

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590879

研究課題名（和文） プロテオミクス解析手法を用いたアルドステロンの血管細胞への直接作用の解明

研究課題名（英文） Comprehensive analysis of aldosterone-regulated genes in human vascular cells

研究代表者

吉本 貴宣（YOSHIMOTO TAKANOBU）

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80297457

## 研究成果の概要（和文）：

アルドステロン(Aldo)は心血管系組織のミネラルコルチコイド受容体(MR)に直接作用し、心血管障害を惹起する機序が提唱されている。我々は今回、その現象の細胞レベルでの分子機序を解明する目的で、血管内皮細胞でMRを介して遺伝子発現が誘導される因子の網羅的解析と病態との関連の検討を行った。初代血管内皮細胞では継代に伴い急速にMRの発現低下、応答減弱が生じるため、最終的にMR遺伝子をヒト血管内皮細胞株(EAhy926)に恒常的に遺伝子導入した細胞株(MR-EAhy)を作成し、MR-EAhyが生理的血中濃度( $10^{-10}$ ~ $10^{-9}$ M)のAldoで良好なMR依存性の遺伝子転写応答を生じることを確認した。次いで、MR-EAhyにおいてAldo( $10^{-9}$ M)刺激下で発現誘導される遺伝子群をtranscriptome解析し、発現が有意( $p>0.05$ )に増加した125遺伝子中、real-time RT-PCRによる二次スクリーニングにより、1) Aldo非刺激時の基底発現レベルが高く(RT-PCRのCt値30未満)、2) Aldo刺激により1.5倍以上の発現増加を示し、3) MR拮抗薬(スピロラクトン $10^{-6}$ M)にて完全に発現が抑制される、12遺伝子(FKBP5, DDIT4, CCL23, NEDD9, EPS8, ESM-1, AKAP12, ERRF11, ANGPTL4, S1P3, IGFBP3, SNF1LK)を選定した。このうちFKBP5, CCL23, NEDD9, ESM-1, ERRF11, ANGPTL4, IGFBP3, SNF1LKの7因子についてイムノプロットでAldoによる蛋白レベルでの発現が確認された。これら7因子のうち、Aldo誘導性高血圧モデルラットの大動脈壁において対照ラットに比しESM-1(約10倍)、SNF1LK(約3倍)、ANGPTL4(約3倍)のmRNA発現増加が認められ、いずれもスピロラクトン投与により有意に発現の抑制が認められた。

本研究の結論として、MR遺伝子導入ヒト血管内皮細胞株を用いたトランスクリプトーム解析を起点に蛋白レベルへの翻訳が確認され、Aldo血管障害モデルで発現が増加するESM-1、SNF1LK、ANGPTL4の3遺伝子を同定した。これらの遺伝子産物のAldo誘導性血管炎における病態生理学的意義が注目される。

## 研究成果の概要（英文）：

A series of studies have demonstrated that endothelial cell is one of the target tissues of aldosterone. Here, we have conducted a comprehensive gene expression analysis of aldosterone-inducible genes in human endothelial cell lines stably expressing human mineralocorticoid receptor (MR) by bicistronic retroviral system (MR-EAhy). We found that aldosterone in physiological concentrations robustly induced MR-dependent transcriptional response in MR-EAhy. By DNA microarray analysis, we validated 12 aldosterone-inducible genes up-regulated (FKBP5, DDIT4, CCL23, NEDD9, EPS8, ESM-1, AKAP12, ERRF11, ANGPTL4, S1P3, IGFBP3, SNF1LK) among which at least 7 genes (FKBP5, CCL23, NEDD9, ESM-1, ERRF11,

ANGPTL4, IGFBP3, SNF1LK) were confirmed to their upregulation at protein levels. In addition, the mRNA expressions of ESM1, SNF1LK, ANGPTL4 were upregulated in vascular tissue from aldosterone-induced hypertensive rats, suggesting the pathophysiological relevance of these genes in aldosterone-induced vascular injury. In conclusion, using MR stably-expressed human endothelial cell lines, we identified a variety of aldosterone-inducible genes, with their possible roles in the development and/or the protection for aldosterone-induced vascular injury.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器病態学

