

機関番号：34417

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590589

研究課題名 (和文) 内因性ジギタリスの構造解析とその電解質・血圧調節に占める役割の解明

研究課題名 (英文) Studies on the role of endogenous digitalis in electrolytes and blood pressure regulation

研究代表者

高橋 伯夫 (TAKAHASHI HAKUO)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：80094431

研究成果の概要 (和文) : 内因性ジギタリスが種々存在する中で、両生類で発見され、現在、ヒトでも確認されている bufadienolide にはトキシン型が存在し、それらが生理活性を有することを明らかにした。食塩負荷で増量することも明らかにした。産生部位の同定と生理的な分泌調節を検討するために細胞培養系で検討し、副腎皮質、副腎髄質、視床下部由来の神経細胞などでの産生を確認した。また、視床下部由来細胞株からウアバイン産生を確認し、その分泌にはアルドステロンが鉱質コルチコイド受容体を介して関与することを明らかにした。以前からの一連の研究成果として、すべての高血圧の成因が食塩代謝と関連し、脳内レニン-アンジオテンシン-アルドステロン (RAA) 系とウアバインが中心的役割を演じていることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文) : Among a variety of endogenous digitalis, bufadienolides originally found in toads and now determined in humans were demonstrated to have their toxin types with biological functions. They increase with sodium-loading. Immortalized cell lines originated from adrenal-cortex and -medulla, and hypothalamic neurons were used to determine the origin and secretory mechanism of those bufadienolides and ouabain, and the active production was found. Collectively with our previous studies, I conclude that sodium metabolism is crucially involved in the pathogenesis of all types of hypertension; thereby, brain renin-angiotensin-aldosterone system and ouabain are essentially implicated as players.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：高血圧の病態生理

科研費の分科・細目：病態検査学

キーワード：脳・神経、高血圧、バイオマーカー、電解質代謝、ジギタリス

1. 研究開始当初の背景

(1) 前年度に、我々が独自に発見し報告したマリノブフォトキシン (MBT) の病態生理的役割は不明であったし、それ以外の内因性ジギタリスでトキシンタイプの存在やその

生理作用については全く不明であった。ただし、両生類から単離したブファジェノライドでは、トキシンタイプが存在し、 Na^+ , K^+ -ATPase 抑制活性があることが知られていた。

(2) 脳内にウアバインが存在することは、我々を始めとして多くの研究報告があったが、具体的な分泌ならびに作用機構が不明であった。

2. 研究の目的

- (1) MBT の産生部位、その分泌刺激などについて明らかにする。さらに、テロシノブファゲニン (TCB) にもトキシソタイプが存在するか否かを検討する。
- (2) 視床下部由来のウアバインの分泌機序の解明および生体における病態生理的役割の検討。

3. 研究の方法

- (1)① MBT と免疫交叉活性がある抗マリノブファゲニン抗体を用いて免疫組織化学的に、その存在を網羅的に検索。
- (1)② 副腎皮質由来の Y-1 細胞培養系を用いて MBT の産生と、その分泌に及ぼすアンジオテンシン II (ANG II) の作用を検討。
- (1)③ 副腎髄質細胞由来の PC-12 細胞培養系を用いて、MBT の産生を検討。
- (1)④ ヒト血漿中の TCB のトキシソ型を HPLC/質量分析系を用いて検討
- (2)① 拡張不全型心不全を呈する症例が増加しつつあるが、その病態にジギタリスが関与する可能性があり、ウアバインの動態を検討
- (2)② 視床下部神経細胞由来の不死化細胞株である N1 細胞培養系を用いて、その産生を確認した上で、分泌に及ぼすアルドステロンの役割を検討

4. 研究成果

- (1)① 副腎皮質には、マリノブファゲニンと交叉活性を有する物質を含有する細胞が存在することが確認できた。副腎髄質や腎尿細管細胞にも僅かではあるが、免疫活性物質の存在を疑わせる所見が得られた。他方、脳では、視床下部、下部脳幹部では明瞭な像は得られなかった。
- (1)② 副腎皮質細胞から MBT が産生されることを確認した。そこで、ANG II を培養系に添加すると MBT の産生が増加し、AT-1 受容体遮断薬であるテルミサルタンを添加すると ANG II の MBT 分泌促進作用が遮断できたことから ANG II が MBT の産生刺激の一つであることが明らかになった。
- (1)③ PC-12 細胞を無血清で培養した上清中に MBT があることを高速液体クロマトグラフィ (HPLC) で分離した分画を質量分析する (LC/MS) ことで構造を明らかにした。内因性ジギタリスが、生体内では中枢神経系で重要な循環調節に役割を演じている可能性が高く、発生学的に神経由来である副腎髄質細胞で MBT が産生されている事実は、MBT が脳

