

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08066

研究課題名(和文) 副腎アルドステロン産生に対するバゾプレシンV2受容体拮抗薬の新しい薬理作用の解明

研究課題名(英文) Effects of Tolvaptan via vasopressin V2 receptor-independent pathway on adrenal aldosterone synthesis.

研究代表者

伊藤 正明 (Ito, Masaaki)

三重大学・医学系研究科・学長

研究者番号：00223181

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：V2受容体拮抗薬であるトルバプタンは腎集合管でV2受容体を阻害することで水利尿作用を発揮する。AngII刺激下でアルドステロン産生を増加させたヒト副腎皮質由来の培養細胞であるH295R細胞およびラットモデルを用いた実験からトルバプタンがV2R非依存性にアルドステロン濃度上昇およびアルドステロン合成酵素であるCYP11B2タンパク発現量増加を抑制することが確認された。これらの機序として、トルバプタンがCYP11B2のmRNA発現量を抑制することなく蛋白発現量を抑制し、DDIT3蛋白発現の増加とeIF2のリン酸化亢進をきたしたことから、小胞体ストレス応答を介した蛋白合成過程への関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心不全では体液過剰に対する治療に利尿薬が用いられる。ナトリウム利尿を起こす利尿薬ではレニン-アンジオテンシン-アルドステロン(RAA)系や交感神経系の活性、腎集合管での自由水再吸収亢進が引き起こされ、心筋リモデリングやナトリウム・水分貯留の原因となる。近年臨床応用された選択的V2R拮抗薬トルバプタンは腎集合管での自由水再吸収を抑制することにより水利尿を引き起こし、RAA賦活化作用の少ないとされている。今回の研究でトルバプタンの分子薬理機序が解明され、トルバプタンの心不全におけるより有効な治療法やその他の病態への応用に結び付き、さらには新しいアルドステロン阻害薬の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Tolvaptan, a V2 receptor antagonist, exerts its water diuretic effect by inhibiting V2 receptors in the renal collecting ducts. Experiments using H295R cells, cultured cells derived from the human adrenal cortex and rat models with increased aldosterone production under AngII stimulation, have shown that Tolvaptan suppressed the increase in aldosterone concentration and protein expression of CYP11B2, an aldosterone synthase, by a V2R-independent manner. In addition, tolvaptan suppressed protein expression without suppressing CYP11B2 mRNA expression, and increased DDIT3 protein expression and phosphorylation of eIF2. These results suggest that tolvaptan could have attenuated CYP11B2 translation and subsequently inhibited the aldosterone biosynthesis, likely in part by promoting the UPR and subsequent inhibition of global protein translation.

研究分野：循環器内科学

キーワード：トルバプタン アルドステロン 心不全

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心不全では、体液過剰に対する治療に利尿薬が用いられる。ループ利尿薬やサイアザイド系利尿薬はナトリウム利尿によってその効果を発現させるが、近年臨床応用された選択的 V2R 拮抗薬トルバプタン (Tolv) は、バゾプレシン (AVP) による腎集合管での自由水再吸収を抑制することにより水利尿を引き起こす。Na 利尿では、レニン-アンジオテンシン-アルドステロン (RAA) 系や交感神経系の活性、さらに V2R を介した AVP による腎集合管での自由水再吸収亢進が引き起こされ、心筋リモデリングやナトリウム・水分貯留の原因となる。一方、Tolv は、強い利尿作用を有するものの、フロセミド等のループ利尿薬で見られる RAA 賦活化作用の少ない特徴が動物実験で確認されているが、この分子機序は十分に解明されていない。申請者らは、肺高血圧 (PH) ラットモデルに対する Tolv の効果を解明した際に、Tolv が PH ラットの血中 Aldo 濃度を正常ラットのレベルにまで有意に低下させることを発見した。Tolv 自体がこのモデルラットに対して右心不全を悪くさせる結果であったため、この Aldo 濃度の低下は極めて意外な結果であり、Tolv の水利尿以外の新しい薬理作用と考えるに至った。予備的実験より、Tolv はヒト副腎皮質細胞において、Ang 刺激による Aldo 産生を濃度依存性に抑制し、その機序として CYP11B2 発現抑制が明らかとなってきた。そこで、この新しい Tolv の分子薬理機序を *in vivo* を含めた実験系で解明し、心不全の新しい治療法に結び付けるため、本研究を企画することとなった。

