

助成番号 0645

ナトリウム利尿ペプチド及び新規内分泌因子 Ngal を用いた腎疾患治療法の開発と作用機構の解明

森 潔¹, 横井 秀基¹, 越川 真男¹, 吉岡 徹朗¹, 榎野 久士²¹京都大学大学院医学研究科内分泌代謝内科, ²国立循環器病センター動脈硬化代謝内科

概要 ナトリウム利尿ペプチドファミリーは強力な降圧利尿作用を有する心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)およびその類縁分子である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)から構成される。種々の腎疾患において ANP、BNP の血液中濃度が上昇するが、これが腎障害の進行に対してどのような作用を有するのか明らかではない。申請者らは当科で樹立した肝臓特異的 BNP 過剰発現マウスを用いて、慢性の BNP 過剰により、腎垂全摘後あるいは自己免疫性糸球体腎炎後の腎機能悪化が軽減されることを明らかにした。本研究では、BNP トランスジェニックマウスを用いて、BNP の慢性過剰が糖尿病性腎症に対する効果を検討した。また申請者らは新しい腎臓分化誘導因子として neutrophil gelatinase-associated lipocalin (Ngal)を同定しているので、腎障害に対する Ngal の効果、さらに BNP および Ngal の作用機構について検討を行った。

ストレプトゾトシンにより野生型マウスに糖尿病を誘発すると、糸球体肥大、メサンギウム領域拡大、アルブミン尿の増加が認められた。一方、BNP トランスジェニックマウスではこれらの変化は軽減されていた。培養ラットメサンギウム細胞において高グルコース濃度刺激は細胞外マトリクス蛋白である fibronectin およびその強力な誘導因子の transforming growth factor- β の遺伝子発現を亢進させたが、BNP の添加によりこれらの変化はキャンセルされた。腎虚血再灌流障害は組織構造の破壊と腎の濾過機能の悪化を引き起こすが、マウスに Ngal 蛋白を予め投与しておくこと、これらの障害は軽微に留まり、Ngal による腎保護効果が明らかとなった。培養上皮細胞において Ngal の添加は上皮マーカーの E-cadherin 蛋白の安定化により上皮様形質の増強をもたらした。BNP と Ngal の両者は extracellular signal regulated-kinase のリン酸化を抑制したため、BNP 及び Ngal の細胞内での作用において mitogen-activated kinases が重要な働きを果たしていることが示唆された。本研究により、腎疾患の新しい治療法の開発への道が開かれるものと期待される。

1. 研究目的

ナトリウム利尿ペプチドファミリーは強力な降圧利尿作用を有する心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)およびその類縁分子である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)から構成される^{1,2}。種々の腎疾患において ANP、BNP の血液中濃度が上昇するが、これが腎障害の進行に対してどのような作用を有するのか明らかではない³。臨床面でも急性腎不全に対する ANP あるいは BNP の投与が腎保護効果を示すのか、未だに賛否両論ある^{4,5}。申請者らは当科で樹立した肝臓特異的 BNP 過剰発現マウスを用いて⁶、慢性の BNP 過剰により、腎垂全摘後あるいは自己免疫性糸球体腎炎後の腎機能悪化が軽減されることを明らかにした^{7,8}。本研究では、BNP トランスジェニックマウスを用いて、BNP の慢性過剰が糖尿病性腎症に対する効果を検討した。また申請者ら

は新しい腎臓分化誘導因子として neutrophil gelatinase-associated lipocalin (Ngal)を同定しているので⁹、腎障害に対する Ngal の効果、さらに BNP および Ngal の作用機構について検討を行った。

2. 研究方法

本研究では、肝臓特異的な serum amyloid protein P component プロモーターの支配下に BNP を過剰発現し、慢性的に高い循環血中 BNP 濃度を示すマウス(BNP-Tgマウス)およびその同腹野生型 C57BL/6J マウスを用いた⁶。

糖尿病の誘発には 10 週齢のマウスにストレプトゾトシン(STZ, 70 mg/kg BW, Sigma)を血糖が 300 mg/dl 以上になるまで 4-7 日間、腹腔内投与した。マウスは糖尿病誘発 16 週間後に解剖し解析した。血圧は tail-cuff 法により、尿中

