



Physiological relevance of hydrolysis of atrial natriuretic peptide by endothelin-converting enzyme-1

Nakayama, Kazuhiko

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2012-03-25

(Date of Publication)

2012-09-05

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5437

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005437>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Physiological relevance of hydrolysis of atrial natriuretic peptide by endothelin-converting enzyme-1.

エンドセリン変換酵素-1の心房性ナトリウム利尿ペプチド分解に関する生理学的検討

神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻
循環器内科学
(指導教員: 平田 健一 教授)

中山 和彦

エンドセリン-1(ET-1)は強力な血管収縮物質であり、肺高血圧や心不全をはじめとする多くの心血管病患者でその血中濃度上昇が指摘され、その病態進展に深くかかわっている。

エンドセリン変換酵素-1(ECE-1)は膜結合型メタロプロテアーゼであり、ET-1の前駆物質で不活性型の big ET-1 から活性型の ET-1 を産生する活性を担う。すなわち、ECE-1 はエンドセリン系活性化における律速酵素として知られ、ECE-1 を阻害することはエンドセリン受容体拮抗薬とは全く異なる機序でエンドセリン系を抑制できる将来有望な治療手段になる可能性がある。

心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)は心筋細胞から心筋伸展刺激によりその分泌が亢進し、血管拡張作用やナトリウム利尿作用を介して心血管保護作用をもたらすペプチドである。ANP 補充療法は現在多くの臨床現場で有用な心不全治療薬として使用されている。ANP は中性エンドペプチダーゼ 24.11 (NEP) という酵素によって代謝されるとされているが、NEP と ECE-1 は同じ膜結合型メタロプロテアーゼファミリーに属し、特に酵素活性中心部位のアミノ酸配列の相同性が高い。したがって、ECE-1 が NEP と共に ANP の代謝に関係している可能性がある。実際これまでに組換え可溶性 ECE-1 を使った *in vitro* の実験で、ECE-1 が big ET-1 の他に様々な生理活性ペプチドの代謝に関係しているという報告がなされているが、生理的条件下での ANP に対する ECE-1 の代謝作用の関与に関してはいまだはっきりしていない。

そこで私たちは、ECE-1 を標的とした生理活性ペプチドの制御という新たな治療アプローチの可能性を明らかにするために、ECE-1 が ANP を代謝するか否かの評価を、培養細胞アッセイと ECE-1 遺伝子欠損マウスを使用し検討を行った。

まずチャイニーズハムスター卵巣由来細胞(CHO-K1 cell)に対しヒト由来 ECE-1 cDNA の発現コンストラクトをリポフェクタミン法により形質導入し、ECE-1 を発現させた。12時間後に ANP 1 μ M を細胞培養液に添加し、添加後の ANP 濃度の時間推移を蛍光免疫学測定法にて定量した。その結果、ECE-1 発現群で ECE-1 非発現群に比べて培養液中の ANP 濃度は有意に低かった。また、ECE 阻害薬 Phosphoramidon 添加により ANP 濃度は ECE-1 非発現群と同レベルまでに達し、*in vitro* 条件下での ECE-1 の ANP 分解作用を、培養細胞を用いた細胞生物学的手法でも確認する事が出来た。

次に生理条件下での ANP に対する影響を ECE-1 遺伝子欠損マウスを用いて観察

を行った。ECE-1 ホモ欠損マウス (*ECE-1^{-/-}*マウス) では顎顔面、心大血管の発生異常により胎生期 13.5 日前に死亡するため、成体マウスを用いた解析が不可能である。したがって、私たちは ECE-1 ヘテロ欠損マウス (*ECE-1^{+/-}*マウス) を解析に使用した。まず ECE-1 の発現レベルを胎児、腎臓、肺、心臓から抽出した mRNA で評価を行った。*ECE-1^{+/-}*マウスは野生型に比べおおよそ半分程度までに減少していることを定量的 PCR 法で確認した。一方、ANP 分解酵素である NEP mRNA の評価も行ったが、こちらは *ECE-1^{+/-}*マウスと野生型マウスで発現レベルには差がなかった。また ANP の発現レベルを preproANP mRNA の定量にて行ったが、*ECE-1^{+/-}*マウスと野生型マウスで両者に差がなかった。以上の様に *ECE-1^{+/-}*マウスでは NEP, preproANP 発現レベルに影響を与えず ECE-1 発現が半分に抑制されていることを確認した。

