

ナトリウム利尿ペプチド系の心臓保護機序

岸本 一郎 徳留 健 寒川 賢治

要 旨：心房性ナトリウム利尿ペプチドが発見されてから20年以上が経過し、ナトリウム利尿ペプチドを応用した臨床心不全診断法・治療法が確立されてきた。一方で、近年の発生工学的手法を用いて作製されたナトリウム利尿ペプチド関連遺伝子改変動物を用いた研究から、内因性ナトリウム利尿ペプチドの生理的・病態生理的役割が明らかになってきている。また、ヒト遺伝子多型解析よりナトリウム利尿ペプチド系遺伝子と高血圧・心肥大の関係が示唆されている。

(J Jpn Coll Angiol, 2009, 49: 293-297)

Key words: atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, guanylyl cyclase-A receptor, cardiac remodeling, cardiac hypertrophy

はじめに

ナトリウム利尿ペプチドファミリーは、分子内環状構造を有する少なくとも3種のペプチド[心房性(ANP)、脳性(BNP)およびC型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)]からなる。これらはguanylyl cyclase(GC)活性を有する機能的受容体に結合し、cyclic GMP産生を介して種々の作用を発揮するが、このうちANP、BNPはGC-A受容体[A型ナトリウム利尿ペプチド受容体(NPR-A)とも呼ばれる]に、CNPはGC-B受容体にそれぞれ結合する。これまでの研究で、ANP、BNPはそれぞれ主に心房、心室の心筋細胞で産生・分泌され、血管、腎臓や副腎を標的臓器として血管拡張、ナトリウム利尿、アルドステロン分泌抑制作用などをもたらす循環ホルモンとして機能することが明らかにされている。これら心臓由来ナトリウム利尿ペプチドの受容体(GC-A)は心臓にも発現していることが知られており、ANP、BNPの全身作用(降圧、利尿作用)とは独立した心臓局所での作用が注目されている。本稿では、ナトリウム利尿ペプチドの心臓局所作用を中心にわれわれの最近の成績を含めて紹介する。

GC-A遺伝子欠損動物の解析から得られた知見

前述のようにGC-Aは、ANPとBNPの共通の受容体であり、これを欠損した動物を解析することによりANPとBNPの両方の情報伝達系の成体における意義が解明できる。そこでわれわれはGC-A遺伝子欠損マウスを作製しその心血管表現型を解析した。すでにANP遺伝子欠損マウスにおける血圧上昇が報告されていたため、われわれもGC-A遺伝子欠損マウスの血圧を測定したところ、GC-A欠損マウスの収縮期血圧は、野生型と比べ約30mmHg上昇していた¹⁾。この血圧上昇は高食塩下でも増加しなかったため、食塩非感受性高血圧のモデルと考えられる。このことより内因性GC-A活性が基礎血圧を規定する重要な因子であることが証明された。次に、内因性ナトリウム利尿ペプチド系の体液量調節における意義を明らかにするため、体液量増加に対する利尿反応をGC-A欠損マウスと対照マウスで検討した²⁾。野生型マウスに乳酸加リンゲル液を静脈内投与すると、著明な利尿・ナトリウム利尿反応を認めるが、GC-A欠損マウスでは、この急性水利尿・ナトリウム利尿がほとんど認められなかった。よって内因性GC-Aが急性の体液量増加に対する尿量調節に必須であることが証明された。さら

