

機関番号：32651

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590841

研究課題名（和文）循環器疾患におけるアルドステロンの病態生理学的研究

研究課題名（英文）The pathophysiological role of aldosterone in cardiovascular disease.

研究代表者

吉村 道博 (YOSHIMURA MICHIMIRO)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：30264295

研究成果の概要（和文）：

アルドステロンは心不全の病態に深くかかわっているが、副腎における古典的アルドステロン産生経路に加え、近年我々は心臓でもアルドステロンが産生されていることを報告した。今回の研究では、これまで神経終末にのみ存在が知られていたN型カルシウムチャンネルが実は副腎におけるアルドステロン産生について深く関与していることを初めて報告した。また、心臓での組織アルドステロンの産生についても食塩や糖濃度、時間の関与が強く示唆された。これらの知見は将来的に糖と食塩と心疾患の関連の解明と心血管病の新たな治療戦略の開発に重要な意味をもたらすものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Aldosterone plays a key role in the pathogenesis of heart failure. In addition to the classical adrenocortical aldosterone synthesis pathway, we have previously reported that aldosterone is also produced in the heart. In this study, we demonstrated that N-type Calcium channel which has been indentified exclusively in sympathetic nerve terminals actually regulates aldosterone production in adrenal glands. Moreover, we found that aldosterone production in the heart is deeply affected by glucose and/or sodium condition. These results further elucidate the contribution of sodium and glucose condition to the pathophysiological significance in the cardiovascular diseases, and will lead to the development of novel therapeutic approach in the future.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000円	420,000円	1,820,000円
2009年度	1,000,000円	300,000円	1,300,000円
2010年度	1,000,000円	300,000円	1,300,000円
年度			
年度			
総計	3,400,000円	1,020,000円	4,420,000円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：心血管内分泌、アルドステロン、酸化ストレス、カルシウムチャンネル

1. 研究開始当初の背景

心臓はポンプ機能のみならず、内分泌器官としての特徴をもっている。心不全状態においてはその側面が強調され、レニン-アンギオテンシン-アルドステロン系やエンドセリンなどのホルモンは体循環のみならず心臓局所での発現も生じ、最終的には心臓を肥大化させ生体の恒常性を破綻に導く。これらのホルモンに対してナトリウム利尿ペプチド(NP)ファミリーが不全心筋より分泌され、これらに拮抗し心不全を改善させる方向に導くが、作用は不十分であり最終的には心不全は進行してしまう。我々はこの20年間、特にNPの病態生理学的意義の研究を続けてきており、さらに心不全に治療の面では世界に先がけて急性心不全の治療薬としてANP、BNPの投与を行った。その成果はCarpeptide ANP(日本)、Nesiritide(BNP:米国)として現在繁用されている(Yoshimura M, et al. *Circulation* 1991)。最近では血中BNP濃度と予後の関係を検討し、心筋梗塞を対象に最長約10年のフォローアップ研究を行い、BNPが心筋梗塞発症後の予後因子となることを示した(Suzuki S, Yoshimura M, et al. *Circulation* 2004)。我々はNPの研究を皮切りに心臓ホルモン合成系の研究を進めており、特にアルドステロンにおいてはこれまで副腎でのみ合成されていると考えられていたところ、不全心からの分泌をヒトにて証明した(Mizuno Y, Yoshimura M et al. *Circulation* 2001)。さらに、ヒト剖検心にてCYP11B2酵素(Aldosterone Synthase)の遺伝子発現を高感度real-time PCR法を新たに開発し確認した(Yoshimura M, et al. *J Clin Endocri Metab* 2002)。アルドステロン合成については、CYP11B2のほかにCYP11A、3 β -HSD2、CYP21といった酵素が必要であるが、そのすべてをヒト心臓にて確認した。作用の面では、仔ラット心筋培養系にてアルドステロンがACEにpositive feedbackをかけることを示した(Harada E, Yoshimura M, et al. *Circulation* 2001)。これは組織内にてレニン-アンギオテンシン-アルドステロン系の悪循環が存在することを意味している。不全心にてANP、BNPは大量に分泌されるが、これらは副腎でも強いアルドステロン合成抑制作用を有する。このことから、同様に心臓でのアルドステロン合成を抑制していると仮説し、実際にそれを確認した(Ito T, Yoshimura M, et al. *Circulation* 2004)。この事実は、仮に心臓にNPが存在しない場合は不全心は強いアルドステロン産生臓器であることを物語っている。さらに強調したいことに最近の我々の研究成果では、アルド

