itoh H, Chun TH, et al. Significance and therapeutic potential of the natriuretic peptides/cGMP/cGMP-dependent protein kinase pathway in vascular regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:3404-3409, 2003.
- 11) Makino H, Tanaka I, Mukoyama M, et al. Prevention of diabetic nephropathy in rats by prostaglandin E receptor EP1-selective antagonist. *J Am Soc Nephrol* 13:1757-1765, 2002.
- 12) Johnson RJ, Floege J, Couser WG, et al. Role of platelet-derived growth factor in glomerular disease. *J Am Soc Nephrol* 4:119-128, 1993.
- 13) Border WA, Noble NA. TGF- β in kidney fibrosis: a target for gene therapy. *Kidney Int* 51:1388-1396, 1997.
- 14) Allgren RL, Marbury TC, Rahman SN, et al. Anaritide in acute tubular necrosis. *N Engl J Med* 336:828-834, 1997.

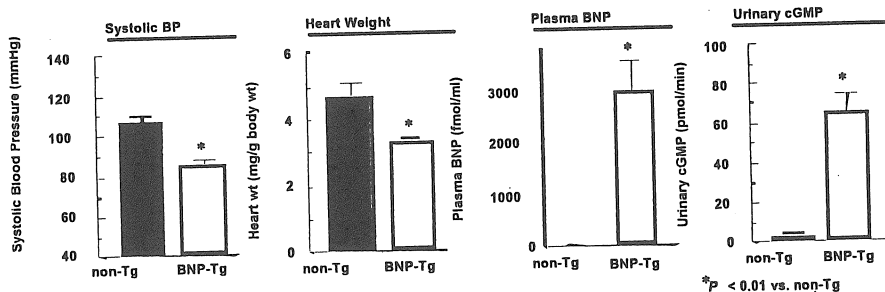


Fig. 1. BNP transgene の構造。

Fig. 2. BNP トランスジェニックマウスの表現型。

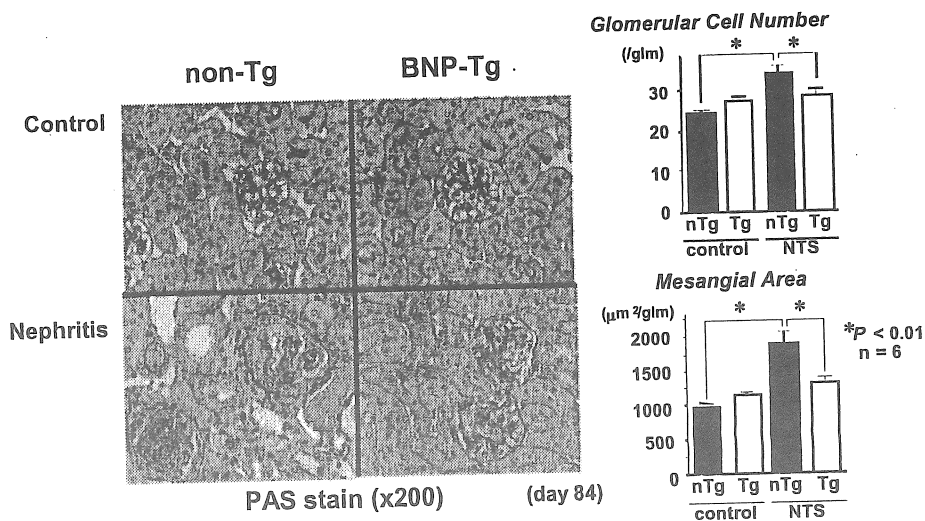


Fig. 3. non-Tg および BNP-Tg における抗 GBM 腎炎惹起後 84 日目の腎組織像と BNP-Tg における改善。

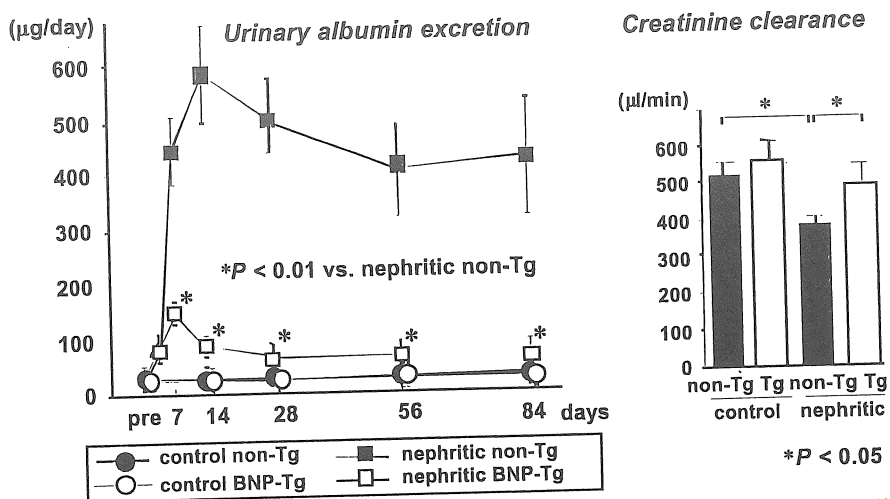


Fig. 4. non-Tg および BNP-Tg における腎炎惹起後の蛋白尿の推移および腎機能と BNP-Tg における改善。

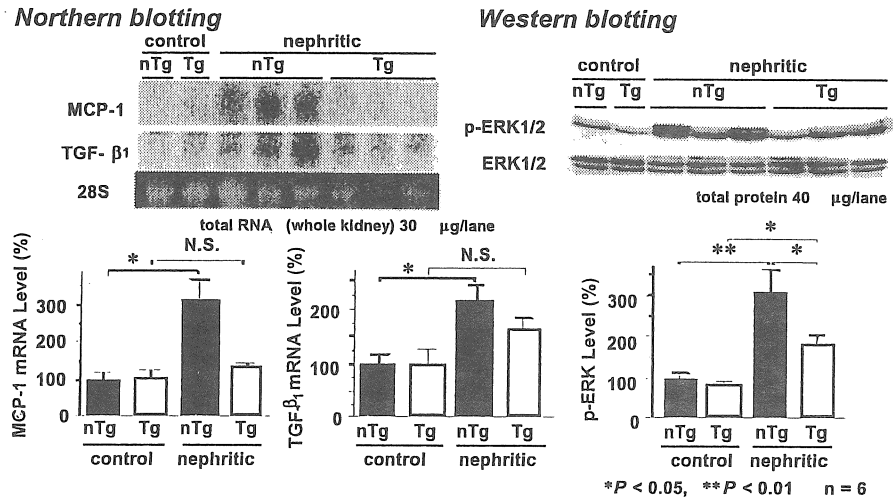