2. 研究の目的

本研究は、Tolv の直接的 Aldo 産生抑制につき、以下の 3 項目を解明する。

研究 1 : Aldo 産生抑制に関する分子機序を、培養細胞を用いて解明する。

研究 2 : 研究 1 によって明らかにされる分子機序を、動物モデルを用いて *in vivo* で検討する。

研究 3 : Tolv の Aldo 産生抑制効果を、慢性心不全モデルにおいて検証する。

Tolv の Aldo 産生に対する直接効果についての検討は、新しいアイデアで、現在までに全く報告がなく、学術的に独自性のある研究課題である。Tolv の RAA 系制御に対する新たな分子機序や本機序と心不全モデルにおける Tolv の治療効果との関連を解明することは、心不全診療にとって非常に意義深く、新しい Aldo 阻害薬の開発などの研究にも繋がると期待される。

3. 研究の方法

(1) Tolv の Aldo 産生抑制に関与する分子機構を培養細胞で解明する : ヒト副腎皮質細胞株 H295R を用い、Tolv の Aldo 産生抑制の分子機序を解明する。H295R を Ang II 刺激した際、CYP11B2 の mRNA およびタンパク質いずれのレベルにおいても発現が亢進する。申請者らは、定量 RT-PCR 法と CYP11B2 に対する特異的抗体を用いて、Tolv が細胞毒性や CYP11B2 の mRNA 発現には影響を与えず、特異的にタンパク質発現を抑制することを既に見いだしている。AVP などのア

ゴニストを同時に添加することで、ToIv の阻害作用が V2R 非依存性が判定し、mRNA への影響がないことも確認する。さらに mRNA からタンパク質への翻訳レベルに重要な働きを担う eukaryotic translation initiation factor 2 kinase (eIF-2) などのシグナル伝達を、リン酸化抗体やウエスタンブロット法などを用いて検討を行う。

(2) ToIv の Aldo 産生抑制の分子機序を in vivo で検討する：モデル動物として、Aldo 産生亢進性高血圧モデルを使用する。5 週齢の雄 Sprague-Dawley ラット (140-150g) に浸透圧ポンプを用いて Ang II を 5 日間持続皮下投与し作成する。Ang II を 20, 60, 200 pmol/min で持続投与 (各用量で n=3) し、投与前に較べて 60-80mmHg 程度血圧が上昇する用量を確認する。上記実験で設定された Ang II 用量を浸透圧ポンプで 5 日間持続投与し、以下の 4 群 (各群 n=6) で、ToIv 持続投与による血圧への影響および利尿効果の比較検討を行う。I 群：浸透圧ポンプシャム手術；II 群：Ang II 投与；III 群：Ang II 投与+ToIv 治療；IV 群：浸透圧ポンプシャム手術+ToIv 治療。ToIv 治療は 10mg/kg/day (0.05% Tolvaptan 混合食) に設定し、浸透圧ポンプ埋め込み術の 24 時間後から開始して、Ang II 投与終了時点まで継続する。浸透圧ポンプ埋め込み術前および実験最終日に体重測定、血圧測定、血液検査を施行する。また、ToIv の腎集合管での V2R 拮抗作用を確認するため、ToIv 投与開始後の 24 時間における飲水量、尿量測定および尿採取を代謝ケージ内で行う。最終日に屠殺し、副腎、腎臓、心臓を取り出し、- 80 で冷凍保存する。血液検査では、一般的な生化学項目、電解質、浸透圧に加え、レニン活性、Ang II、Aldo、BNP 等を測定する。尿検査では、ToIv の腎集合管での V2R 拮抗作用を確認するため、電解質、浸透圧、尿素、クレアチニン等を測定する。副腎組織の組織学的解析として、CYP11B2 の発現量や eIF-2 リン酸化を Westernblot 法により確認する。