アルブミン濃度は ELISA 法(Exocell, Philadelphia)により測定した。

糸球体断面積およびメサンギウム領域は、腎皮質病理標本を用いてコンピューターにより計測した(KS-400, Carl Zeiss Vision)¹⁰。腎臓内の transforming growth factor- β の免疫組織化学には、rabbit anti-mouse TGF- β antibody (Santa Cruz)および ABC 法(Vector)を用いた。培養メサンギウム細胞は Sprague-Dawley ラットから樹立し、20%牛血清+DMEM 培地 (Gibco BRL) 存在下に増殖させ、10%牛血清+種々の濃度のグルコース存在下に5日間培養、0.2%牛血清+グルコース存在下に 24 時間静置したのち、ラット BNP (Peptide Institute)あるいは 8-bromo-cGMP (Sigma)による刺激を 24 時間行った。Western blot, Northern blot は定法に従った。

腎虚血再灌流障害の作製には、20-25g の雄性マウスを用いた。マウスを 37^Lのテーブル上に固定し、ペントバルビタール(50 mg/kg)麻酔下に開腹、右腎を摘出、左腎動脈を microaneurysm clip (Kent Scientific)により30分間クランプし、開放、24 時間後にマウスを解剖した。リコンビナントマウス Ngal 蛋白は GST 融合蛋白として大腸菌に

発現、Glutathione Sepharose 4B beads (Amersham Biosciences)にて回収、ゲル濾過にて精製した。

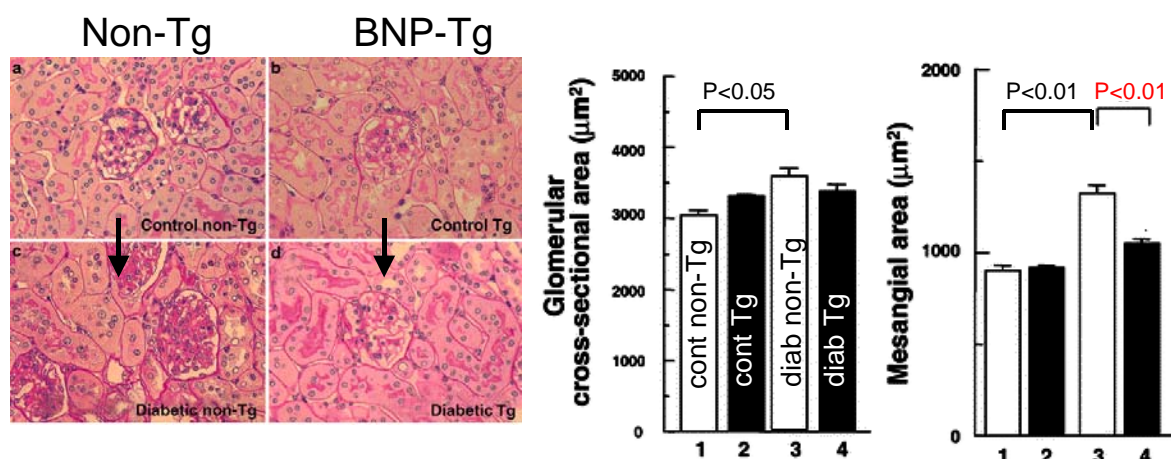
Ngal 蛋白の上皮細胞への直接作用を検討するために H-ras-transformed 4T1 mammary cells を Ngal 蛋白 50 μ g/ml の共存有り無しの状態が無血清培地により 48 時間静置し、その後 MAP キナーゼ刺激のために 10%牛血清により 20 分間処理した。

3. 研究結果

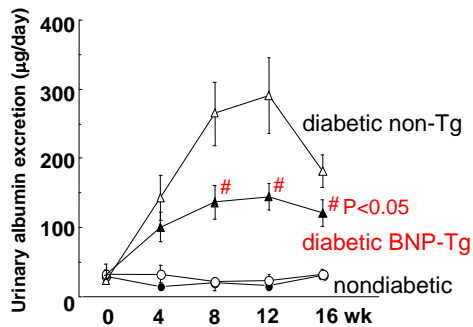
BNP-Tg マウスおよびコントロールマウスに STZ を投与し糖尿病を惹起した。16 週間後の時点で、コントロールマウスではメサンギウム領域が 30%拡大したが、BNP-Tg マウスでは拡大が抑制されており、糸球体断面積についても同様の傾向を認めた(図 1)。以上のことから、BNP-Tg マウスでは、糖尿病による腎組織病変が軽度に留まることが明らかとなった。

