

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 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591018

研究課題名（和文） ミネラルコルチコイド受容体関連高血圧の分子病態の解明と新規治療法の確立

研究課題名（英文） Mineralocorticoid receptor-associated hypertension: molecular mechanisms and novel therapies

研究代表者

柴田 洋孝 (SHIBATA HIROTAKA)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：20245484

研究成果の概要（和文）：糖尿病の腎障害や高血圧がミネラルコルチコイド受容体(MR)拮抗薬の投与により改善する機序を培養細胞および遺伝的糖尿病モデル db/db マウスを用いて検討した。高グルコース環境は Protein kinase C (PKC)beta の活性化により、MR 蛋白の安定化による活性化を認め、古典的 PKC 阻害薬の投与によりこれらの改善を認めた。

研究成果の概要（英文）：The present study investigated mechanisms for improvement of renal dysfunction and resistant hypertension by administration of mineralocorticoid receptor antagonist in diabetes. The results showed that high glucose conditions activate protein kinase C (PKC) beta, thus resulting in stabilization of MR protein, which is followed by MR transactivation. Treatment with a classical PKC inhibitor reversed levels and activity of the MR.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
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・内分泌学

キーワード：内分泌学・アルドステロン

1. 研究開始当初の背景

(1) 高血圧とアルドステロン

アルドステロンは、血圧や電解質の生理学的調節に加えて、食塩の過剰摂取により血管炎を惹起する心血管リスクホルモンである。原発性アルドステロン症は、副腎腫瘍によるアルドステロンの自律的な過剰産生を認め、高血圧症の 5%～15%を占め、心血管疾患の罹患率が高い。食塩過剰摂取下では、通常は血中アルドステロン濃度は低下するが、原発性アルドステロン症では十分に低下しないために心血管合併症が多い。

(2) アルドステロンと「ミネラルコルチコ

イド受容体関連高血圧」

一方、現代社会で増えている糖尿病、肥満、慢性腎臓病などは、治療抵抗性高血圧や腎障害などが多く、血中アルドステロン濃度が正常範囲でも、ミネラルコルチコイド受容体(MR)拮抗薬の投与により、著明な改善を認めることが報告されている。我々はこのような MR 拮抗薬が著効を示す治療抵抗性高血圧および臓器障害の病態を、「MR 関連高血圧」として提唱した(Am.J Hypertens. 2012)。しかし、MR 関連高血圧の分子機構は不明であり、本研究はそれを明らかにすることを目的とした。

(3) 糖尿病における PKC の役割

糖尿病における網膜症、腎障害、神経障害などの合併症において、Protein kinase C (PKC)の活性化が関与することが示されている。PKCbeta 阻害薬の臨床試験の報告では、アルブミン尿の減少や視力の改善なども示されているが、有効性は controversial であった。

2. 研究の目的

(1) MR 活性化における PKC の役割

PKC 活性化または PKCalpha や PKCbeta の抑制の際に、MR 転写活性、MR 発現レベルを明らかにする。

(2) 糖尿病における PKC と MR 活性化の検討

高グルコース環境または 2 型糖尿病モデル db/db マウス (対照は db/-マウス) の腎臓組織を用いて、PKC 活性と MR 発現レベルや MR 転写活性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) MR 活性化における PKC の役割

TPA (古典的 PKC 活性化剤) 処置、PKCalpha や PKCbeta の発現プラスミドまたは siRNA-PKCalpha, -PKCbeta を用いて、PKC と MR 転写活性、MR 発現レベルを検討した。

(2) 糖尿病における PKC と MR 活性化の検討

HEK293-MR 細胞 (MR 安定発現細胞株) の培地中のグルコース濃度を 5mM または 30mM としてグルコース濃度による MR 活性および発現レベルを検討した。また、db/db マウスとコントロールとして db/-マウスの腎臓における PKC 活性、MR 発現レベル、MR 活性を検討した。

