

## 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 24 年 5 月 14 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790721

研究課題名（和文）病的心筋リモデリングにおける食塩毒性とグアニリルシクラーゼシグナ  
の役割の解明研究課題名（英文）The role of GC-A signaling against aldosterone and salt-induced cardiac  
remodeling

研究代表者

染川 智（SOMEKAWA SATOSHI）

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：90543167

研究成果の概要（和文）：

ナトリウム利尿ペプチド（NP）シグナルが高食塩＋アルドステロン（ALD）により誘発される心リモデリングにどのように関連し、心保護的に機能するかを検討した。心房ナトリウム利尿ペプチド（ANP）と脳性ナトリウム利尿ペプチド（BNP）が機能しないようそれらのリガンドの受容体であるグアニリルシクラーゼ受容体（GC-A）を欠損させたGCA KOマウスを実験に用いた。GC-A KOマウスは一定量のアルドステロン存在下では食塩負荷に応じて心筋肥大や心筋線維化の心リモデリングの増悪が認められた。その機序は血圧に非依存であった。また、野生型（WT）マウスではそのような反応は認められなかった。この、GC-A KOマウスの食塩依存的な心リモデリング増悪は抗MR薬でキャンセルされた。すなわち、NP系シグナルが何らかの機序でミネラルコルチコイド受容体（MR）系シグナルを抑制していた。しかし、GC-A KOマウスの高食塩＋アルドステロン負荷の心筋でMRの発現量はコントロールと比較しても変化なく、NP系シグナルがMRの活性化を抑制しているかは不明のままであった。今回の検討からはNP系が機能しない環境では食塩負荷依存的にMR系シグナルの反応性が上昇するという知見を得ることができた。また、その高食塩＋アルドステロン負荷したGC-A KOマウスにおいてMR系シグナルの下流で酸化ストレスマーカーの充進が認められた。抗酸化剤の投与でそのKOマウスの心リモデリングは改善が認められた。実際、酸化ストレスの産生に関与するNADPHオキシダーゼのコンポーネントの一つであるNox4の発現がGC-A KOマウスの高食塩＋アルドステロン投与群で著明に増加しており、NPが機能しない心筋細胞ではMR系シグナルが強く活性化されその下流でNox4が調節されて酸化ストレスの産生につながる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Aldosterone (ALD) participates in hypertension and cardiac remodeling through mineralocorticoid receptor (MR). Natriuretic peptide (ANP and BNP) and guanylyl cyclase-A/natriuretic peptide receptor (GC-A) signaling attenuates MR-signaling induced cardiac remodeling. However, the relationship of GC-A signaling and salt toxicity on ALD-induced cardiac remodeling is not fully understood. We investigated whether GC-A interacts with salt effect on ALD-induced cardiac remodeling (hypertrophy and fibrosis) with various dietary salt conditions in wild type mice (WT) and GC-A-KO. Male 12-weeks old WT and GC-A-KO were assigned to control and ALD-treatment group with low dietary salt (LS) (0.001% NaCl), normal dietary salt (NS) (0.6% NaCl) and high dietary salt (HS) (6.0% NaCl). Subpressor dose of exogenous ALD (100ng/kg/min) for 4 weeks significantly exacerbated cardiac remodeling in GC-A KO with NS and HS but not in GC-A KO with LS, and WT with any dietary salt conditions. ALD did not change blood pressure (BP) in either WT or GC-A-KO in any salt conditions. There were no significant difference in MR localization and MR mRNA levels

between WT and GC-A KO in each salt condition. The degree of ALD-induced cardiac remodeling in GC-A KO with HS was significantly higher than in GC-A KO with NS, in association with higher expression levels of Nox4 mRNA and oxidative stress. These data may indicated that GC-A signaling interact MR-induced cardiac remodeling in BP-independent but salt toxicity-oxidative stress dependent manner.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	1,900,000	570,000	2,470,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：(1) グアニリルシクラーゼ (2) ナトリウム利尿ペプチド (3) 食塩

(4) アルドステロン

## 1. 研究開始当初の背景

進化医学的な見地から、陸上動物では食塩摂取を促し、食塩を体内に蓄積するためにレニン・アンジオテンシン・アルドステロン(RAA)系は発達してきたと考えられる。事実、アルドステロン(ALD)は両生類以上の動物にしか検出されない。また、現在でも食塩摂取量が1日1g以下の原始的な食生活を行っている部族では血中ALD濃度が著名に上昇している。しかし、興味深いことには彼らは生涯にわたって正常血圧を保っており、心血管疾患も少ない。一方で食塩摂取が自由な文明国においては多くの食塩摂取によりそれらの部族より血中ALD濃度が低下しているにも関わらず、血圧上昇や心血管疾患の増加が認められ、これらの心血管疾患に対して抗ALD薬(抗MR薬)が奏功する。最近になりALDによる血圧を介さない直接の心血管系へ臓器障害、すなわちALDの心血管リスクホルモンとしての役割が証明されている。したがってそれらの事実はALD濃度の観点からは一見矛盾した結果と考えられるがALD濃度に依存性しないMR活性化機序が存在しそこには食塩が関与することが容易に想像されるがその機序は不明な点が多い。