コントロールマウスについては、糖尿病誘発 4・8・12 週後に徐々に尿中アルブミン排泄の増加を認めたが、BNP-Tg マウスではアルブミン排泄が 60%に抑制されていた(図 2)。

(図 1) BNP-Tg における糸球体肥大の抑制



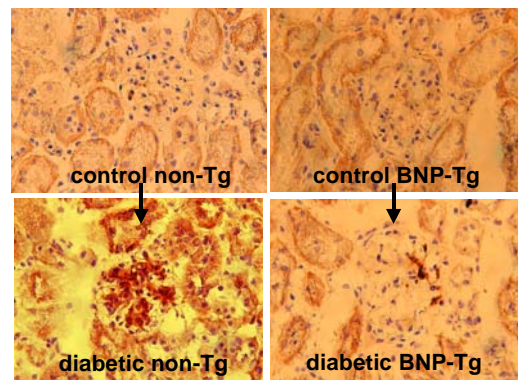
(図2) diabetic BNP-Tgにおける尿中アルブミン排泄の低下



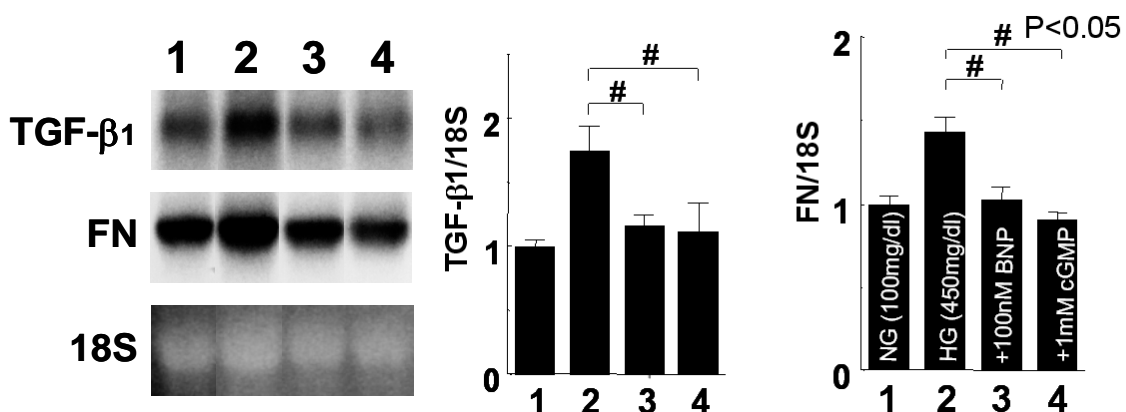
糖尿病性腎症の糸球体におけるメサンギウム領域の拡大については TGF-βが重要な役割を果たすことが知られているため¹¹、BNP-Tg マウスにおける TGF-βの発現について検討した。コントロールマウスでは STZ 投与 16 週間後に糸球体内とくにメサンギウム領域に TGF-β蛋白の強い発現を認めたが、BNP-Tg マウスでは発現亢進が抑制されていた(図3)。遺伝子発現のレベルでも腎内の TGF-β mRNA 発現はコントロールマウスの糖尿病で 3.7 倍に亢進していたが、BNP-Tg マウスでは増加が 50%に抑制されていた。メサンギウム基質のひとつである collagen IV (α1 chain)の腎内遺伝子発現についても同様の結果であった。

高グルコース濃度およびBNPの、細胞への直接作用を明らかにするために、ラットから樹立した培養メサンギウム細胞を用いた解析を行った。normal glucose (NG, 100 mg/dl)に比べて、hi glucose (HG, 450 mg/dl)でメサンギウム細胞を培養すると TGF-β mRNA レベルが 1.7 倍、腎病変で重要な細胞外マトリックスである fibronectin (FN) mRNA レベルが 1.4 倍に増加したが、100 nM BNPあるいはその細胞膜透過型セカンドメッセンジャーである 1 mM 8-bromo-cGMP で 24 時間刺激すると、TGF-βの発現レベルは normal glucose のレベルに回復した(図4)。