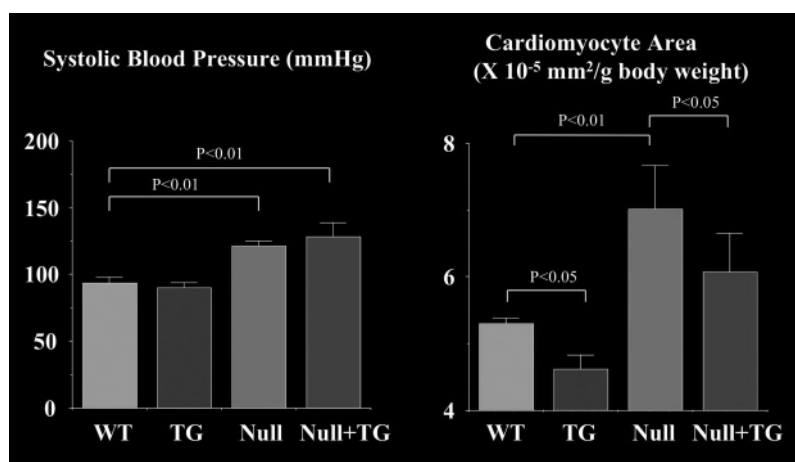


Figure 1 Systolic blood pressure (A) and cardiomyocyte area (B) of wild type (WT), cardiomyocyte-specific overexpression of GC-A (TG), GC-A null mice (Null), and cardiomyocyte-selective expression of GC-A (Null + TG). Transgenic expression of GC-A in the cardiac myocyte significantly reduces cardiac hypertrophy both in wild type and in GC-A null background, while it did not alter systolic blood pressure. Adopted from reference #3.

に、GC-A欠損マウスでは、心重量/体重量比が野生型の約160%と著明な心肥大を認め、著明な心臓線維化も認められた。これらの心臓肥大・線維化の程度は、血圧上昇の程度に比較して著しいものであった。

心臓局所における ナトリウム利尿ペプチド系の意義

GC-A欠損マウスの心肥大はその血圧上昇に比較して著明であることから、内因性ANP・BNPは、GC-Aを介した心臓局所での直接作用によって心肥大を抑制している可能性が考えられた。そこでGC-Aの直接的な心臓リモデリングに対する影響を検討する目的で、心臓のみにGC-Aを過剰発現させたトランスジェニックマウスを作製し解析したところ、このマウスの心重量は野生型よりも有意に小さくなっていった³⁾。さらにGC-A欠損マウスとかけ合わせるにより、心筋細胞のみにGC-Aを発現したマウスを作製した。するとこのマウスでは血圧は高値のままであったが、心筋細胞面積はGC-A欠損マウスよりも縮小していた(**Fig. 1**)。これらの結果より、内因性ANP・BNPは心筋細胞GC-Aを直接刺激することにより心筋肥大を抑制していると考えられた。

次にわれわれは心臓リモデリングの重要な液性因子系であるアンジオテンシン系の関与を調べた。浸透圧ミ

ニポンプを用いてGC-A欠損マウスに血圧を上げない量(sub-pressor dose)のアンジオテンシンIIを2週間投与したところ、その心肥大は明らかに増悪していた⁴⁾。一方で野生型の心重量・体重量比はアンジオテンシンII投与前後で変わらなかったため、GC-A欠損マウスではアンジオテンシンIIに対する心肥大反応性が亢進していることが考えられた。この結果より、内因性GC-Aを介する情報伝達系がアンジオテンシンII作用と拮抗していることが示唆された。

ナトリウム利尿ペプチド系による calcineurin系抑制

前述のようにGC-A欠損マウスを用いた検討により、心筋細胞・心臓線維芽細胞のGC-Aが直接心肥大・心臓線維化を抑制していること、その効果の少なくとも一部はアンジオテンシン系シグナルの抑制によることが示唆された。さらに、そのメカニズムの詳細を検討する目的でわれわれは、DNAマイクロアレイを用いてGC-A欠損マウスの肥大心と野生型の心臓とのRNA発現プロファイルの相違を検討したところ、MCIP1(modulatory calcineurin-interacting protein1)という遺伝子の発現がGC-A欠損マウスの心臓で亢進していることを見出した。MCIP1は、calcineurinの活性化に伴ってその発現が亢進すること

