

内因性ナトリウム利尿ペプチドの虚血組織血管新生における役割

徳留 健¹ 岸本 一郎² 寒川 賢治³

要 旨：内因性 ANP・BNP の虚血組織血管新生における役割は不明である。そこで我々は ANP・BNP の共通受容体である GC-A の遺伝子欠損マウス(GC-A-KO)に下肢虚血を作成し、野生型マウス(WT)との間で血流回復について比較検討を行った。結果、GC-A-KO では WT に比較し、著明に血流回復が阻害された。これは内因性 ANP・BNP が虚血組織血管新生において重要な役割を果たしていることを示すものである。
(J Jpn Coll Angiol, 2010, 50: 169-174)

Key words: atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, guanylyl cyclase-A, angiogenesis, ischemia

序 言

血管新生は創傷治癒に不可欠であり、vascular endothelial growth factor(VEGF)や内皮型 NO 合成酵素(eNOS)が血管新生における重要な molecule であることがこれまでの研究によって明らかにされた^{1,2)}。

一方、心房性・脳性ナトリウム利尿ペプチド(ANP・BNP)は心臓において産生・分泌されるホルモンであり、利尿・ナトリウム利尿・血管拡張などの生理作用を有する³⁾。また最近我々は ANP・BNP がオートクリン因子として心臓を過剰なりモデリングから保護していることを明らかにした^{4,5)}。さらに最近 ANP・BNP が血管新生作用を有することも明らかにされつつあるが⁶⁾、内因性の ANP・BNP が虚血組織における血管新生にどの程度関与しているかについては全く不明である。そこで我々は ANP・BNP の共通受容体である guanylyl-cyclase-A(GC-A)の遺伝子欠損マウスに下肢虚血モデルを作成し、野生型マウス(WT)との間で血流回復・血管新生について比較することにより、内因性 ANP・BNP の血管新生作用について検討することとした⁷⁾。

方法・結果

実験には 10 週齢 WT, および GC-A-KO を用いた。実験計画書は国立循環器病センター動物実験委員会によって承認を受けた。

既報の方法に準じて下肢虚血を作成後⁸⁾、4 週間経過を追った。Fig. 1A に示すように、4 週間後野生型マウスでは部分的な下肢脱落、小さな潰瘍を 2 匹のマウスに認めただけであったが、GC-A-KO では 6 匹のマウスに下肢の脱落もしくは重篤な潰瘍を認めた。また Fig. 1B に示すように、下肢脱落を認めなかった GC-A-KO においても血流回復は野生型に比較し顕著に遅れていた。Fig. 2A はレーザードプラ血流計を用いて計測した健側肢に対する患側肢の血流比を、横軸に時間経過をとって示したものである。次に我々は虚血組織における血管新生を、血管内皮および血管平滑筋に対する抗体を使った免疫組織染色にて評価した。Fig. 2B は血管内皮のマーカーである PECAM-1 に対する抗体で組織切片を染色したものであるが、GC-A-KO では WT に比べ、陽性染色面積が優位に少なかった。また連続切片で α -SMA に対する抗体で組織切片を染色したところ、GC-A-KO では WT に比べ、やはり陽性染色面積が優位に少なかった(Fig. 2C)。これらの結果から、GC-A-KO では下肢虚血組織における血管新生が低いレベルに抑えられていることがわかった。