キーワード：分子血管病態学、アルドステロン、ミネラルコルチコイド受容体

#### 1. 研究開始当初の背景

アルドステロンの心血管障害には、腎臓からのNa再吸収亢進による昇圧作用のみならず、心血管組織のミネラルコルチコイド受容体(MR)に作用して酸化ストレスや炎症、線維化を惹起し、直接的に心血管障害を惹起する機序が想定されている。このアルドステロンの心血管障害作用はアルドステロンの自律過剰分泌によって発症する二次性高血圧症である原発性アルドステロン症で、血圧が同等の本態性高血圧症に比べ脳卒中、心筋梗塞の発症が4-6倍多いことからも支持される。しかしアルドステロンによる心血管障害の詳細な分子機序は明らかでない。当研究室では、アルドステロンがラット血管内皮細胞でMRを介して、オステオポンチンやACEなど各種向炎症性遺伝子群の発現を増加させ、NAD(P)Hオキシダーゼを活性化して酸化ストレスを増加させることをこれまで報告し、アルドステロンによる血管障害の標的細胞として血管内皮細胞の重要性を示した。しかし、ヒト血管内皮細胞におけるMRのゲノ

ミック作用の下流応答遺伝子の詳細は不明である。

#### 2. 研究の目的

本研究ではヒトでのアルドステロンによる血管障害に関与する心血管組織MR下流の応答遺伝子の同定をヒト血管内皮細胞株を用いた網羅的スクリーニングにより同定することを目的としている。さらに候補遺伝子を遺伝子発現動態や、蛋白翻訳レベルでの検討、病態モデルでの発現により選定し、ヒトよりアルドステロンMRの下流で心血管障害と密接に関連する候補遺伝子を抽出し、アルドステロンによる心血管障害の分子機序の解明を目指した。

#### 3. 研究の方法

##### 細胞モデル：

ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞(HUVEC)株(EAhy926：以下EAhy)に、レトロウイルス系を用いてヒトMR cDNAを導入し、MRを恒常的に発現する血管内皮細胞株(MR-EAhy)を作製した。

#### MR 依存性転写活性の検討：

HRE-minimal promoter-LUC よりなるプロモーター発現ユニットを非増殖型アデノウイルスベクターに組み換えたルシフェラーゼアッセイ系を作成し、MR-EAhy, EAhy に遺伝子導入し Aldo 刺激の有無による、転写応答を検討した。

#### 各種蛋白発現：

イムノプロットで確認した。

#### マイクロアレイと real-time RT-PCR による二次スクリーニング：

MR-EAhy をアルドステロン( $10^{-9}$ M)で 6 時間刺激し、DNA マイクロアレイ (Whole Human Genome Oligo DNA Microarray, Agilent 社) を用いて遺伝子の網羅的解析を行い、非刺激群との遺伝子発現の差異を統計学的に解析し (各群  $n=3$ ), アルドステロンにより誘導される遺伝子群を抽出した。real-time RT-PCR でその再現性と特異性や発現プロファイル (時間、濃度依存性) を確認した。

#### アルドステロン負荷高血圧モデルでの検討：

浸透圧ミニポンプを留置してアルドステロンの持続皮下投与を行ったアルドステロン負荷高血圧モデルラットを作成し、大動脈組織を用いて、real-time RT-PCR で選定された候補遺伝子の発現動態を、対照群、スピロノラクトン治療群ラットと比較検討した

#### 4 . 研究成果

研究開始当初は初代培養血管内皮細胞を対象にアルドステロン刺激により誘導される蛋白質を二次元電気泳動で展開後にスポットしプロテオーム手法で同定する実験系を試みた。しかし初代培養血管内皮細胞は継代に伴い MR 発現およびアルドステロン応答が急速に減弱すること、細胞バッチによる結果の差異、プロテオームによる検出感度が低く、候補遺伝子を偽陰性の問題が生じた。そこでヒト血管内皮細胞株 EAhy にレトロウイルスを用いてヒト MRcDNA を恒常的に遺伝子

導入した細胞株 (MR-EAhy) を作製し、より感度の高いトラスクリプトーム解析を試みた。MR-EAhy ではイムノプロットで MR 蛋白の発現を認め、生理的濃度のアルドステロン刺激により、用量依存性 ( $3 \times 10^{-10}$ - $3 \times 10^{-9}$  M) に HRE 転写活性が増強し、MR 拮抗薬であるスピロノラクトン ( $10^{-6}$  M) で完全に抑制された。また、上皮細胞における MR の一次応答遺伝子である SGK-1 の mRNA 発現もアルドステロンにより濃度依存性 ( $10^{-9}$ - $10^{-8}$  M) に誘導された。以上より、MR-EAhy は生理的濃度のアルドステロンによって細胞応答を示す細胞モデルであることが示された。