次に同マウスの胎児、心臓と血清中の ANP ペプチド量を定量した。心臓と血清から調製した検体は Sep-Pak C-18 カラムで精製後、蛍光免疫測定法により測定を行った。血清中 ANP 濃度と胎児組織中 ANP 濃度は野生型マウスに比べ *ECE-1^{+/-}*マウスで高く、生理条件下における成体マウスで内因性 ECE-1 が ANP 分解に関与している可能性を示す結果を得た。

これまでの ECE-1 によるペプチド分解作用を検討した研究では、ECE-1 精製が困難であるために、ECE-1 の細胞外ドメインとアルカリフォスファターゼのシグナル配列よりなる組換え可溶性 ECE-1 を直接試験管内で基質と反応させることで検討されてきた。実際この組換え ECE-1 により ANP が数カ所で切断・分解されることが報告されている。しかし、この酵素活性が生理学的に意味のある ANP 分解作用であるかどうかは不明であった。今回、私たちはより生理的な条件下において ECE-1 が ANP 分解に関与することを証明し得た。

*ECE-1^{-/-}*マウスが胎生致死であることは先ほど述べたが、致死前 *ECE-1^{+/-}*マウスの胎児では末梢血管拡張や心のう水貯留といった心不全兆候が見られ *ECE-1^{+/-}*マウスでより ANP 濃度が高くなっていることが推察される。そのために本研究では *ECE-1^{+/-}*マウスを解析に使用することができなかった。

以前、私たちは *ECE-1^{+/-}*マウスの血清中、心臓組織中の ET-1 濃度は野生型と変わらないという報告をしているが、それに対し今回 *ECE-1^{+/-}*マウスで ANP 濃度が高くなっている事を示した。このことは ECE-1 を抑制することが bigET-1 に対してではなく ANP の分解に律動的な影響を果たしていることを示している。これは ECE-1 の ANP に対する kcat/Km が bigET-1 に対する kcat/Km に比べて 250 倍低く、ECE-1 の基質として ANP が bigET-1 に比べて代謝効率が落ちるとするこ

れまでの報告と一致する。以上の事より ECE-1 が生体内で ANP を排泄除去するのに重要な働きをしていることを示唆していると言える。

ECE-1 は亜鉛金属プロテアーゼであり、同ファミリーの NEP と特に酵素活性中心である亜鉛結合部位付近のアミノ酸配列の相同性が高く、このことは ECE-1 が NEP と共通の代謝基質を持ち得ることを示唆している。我々の使用した CHO-K1 cell では NEP の発現は確認できず、また *ECE-1^{+/-}*欠損マウス中の NEP 発現レベルも野生型と変化がないので、今回確認した細胞培養液中とマウス組織中の ANP 濃度上昇に NEP は関与していないと結論した。