Fig. 5. 腎炎惹起後の腎組織内 MCP-1、TGF-β1 遺伝子発現および ERK/MAP キナーゼリン酸化の比較と BNP-Tg における抑制。

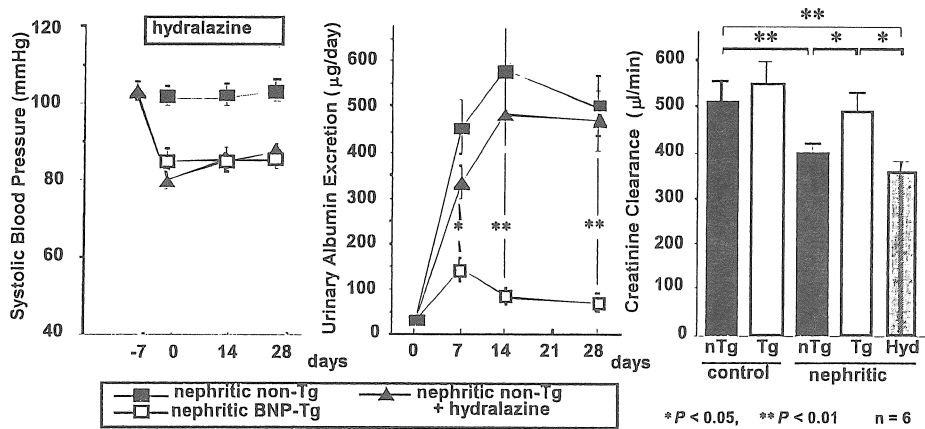


Fig. 6. non-Tg 腎炎群におけるヒドララジン慢性投与の効果と BNP-Tg との比較。

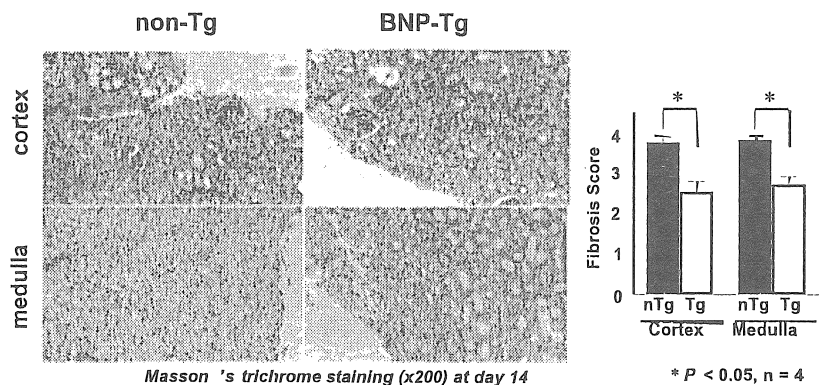


Fig. 7. non-Tg および BNP-Tg における一側尿管結紮 14 日後の間質線維化の比較と BNP-Tg における改善。

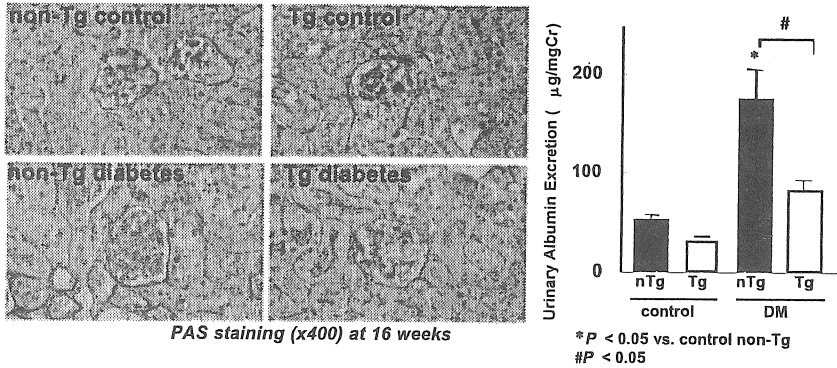


Fig. 8. non-Tg および BNP-Tg における糖尿病性腎症発症 16 週の腎組織像および蛋白尿の比較と BNP-Tg における改善。

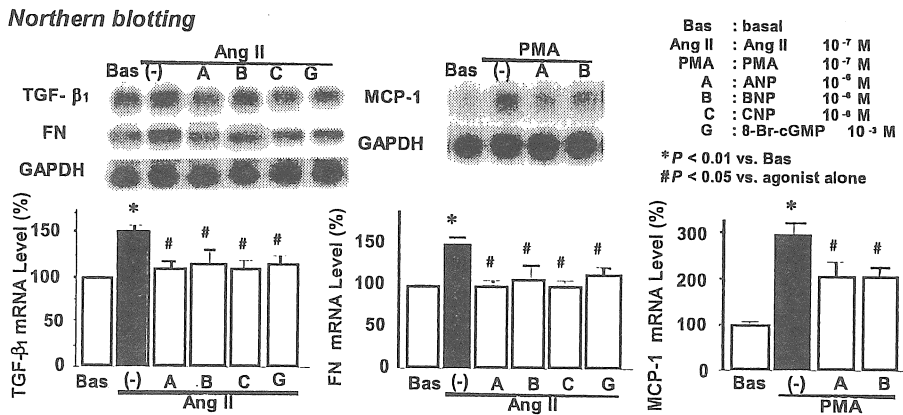


Fig. 9. 培養ラットメサンギウム細胞における Ang II または PMA で誘導された TGF-β₁, fibronectin および MCP-1 発現亢進に対するナトリウム利尿ペプチドの抑制作用。

