

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月13日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591006

研究課題名（和文）アルドステロン合成酵素 CYP11B2 発現抑制に基づく新規降圧療法の開発

研究課題名（英文）Innovation of a novel anti-hypertensive therapy due to the inhibition of aldosterone synthase (CYP11B2) gene expression

研究代表者

菅原 明（SUGAWARA AKIRA）

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90270834

研究成果の概要（和文）：

本研究期間に我々は、1）PPAR γ アゴニスト並びに RXR アゴニストが、アルドステロン合成酵素（CYP11B2）遺伝子の転写抑制を招来する事を明らかにした、2）脂肪細胞上清が、CYP11B2 遺伝子の転写活性を誘導する事を明らかにした、3）CYP11B2 遺伝子転写調節領域/ルシフェラーゼの H295R 細胞安定発現株を作成した。今後、これらの成果を踏まえて、CYP11B2 遺伝子の転写抑制を指標とした新規創薬を進める。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, we elucidated that both PPAR γ and RXR agonists suppressed aldosterone synthase (CYP11B2) expression at the gene transcription level, while the supernatant of adipocytes induced CYP11B2 transcription activation. Additionally, we generated a stable H295R cell line expressing CYP11B2 promoter/luciferase chimeric reporter construct. Based on these observations, we are going to develop novel anti-hypertensive drugs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：内分泌学、分子高血圧学

1. 研究開始当初の背景

現在、本邦における高血圧患者は4,000万人と推定されるが、そのうち血圧が良好にコン

トロールされているのは1,000万人で、他の3,000万人は治療抵抗性高血圧を含むコントロール不良群と考えられる。アルドステロンは昇圧に関与する最も重要なホルモンの一つであり、その上昇が治療抵抗性高血圧の一

因と考えられている。さらに近年、メタボリック症候群患者における治療抵抗性高血圧の要因として、内臓脂肪細胞由来の未知の液性因子の副腎刺激によるアルドステロン分泌亢進が推定されている。

2. 研究の目的

これらの背景を踏まえて、アルドステロン合成酵素 CYP11B2 の発現調節をターゲットとした新規降圧療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

ヒト副腎癌由来 H295R 細胞を用いた。CYP11B2 遺伝子の転写活性はルシフェラーゼアッセイにて検討した。また、CYP11B2 遺伝子転写調節領域/ルシフェラーゼキメラ遺伝子を PGL4.15 プラスミドに組み込んだ後、H295R 細胞にトランスフェクションし、ハイグロマイシンによる選別を行う事により、安定発現株を得た。

4. 研究成果

(1) PPAR γ アゴニストであるピオグリタゾンが、アンジオテンシン II 依存性の CYP11B2 遺伝子転写活性を抑制する事が明らかとなった。その機序としては、PPAR γ アゴニストが Ca²⁺/カルモジュリン依存性キナーゼの活性を抑制し、その結果 Ad1/CRE 領域を介した転写抑制を招来する事が考えられた。また、RXR アゴニストである HX630 は、PPAR γ アゴニスト同様に CYP11B2 遺伝子の発現抑制を誘導し、両者の併用により更なる転写抑制が招来される事が明らかとなった。

(2) 脂肪細胞の培養上清を H295R 細胞に添加したところ、CYP11B2 遺伝子の転写活性が亢進する事が明らかとなった。培養上清を分画したところ、活性は 50kDa 以上の画分に認められたことから、アンジオテンシン II (分子量: 926.07) とは異なる分子量 50 kDa 以上のタンパク性因子により、CYP11B2 遺伝子転写が活性化されている可能性が考えられた。

(3) CYP11B2 遺伝子転写調節領域の安定発現株は一過性発現系と比較して、塩化カリウムに対する反応は 6.22 倍、アンジオテンシン II に対する反応は 18.9 倍と、著明な反応性の増強を認めた。従って、本安定発現株は、新規薬剤のスクリーニングに、非常に有効であると考えられた。

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 28 件)

① Sugawara A, Uruno A, Matsuda K, Saito-Ito T, Funato T, Saito-Hakoda A, Kudo M, Ito S. Effects of PPAR γ agonists against vascular and renal dysfunction. *Curr Mol Pharmacol*. 2012; 5: 248-254. DOI: 10.2174/1874467211205020248 (査読有)

② Ikeda T, Takasawa S, Noguchi N, Nata K, Yamauchi A, Takahashi I, Yoshikawa T, Sugawara A, Yonekura H, Okamoto H. Identification of a major enzyme for the synthesis and hydrolysis of cyclic ADP-ribose in amphibian cells and evolutionary conservation of the enzyme from human to invertebrate. *Mol Cell Biochem*. 2012; 366: 69-80. doi: 10.1007/s11010-012-1284-0. (査読有)