次にMR-EAhyをアルドステロン ( $10^{-9}$  M) で6h刺激後、DNAマイクロアレイ解析を行い、MR下流遺伝子の網羅的な解析を試みた。有意に発現変動した遺伝子を、NCBIデータベースに登録されている候補遺伝子で選別したところ、2倍以上の発現増加する遺伝子群(125個)と、1/2倍以下に発現低下する遺伝子群(20個)を認めた。さらに発現増加した中から候補遺伝子(26個)を選別し、real-time RT-PCRを行い再現性と特異性を確認したところ、アルドステロン刺激によって1.5倍以上に発現が亢進し、スピロノラクトンにより完全に反応が抑制される遺伝子群(15個)を検出した(陽性的中率57.7%)。さらに、mRNA発現レベルの低い遺伝子(PCR曲線のthreshold cycle数  $\geq 30$ )を除外し、以下の12個の候補遺伝子を選定した：FK506 binding protein 5 (FKBP5)、DNA-damage-inducible transcript 4 (DDIT4)、chemokine (C-C motif) ligand 23 (CCL23)、neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9 (NEDD9)、epidermal growth factor receptor pathway substrate 8 (EPS8)、endothelial cell-specific molecule 1 (ESM-1)、A kinase (PRKA) anchor protein 12 (AKAP12)、ERBB

receptor feedback inhibitor 1 (ERRF1)、  
angiotensin-like 4 (ANGPTL4)、  
sphingosine-1-phosphate receptor 3  
(S1PR3)、insulin-like growth factor  
binding protein 3 (IGFBP3)、SNF-1 like  
kinase (SNF1LK)。同様に、アルドステロンに  
より発現が抑制された候補遺伝子群を絞り込  
んだ結果、以下の5個の遺伝子を選定した：  
serpin peptidase inhibitor clade D member  
1 (SERPIND1)、D4 zinc and double PHD fingers  
family 3 (DPF3)、ureidopropionase (UPB1)、  
leckstrin 2 (PLEK2)、hepatitis A virus  
cellular receptor 2 (HAVCR2)。

また、MR-EAhyをアルドステロン( $3 \times 10^{-9}$  M)  
で48h刺激後にイムノプロットを行い、アルド  
ステロン誘導遺伝子(12個)のうち9個につい  
て蛋白発現を検証した。その結果、CCL23、  
S1PR3を除く7個の遺伝子(FKBP5、NEDD9、ESM1、  
ERRF1、ANGPTL4、IGFBP3、SNF1LK)がアルド  
ステロン刺激により蛋白発現が亢進した。  
これらのトランスクリプトーム解析結果を  
検証するため、ラットの cDNA 遺伝子配列が  
データベースより入手できないCCL23を除く  
11個のアルドステロン誘導遺伝子について、  
アルドステロン負荷高血圧モデルラットの  
大動脈を用いて mRNA の発現を評価し、対照  
ラットとの比較で ESM1、SNF1LK、ANGPTL4 に  
mRNA 発現増加を認めた。残りの 8 個(FKBP5、  
DDIT4、NEDD9、EPS8、AKAP12、ERRF1、S1PR3、  
IGFBP3)については差を認めなかった。

結論：生理的濃度のアルドステロンで MR の  
細胞応答が増強するヒト血管内皮細胞株  
(MR-EAhy)を樹立し、DNA マイクロアレイ解析  
を端緒に、詳細な mRNA 発現プロファイル解  
析、蛋白発現、病態モデル血管壁での発現動  
態の検討より、ESM-1、SNF1LK、ANGPTL4 の 3  
遺伝子を同定した。これらの遺伝子産物の  
Aldo 誘導性血管炎における病態生理学的意

義が注目される。

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7件)