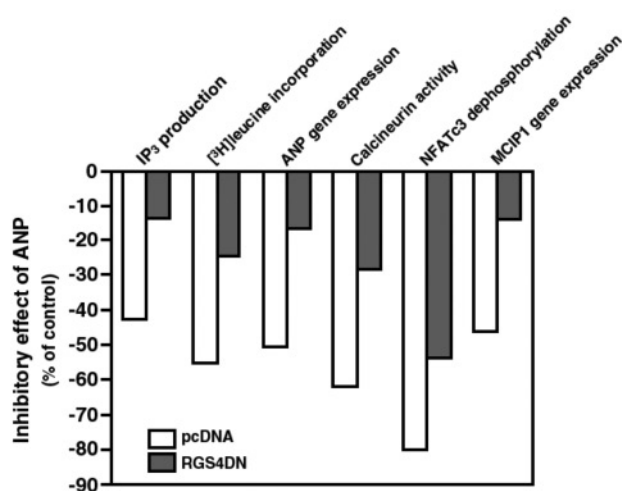


Figure 2 Percentage changes in IP₃ production, [³H] leucine incorporation, ANP gene expression, calcineurin activity, NFATc3 dephosphorylation, and MCIP1 gene expression induced by treatment of ANP, in cells transfected with empty vector (pcDNA), or overexpressing dominant negative RGS4 (RGS4DN). Adopted from reference #6.

が知られていたため、次にcalcineurin系に及ぼす内因性 ANP・BNPの効果に着目した。Ca²⁺/calmodulin依存性脱リン酸化酵素であるcalcineurinは心臓を含む多くの細胞に存在し、心肥大の形成にも関与していることが報告されている。calcineurinの活性をGC-A欠損マウスの心臓で検討したところ、野生型に比較し有意に上昇していた⁵⁾。これらの結果より、アンジオテンシンIIやカテコラミンの刺激でcalcineurin系の細胞内シグナル伝達が亢進し、心肥大関連遺伝子プログラムが活性化するとANP・BNPの発現も亢進し、その受容体であるGC-Aの刺激を介してcalcineurinの活性を抑制するという、心肥大に対するオートクライン的な局所ネガティブフィードバック機構の存在が考えられた。

ナトリウム利尿ペプチド系による心臓リモデリング抑制の分子機序

それでは、ANP・BNPはどのようにしてcalcineurin系の心肥大促進シグナルを抑制しているのでしょうか？近年、Gタンパクシグナル伝達系の新たな調節因子として、一連のregulator of G-protein signaling(RGS)の存在が明らかにされている。Gタンパクは α 、 β 、 γ サブユニットから成るヘテロ三量体であるが、アゴニストがGタンパクと共役する受容体に結合するとG α からGDPが放出さ

れGTPが結合し、G α は活性型となる。G α には結合したGTPをその分子上でGDPに加水分解する酵素(GTPase)活性が存在するが、RGSはGTP結合型G α に結合し、GTPaseを活性化してG α を不活性型へ復帰させる反応を著しく促進する。現在までにRGSは30種類以上が報告されているが、心臓での発現が多いのはRGS2、RGS4である。われわれは免疫組織染色でRGS2とRGS4の野生型マウス心臓における発現を検討したところ、RGS2は冠動脈平滑筋に多く発現していたが、心筋での発現は比較的少なかった。他方RGS4は心筋に多く発現しており、冠動脈にはほとんど発現がみられなかった。また、RGS2欠損マウスは野生型に比較し約20mmHg血圧が上昇しているにも関わらず心肥大は報告されていないことから、われわれはRGS4に焦点を絞って検討することにした。ANPの心肥大抑制効果におけるRGS4の意義について検討するため、RGS4の優性変異体(dominant negative)を用いた実験を行った結果、RGS4の優性変異体遺伝子を導入した培養心筋細胞においては、ANPによる心肥大抑制効果、およびcalcineurin系抑制効果が減退することが確認され(Fig. 2)、ANPの心肥大抑制効果におけるRGS4の重要性が示唆された⁶⁾。続いてわれわれはGC-A欠損マウスの心臓におけるRGS4リン酸化の程度を野生型と比較したところ、GC-A欠損マウスの心臓においては、RGS4

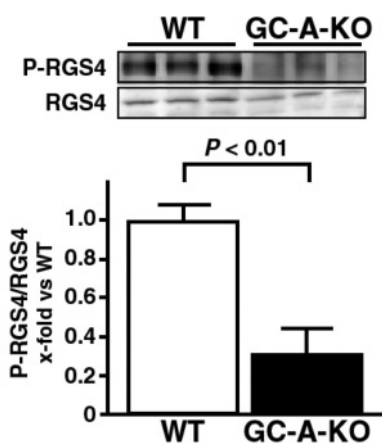


Figure 3 Detection of phosphorylated RGS4 and total RGS4 in hearts from wild type (WT) and GC-A deficient mice. Top: Images of western blots. Bottom: RGS4 phosphorylation ratio relative to WT. n = 3 animals per group. Values are expressed as means \pm SEM. Adopted from reference #6.