4. 研究成果

(1) MR 活性化における PKC の役割

HEK293-MR 細胞において、TPA 処置を行ったところ、濃度依存性に MR 蛋白発現レベルが増加し、古典的 PKC 阻害薬 GF109203X および Go6976 処置を行うと濃度依存性に MR 蛋白レベルの減少を認めた (図 1)。この結果から、PKCalpha, PKCbeta を含む古典的 PKC シグナルは MR 蛋白レベルを増加させることが示された。

次に、内因性 PKC の役割を検討するために、siRNA を用いて PKCalpha PKCbeta を別々にノックダウンしたところ、PKCalpha および PKCbeta の内因性レベルの減少は、MR 転写活性を有意に減少させた (図 2)。これらの結果から、PKCalpha および PKCbeta はいずれも MR 発現レベルを増加させて転写活性を増加させることが示された。

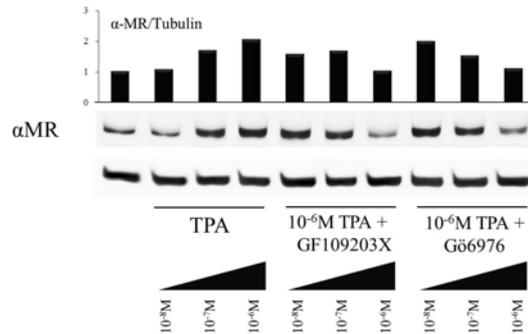


図 1 TPA による MR 発現レベルの調節

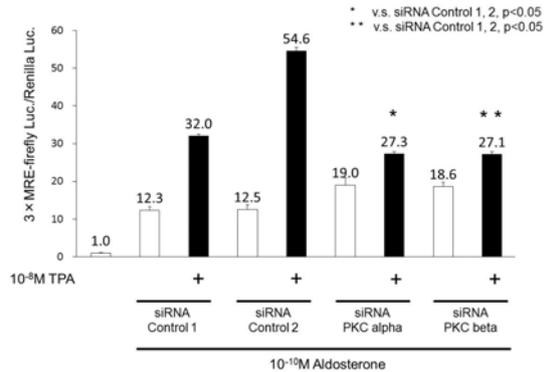


図 2 PKCalpha および PKCbeta による MR 転写活性

(2) 糖尿病における PKC と MR 活性化の検討

HEK293-MR 細胞の培地中グルコース濃度を 5mM と 30mM にしたところ、siRNA-PKCalpha, siRNA-PKCbeta を導入した時は、コントロールと比べて MR 蛋白レベルの減少を認めた (図 3)。

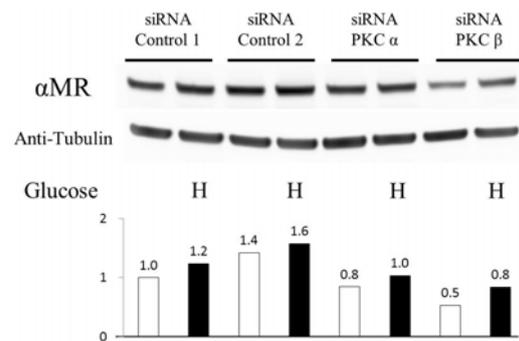


図 3 高グルコースおよび PKC シグナルによる MR 発現レベルの増加

次に、MR 転写活性と内因性 PKC レベルの関係を検討した。siRNA-PKCalpha を導入した際には、グルコース濃度にかかわらず MR 転写活性に有意な変化を認めなかったが、siRNA-PKCbeta を導入した際には、グルコース濃度は 5mM と 30mM のいずれの場合も MR 転写活性の有意な減少を認めた (図 4)。