1. Sekizawa N, Yoshimoto T, Hayakawa E, Suzuki N, Sugiyama T, Hirata Y. Transcriptome analysis of aldosterone-regulated genes in human vascular endothelial cell lines stably expressing mineralocorticoid receptor. *Mol Cell Endocrinol.* 2011;341:78-88.
2. Akaza I, Yoshimoto T, Tsuchiya K, Hirata Y: Endothelial dysfunction associated with hypercortisolism is reversible in Cushing's syndrome. *Endocr J* 2010;57:245-252.
3. Sakurada M, Yoshimoto T, Sekizawa N, Hirono Y, Suzuki N, Hirata Y: Vasculoprotective effect of cilostazol in aldosterone-induced hypertensive rats. *Hypertens Res* 2010;33:229-235
4. Wago T, Yoshimoto T, Akaza I, Tsuchiya K, Izumiyama H, Doi M, Hirata Y: Improvement of endothelial function in patients with hypertension and type 2 diabetes after treatment with telmisartan. *Hypertens Res* 2010;33:796-801
5. Tsuchiya K, Yoshimoto T, Hirata Y. Endothelial dysfunction is related to aldosterone excess and raised blood pressure. *Endocr J* 2009;56:553-559.
6. Minami I, Yoshimoto T, Hirono Y, Izumiyama H, Doi M, Hirata Y: Diagnostic accuracy of adrenal venous sampling in comparison with other parameters in primary aldosteronism. *Endocr J* 2008;55:839-846.
7. Iwashima F, Yoshimoto T, Minami I, Sakurada M, Hirono Y, Hirata Y: Aldosterone induces superoxide generation via Rac1 activation in endothelial cells. *Endocrinology* 2008;149:1009-1014.

[学会発表](計5件)

- 1 . 関澤直子、吉本貴宣、Jack Beadle、早川恵理、杉山徹、平田結喜緒：ミネラルコルチコイド受容体(MR)導入血管内皮細胞におけるアルドステロンによるANGPTL4の発現制御機構 第33回日本高血圧学会総会 福岡(2010.10.15~17)
- 2 . Sekizawa N, Izumiyama H, Yoshimoto T, Hirata Y: Distinct Uptake of 18F-Fluorodeoxyglucose by Brown

Adipose Tissue in  
Catecholamine-Secreting Tumor. 14th  
International Congress of Endocrinology  
Kyoto, Japan (2010.3.31~4.1)

3. 吉本貴宣、平田結喜緒：アルドステロン高血圧モデルでの心血管障害発症の分子機構-酸化ストレスと炎症の意義 第 82 回日本薬理学会年会 横浜 (2009.3.16~18)
4. 関澤直子、吉本貴宣、早川恵理、土屋恭一郎、七里眞義、平田結喜緒：ヒト血管内皮細胞へのミネラルコルチコイド受容体(MR)遺伝子導入細胞株の樹立：第 82 回日本内分泌学会学術総会 前橋市 (2009.4.23~25)
5. 関澤直子、吉本貴宣、早川恵理、杉山徹、七里眞義、平田結喜緒：血管内皮細胞でのアルドステロン作用の解明を目指したミネラルコルチコイド受容体(MR)遺伝子過剰発現内皮細胞株の樹立：第 13 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会 さいたま市 (2009.11.23~24)

〔図書〕(計 5 件)

1. 吉本貴宣、平田結喜緒「アルドステロンの心血管作用」原発性アルドステロン症診療マニュアル 改定第 2 版(成瀬光栄、平田結喜緒 編)診断と治療社(東京):16-17,2010
2. 吉本貴宣、平田結喜緒「アルドステロン」内分泌性高血圧診療マニュアル(成瀬光栄、平田結喜緒、楽木宏美 編)診断と治療社(東京):23-26,2010
3. 吉本貴宣、泉山 肇、平田結喜緒「原発性アルドステロン症との合併例」クッシング症候群診療マニュアル(平田結喜緒、成瀬光栄 編)診断と治療社(東京):226~227,2009.
4. 吉本貴宣、平田結喜緒「腎血管性高血圧」内分泌代謝専門医ガイドブック改訂第 2 版(成瀬光栄、平田結喜緒、島津章 編)診断と治療社(東京):230~232,2009.
5. 吉本貴宣、平田結喜緒「心血管リスクホルモンとしてのアルドステロンおよび受容体の機能と役割をみる」選択的アルドステロンブロッカーのすべて(猿田享男 編)先端医学社(東京):23-28,2009.

〔産業財産権〕

該当なし。

出願状況(計 件)

名称：

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
該当なし。

6. 研究組織

(1)研究代表者：吉本貴宣

(東京医科歯科大学・医学部附

属病院・助教)

研究者番号：80297457

(2)研究分担者：該当なし

( )

研究者番号：

(3)連携研究者；該当なし。

( )

研究者番号：