ステロンだけでなく、副腎網状層でのみ発現されると思われていたデヒドロエピアンドロステロン(DHEA)のヒト心臓での発現を示した(Nakamura S, Yoshimura M, et al. *Circulation* 2004)。DHEAの合成にはCYP17酵素が必須であるが、その遺伝子発現もヒト剖検心にて発現を確認した。これらアルドステロンやDHEAの研究により、'Cardiac steroidogenesis'の概念が形成された。アルドステロンとDHEAの両ホルモンの分泌バランスを健常心と不全心で検討すると、不全心ではアルドステロンが優位に、健常心ではDHEAが優位に分泌され、さらにヒト高血圧心からのadenocorticotrophic hormone(ACTH)の分泌も示した。(Mizuno Y, Yoshimura M, et al. *J Hypertens* 2005)。この発見は心臓においては局所ステロイド合成系としてレニン-アンギオテンシン-アルドステロン系のみでなく、HPA軸が存在することを示している。アルドステロンは心血管のリモデリングを起こすことは広く知られているが、その場合の重要な共役因子としては食塩である。最近の我々の研究では、アルドステロンそのものは心血管系には悪い影響は及ぼさないが、高食塩下ではごく短期の間、非ゲノム的に'抗細胞脱水作用'という細胞保護的に働くことを示した(Yamamuro M, Yoshimura M, et al. *Endocrinology* 2006)。しかし、長期的には高食塩下においてはアルドステロンが心筋に作用すると細胞は著しく肥大を起こす。これはゲノム作用であって、Mineralocorticoid Receptor阻害薬はこの悪い心肥大作用を抑制するが、前者の好ましい作用を阻害することはない。この短期および長期のアルドステロン作用に関しては、詳細な機序こそ違うが、心筋細胞上に存在するNa/H exchanger (NHE1)が深く関与している。以上の様な研究背景から、我々はアルドステロンの合成と作用に関してさらなる検討を行う予定である。

2. 研究の目的

(1) 組織アルドステロン合成に関する検討

アルドステロンに関して、まず心臓組織での合成制御因子を検討する必要がある。ナトリウム過剰摂取が関与していることが予測され、組織内アルドステロンの合成亢進にて肥大が進行する(Yamamuro S, Yoshimura M, et al. *Endocrinology* 2006)。よって、この研究は心肥大や血管障害と塩分過剰摂取の関連に直結する。

(2) ストレスと心臓アルドステロン

ストレスにより心臓アルドステロン合成が亢進すると考えており、如何に関与するか

を検討する。

(3) 高感度の酸化ストレス反応実験系を用いた 'Angiotensin II とアルドステロン' の酸化ストレス促進力の比較

アルドステロンは心血管系に悪影響を与えるが、これまでアンジオテンシン II がその主役と考えられており、いずれがより強い作用を与えるのか、酸化ストレスを指標に AT1 受容体拮抗薬や MR 阻害薬を用いて培養細胞系にて検討する。

(4) アルドステロン、Angiotensin II、またはエンドセリンと食塩に関する検討。

In vitro の系において、培養液中の食塩濃度はアルドステロンの作用に強く影響し、低濃度の食塩培養液ではアルドステロンはほとんど心肥大に影響を及ぼさず、僅かな食塩濃度の増加がアルドステロンの心肥大作用を大きく進める。一方では Angiotensin II は心肥大作用があるが、食塩との関係は明らかになっていない。そこに組織アルドステロン合成が介入するか否かは不明であり、それを検討する。エンドセリンに関しても同様に検討する。

(5) 副腎におけるアルドステロン研究

心臓と同様に副腎でのアルドステロン研究も進める。現在注目しているのは Ca チャネルとアルドステロン合成の関係であり、すなわちカルシウム拮抗薬がアルドステロン合成を抑制している可能性が考えられる。Ca チャネルのサブタイプとして L 型、N 型、T 型がどのように関与しているか不明であり、近年は T 型との関連性が注目されているが、我々は N 型を主に研究する。

以上のことを踏まえ、内分泌学的な側面から心臓には従来の概念を大きく超える可能性が潜んでいる。心臓で合成、分泌されるホルモンがペプチドのみならずステロイド系に及ぶことはこれまでにない発見であり将来的に、食塩と心血管疾患の関連やストレスと心血管疾患の関連の臨床的研究につながると思われる。