内でも産生されている傍証と考える。また、視床下部をブロックとして採取し、その中の MBT 含量を測定すると一定量存在するので、今回の検討では、免疫組織化学で実証できなかったが、その原因として、ステロイドである MBT の脳組織での固定が困難であった可能性が残り、今後の再検討課題である。

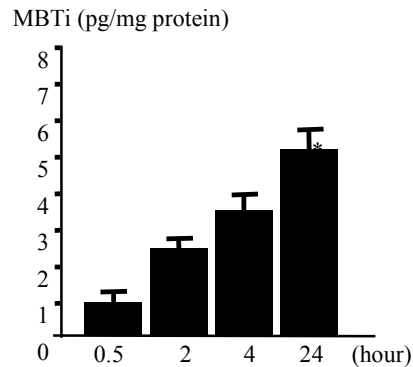


図 1. PC-12 細胞無血清培養上清中の MBT 様免疫活性物質量の推移

- (1)④ ヒト血漿を ODS のミニカラムで濃縮し、さらに HPLC で 2 段階に精製した上で、LC/MS 系にて解析したところ、TCB のトキシソタイプであるスベロイルアルギニンが付加されたテロシノブフォトキシソの存在が明らかになった。すでに、 Na^+ , K^+ -ATPase 活性を抑制することがガマ由来の本物質で確認されているので、今後は、その Na^+ , K^+ -ATPase 活性抑制を介する生体内での生理作用を追求する予定である。

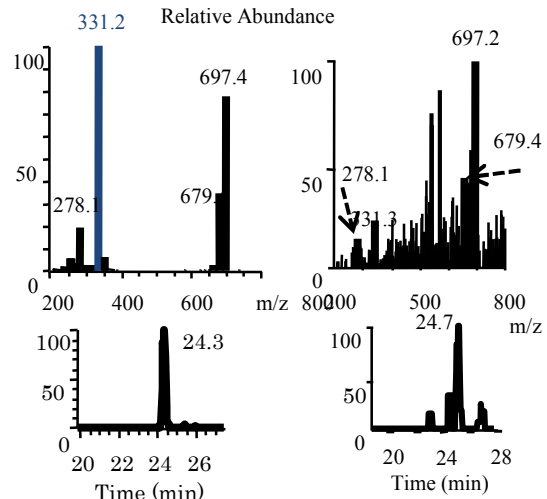


図 2. 左 2 つは authentic TCT、右がヒト血漿中の TCT を示す質量分析パターン

- (2)① 拡張型心不全のモデルラットとして、Dahl 食塩感受性高血圧ラットでは、心不全期で明らかにウアバインの尿中排泄量が増加した。このことから、ウアバインが心筋の肥大および拡張不全に決定的な役割を演じる

可能性があるものと考えられる。

(2)② N-1 細胞は、そのホルモン産生動態から視床下部の室傍核由来の細胞株と考えられている。この細胞の無血清培養下の培養上清では、時間依存性にウアバイン濃度が増加することを明らかにした。これに、アルドステロン (aldo) を添加するとウアバインの濃度はより増加し、その増加を鉍質コルチコイド受容体遮断薬であるエプレレノン (epl) の添加で遮断できた。したがって、室傍核の神経細胞がウアバインを産生し、その直接的な産生刺激がアルドステロンであることが明らかになった。

OLI(pg/mg protein)