これらの結果から、高グルコース環境では主に PKCβ の活性化により MR 転写活性化が誘導されていることが示唆された。

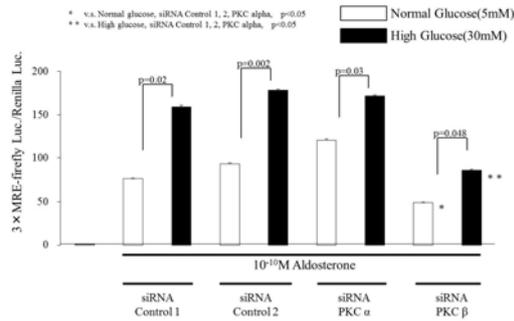


図4 高グルコース環境下における PKCβ による MR 転写活性化

次に、高グルコース環境で MR 蛋白レベルが増加する機序を検討した。MR mRNA レベルの変化を認めなかったことから、高グルコース環境での MR 蛋白レベルの増加は、翻訳後修飾レベルでの変化と考え、MR のユビキチン化を検討した。その結果、5mM グルコースの時と比べて、30mM グルコースでは MR のユビキチン化が有意に減少していることが示された (図5)。

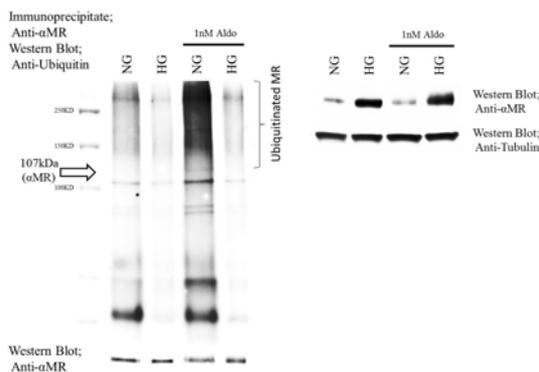


図5 高グルコース環境下における MR のユビキチン化の減少と発現レベルの増加

次に、培養細胞で得られた上記の知見を個体レベルで検証するために、db/db マウスとコントロールマウスに PBS または PKC 阻害薬 Go6976 を投与した。その結果、db/db マウス腎臓では、コントロールと比べて PKCβ および MR レベルの高値を認めた。また、PKC 阻害薬の投与により、コントロールマウスとの有意差は消失した (図6)。

以上の結果から、培養細胞および個体レベルのいずれにおいても、高グルコースや糖尿病の病態では、MR 蛋白の安定化を介して MR 転写活性の増加が示された。すなわち、血中アルドステロン濃度の増加を伴わなくても、PKCβ 活性化を介した MR 蛋白の安定化に

よる MR 活性化という「MR 関連高血圧」および臓器障害の新しい分子機構が示された。

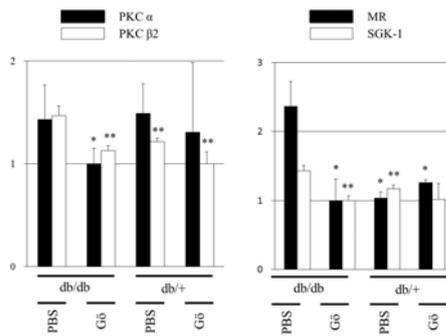


図6 db/db マウスにおける PKCβ の活性化と MR 発現レベルおよび転写活性

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 H.Shibata, H.Itoh. Mineralocorticoid receptor-associated hypertension and its end-organ damage:clinical relevance for resistant hypertension. *Am J Hypertension*, 査読有り, 25, 2012, 514-523.
DOI: 10.1038/ajh.2011.245.

② S.Monticone, H.Shibata, et al. (他14名、9番目) Effect of KCNJ5 mutations on gene expression in aldosterone-producing adenomas and adrenocortical cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 査読有り, 97, 2012, 1567-1572.
DOI: 10.1210/jc.2011-3132.

③ K.Kitada, H.Shibata, et al. (他10名、7番目) Oxidative stress-induced glomerular mineralocorticoid receptor activation olimits the benefit of salt reduction in Dahl salt-sensitive rats. *PLoS One*, 査読有り, 7, 2012, e41896.
DOI: 10.1371/journal.pone.0041896.