(3) ToIv の Aldo 産生抑制効果を、心不全モデルにおいて検証する：慢性心不全モデルとして、5 週齢 Lewis ラットに既報の方法に従って精製ブタ心筋ミオシンを皮下投与し、自己免疫性心筋炎モデルを作成する。6 週後に心エコーで心機能検査を行い、左室内径短縮率 40%未満のラットを心不全ラットとして実験に使用する。ToIv 慢性投与プロトコールは、同週齢の正常ラット、無治療心不全ラット群、低用量 ToIv 治療群 (0.01% Tolvaptan 混合食、3 週間)、高用量 ToIv 治療群 (0.05% Tolvaptan 混合食、3 週間) の 4 群 (各群 n=12) で、ToIv の副腎 Aldo 合成抑制効果および心・腎組織への影響を検討する。すべての群で、治療前後に体重測定、血圧測定、血液検査を施行する。また、ToIv の慢性的利尿効果を確認するため、最終週の 24 時間における飲水量、尿量測定および尿採取を代謝ケージ内で行う。実験最終日には、心エコー図検査後に屠殺し、副腎、腎臓、心臓を取り出し - 80 で冷凍保存するラット (各群 n=6) と、カテーテル検査および断頭により血液を採取するラット (各群 n=6) に振り分ける。最終日に全身麻酔下、自然呼吸下で心エコー検査を実施する (各群 n=6)。血液・尿サンプル測定、副腎組織の組織学的解析、腎組織の組織学的解析、心筋組織の組織学的解析については、高血圧ラットモデルと同様に行う。心エコー検査後、心重量を測定し、左室+中隔と右室の重量比を測定後-80 での凍結保存し、各

群で ELISA により Aldo、BNP 含有量等を測定し、更に V1aR、V2R、CYP11B1、CYP11B2 の発現量や eIF-2 リン酸化を Westernblot 法により確認する。CYP11B1、CYP11B2 の mRNA 量についても定量 RT-PCR 法で確認する。

4. 研究成果

(1) ヒト副腎皮質由来培養細胞 (H295R 細胞) において、AngII 刺激下で増加したアルドステロン産生は、AVP および dDAVP 投与により影響を受けなかったが、Tolv 投与により用量依存性に低下したことから Tolv は、V2 受容体非依存性に副腎における AngII 誘発性アルドステロン産生を抑制することが示唆された (FIGURE 1)。また、Tolv 投与はアルドステロン合成酵素である CYP11B2 の mRNA 発現量を抑制することなく蛋白発現量を抑制しており (FIGURE 2) Tolv がタンパク合成の翻訳過程への関与が示唆された。アンギオテンシン系カスケードに關与する ERK は Tolv による影響を受けなかったが、小胞体ストレス応答を惹起する DDIT3 やリン酸化によりタンパク合成を停止させる eIF2 のリン酸化亢進が確認された (FIGURE 3)。上記結果より Tolv は小胞体ストレス応答の惹起やタンパク合成の抑制によりアルドステロン産生を抑制していることが示唆された。

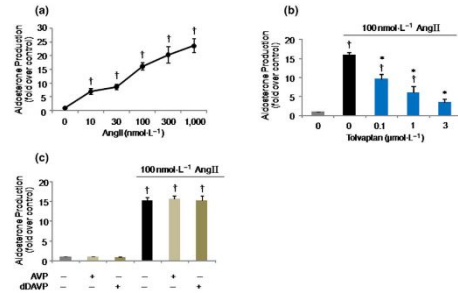


FIGURE 1 Effects of tolvaptan and arginine vasopressin (AVP)-1-desamino-8-D-arginine vasopressin (dDAVP) on angiotensin II (AngII)-induced aldosterone production in H295R cells. (a) Dose-dependency of AngII on aldosterone production. Cells were stimulated with AngII at the indicated doses for 24 hr. (b) Effect of tolvaptan on AngII-induced aldosterone production. Cells were pretreated with tolvaptan at the indicated doses for 30 min and then stimulated with 100 nmol·L⁻¹ AngII for 24 hr. (c) Effect of 1 μmol·L⁻¹ AVP or dDAVP on aldosterone production with and without 100 nmol·L⁻¹ AngII for 24 hr. Results are shown as mean ± SD (n = 5 separate experiments performed in duplicate). [†]P < 0.05 versus Cont; *P < 0.05 versus AngII