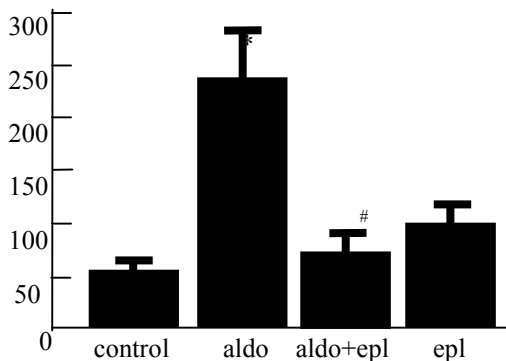


図 3. N1 細胞培養上清中のウアバイン様免疫活性 (OLI) : Ald 添加で増加し、その反応は epl 添加で遮断される。

【総括】

細胞膜には Na^+ , K^+ -ATPase が存在し、その重要性は周知である。生体内には種々のジギタリスが存在し、この酵素活性を阻害することで細胞内 Ca^{2+} イオン濃度を高めて細胞機能を変化させる。このことは心筋細胞を詳細に研究されているが、神経系での研究は少ない。私は約 30 年前にウアバインが中枢性に交感神経活動を高めて高血圧をもたらすことを明らかにしたのを契機に、食塩負荷が脳内ウアバイン産生を介して本態性高血圧の成因となる作業仮説を設けて研究してきた。食塩負荷したラットでは、血中にジゴキシンやウアバインが低濃度ながら増加する。しかし、その程度の増加が生理的な役割を演じるとは考えられず、ウアバインやジゴキシンは産生される脳の局所で機能を発揮するものと思われる。今回の研究成果で、視床下部の室傍核や視索上核由来培養細胞からウアバインが産生されること、その分泌刺激がアルドステロンであることは極めて注目を集める所見である。食塩負荷では、腎レニン分泌が抑制されるのに反し、脳内ではレニン活性が高まり、レニンや AT-1 受容体のメッセンジャー RNA の発現が亢進するとの我々の知見

と併せて考えると RAA 系が脳内で亢進し、続いてアルドステロンがウアバインを産生させて交感神経活動を高めることで高血圧をもたらすものと考えられる。亢進した交感神経活動のレベルに合わせて血圧が上昇し、その結果交感神経活動は正常化する。つまり、交感神経活動のレベルに併せて血圧が規定されるものと考えられる。

最近、アンジオテンシンやアルドステロンを末梢に投与した際の高血圧が、脳内に微量投与した RAA 系の阻害薬で遮断されることから、末梢由来のすべての昇圧機序も、結局は脳に作用して高血圧をもたらしていることが明らかにされている。つまり、末梢の血管を収縮させても中枢神経系がこれを緩衝することで高血圧にはならないことを示している。以上のような事実と、現在の高血圧治療との関係を考察すると興味ある事実が浮かび上がる。すなわち、近年、第一選択薬として使用されている RAA 系阻害薬は、それらによって良好な降圧効果が得られた際に反射性頻脈を来さない。つまり、このことは降圧した際に血圧調節の反射系がすべて降圧レベルにリセットされていることを意味している。この圧受容体反射系の中樞が脳にあることは言うまでもなく、この現象が中枢神経系を介する機序によることが明らかである。これまでは、このような事実を直視せず、薬剤が脳に作用するという事実から逃避していたものである。その理由は、脳には血液-脳関門があって、薬物が脳内に浸透しないことと脳に作用すると複雑な副作用と結びつくことを恐れていたためと思われる。しかし、脳の中でも第三脳室周囲にある循環調節に密接に関与する脳室周囲器官群と呼ばれる下弓器官や終板器官などでは血脳関門に欠けている。まさに、それらの部位にウアバインが密に分布し、AT-1 受容体も同様に密に分布して、相互作用が起きていることを如実に示している。RAA 系阻害薬だけでなく、カルシウム拮抗薬、 α_1 ブロッカー、 β ブロッカー、利尿薬など第一線で使われている降圧薬はいずれも中枢性に交感神経活動を抑制することが明らかにされており、詳細な作用点は明確になっていないが、脳内に起きている昇圧メカニズムのカスケードのどこかのポイントに作用しているものと考えられる。その点、血管拡張薬ではヒドララジンなどは、一過性の降圧があるものの反射性頻脈などの副作用で市場から淘汰された経緯があるが、以上のようなメカニズムを考慮すると当然のことかもしれない。以上のように、これまで「仮説の疾患」と揶揄されてきた高血圧であるが、ようやく、その成因が明らかになってきたものと思われる。ただし、未だ多少の空白部分を推測で補っているもので、今後の更なる研究が待たれる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計6件)