(図3) diabetic BNP-Tgにおける TGF-βの発現亢進



(図4) High Glucose 培養条件メサンギウム細胞での TGF-β、FN 遺伝子発現



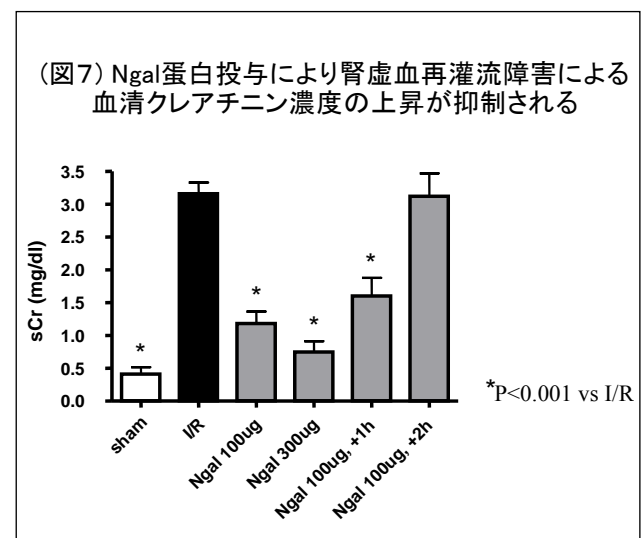
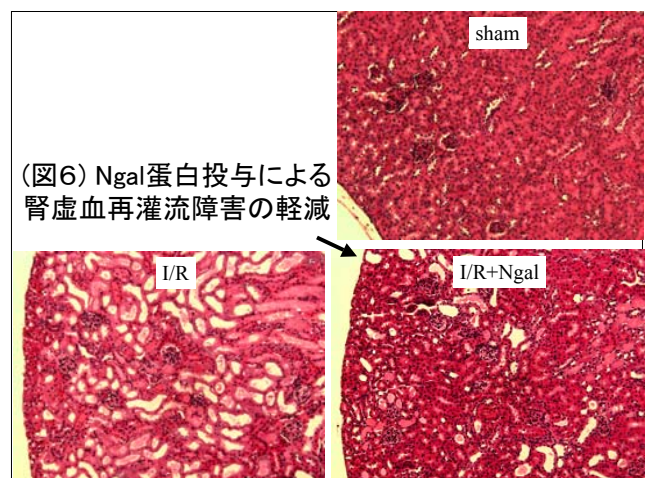
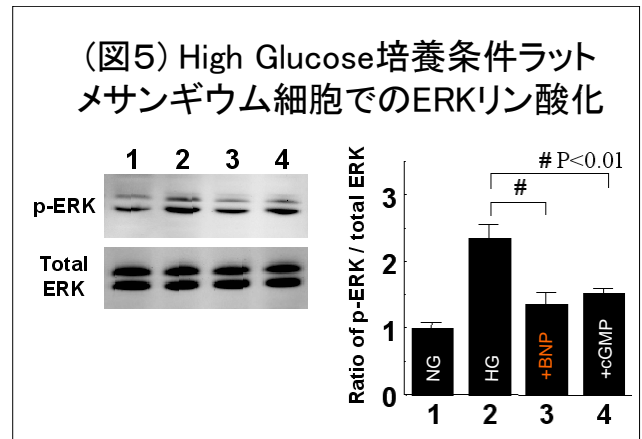
高グルコース濃度あるいは TGF- β により活性化を受けた細胞では、mitogen-activated kinase (MAP キナーゼ) の中でも特に extracellular signal-regulated kinase (ERK) の活性化、リン酸化がしばしば見られるので、その点について検討を行った。メサンギウム細胞を HG により刺激すると ERK のリン酸化が 2.3 倍に増加したが、BNP あるいは 8-bromo-cGMP でさらに処理をするとリン酸化のレベルは NG のレベルまで低下した(図5)。また diabetic BNP-Tg マウスでは、diabetic non-Tg マウスに比して腎臓内 ERK のリン酸化が 30%抑制されていた。