3. 研究の方法

(1) 組織アルドステロン合成に関する検討

まず心臓組織での合成制御因子を検討する。その中でも食塩過剰摂取との関連性は重要な検討課題である。方法としては、まず in vitro の系として、ラット心筋培養細胞を用いて高濃度の食塩負荷のもと、アルドステロン合成酵素である CYP11B2 の発現を real time PCR にて定量的に評価を行う。また、アルドステロンの分泌の検討を行うが、組織量が少ないため、微量でも検出可能な高感度の検出方法の検討も進める。

(2) ストレスと心臓アルドステロン

各種ストレスにより心臓アルドステロン

の合成が促進されると考えており、種々の刺激を行い心臓におけるアルドステロンの発現を検討する。具体的には(1)の食塩負荷下での系と同様に行う。

(3) 高感度の酸化ストレス反応実験系を用いた 'Angiotensin II とアルドステロン' の酸化ストレス促進力の比較

アルドステロンは心血管系に悪影響を与えるが、これまでアンジオテンシン II がその主役と考えられており、いずれがより強い作用を与えるのか、酸化ストレスをキーワードに調べる。従来は有効な酸化ストレスマーカーがなかったが、最近我々が開発した 2',7'-dichloro dihydro - fluorescein diacetate fluorescence (H₂D₂C-FDA) を用いて培養細胞下に検討を行う (Shono M, Yoshimura M, et al. Circ J 2007)。また Thioredoxin も優れた酸化の指標となるため、この検討も行う。

(4) アルドステロン、Angiotensin II、またはエンドセリンと食塩に関する検討。

Angiotensin II、エンドセリンに関して、その作用にアルドステロンが介入するかどうかを検討する。これまでの我々の実験では培養液 Na 濃度を生理的な 141-146mEq/ml に変動させているが (Yamamuro M, Yochimura M, et al. Endocrinol 2006)、病態修飾を考慮し、より低濃度・高濃度での食塩の影響を心肥大作用、組織アルドステロン合成に関して検討を行う。

(5) 副腎におけるアルドステロン研究

L/N 型カルシウム拮抗薬であるシニルジピンを用いて、副腎皮質細胞上にある N 型 Ca チャネルへの作用が、アルドステロン分泌を抑制するかどうか検証を行う。

4. 研究成果

(1) 組織アルドステロン合成に関する検討

ラット初代心筋培養細胞を用いて in vitro に高濃度食塩下に培養を行い、各種因子により刺激し、CYP11B2 酵素の発現の評価を Real time PCR 法により試みた。アンジオテンシン II、インスリン、エンドセリン、フェニレフリン、高血糖など試みた中では、高血糖が同酵素の発現を上昇させる可能性が示唆された。ただ発現の時間依存性の変化も示唆されており、さらなる検討が必要である。

また組織アルドステロン分泌に関しては ELISA 法および質量分析法にて、CYP11B2 酵素の上昇が認められた反応系にて検討を試みており、追って報告する予定である。

In vivo の系としては圧負荷モデルである下行大動脈結紮ラット心筋組織において、心不全以降前に CYP11B2 酵素の上昇が認められ、アルドステロン分泌の可能性が示唆された。食塩負荷や心不全への移行との関連など、さらなる検討が必要である。

(2) ストレスと心臓アルドステロン

(1)と同様の系にてH2O2刺激による酸化ストレス惹起を行い、CYP11B2酵素の発現上昇を認めた。濃度、時間依存性の反応変化もみられることから、より生理的ストレスに近い反応系を構築し検討を重ねていく必要があると考えられた。

(3)高感度の酸化ストレス反応実験系を用いた'Angiotensin IIとアルドステロン'の酸化ストレス促進力の比較

高感度酸化ストレス反応系の実験システムを用いたアルドステロンの酸化力の検討を行った。仔ラット培養心筋細胞を用い、無血清培養を行い、H₂DC-FDAを用いてsuperoxide levelを測定することで酸化ストレスの評価を行った。結果、48時間の無血清培養によりreactive oxygen species(ROS)産生は有意に増加した。アルドステロンを48時間無血清培養の各々前後1時間のみ、短時間刺激したところ有意ではないもののROS産生が抑制される傾向が示された。この結果はこれまで多数報告されている、アルドステロンのゲノム作用を介した炎症惹起作用に伴う、ROS産生増加作用と相反する作用であり、大変興味深い。つまり、アルドステロンは短時間刺激により、非ゲノム作用を介し、一過性に細胞保護作用を示す可能性があることを示唆する所見である。今後は、各種受容体あるいは蛋白活性などの阻害薬を併用し、この細胞保護作用のメカニズムにつき検討していく予定である。