- ① Yoshika M, Komiyama Y, Takahashi H. Isolation of marinobufotoxin from the supernatant of cultured PC12 cells. Clin Exp Pharmacol Physiol. 38, 334-337, 2011. (査読あり)
- ② Kamimura D, Ohtani T, Sakata Y, Mano T, Takeda Y, Tamaki S, Omori Y, Tsukamoto Y, Furutani K, Komiyama Y, Yoshika M, Takahashi H. Matsuda T, Baba A, Umemura S, Miwa T, Komuro I, Yamamoto K. Ca²⁺ Entry Mode of Na⁺/Ca²⁺ Exchanger as A New Therapeutic Target for Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. Eur Heart J. 2011 Apr 13. [Epub ahead of print] (査読有り)
- ③ Yoshika M, Komiyama Y, Konishi M, Akizawa T, Takahashi H. Evidence for a novel digitalis-like factor, telocinobufotoxin, in human plasma. Submitted for publication 2011 (査読あり)
- ④ Yoshika M, Komiyama Y, Takahashi H. An ouabain-like factor is secreted from immortalized hypothalamic cells, and the release is regulated by aldosterone. Neurochemistry International in press 2011 (査読有り)
- ⑤ Takahashi H. Yoshika M, Komiyama Y, Nishimura M. The central mechanism of hypertension of every cause- Highlights on sodium ion, epithelial sodium channel, renin-angiotensin-aldosterone, oxidative stress and endogenous digitalis in the brain -, Hypertension Research in press 2011 (査読有り)
- ⑥ 高橋伯夫: 血管作動性物質-生合成、分泌、生理作用-内因性ジギタリス。日本臨床増刊号(第4版上) 67巻、Suppl 6号、2009、272-277. (査読なし)

[学会発表] (計8件)

- ① 高橋伯夫: 内因性ジギタリス研究の現状と将来、第33回日本高血圧学会総会、2010年10月15日、福岡国際会議場(福岡市)
- ② 吉賀正亨, 小宮山豊, 高橋伯夫: 中枢神経系における内因性ジギタリス様物質で

ある ouabain 分泌に関する検討、第33回日本高血圧学会総会、2010年10月16日、福岡国際会議場(福岡市)

- ③ Yoshika M, Komiyama Y, Takahashi H. Evidence for marinobufagenin-like immunoreactivity in the central nervous system. The 6th International Congress of Pathophysiology, International Conference Hall, Montreal, Canada, September 24, 2010
- ④ 吉賀正亨, 小宮山豊, 高橋伯夫: 高血圧発症機序における内因性ジギタリスの臨床検査学的研究。第57回日本臨床検査医学会学術集会、2010年9月10日、京王プラザホテル(東京)
- ⑤ Yoshika M, Komiyama Y, Yokoi T, Masuda M, Masaki H, Takahashi H. A mineralocorticoid receptor blocker, eplerenone decreases plasma levels of marinobufagenin-like immunoreactivity in rats. International Symposium on Cardiovascular Endocrinology and Metabolism CVEM 2010年3月31日、奈良市新公会堂(奈良市)
- ⑥ 吉賀正亨, 小宮山豊, 高橋伯夫: 高速液体クロマトグラフィーを用いた内因性ジギタリス様物質マリノブフォトキシンの存在様式の検討。第45回高血圧関連疾患モデル学会学術総会、2009年9月4日、東京ステーションコンファランス(東京都)
- ⑦ 吉賀正亨, 小宮山豊, 高橋伯夫: 副腎髄質における内因性ジギタリス様物質であるマリノブフォトキシシンとアンギオテンシンについての検討、第31回日本高血圧学会総会、2008年10月11日、札幌国際会議場(札幌市)
- ⑧ Yoshika M, Komiyama Y, Takahashi H. Evidence of an Endogenous Digitalis, Marinobufotoxin, in the Sodium Metabolism, 13th International SHR Symposium, 2008年6月19日、プラハ市(チェコ共和国)

[図書] (計1件)

- ① 成瀬光栄、平田結喜緒、楽木宏美(編集) 内分泌性高血圧診療マニュアル、診断と治療社、高橋伯夫: 内因性ジギタリス様物質、2010、pp. 63-67.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 伯夫 (TAKAHASHI HAKUO)

関西医科大学・医学部・教授
研究者番号：80094431

(2)研究分担者
なし
研究者番号：

(3)連携研究者
なし
研究者番号：