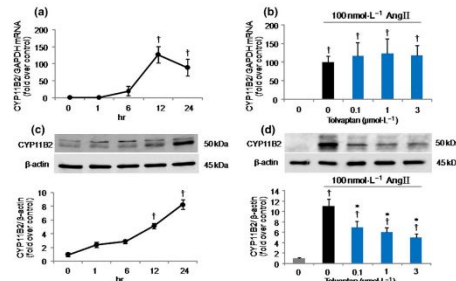


FIGURE 2 Effects of tolvaptan on CYP11B2 mRNA and protein expressions in H295R cells stimulated with angiotensin II (AngII). (a) Time course of the increase in CYP11B2 mRNA expression by AngII. Cells were treated with 100 nmol·L⁻¹ AngII for the indicated periods, and CYP11B2 mRNA expression was measured by quantitative real-time PCR. (b) Effect of tolvaptan on AngII-induced CYP11B2 mRNA expression. Cells were pretreated with tolvaptan at the indicated doses for 30 min and then stimulated with AngII for 12 hr. (c) Time course of the increase in CYP11B2 protein levels induced by AngII. Cells were incubated with 100 nmol·L⁻¹ AngII for the indicated periods, and CYP11B2 protein level was analysed by Western blotting (antibody used: Millipore). Upper, representative immunoblots; lower, relative quantification of protein expression. (d) Effect of tolvaptan on AngII-induced CYP11B2 protein levels. Cells were pretreated with tolvaptan at the indicated doses for 30 min and then stimulated with 100 nmol·L⁻¹ AngII for 24 hr. CYP11B2 protein level was analysed by Western blotting (antibody used: Dr Celso E. Gomez-Sanchez). Upper, representative immunoblots; lower, relative quantification of protein expression (n = 5 separate experiments performed in duplicate). Results are shown as mean ± SD. [†]P < 0.05 versus Cont; *P < 0.05 versus AngII

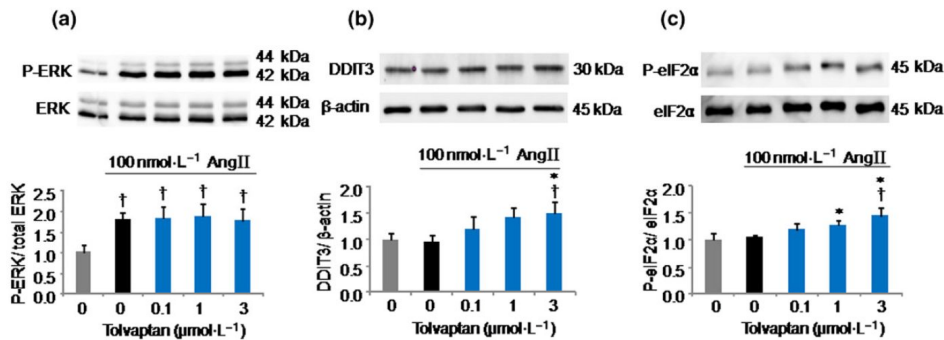


FIGURE 3 Effects of tolvaptan on angiotensin II (AngII)-induced ERK and eIF2α phosphorylation and DDIT3 protein expression in H295R cells. ERK phosphorylation (a). Cells were pretreated with tolvaptan at the indicated doses for 30 min and then stimulated with 100 nmol·L⁻¹ AngII for 5 min. The phosphorylation level of ERK was analysed by Western blotting. Upper, representative immunoblots; lower, relative quantification of protein expression. (b) Effect of tolvaptan on DDIT3 protein expression levels. Cells were pretreated with tolvaptan at the indicated doses for 30 min and then stimulated with 100 nmol·L⁻¹ AngII for 24 hr. DDIT3 protein level was analysed by Western blotting. Upper, representative immunoblots; lower, relative quantification of protein expression. eIF2α phosphorylation (c). Cells were pretreated with tolvaptan at the indicated doses for 30 min and then stimulated with 100 nmol·L⁻¹ AngII for 24 hr. The phosphorylation level of eIF2α was analysed by Western blotting. Upper, representative immunoblots; lower, relative quantification of protein expression. Results are shown as mean ± SD (n = 5 separate experiments) and expressed as fold over control. [†]P < 0.05 versus Cont; *P < 0.05 versus AngII

(2) AngII 刺激下で収縮期血圧は用量依存的に上昇したが、血中アルドステロン濃度や副腎組織での CYP11B2 発現量の増加は 200 pmol/min を投与したモデルでのみ確認された。

群では尿量および飲水量の増加が見られ、および 群ではさらに増加が見られた。また、ToIv 投与群では尿蛋白量の減少効果も見られており、これは収縮期および拡張期血圧の低下が得られたことが要因と考えられる。血中アルドステロン濃度上昇、副腎アルドステロン濃度上昇および CYP11B2 蛋白発現量増加をそれぞれ $42.70 \pm 16.16\%$ 、 $60.45 \pm 24.32\%$ および $32.33 \pm 10.29\%$ 抑制した ($p < 0.05$)。また、ToIv 投与により収縮期および拡張期血圧の上昇もそれぞれ $196 \pm 20 \text{ mmHg}$ ($P < 0.05$ vs. AngII)、 $144 \pm 25 \text{ mmHg}$ ($P < 0.05$ vs. AngII) と有意に抑制した。血中 K 値はいずれの群でも差は見られなかったことから、ToIv は血中 K 値に非依存性にアルドステロンおよび CYP11B2 発現量を抑制することが示唆された。