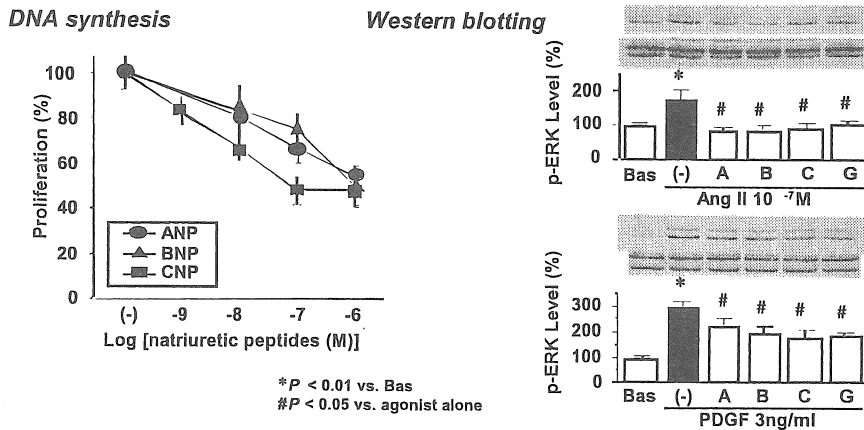


Fig. 10. 培養ラットメサンギウム細胞における PDGF-BB 刺激下増殖および Ang II、PDGF-BB による ERK/MAP キナーゼリン酸化亢進に対するナトリウム利尿ペプチドの抑制作用。

Functional Studies on the Role of Natriuretic Peptides in the Regulation and Maintenance of Renal Homeostasis —Protective Role in Renal Injury and Remodeling—

Masashi Mukoyama, Kiyoshi Mori, and Takayoshi Suganami
Department of Medicine and Clinical Science
Kyoto University Graduate School of Medicine

Summary

We already reported that cardiac secretion of brain natriuretic peptide (BNP), a potent natriuretic and vasorelaxing peptide, is markedly increased in heart failure, hypertension and renal failure. We recently generated transgenic mice that overproduce BNP in the liver to the circulation (BNP-Tg), which showed low blood pressure. Although tissue-protective role of natriuretic peptides has been suggested in cardiac and vascular remodeling, effects on renal histology and function are still unclarified. Therefore we investigated the effects of chronic excess of BNP on renal injury using various nephropathy models in mice.

We first examined the effect on glomerular injury following subtotal nephrectomy using surgical excision method. We found that glomerular hypertrophy with mesangial expansion was significantly ameliorated in BNP-Tg mice. Next we examined the effect on renal injury in the anti-GBM glomerulonephritis model. BNP-Tg revealed much less proteinuria with significant inhibition in mesangial proliferation and in interstitial fibrosis compared with control non-Tg mice. Lower BUN levels and less renal expression of transforming growth factor- β (TGF- β) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) were also observed in nephritic BNP-Tg. Furthermore, BNP-Tg ameliorated tubulointerstitial injury following unilateral ureteral obstruction. After ureteral ligation, tubular damages with interstitial fibrosis were marked in non-Tg but significantly suppressed in BNP-Tg. Interstitial expression of TGF- β was also suppressed. In addition, the blood flow of the peritubular capillary was significantly maintained, suggesting the mechanism by which BNP exerts the protective effects against interstitial fibrosis. Finally, BNP-Tg showed significant amelioration in renal injury and proteinuria following streptozotocin-induced diabetes. These beneficial effects of BNP in nephropathy models were not reproduced by systemic hypotension with chronic hydralazine treatment. In cultured mesangial cells, natriuretic peptides abolished angiotensin II-induced TGF- β and fibronectin expression with inhibited ERK/MAP kinase activation.

These results indicate that the chronic excess of BNP in mice ameliorates histological and functional alterations in various nephropathy models. The results also suggest that the renoprotective effects of natriuretic peptides on renal injury, not due merely to systemic blood pressure reduction, may be therapeutically applicable in various renal diseases.