以上のことから、BNP の慢性過剰状態は糖尿病性腎症の進行を軽減すること、そのメカニズムとして TGF- β の発現抑制、その下流の ERK のリン酸化抑制、FN \cdot collagen IV (α 1)の発現誘導抑制が関わっているものと考えられた。

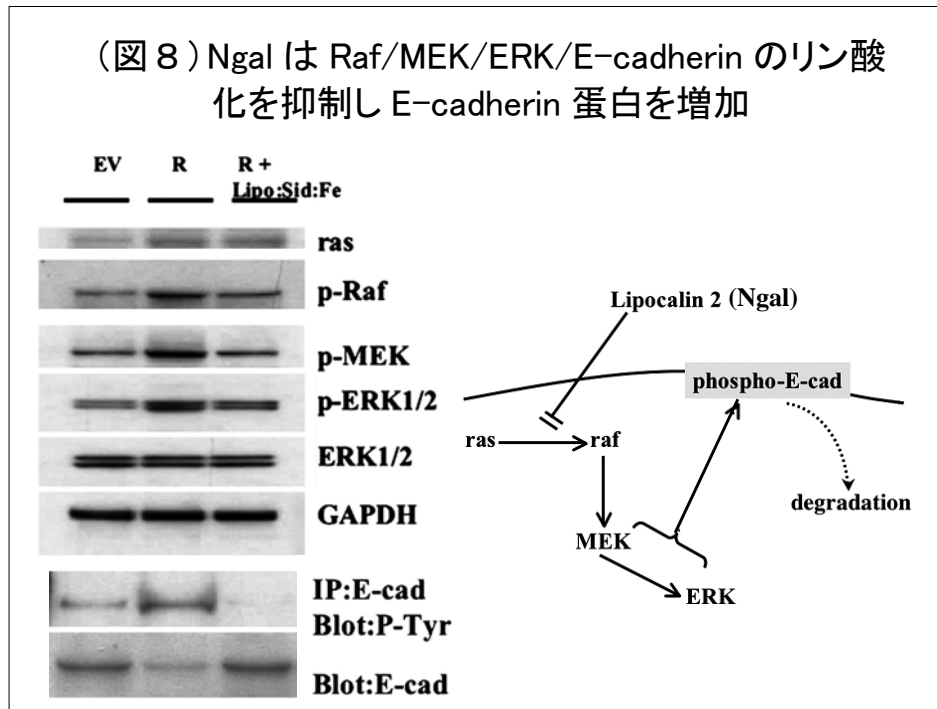
マウスにおいて腎虚血再灌流障害(I/R)を惹起し 24 時間後に評価すると、腎組織像では尿細管管腔の拡大、尿細管上皮細胞の核の融解、円柱形成などの強い組織破壊を認め、腎障害のマーカーである血清クレアチニンの著しい増加を認めたが、Ngal 蛋白を前投与あるいは再灌流1時間後に投与した場合には腎障害が軽微であった(図6, 7)。Ngal 蛋白の上皮細胞への直接作用を検討したところ、MAP キナーゼのうち特に Raf-MEK-ERK の経路のリン酸化の抑制を介して、上皮マーカー E-cadherin 蛋白の安定化を生じて、最終的には上皮形質を強化することが明らかとなった(図8, ハーバード大学花井順一博士との共同研究)。

4. 考 察

現在までに、マウスやラットにおける腎障害に対して growth factor、抗アポトーシス剤、抗酸化ストレス剤など何十種類もの蛋白・薬剤の投与により腎障害を予防できることが繰り返し報告されているが、ヒトにおける有用性はいまだ確立されておらず、新しい治療法の開発が望まれている。BNP は心不全に対して米国ですでに臨床応用されており、血圧低下以外の副作用は知られていない安全性の高い薬である。Ngal はまだ臨床応用されていないが、今回示したように腎虚血再灌流障害において、再灌流1時間後であっても腎障害軽減効果があるため、腎障害の発症、診断がまず先行して治療が開始される臨床の状況でも有効な可能性を秘めている。本研究では、以上のような臨床的優位性・利点をもった BNP、Ngal に関して腎障害