(4)アルドステロン、Angiotensin II、またはエンドセリンと食塩に関する検討。

(1)と同様の系において初代心筋培養を行い、低食塩、高食塩の条件のもとアルドステロン、angiotensin II、エンドセリンにてそれぞれ刺激を行った。高食塩において一定の条件下にてBNP遺伝子、およびアルドステロンCYP11B2酵素の上昇反応がある可能性が示唆され、組織アルドステロンへの強い影響も示唆された。ナトリウム濃度は137-155 mEq/mlの変動の下の結果であり、血糖の影響や時間依存性変化の側面もあることから、さらなる検討が必要である。

(5)副腎におけるアルドステロン研究

H295R細胞を用いて、副腎皮質細胞においてN型Caチャネルの阻害がいかんアルドステロン分泌への影響するかを検討した。まず免疫染色、ウエスタンブロッティング、パッチクランプ法にてN型Caチャネルの電流測定を行いH295R細胞にN型Caチャネルが存在し、機能的に働いていることを明らかとした。それからAngiotensin II刺激によるCYP11B2蛋白の発現上昇、およびCnTXがこれを阻害しないことを確認したうえで、siRNA手法を用いてN型Caチャネルの発現量を低下させるか(図1)、N型Caチャネル特異

的阻害剤である ω -conotoxin(CnTX)を作用させることで(図2)、Angiotensin II刺激によって分泌されるアルドステロン分泌量は有意な低下がみられた。

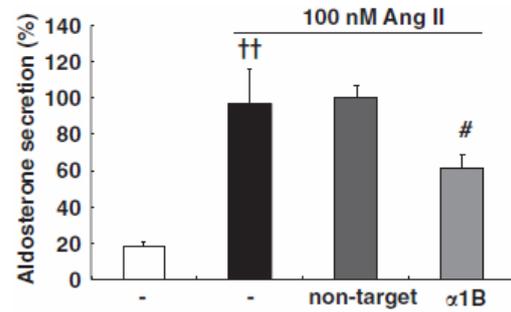


図1

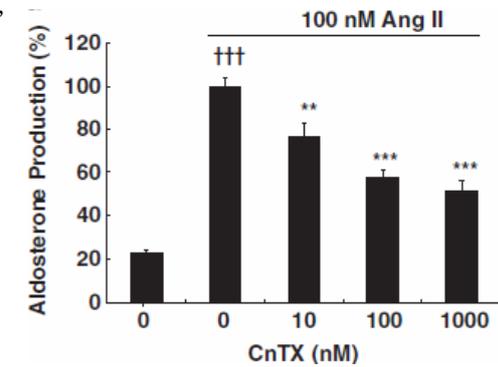


図2

次にL/N型Caチャネル阻害作用を持つシニルジピンがアルドステロン分泌を抑制するかどうか、T型Caチャネル拮抗薬であるニフェジピン、L型チャネルの影響も考慮しL/T型Caチャネルブロッカーであるエホニジピンも加えて比較検討を行った。(図3)

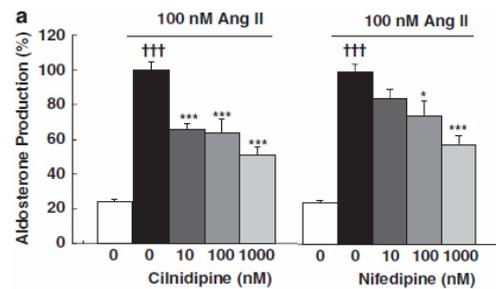


図3

結果、L型Caチャネル阻害作用のみを持つニフェジピンに比べ、L/N型Caチャネル阻害作用を持つシニルジピンでは強いアルドステロン分泌抑制作用が示された。以上よりヒト副腎皮質細胞に存在するN型Caチャネルは、一部アルドステロン分泌機能を担っており、その阻害剤であるシニルジピンは副腎皮質からのアルドステロン分泌を直接抑制する可能性が示唆された。また今回有効血中濃度(0.8~32.5nM)内にも抑制作用が認められ