④ S.Hattori, H.Shibata, et al. (他8名、9番目) Risk factors for perioperative complications of laparoscopic adrenalectomy including single-site surgery. *J Endourol*, 査読有り, 26, 2012, 1463-1467.
DOI: 10.1089/end.2012.0274.

⑤ Y.Koyama, H.Shibata, H.Itoh, et al. (他3名、4番目) Free cortisol/cortisone ratio in pooled urine was increased after rapid-ACTH stimulation test under dexamethasone suppression. *Endocr J*, 査読有り, 58, 2011, 1099-1103.

<http://dx.doi.org/10.1507/endocrj.EJ11-0021>

⑥ T.Nishikawa, H.Shibata, et al. (他5名、4番目) Guideline for the diagnosis and treatment of primary aldosteronism-The Japan Endocrine Society 2009-, *Endocr J*, 査読有り, 58, 2011,

711-721.

<http://dx.doi.org/10.1507/endoerj.EJ11-0133>

⑦N.Suda, H.Shibata, et al. (他 11 名、2 番目)
Coactivation of SF-1-mediated transcription of steroidogenic enzymes by Ubc9 and PIAS1. *Endocrinology* 査読有り, 152, 2011, 2266-2277.

DOI: 10.1210/en.2010-1232.

〔学会発表〕(計 9 件)

- ① H.Shibata, Clinical relevance of mineralocorticoid receptor-associated hypertension: a subtype of resistant hypertension, A Satellite symposium of the 24th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, Aldosterone & Salt: Heart and Kidney, 2012 年 10 月 5 日～10 月 7 日、Palm Cove, Australia
- ②柴田洋孝、ミネラルコルチコイド受容体関連高血圧におけるアルドステロン拮抗薬の使い分け、第 35 回日本高血圧学会総会、2012 年 9 月 20 日～9 月 22 日、名古屋
- ③柴田洋孝、睡眠時無呼吸症候群とアルドステロン、第 35 回日本高血圧学会総会、2012 年 9 月 20 日～9 月 22 日、名古屋
- ④柴田洋孝、治療抵抗性高血圧のサブタイプとしてのミネラルコルチコイド受容体関連高血圧の重要性、第 85 回日本内分泌学会学術総会、2012 年 4 月 19 日～4 月 21 日、名古屋
- ⑤柴田洋孝、糖尿病におけるミネラルコルチコイド受容体の活性化機構、第 85 回日本内分泌学会学術総会、2012 年 4 月 19 日～4 月 21 日、名古屋
- ⑥T.Hayashi, High glucose treatment enhances mineralocorticoid receptor expression and its transcriptional activity through the PKCbeta activation, The 37th International Aldosterone Conference, 2011 年 6 月 2 日～6 月 3 日、ボストン (米国)
- ⑦栗原 勲、副腎静脈血中 18-水酸化ステロイド測定は原発性アルドステロン症の病型診断に有用である、第 33 回日本高血圧学会総会、2010 年 10 月 15 日～10 月 17 日、福岡国際会議場
- ⑧城 理絵、ミネラルコルチコイド受容体は栄養センサーとして高血圧の増悪因子となる：慢性高血糖状態における細胞内 O-linked β -N-acetylglucosamine レベルの上昇との関連、第 33 回日本高血圧学会総会、2010 年 10 月 15 日～10 月 17 日、福岡国際会議場
- ⑨林 毅、マクロファージはミネラルコルチコイド受容体活性亢進因子を分泌してアルドステロン作用を増強する、第 33 回日本高血圧学会総会、2010 年 10 月 15 日～10 月 17 日、福岡国際会議場

〔図書〕(計 2 件)

- ①柴田洋孝、中外医学社、Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌 2012, 2012, 240 ページ (p.161-169)
- ②柴田洋孝、南山堂、心血管内分泌検査から読み解く降圧薬俺流処方、2012、160 ページ (p.48-59)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 洋孝 (SHIBATA HIROTAKA)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：20245484

(2) 研究分担者

伊藤 裕 (ITOH HIROSHI)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：40252457

(3) 連携研究者

なし