¹国立循環器病センター研究所高血圧研究室

²国立循環器病センター研究所生化学部

³国立循環器病センター研究所

2009 年 9 月 24 日受付 2009 年 11 月 26 日受理

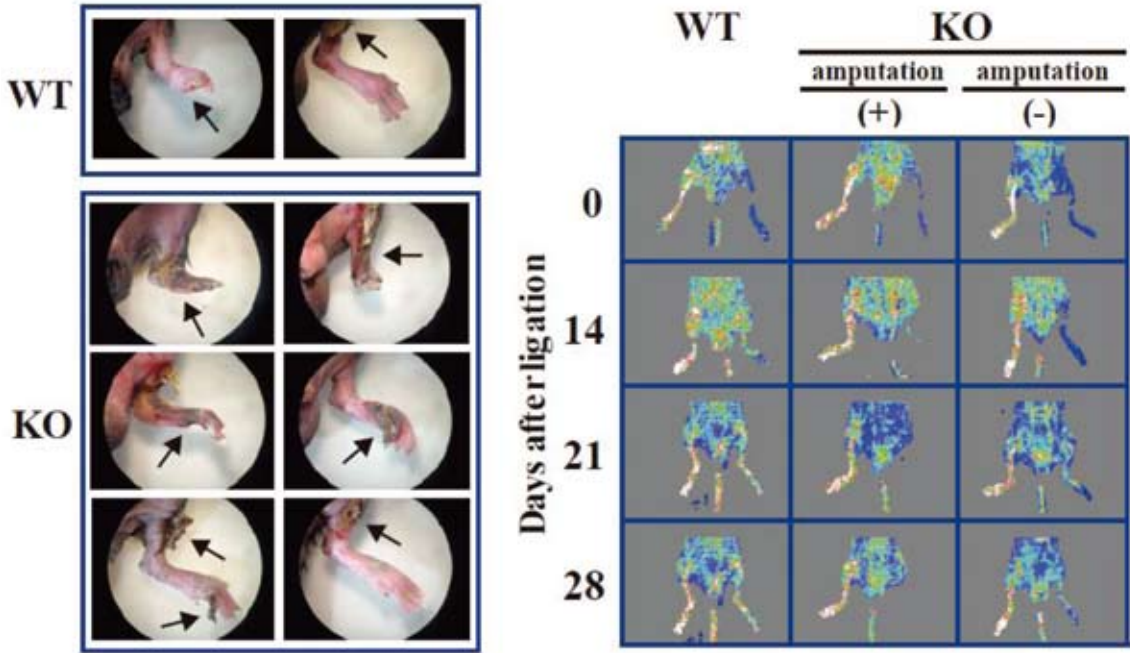


Figure 1 Contribution of GC-A-mediated signaling to vascular remodeling.
 A: Photographs obtained 28 days after operation in WT and GC-A-KO (KO) mice. Lesions are marked with arrows.
 B: Serial LDPI of hind-limb ischemia in WT and KO mice.
 Adopted from reference #7.

A | B

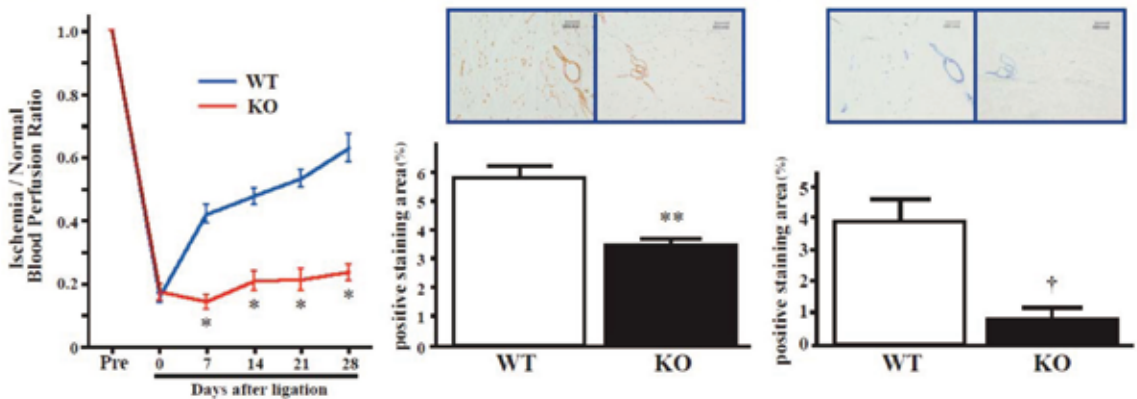


Figure 2 Serial quantitative analysis of the ischemic/normal hind-limb perfusion ratio in WT and GC-A-KO (KO) mice using LDPI. * $P < 0.05$ vs. WT. B-C, Immunostaining of ischemic hind-limbs using anti-PECAM-1 antibody (B) and anti- α -SMA antibody (C) on Day 28. Values are expressed as the means \pm SEM. ** $P < 0.0001$ vs. WT. † $P < 0.01$ vs. WT. Adopted from reference #7.