ることから、臨床使用においても同様の効果は十分に期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 19 件)

- ① Aritomi S, Wagatsuma H, Numata T, Uriu Y, Nogi Y, Mitsui A, Konda T, Mori Y, Yoshimura M. Expression of N-type calcium channels in human adrenocortical cells and their contribution to corticosteroid synthesis, *Hypertension Research*, 査読有, 34, 2011, 193-201
- ② 吉村道博: 内分泌器官としての心臓研究: ナトリウムペプチドとアルドステロンを中心に、日本小児循環器学会雑誌、査読無、27 (2)、2011、2-9
- ③ Yoshimura M, Kawai M. Synergistic inhibitory effect of angiotensin II receptor blocker and thiazide diuretic on the tissue renin-angiotensin-aldosterone system, *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 査読有, 11(2), 2010, 124-126
- ④ Ueno H, Yoshimura M, Nakayama M, Yamamuro M, Nishijima T, Kusuha K, Nagayoshi Y, Kojima S, Kaikita K, Sumida H, Sugiyama S, Ogawa H, Clinical Factors affecting Serum Potassium Concentration in Cardio-renal Decompensation Syndrome, *Int J Cardiol*, 査読有, 138(2), 2010, 174-181
- ⑤ 阿部裕一、吉村道博、e. 抗アルドステロン薬②心不全における使い方、*Heart View*、査読無、14(12)、2010、130-133
- ⑥ 小武海公明、吉村道博、アルドステロン拮抗薬の効果、意義、*Vascular Medicine*、査読無、6 (3)、2010、83-85
- ⑦ 川井 真、吉村道博、アルドステロンブロッカーの心保護作用研究の最先端、*血圧*、査読無、17 (6)、2010、32-37
- ⑧ Kawai M, Hongo K, Komukai K, Morimoto S, Nagai M, Seki S, Taniguchi I, Mochizuki S, Yoshimura M, Telmisartan predominantly suppresses cardiac fibrosis, rather than hypertrophy, in renovascular hypertensive rats. *Hypertens Res*, 査読有, 32(7), 2009, 604-610
- ⑨ 小武海公明、吉村道博、選択的抗アルドステロン薬、*日本臨床*、査読無、67 (増7)、2009、359-362
- ⑩ 小武海公明、吉村道博、ACE阻害薬・ARB・抗アルドステロン薬の共通点と相違点、*診断と治療*、査読無、97 (4)、2009、694-700

- ⑪ 吉村道博、心不全とアルドステロン、*日本医事新報*、査読無、4420、2009、57-61
- ⑫ 名越智古、吉村道博、抗アルドステロン薬、*medicina*、査読無、46(1)、2009、39-41
- ⑬ Yoshimura M, Anzawa R, Mochizuki S, Cardiac metabolism in diabetes mellitus, *Curr Pharm Des*, 査読有, 14(25), 2008, 2521-2526
- ⑭ Komukai K, Yagi H, Ogawa T, Date T, Morimoto S, Kawai M, Hongo K, Taniguchi I, Yoshimura M, Inhibition of rennin-angiotensin system prevents re-hospitalization in heart failure patients with preserved ejection fraction, *Circ J*, 査読有, 72(12), 2008, 2004-2008
- ⑮ Yamamuro M, Yoshimura M, Nakayama M, Abe K, Sumida H, Sugiyama S, Saito Y, Nakao K, Yasue H, Ogawa H, Aldosterone, but not angiotensin II, reduces angiotensin converting enzyme 2 gene expression levels in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ J*, 査読有, 72(8), 2008, 1346-1350
- ⑯ 名越智古、吉村道博、心不全と選択的アルドステロン拮抗薬、成人病と生活習慣病、査読無、38(12)、2008、1379-1385
- ⑰ 吉村道博、アルドステロンの基礎臨床: 新たな展開を前にして 心不全とアルドステロン、*日本内科学会雑誌*、査読無、97 (9)、2008、2166-2170
- ⑱ 南井孝介、吉村道博、アルドステロンと心筋リモデリング、*Mebio*、査読無、25 (9)、2008、26-34
- ⑲ 小武海公明、吉村道博、心不全とアルドステロン、*最新医学*、査読無、63 (4)、2008、126-130