③ Uruno A, Noguchi N, Matsuda K, Nata K, Yoshikawa T, Chikamatsu Y, Kagechika H, Harigae H, Ito S, Okamoto H, Sugawara A. All-trans retinoic acid and a novel synthetic retinoid tamibarotene (Am80) differentially regulate CD38 expression in human leukemia HL-60 cells: possible involvement of protein kinase C- δ . *J Leukoc Biol*. 2011; 90: 235-247. doi: 10.1189/jlb.0109025. (査読有)

④ Uruno A, Matsuda K, Noguchi N, Yoshikawa T, Kudo M, Satoh F, Rainey WE, Hui XG, Akahira JI, Nakamura Y, Sasano H, Okamoto H, Ito S, Sugawara A. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ suppresses CYP11B2 expression and aldosterone production. *J Mol Endocrinol*. 2011; 46: 37-49. doi: 10.1677/JME-10-0088. (査読有)

⑤ Sugawara A, Uruno A, Kudo M, Matsuda K, Yang CW, Ito S. PPAR γ agonist beyond glucose lowering effect. *Korean J Intern Med*. 2011; 26: 19-24. doi: 10.3904/kjim.2011.26.1.19. (査読有)

⑥ Sugawara A, Kudo M, Saito A, Matsuda K, Uruno A, Ito S. Novel effects of beraprost sodium on vasculatures. *Int Angiol*. 2010; 29(2 Suppl): 28-32. <http://www.minervamedica.it/en/journals/international-angiology/article.php?cod=R34Y2010N07A0028> (査読有)

⑦Sugawara A, Uruno A, Kudo M, Matsuda K, Yang CW, Ito S. Effects of PPAR γ on hypertension, atherosclerosis, and chronic kidney disease. *Endocrine J.* 2010; 57: 847-852.

<http://dx.doi.org/10.1507/endocrj.K10E-281> (査読有)

⑧菅原 明、宇留野晃、松田 謙、工藤正孝、伊藤貞嘉：PPAR γ と生活習慣病。ホルモンと臨床 58：143-148、2010 (査読有)

[学会発表] (計56件)

①伊藤貴子、松田 謙、宇留野晃、佐藤郁子、清水恭子、杵岐裕子、吉川雄朗、工藤正孝、箱田明子、伊藤貞嘉、菅原 明：高血糖刺激はアルドステロン合成酵素遺伝子 (CYP11B2) の発現を増強する。第 16 回日本内分泌病理学会学術総会 2012 年 10 月 12 日、仙台

②箱田明子、宇留野晃、清水恭子、伊藤貴子、吉川雄朗、藤原幾磨、松田 謙、佐藤郁子、杵岐裕子、工藤正孝、影近弘之、岩崎泰正、伊藤貞嘉、菅原 明：種々の RXR アゴニストが AtT20 細胞増殖・アポトーシス・POMC 発現・ACTH 分泌に及ぼす影響。第 16 回日本内分泌病理学会学術総会 2012 年 10 月 12 日 仙台

③伊藤貴子、松田 謙、宇留野晃、清水恭子、吉川雄朗、工藤正孝、箱田明子、伊藤貞嘉、菅原 明：高血糖刺激はヒト副腎 H295R 細胞におけるアルドステロン合成酵素遺伝子の発現を増強する。第 35 回日本高血圧学会総会 2012 年 9 月 20~22 日、名古屋

④工藤正孝、松田 謙、伊藤貴子、宇留野晃、清水恭子、吉川雄朗、箱田明子、伊藤貞嘉、菅原 明：ニコチンがヒト冠動脈血管内皮細胞の遺伝子発現に及ぼす影響ならびにそれに対する ACE 阻害薬・ARB の効果。第 35 回日本高血圧学会総会 2012 年 9 月 20~22 日 名古屋

⑤松田 謙、宇留野晃、伊藤貴子、清水恭子、吉川雄朗、箱田明子、工藤正孝、佐藤文俊、伊藤貞嘉、菅原 明：各アンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) はアルドステロン合成酵素 (CYP11B2) 発現に異なる影響を及ぼす (第二報)。第 85 回日本内分泌学会学術総会 2012 年 4 月 19~21 日、名古屋

⑥松田 謙、宇留野晃、伊藤貴子、清水恭子、工藤正孝、箱田明子、吉川雄朗、佐藤文俊、伊藤貞嘉、菅原 明：アルドステロン合成酵素および 11 β -水酸化酵素転写解析系として使用可能な新規安定発現株の作成。第 85 回