心不全患者の循環血液中の ET-1, bigET-1 濃度は高くなっており、その生命予後の予測因子となることが分かっている。よってエンドセリン拮抗薬 (ERAs) によるエンドセリン系阻害による治療戦略は心不全患者への有効なアプローチと期待された。実際 ERAs を使った心不全患者への臨床試験は、動物実験で示された有益性にもかかわらず、患者の予後改善効果を示すことが出来なかった。この度私たちが示した ECE-1 による ANP 分解作用は、ECE-1 阻害というアプローチが ANP の分解を抑え ANP 系を賦活し、その血管拡張作用やレニンアンギオテンシン系抑制作用、エンドセリン系抑制作用、交感神経抑制作用を介して心筋保護をもたらすことが予測される。よって、エンドセリン系だけでなく ANP 系への影響も併せ持つ ECE-1 阻害効果を今後は病態モデルを使った実験で明らかにすることがより臨床応用に向けた課題と思われる。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2249号	氏名	中山 和彦
論文題目 Title of Dissertation	エンドセリン変換酵素-1の心房性ナトリウム利尿ペプチド分解に関する生理学的検討 Physiological relevance of hydrolysis of atrial natriuretic peptide by endothelin-converting enzyme-1		
審査委員 Examiner	主査 平井みどり Chief Examiner 副査 平島正則 Vice-examiner 副査 中村俊一 Vice-examiner		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

【発表要旨】

発表者は、エンドセリン変換酵素-1(ECE-1)が big ET-1 から ET-1 への変換を担うだけでなく、同時に ANP の分解・不活性化にも関与していることを証明した研究成果を発表した。

エンドセリン変換酵素-1(ECE-1)は膜結合型メタロプロテアーゼであり、ET-1の前駆物質で不活性型の big ET-1 から活性型の ET-1 を産生する活性を持ちエンドセリン系活性化における律速酵素として知られている。同時に心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)を代謝する中性エンドペプチダーゼ 24.11 (NEP) という酵素とアミノ酸配列の相同性が高く、ECE-1 が ANP の代謝に関係している可能性がある。しかし生理的条件下での ANP に対する ECE-1 の代謝作用の関与に関してはいまだはっきりしていない。そこで、ECE-1 を標的とした生理活性ペプチドの制御という新たな治療アプローチの可能性を明らかにするために、ECE-1 が ANP を代謝するか否かの評価を、培養細胞アッセイと ECE-1 遺伝子欠損マウスを使用し検討を行った。

方法として、チャイニーズハムスター卵巣由来細胞(CHO-K1 cell)に対しヒト由来 ECE-1 cDNA の発現コンストラクトをリポフェクタミン法により形質導入し、ECE-1 を発現させ、12時間後に ANP 1 μ M を細胞培養液に添加し、添加後の ANP ペプチド濃度の時間推移を蛍光免疫学測定法にて定量した。その結果、ECE-1 発現群で ECE-1 非発現群に比べて培養液中の ANP 濃度は有意に低く、ECE 阻害薬 Phosphoramidon 添加により ANP 濃度は ECE-1 非発現群と同レベルまでに達した。次に生理条件下での ANP に対する影響を ECE-1 遺伝子欠損マウスを用いて観察を行った。各臓器で NEP mRNA、preproANP mRNA が遺伝子欠損マウスと野生型マウス間で差がなかったが、血清中・胎児組織中 ANP ペプチド濃度は野生型マウスに比べ ECE-1 欠損マウスで高かった。

以上より生理条件下において ECE-1 が ANP 分解に関与している可能性を示す結果を得た。

この度発表者が示した ECE 阻害という治療アプローチは、エンドセリン系の抑制に加えてナトリウム利尿ペプチド系の亢進という新たな作用機序により、従来のエンドセリン受容体を超えた臨床応用の可能性が期待できる。具体的には、心不全や糖尿病性腎症においてエンドセリン受容体拮抗薬に伴う浮腫の発現に対し、ANP 系を亢進させることによって浮腫発症を相殺することが期待される。受容体拮抗薬を用いた臨床試験ではその副作用のために中断してしまった心不全や腎症患者への新たな治療戦略として、酵素阻害薬の治療効果の検討が望まれる。

なお現在発表者は、ECE-1 遺伝子欠損マウスを用いて作製した病態モデルで、エンドセリン系抑制とナトリウム利尿系亢進により病態の改善をきたすことを明らかにした論文を作製中である。(ATVB in revision)