タンパクのリン酸化率は、野生型の約30%であった(Fig. 3)。これらの結果から、われわれはGC-A欠損マウスの心臓においてはANP・BNPの作用消失に伴うRGS4の発現および機能低下が存在し、その結果Gタンパクシグナルに対するブレーキが弱まり、下流に存在するcalcineurin系の過剰な活性化が引き起こされた結果、肥大が生じるのではないかと仮説を立てた。

RGS4遺伝子過剰発現による心肥大抑制

この仮説を証明するため、われわれはGC-A欠損マウスに心臓特異的にRGS4を補充することで心肥大が退縮するかどうか検討した⁶⁾。具体的には α -MHCプロモーターを用いて心臓特異的RGS4過剰発現マウスを作製し、GC-A欠損マウスとかけ合わせた。RGS4過剰発現マウスには特に目立った異常はなかったが、GC-A欠損マウスとかけ合わせることにより、GC-A欠損マウスの心肥大・心拡大が明らかに退縮した(Fig. 4)。さらにGC-A欠損マウスの心臓におけるcalcineurin系の過剰な活性化が有意に抑制された。なお、心収縮能、血圧、心拍数はかけ合わせによって影響を受けなかった。

ナトリウム利尿ペプチド系遺伝子多型とヒト高血圧・心肥大の関連

すでに述べたように内因性GC-A活性の増減が血圧・

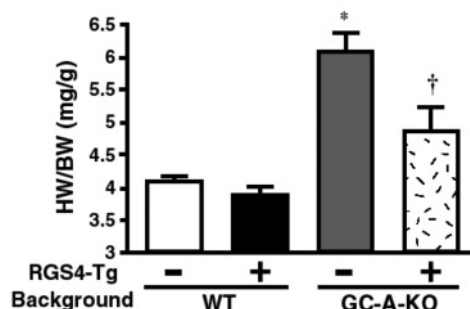


Figure 4 Transgenic RGS4 overproduction in cardiac myocytes (RGS4-Tg) significantly decreased heart-to-body weight ratio (HW/BW) in GC-A null (GC-A-KO) background but not in wild type (WT) background.

n = 8 animals per group. Adopted from reference #6.

*: p < 0.05 vs. WT

†: p < 0.05 vs. GC-A-KO

心臓リモデリングを規定する重要な因子であることが動物実験により確認され、ヒト高血圧や心肥大におけるGC-A遺伝子とその活性解析が注目されてきた。中山らは高血圧患者と正常血圧者各200人のGC-A 5'転写調節領域の遺伝子多型を検索し翻訳開始コドンより上流-60から-70塩基の部位に8塩基の欠損変異が高血圧患者の8人に認められることを報告している⁷⁾。正常血圧者では一人のみに変異が存在したが、心肥大を認めたという。in vitroの実験ではこの部の欠損で転写活性が著明に低下しており、実際にin vivoでもGC-A活性が低下している可能性が高く、興味深い結果と思われる。さらにナトリウム利尿ペプチド系遺伝子多型と心臓形態との関連を約200人の高血圧患者を対象に検討した報告では、ANPとGC-Aの遺伝子多型が有意に心臓肥大と相関していた⁸⁾。われわれも日本人高血圧患者と正常血圧対照群各170名におけるGC-A遺伝子プロモータ領域の多型を解析し、翻訳開始点から-293塩基上流のCT繰り返し多型と高血圧との有意な相関を見出した⁹⁾。有意ではなかったが、左室肥大もこの多型を有する対象に多い傾向を認めた。これらの事実より、これらのナトリウム利尿ペプチド系遺伝子多型を有するヒトでは、高血圧・心肥大が起こりやすいことが示唆されている。