[学会発表] (計 14 件)

- ① 吉村道博、内分泌器官としての心臓研究: ナトリウムペプチドとRAA系を中心として、第30回日本小児循環動態研究会学術集会、2010年10月16日、東京
- ② 吉村道博、循環器疾患における神経体液性因子の意義「循環器疾患におけるアルドステロンの意義」、第58回日本心臓病学会学術集会2010年9月18日、東京
- ③ 吉村道博、RAAS activation and remodeling of the failing heart -4 Is aldosterone angiotensin a unique agent for treatment of hypertension and heart failure?、第20回国際心臓研究学会、2010年5月14日、京都
- ④ 吉村道博、Aldosterone and disease 「Biphasic Character of Aldosterone to the Cardiomyocytes From Viewpoints of Sodium Regulation and Insulin

signaling]、第 14 回国際内分泌学会、2010 年 3 月 27 日、京都

- ⑤吉村道博、Heart as an Endocrine Organ 「Cardiac Aldosterone synthesis」、第 14 回国際内分泌学会、2010 年 3 月 27 日、京都
- ⑥吉村道博、How to Prevent the Progression from Hypertension to Congestive Heart Failure、Biphasic Character of Aldosterone to the Cardiomyocytes from a Viewpoint of Sodium Regulation and Insulin Signaling、第 74 回日本循環器学会総会・学術集会、2010 年 3 月 6 日、京都
- ⑦吉村道博、慢性腎臓病と RAAS 研究の将来展望 心腎関連におけるアルドステロンの意義：アルドステロンの生理および病態生理からの考察、第 39 回日本腎臓学会東部学術大会、2009 年 10 月 3 日、東京
- ⑧吉村道博、心不全とアルドステロン、第 39 回日本腎臓学会東部学術大会、2009 年 10 月 3 日、東京
- ⑨吉村道博、ホルモンからみた心不全の病態と治療、第 14 回日本冠動脈外科学会学術大会、2009 年 7 月 16 日、熊本
- ⑩吉村道博、循環器疾患とカリウム、第 73 回日本循環器学会総会・学術集会、2009 年 3 月 22 日、大阪
- ⑪吉村道博、循環器疾患とアルドステロン、第 49 回日本老年医学会 関東甲信越地方会、2009 年 3 月 7 日、東京
- ⑫吉村道博、循環器疾患とアルドステロン、第 8 回日本心血管カテーテル治療学会学術集会、2008 年 11 月 23 日、京都
- ⑬吉村道博、内分泌器官としての心臓：心不全の病態研究の転換、第 53 回日本未熟児新生児学会学術集会、2008 年 10 月 30 日、札幌
- ⑭吉村道博、高食塩状態とアルドステロンの心肥大に対する影響：ラットを用いた in vitro と in vivo の検討、第 31 回日本高血圧学会総会、2008 年 10 月 9 日、札幌

[図書] (計 9 件)

- ①安澤龍宏、吉村道博、先端医学社、選択性アルドステロンブロッカーのすべて、2009 年、212 頁-215 頁
- ②小武海公明、吉村道博、中外医学社、重症心不全の予防と治療、2009 年、238 頁-243 頁
- ③上原良樹、清水光行、吉村道博、羊土社、生活習慣病診療に基づく CVD 予防ハンドブック、2009 年、289 頁-292 頁
- ④伊達太郎、吉村道博、中山書店、心血管病薬物治療マニュアル、2008 年、213 頁-215 頁
- ⑤橋本浩一、吉村道博、文光堂、新・心臓病診プラクティス 12 冠動脈疾患に迫る、

2008 年、266 頁-271 頁

- ⑥小武海公明、吉村道博、文光堂、新・心臓病プラクティス 高血圧を織る・個別診療に活かす、2008 年、258 頁-261 頁
- ⑦吉村道博、文光堂、心腎連関を織る、2008 年、222 頁 - 225 頁
- ⑧吉村道博、メディカ出版、CIRCULATION Up-to-Date、病棟必携！心不全診療マニュアル、2008 年、249 頁 - 252 頁
- ⑨吉村道博、羊土社、心腎相関の病態理解と診療、2008 年、261 頁-266 頁

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉村 道博 (YOSHIMURA MICHIHIRO)
東京慈恵会医科大学・医学部・教授
研究者番号：30264295