A | B | C

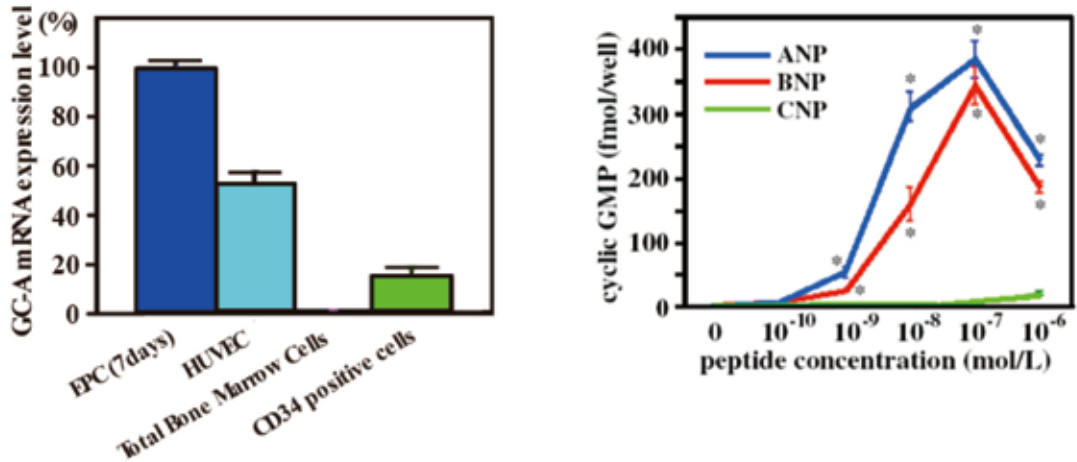


Figure 3 GC-A mRNA was abundantly expressed on EPCs.

A: Relative GC-A mRNA expression levels when defined expression level in 7 days cultured EPCs as 100 percent.

B: Results of radioimmunoassay of cyclic GMP. EPCs were stimulated for 15 minutes by various concentrations of ANP, BNP, and CNP.

* $P < 0.05$ vs. control. Values are expressed as the means \pm SEM

A | B

最近血管新生における骨髄由来血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cells; EPCs) の関与が明らかにされた⁹⁾。そこで我々は虚血組織局所に存在する GC-A、もしくは EPCs の GC-A のどちらがより本モデルにおける血管新生に寄与しているのかを調べることにした。まず我々は EPCs における GC-A 遺伝子の発現レベルを定量 PCR 法で検討した。その結果、末梢血単核球から 7 日間培養して分化させた EPCs においては、**Fig. 3A** に示すように培養臍帯静脈内皮細胞 (HUVECs) の約 2 倍多く GC-A 遺伝子が発現していることがわかった。また total bone marrow cells においては GC-A の発現はほとんど認めなかったが、CD34 陽性細胞においては HUVECs の 25% 程度の発現を認めた。また **Fig. 3B** に示すように、EPCs を ANP, BNP, CNP を刺激して、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 cyclic GMP 産生量を測定したところ、ANP・BNP の刺激では有意な産生増加を認め、EPCs に機能的 GC-A が存在することが証明された。また最近の我々の検討で、EPCs を ANP で刺激することにより、複数の内皮マーカー遺伝子の発現が有意に増加することもわかった (徳留ら、未発表データ)。次に我々は WT と GC-A-KO 間で骨髄移植を行った後に下肢虚血モデルを作成し、虚血組織局所の GC-A と EPCs の GC-A