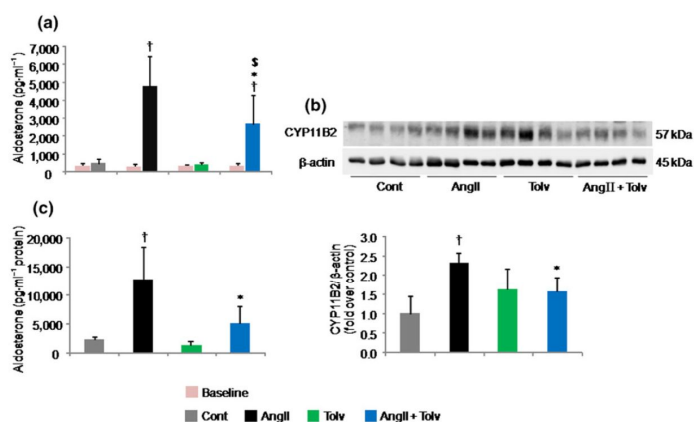


FIGURE 5 Effects of tolvaptan (Tolv) on serum aldosterone and adrenal CYP11B2 protein levels as well as adrenal aldosterone production in Sprague-Dawley rats treated with angiotensin II (AngII). Rats were treated with tolvaptan in the presence and absence of $200 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1}$ AngII. Results are shown as mean \pm SD ($n = 8$ rats per group). Effects of tolvaptan on AngII-induced serum aldosterone (a) and CYP11B2 protein levels (b, upper, representative immunoblots; lower, relative quantification of protein expression) and adrenal aldosterone production (c). [†] $P < 0.05$ versus Cont group; ^{*} $P < 0.05$ versus AngII group; [‡] $P < 0.05$ versus tolvaptan group

(3) 既報を基に5週齢のラットに0.2mgから0.4mgのブタ心筋ミオシンを皮下注射し、6週間後に左室内径短縮率(FS)が40%未満を満たした個体を心不全モデルとして採用した。心不全モデルでは心重量/脛骨長比の増加(コントロール群0.194g/cm vs 0.2567g/cm)、BNP-45の増加(コントロール群0.059 pg/mL vs 0.343pg/mL)を認めた。ウェスタンブロッティングにおける副腎CYP11B2濃度は健常ラット群に比し増加する傾向にあったが有意差はなく、血中アルドステロン値にも差は見られなかった。

上記の結果を踏まえ心不全モデルについて検討を行った。ブタ心筋ミオシンの投与から6週間後にFS 40%未満となった個体は78%と既報の100%に比し低く、平均FS 41.2%であった。また、既報の心不全モデルでは死亡率20から44%であったが本研究では0%であった。安定的な左室駆出率の低下した心不全モデル作成のため、ブタ心筋ミオシン量の調整および同時に投与する結核死菌(*M. tuberculosis* H37Ra)の増量を行った。8週齢のLewisラットを3群に分け、それぞれ0.25mg、0.5mg、1.0mgのブタ心筋ミオシンを皮下注射した(各n=2)。1.0mgを投与した群のみでFS 20.5%と高度な心機能障害および心嚢水貯留を確認した。上記結果よりブタ心筋ミオシン1.0mgで作成したモデルを慢性心不全モデルとして採用し、実験を継続中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ali Y, Dohi K, Okamoto R, Katayama K, Ito M	4. 巻 176
2. 論文標題 Novel molecular mechanisms in the inhibition of adrenal aldosterone synthesis: Action of tolvaptan via vasopressin V(2) receptor-independent pathway.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Br J Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 1315-1327
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/bph.14630.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yusuf Ali, Kaoru Dohi, Ryuji Okamoto, Kan Katayama, Masaaki Ito
2. 発表標題 Tolvaptan Inhibits Aldosterone Production and Blood Pressure Elevation Induced by Angiotensin II in Hypertensive Rat Model
3. 学会等名 American Heart Association 2018 Scientific Sessions (AHA) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	土肥 薫 (Dohi Kaoru) (50422837)	三重大学・医学系研究科・教授 (14101)	
研究分担者	岡本 隆二 (Okamoto Ryuji) (60378346)	三重大学・医学部附属病院・教授 (14101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------