(図8) Ngal は Raf/MEK/ERK/E-cadherin のリン酸化を抑制し E-cadherin 蛋白を増加



に対する効果を検討した。

モデルとしては BNP に関してはインスリン欠乏に伴う糖尿病性腎症、Ngal に関しては腎虚血再灌流障害のモデルを用いた結果、両者において著しい腎保護効果を認めた。また各薬剤の作用機構を明らかにするために、各モデルの病変の主座と考えられている細胞での検討を行った。その結果、BNP は高グルコース濃度刺激によるメサンギウム細胞での TGF- β 、fibronectin の発現誘導、メサンギウム基質の増加などに対して抑制的に作用すると考えられた。一方 Ngal は上皮細胞への直接作用により、上皮マーカー E-cadherin 蛋白の安定化、上皮形質の強化により腎保護効果を示すと考えられた。さらに BNP 及び Ngal の両者に共通の細胞内シグナルとして、MAP キナーゼのひとつである ERK のリン酸化抑制が含まれていることが明らかとなった。

5. 今後の課題

今回使用した BNP-Tg マウスでは、脊椎、尾などの長管骨の伸長が観察されるが、これは CNP に特異的な guanylate cyclase (GC)-B 受容体へ BNP が交差反応するためであると考えられている¹²。一方、GC-A が ANP、BNP 特異的な受容体である¹²。ラットの腎炎に対して CNP 投与により改善が見られたとの報告もあることから¹³、BNP で見られた腎保護効果が主に GC-A、GC-B のいずれを介

するものであるかを明らかにする必要がある。これは、ANP および CNP 過剰発現マウス(当科にて作製済)、GC-A 及び GC-B 欠損マウスを用いた解析により明らかにすることができる。また、実際の臨床では疾病の発症、診断の後に始めて治療開始可能となることから、マウスモデルを用いて、疾患発症後にナトリウム利尿ペプチドの投与を開始した場合の治療効果を評価する必要がある。ひとつの方法は核内受容体アゴニストを用いた薬剤誘導性トランスジェニックマウスの開発であろう¹⁴。

参考文献

1. Nakao K, Itoh H, Saito Y, Mukoyama M, Ogawa Y. The natriuretic peptide family. **Curr Opin Nephrol Hypertens** 5: 4-11, 1996.
2. Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. **Endocr Rev** 27: 47-72, 2006.
3. Yandle TG, Richards AM, Gilbert A, Fisher S, Holmes S, Espiner EA. Assay of brain natriuretic peptide (BNP) in human plasma: evidence for high molecular weight BNP as a major plasma component in heart failure. **J Clin Endocrinol Metab** 76: 832-838, 1993.
4. Allgren RL, Marbury TC, Rahman SN, Weisberg LS,