の、血管新生における優越性について検討を行った。結果、**Fig. 4A** に示すように、WT のバックグラウンドにおいては KO の骨髄を WT に移植することによって血流回復の低下が認められたが、KO のバックグラウンドにおいては EPCs の血流回復に対する影響は認められなかった。これは局所 GC-A が、骨髄からリクルートされてきた EPCs に対し、定着や生存などに関する何らかの作用を及ぼしていることを示唆するデータであり、同時に局所 GC-A が EPCs の GC-A より、血管新生に関しては優越することを示すものである。

さらに我々は下肢虚血組織における GC-A 遺伝子発現の変化を調べた。その結果 **Fig. 4B** に示すように、術後 1 日では有意な発現増加は認めなかったが、術後 7 日で有意な発現増加を認めた (1.7 倍)。次に ANP が血管新生を促進するメカニズムの解析の一端として、現在までに報告されている重要な血管新生因子である eNOS, VEGF, および Angiopoietin2 の培養血管内皮細胞における遺伝子発現に与える ANP の影響を調べた。その結果、ANP 刺激が eNOS および VEGF の遺伝子発現をそれぞれ 2.1 倍、2.0 倍に有意に増加させることがわかった (**Fig. 4C**)。eNOS は Serine 1179 のリン酸化によって活性化されるが、ANP 刺激によるリン酸化の増強は認めな

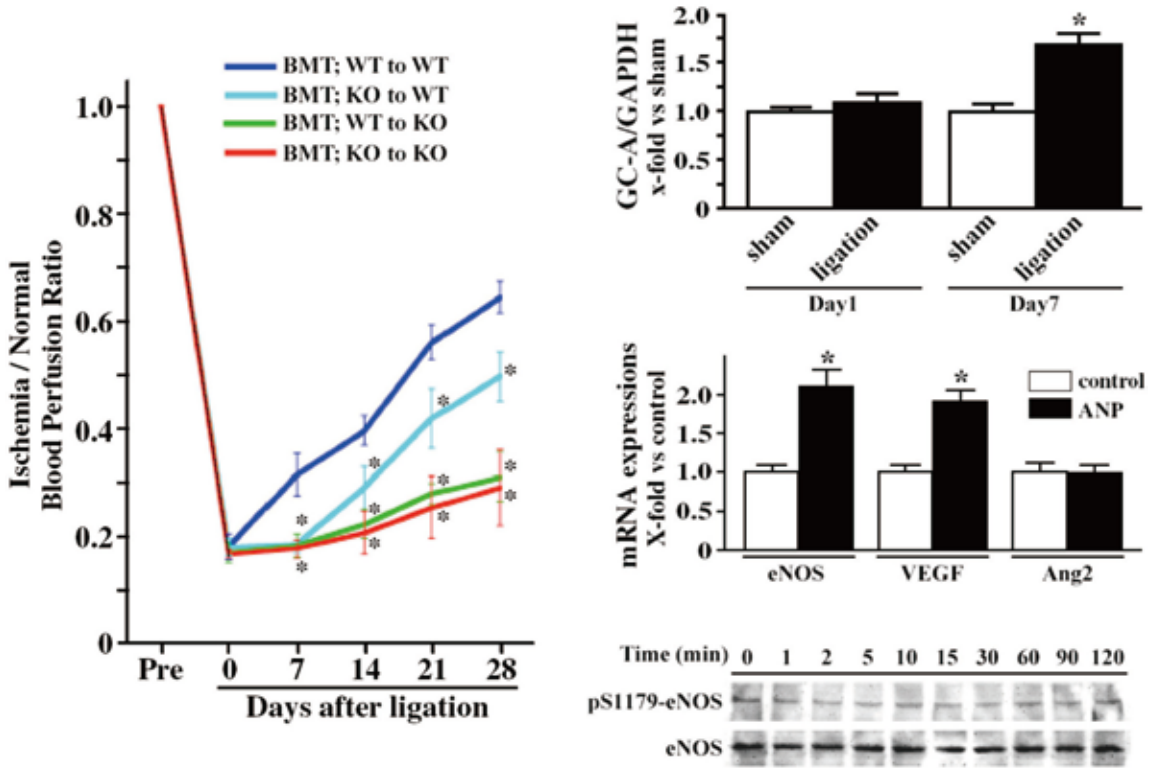


Figure 4

A: Serial quantitative analysis of ischemic/normal hind-limb perfusion ratio in WT and GC-A-KO (KO) mice using LDPI after BMT experiments. Values are expressed as the means \pm SEM. * $P < 0.05$ vs. BMT; WT to WT.