日本内分泌学会学術総会 2012 年 4 月 19~21 日、名古屋

⑦松田 謙、伊藤貴子、宇留野晃、中村美輝、高橋 朗、吉川雄朗、清水恭子、箱田明子、工藤正孝、伊藤貞嘉、菅原 明：高血糖刺激によるアルドステロン合成酵素 (CYP11B2) の発現増強効果。第 85 回日本内分泌学会学術総会 2012 年 4 月 19~21 日、名古屋

⑧宇留野晃、松田 謙、吉川雄朗、箱田明子、伊藤貞嘉、岡本 宏、菅原 明：全トランス型レチノイン酸 (ATRA) と合成レチノイド Am80 は、血球・血管内皮間接着ならびに血球表面 CD38 発現に異なる影響を及ぼす。第 85 回日本内分泌学会学術総会 2012 年 4 月 19~21 日 名古屋

⑨宇留野晃、松田 謙、箱田明子、工藤正孝、岩崎泰正、伊藤貞嘉、菅原 明：レチノイン酸受容体 (RAR) α が ACTH 分泌・POMC 遺伝子発現に及ぼす影響。日本神経内分泌学会第 38 回学術集会 2011 年 11 月 25~26 日 東京

⑩松田 謙、宇留野晃、工藤正孝、佐藤文俊、伊藤貞嘉、菅原 明：各アンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) はアルドステロン合成酵素 (CYP11B2) 発現に異なる影響を及ぼす。第 34 回日本高血圧学会総会 2011 年 10 月 20~22 日、宇都宮

⑪宇留野晃、岡本 宏、菅原 明：全トランス型レチノイン酸 (ATRA) と合成レチノイド Am80 の血球・血管内皮間接着ならびに血球表面 CD38 発現に及ぼす影響の差異。第 84 回日本生化学会大会 2011 年 9 月 21~24 日 京都

⑫宇留野晃、菅原 明、松田 謙、工藤正孝、岩崎泰正、伊藤貞嘉：レチノイド X 受容体 (RXR) による ACTH 分泌・POMC 遺伝子発現抑制作用の検討。第 22 回間脳・下垂体・副腎系研究会 2011 年 9 月 3 日 東京

⑬菅原 明、宇留野晃、松田 謙、箱田明子、工藤正孝、伊藤貞嘉：PPAR γ とレチノイド受容体：臨床に還元できる基礎研究を目指して。第 29 回内分泌代謝学サマーセミナー 2011 年 7 月 7 日、仙台

⑭松田 謙、宇留野晃、工藤正孝、佐藤文俊、伊藤貞嘉、菅原 明：各 ARB はアルドステロン合成酵素 CYP11B2 遺伝子発現に異なる影響を及ぼす。第 29 回内分泌代謝学サマーセミナー 2011 年 7 月 7 日、仙台

[図書] (計10件)

①菅原 明、伊藤貞嘉：Gitelman 症候群。成瀬光栄、平田結喜緒、島津 章編：内分泌代謝専門医ガイドブック（改訂第 3 版）。Pp. 254-255、診断と治療社、2012

②菅原 明、伊藤貞嘉：ホルモン受容体異常症。成瀬光栄、平田結喜緒、島津 章編：内分泌代謝専門医ガイドブック（改訂第 3 版）。Pp. 307-309、診断と治療社、2012

③菅原 明、伊藤貞嘉：中枢性尿崩症。成瀬光栄、平田結喜緒、島津 章編：内分泌代謝専門医ガイドブック（改訂第 3 版）。Pp. 119-121、診断と治療社、2012

④菅原 明、伊藤貞嘉：放射線治療。平田結喜緒、山田正三、成瀬光栄編：下垂体疾患診療マニュアル。Pp. 108-110、診断と治療社、2012

⑤菅原 明、麦倉俊司、伊藤貞嘉：放射線治療後の合併症。平田結喜緒、山田正三、成瀬光栄編：下垂体疾患診療マニュアル。Pp. 118-119、診断と治療社、2012

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.tohoku.ac.jp/org/health/84/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅原 明 (SUGAWARA AKIRA)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：90270834

(2) 研究分担者

工藤 正孝 (KUDO MASATAKA)
東北大学・病院・講師
研究者番号：20509583

(3) 連携研究者

野口 直哉 (NOGUCHI NAOYA)
仙台市立病院・耳鼻咽喉科・医長
研究者番号：20333792