まとめ

上述したようにGC-Aを介する情報伝達系が心臓リモデリング抑制に重要な役割を担うことが明らかとなって

いる。GC-Aが心臓局所で心肥大・心線維化を抑制している事実は、その発見以来循環ホルモンとして注目されてきたナトリウム利尿ペプチド(ANP, BNP)が心臓局所因子としても作用していることを示唆しており、内因性のナトリウム利尿ペプチド系の生理的意義の理解とともに、ANPやBNPを用いた心不全の治療に新しい視点を与えるものである。また高血圧・心肥大の遺伝的素因診断としてGC-A遺伝子多型解析の有用性も示唆される。さらに今後この分野における研究が進展し、新たな診断・治療法の開発につながっていくことを期待したい。

文 献

- 1) Lopez MJ, Wong SK, Kishimoto I et al: Salt-resistant hypertension in mice lacking the guanylyl cyclase-A receptor for atrial natriuretic peptide. *Nature*, 1995, **378**: 65–68.
- 2) Kishimoto I, Dubois SK, Garbers DL: The heart communicates with the kidney exclusively through the guanylyl cyclase-A receptor: acute handling of sodium and water in response to volume expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, **93**: 6215–6219.
- 3) Kishimoto I, Rossi K, Garbers DL: A genetic model provides evidence that the receptor for atrial natriuretic peptide (guanylyl cyclase-A) inhibits cardiac ventricular myocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, **98**: 2703–2706.
- 4) Li Y, Kishimoto I, Saito Y et al: Guanylyl cyclase-A inhibits angiotensin II type 1A receptor-mediated cardiac remodeling, an endogenous protective mechanism in the heart. *Circulation*, 2002, **106**: 1722–1728.
- 5) Tokudome T, Horio T, Kishimoto I et al: Calcineurin-nuclear factor of activated T cells pathway-dependent cardiac remodeling in mice deficient in guanylyl cyclase A, a receptor for atrial and brain natriuretic peptides. *Circulation*, 2005, **111**: 3095–3104.
- 6) Tokudome T, Kishimoto I, Horio T et al: Regulator of G-protein signaling subtype 4 mediates antihypertrophic effect of locally secreted natriuretic peptides in the heart. *Circulation*, 2008, **117**: 2329–2339.
- 7) Nakayama T, Soma M, Takahashi Y et al: Functional deletion mutation of the 5'-flanking region of type A human natriuretic peptide receptor gene and its association with essential hypertension and left ventricular hypertrophy in the Japanese. *Circ Res*, 2000, **86**: 841–845.
- 8) Rubattu S, Bigatti G, Evangelista A et al: Association of atrial natriuretic peptide and type a natriuretic peptide receptor gene polymorphisms with left ventricular mass in human essential hypertension. *J Am Coll Cardiol*, 2006, **48**: 499–505.
- 9) Usami S, Kishimoto I, Saito Y et al: Association of CT dinucleotide repeat polymorphism in the 5'-flanking region of the guanylyl cyclase (GC)-A gene with essential hypertension in the Japanese. *Hypertens Res*, 2008, **31**: 89–96.

Molecular Mechanism of Cardioprotection by Local Natriuretic Peptide System

Ichiro Kishimoto, Takeshi Tokudome, and Kenji Kangawa

Department of Biochemistry, National Cardiovascular Center, Research Institute, Osaka, Japan

Key words: atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, guanylyl cyclase-A receptor, cardiac remodeling, cardiac hypertrophy

Mice deficient for GC-A, a receptor for atrial and brain natriuretic peptides (ANP and BNP), display marked cardiac remodeling, which is enhanced in a blood pressure-independent manner and is suppressed by cardiomyocyte-specific overexpression of GC-A gene, suggesting that cardiac GC-A plays an important role in protecting the heart. In addition, we have recently shown that regulator of G protein signaling 4 (RGS4) is involved in the GC-A-mediated inhibition of G α q-coupled signaling. Furthermore, we and other groups have demonstrated that polymorphisms in the human GC-A gene are associated with essential hypertension and cardiac hypertrophy. Therefore, it is suggested that cardiac GC-A protects the heart through RGS4-mediated inhibition of G α q-coupled hypertrophic signaling and that people carrying certain polymorphisms of the GC-A gene are more susceptible to cardiac remodeling and hypertension. (*J Jpn Coll Angiol*, 2009, **49**: 293–297)

Online publication October 6, 2009