B: Effect of femoral artery ligation and excision on GC-A mRNA expression at Day-1 and Day-7 after operation in the femoral tissue in WT mice. Values are expressed as the means \pm SEM. * $P < 0.05$ vs. sham-operation group.

C: Effect of ANP (10⁻⁷ mol/L) treatment on eNOS, VEGF, and Angiopoietin2 (Ang2) mRNA expressions in HU-VECs. Cells starved for 12 hours in medium containing 0.5% FCS were stimulated ANP for 8 hours. Results are means \pm SEM of four independent assays. * $P < 0.05$ vs. control.

D: Effect of ANP (10⁻⁷ mol/L) treatment on eNOS phosphorylation in HUVECs. Cells starved for 12 hours in medium containing 0.5% FCS were stimulated with ANP (10⁻⁷ mol/L) for the time indicated at the top.

Adopted from reference #7.

A
B
C
D

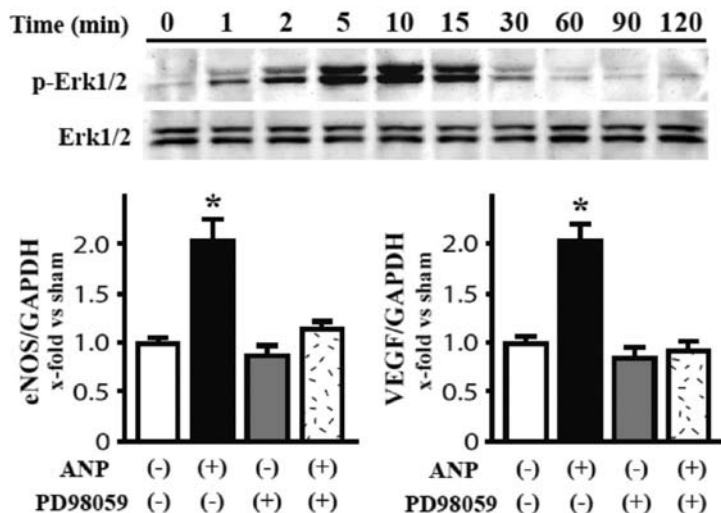
かった(Fig. 4D)。なお、培養血管内皮細胞を ANP で刺激すると顕著な ERK のリン酸化が観察されるが(Fig. 5A)、阻害剤(PD98059)を用いた実験により、この eNOS および VEGF の遺伝子発現増加は、ANP による ERK の活性化に依存していることがわかった(Fig. 5B, C)。

なお我々とほぼ同時期に、ドイツのグループからも内因性 ANP・BNP の血管新生における促進的役割が報告された¹⁰⁾。彼らの検討でも、GC-A 遺伝子完全欠損マウスでは、野生型マウスに比較し下肢虚血作成後の血流回復が有意に低下していた。さらに血管内皮細胞特異的に

GC-A 遺伝子を欠損させたマウスでも、野生型マウスに比較し下肢虚血作成後の血流回復は有意に低下していた。これらのデータは我々のデータと同様に、虚血組織局所の GC-A が血管新生において重要な役割を担っていることを示している。

おわりに

今回の我々の検討により、内因性 ANP・BNP が虚血組織における血管新生に大きく寄与していることが明らかとなった。現在 ANP は急性心不全治療薬として臨床



A
B | C

Figure 5

A: Effect of ANP (10^{-7} mol/L) treatment on Erk1/2 phosphorylation in HUVECs. Cells starved for 12 hours in medium containing 0.5% FCS were stimulated with ANP for the time indicated at the top.