- Fenves AZ, Lafayette RA, Sweet RM, Genter FC, Kurnik BR, Conger JD, Sayegh MH. Anaritide in acute tubular necrosis. Auriculin Anaritide Acute Renal Failure Study Group. **N Engl J Med** 336: 828-834, 1997.
5. Riter HG, Redfield MM, Burnett JC, Chen HH. Nonhypotensive low-dose nesiritide has differential renal effects compared with standard-dose nesiritide in patients with acute decompensated heart failure and renal dysfunction. **J Am Coll Cardiol** 47: 2334-2335, 2006.
6. Ogawa Y, Itoh H, Tamura N, Suga S, Yoshimasa T, Uehira M, Matsuda S, Shiono S, Nishimoto H, Nakao K. 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.
7. Kasahara M, Mukoyama M, Sugawara A, Makino H, Suganami T, Ogawa Y, Nakagawa M, Yahata K, Goto M, Ishibashi R, Tamura N, Tanaka I, Nakao K. Ameliorated glomerular injury in mice overexpressing brain natriuretic peptide with renal ablation. **J Am Soc Nephrol** 11:1691-1701, 2000.
8. Suganami T, Mukoyama M, Sugawara A, Mori K, Nagae T, Kasahara M, Yahata K, Makino H, Fujinaga Y, Ogawa Y, Tanaka I, Nakao K. Overexpression of brain natriuretic peptide in mice ameliorates immune-mediated renal injury. **J Am Soc Nephrol** 12: 2652-2663, 2001.
9. Yang J, Goetz D, Li JY, Wang W, Mori K, Setlik D, Du T, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Strong R, Barasch J. An iron delivery pathway mediated by a lipocalin. **Mol Cell** 10: 1045-1056, 2002.
10. Suganami T, Mukoyama M, Mori K, Yokoi H, Koshikawa M, Sawai K, Hidaka S, Ebihara K, Tanaka T, Sugawara A, Kawachi H, Vinson C, Ogawa Y, Nakao K. Prevention and reversal of renal injury by leptin in a new mouse model of diabetic nephropathy. **FASEB J** 19: 127-129, 2005.
11. Ziyadeh FN, Hoffman BB, Han DC, Iglesias-De La Cruz MC, Hong SW, Isono M, Chen S, McGowan TA, Sharma K. Long-term prevention of renal insufficiency, excess matrix gene expression, and glomerular mesangial matrix expansion by treatment with monoclonal antitransforming growth factor-beta antibody in db/db diabetic mice. **Proc Natl Acad Sci U S A** 97: 8015-8020, 2000.
12. Suda M, Ogawa Y, Tanaka K, Tamura N, Yasoda A, Takigawa T, Uehira M, Nishimoto H, Itoh H, Saito Y, Shiota K, Nakao K. Skeletal overgrowth in transgenic mice that overexpress brain natriuretic peptide. **Proc Natl Acad Sci U S A** 95: 2337-2342, 1998.
13. Cnaan-Kuhl S, Ostendorf T, Zander K, Koch KM, Floege J. C-type natriuretic peptide inhibits mesangial cell proliferation and matrix accumulation in vivo. **Kidney Int** 53: 1143-1151, 1998.
14. Wang Y, DeMayo FJ, Tsai SY, O'Malley BW. Ligand-inducible and liver-specific target gene expression in transgenic mice. **Nat Biotechnol** 15: 239-243, 1997.

No. 0645

Development of New Therapy for Renal Disorders and Investigation of the Molecular Mechanism by Natriuretic Peptides and a Novel Endocrine Factor Ngal

Kiyoshi Mori¹, Hideki Yokoi¹, Masao Koshikawa¹, Tetsuro Yoshioka¹ and Hisashi Makino²

¹Department of Medicine and Clinical Science, Kyoto University Graduate School of Medicine;

²Department of Atherosclerosis and Diabetes, National Cardiovascular Center Research Institute

Summary

The Natriuretic Peptide Superfamily consists of atrial, brain, and C-type natriuretic peptides (ANP, BNP, and CNP). ANP and BNP possess potent hypotensive and natriuretic activities. Circulating ANP and BNP levels are increased in various renal disorders, but their role in the progression of renal damage remains elusive. In our department, we have established transgenic mice overexpressing BNP specifically in the liver (BNP-Tg mice), and reported that chronic excess of BNP in the circulation ameliorates renal damage caused by subtotal nephrectomy and autoimmune-mediated glomerulonephritis. In the present study, we investigated the effects of BNP upon diabetic nephropathy using BNP-Tg mice. Furthermore, we examined the effects of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (Ngal), which is a novel kidney differentiation factor. The molecular mechanism of BNP and Ngal actions was also studied.

Induction of diabetes by streptozotocin in wild-type mice resulted in glomerular hypertrophy, expansion of mesangial area, and increased albuminuria. These changes were diminished in BNP-Tg mice. In cultured rat mesangial cells, high glucose stimulated gene expression of matrix protein fibronectin and its potent inducer transforming growth factor- β , which were all cancelled with co-treatment with BNP. Renal ischemia-reperfusion injury causes histological injury of the kidney, concomitantly with functional impairment shown by accumulation of creatinine in the blood. Pretreatment of mice with Ngal potently suppressed these damages. Both BNP and Ngal inhibited phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase *in vitro*, suggesting the involvement of mitogen-activated kinases in the subcellular actions of BNP and Ngal.

The present study opens a possibility for the development of new tools for the treatment of renal disorders.