B-C: Effect of Erk1/2 inhibitor PD98059 (2×10^{-5} mol/L) on ANP (10^{-7} mol/L)-induced augmentation of eNOS (B) and VEGF (C) mRNA expressions in HUVECs. Cells starved for 12 hours in medium containing 0.5% FCS were stimulated by ANP with or without PD98059 for 8 hours.

Results are means \pm SEM of four independent assays. * $P < 0.05$ vs. control.

Adopted from reference #7.

現場で用いられているが、今回の結果は生理的濃度の ANP が、peripheral arterial disease の治療薬として使用できる可能性を示唆している。今後臨床応用をめざすにあたり、腫瘍血管に対する ANP の効果などを見ていく必要があると考えている。

謝 辞

今回、本稿を書く機会を与えて頂いた日本脈管学会に深謝致します。なおデータの採取にあたり、武田科学振興財団より助成を受けました。ここに感謝の意を表します。

文 献

- 1) Lee SH, Wolf PL, Escudero R et al: Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N Engl J Med*, 2000, **342**: 626–633.
- 2) Murohara T, Asahara T, Silver M et al: Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest*, 1998, **101**: 2567–2578.
- 3) Nakao K, Itoh H, Saito Y et al. The natriuretic peptide family. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 1996, **5**: 4–11.
- 4) 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.
- 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) 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*, 2003, **100**: 3404–3409.
- 7) Tokudome T, Kishimoto I, Yamahara K et al: Impaired recovery of blood flow after hind-limb ischemia in mice lacking guanylyl cyclase-A, a receptor for atrial and brain natriuretic peptides. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, **29**: 1516–1521.
- 8) Couffinhal T, Silver M, Zheng LP et al: Mouse model of angiogenesis. *Am J Pathol*, 1998, **152**: 1667–1679.
- 9) Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res*, 2004, **95**: 343–353.
- 10) Kuhn M, Völker K, Schwarz K et al: The natriuretic peptide/guanylyl cyclase-A system functions as a stress-responsive regulator of angiogenesis in mice. *J Clin Invest*, 2009, **119**: 2019–2030.

Important Roles of Endogenous Atrial and Brain Natriuretic Peptides in Reparative Vascular Remodeling in Ischemic Tissue

Takeshi Tokudome,¹ Ichiro Kishimoto,² and Kenji Kangawa³

¹Division of Hypertension, National Cardiovascular Center Research Institute, Osaka, Japan

²Department of Biochemistry, National Cardiovascular Center Research Institute, Osaka, Japan

³National Cardiovascular Center Research Institute, Osaka, Japan

Key words: atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, guanylyl cyclase-A, angiogenesis, ischemia

Atrial and brain natriuretic peptides (ANP and BNP, respectively) function via guanylyl cyclase (GC)-A, resulting in diuresis, natriuresis, and blood vessel dilation. Here we investigated the role of endogenous ANP/BNP-GC-A signaling on reparative vascular remodeling using a hind-limb ischemia model. In GC-A-deficient mice (GC-A-KO), hind-limb ischemia resulted in autoamputation or severe ulcers in 60% of mice during the 28-day observation period. In wild-type (WT) mice, partial amputation or mild ulcers were detected in only 20% of mice. Laser Doppler perfusion imaging revealed that the recovery of blood flow in the ischemic limb was significantly inhibited in GC-A-KO mice compared with WT mice. Immunostainings with anti-PECAM-1 antibody demonstrated that, in GC-A-KO, the capillary density of the ischemic tissue was significantly diminished compared to WT. Furthermore, bone marrow transplantation showed the predominant role of GC-A on local ischemic tissue rather than on vascular progenitor cells mobilized from bone marrow during vascular remodeling. In cultured human endothelial cells, ANP treatment significantly stimulated mRNA expressions of vascular endothelial growth factor and endothelial nitric oxide synthase via Erk1/2-dependent mechanism. These results suggest that endogenous ANP and BNP play important roles in reparative vascular remodeling in ischemic tissue.

(J Jpn Coll Angiol, 2010, 50: 169–174)