次にALDによる臓器障害動物モデルという観点を考える。ALD過剰投与は従来ラットを用いた実験が多く実施されており、マウスはほとんど使用されていない。その理由はマウスではALD過剰投与しても高血圧や臓器障害が惹起されにくいことによる。ラットにおいてもALD単独での過剰投与による心筋障害誘発は困難で高食塩負荷や片腎摘出な

どの操作が必要であることが報告されている。我々は最近ナトリウム利尿ペプチド系の心血管ホルモンである心房ナトリウム利尿ペプチド(ANP)、脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)の共通の受容体である guanylyl cyclase A をコードする遺伝子の欠損(GC-A KO)マウスでは通常食塩食下でも心リモデリング(心筋肥大・心筋線維化)が惹起され、その心リモデリングには血圧非依存的にMRシグナルが関与していることを証明した。しかし興味深いことにGC-A KOマウスとそれと同じ遺伝子背景を持つ兄弟の野生型(WT)マウスを比較しても、血中ALD濃度やMRのもう一つのリガンドである血中コルチコステロン濃度に差異はなく、またMRへのALDの特異性を維持するための酵素11-β-HSD2の発現はどちらのマウスの心臓からも検出されなかった。また、心臓におけるMRの発現量そのものにも有意差が認められなかった。すなわちGC-A KOマウスではALD濃度やMRの発現量に依存しないMR活性化機序が存在すると考えられ、その機序は不明であったが、やはり食塩の関与が推察された。

## 2. 研究の目的

ALDによるMR活性化心筋障害におけるメカニズムの解明とGC-Aシグナルと食塩毒性との関係を検討する。

## 3. 研究の方法

一定量の ALD 投与下(100ng/kg/min) で食塩摂取量を変化させた時の GC-A KO と WT マウスの MR 以下のシグナル伝達を検討し、ALD 過剰投与下で食塩依存的に変動するシグナルを解析する。その後、心リモデリングに関与する候補遺伝子を絞りそのシグナルが薬理的に阻害できるものなら阻害実験を実施し GC-A KO マウスの ALD 過剰投与の NS、HS 群の心リモデリング増悪が抑制できるかを確認する。さらに、GC-A KO ではどのような機序で食塩毒性が発揮され ALD による MR の活性化に関与するかを検討する。

#### 4. 研究成果

ALDのMRを介した心筋障害の機序に食塩摂取量がどのように関与するかを確認するためにALD過剰投与実験を実施した。GC-A KO とWTマウスを低食塩食(LS) (0.001% NaCl)、通常食塩食(NS) (0.6% NaCl)、および高食塩食(HS) (6.0% NaCl) 群に分類しさらにポンプでALD投与 (100ng/kg/min) を実施し 4 週間後に心リモデリングの状態を検討した。今回使用したALDの投与量ではGC-A KO、WTマウスとも各食塩条件において投与前に比較して血圧の変化は認められなかった。結果はGC-A KOマウスのLS群ではALDによる心リモデリングの増悪は認められなかったが、GC-A KOマウスのNS群であってもALDによる心リモデリングの増悪が認められ、さらに、GC-A KOマウスのHS群はそれを上回る顕著な心リモデリングが観察された。WTマウスはいずれの群でもALDによる心リモデリングの増悪は認められなかった。すなわち、GC-A KOマウスでは食塩摂取量依存的にALDによる心リモデリングが引き起こされた。また、このGC-A KOマウスの心リモデリング増悪はMR拮抗薬の同時投与で抑制された。このマウスを用いてALDによるMR活性化心筋障害におけるメカニズムの解明とGC-Aシグナルと食塩毒性との関係を検討する。ALDによるMR活性化から心リモデリングに至る過程はラットにおいても不明な点多い、このGC-A KOマウスを用いてALDによるMR活性化心筋障害の機序を解明のため、ALD過剰投与下で食塩摂取量を変化させた時のGC-A KOとWTマウスのMR以下のシグナル伝達を検討し、ALD過剰投与下で食塩依存的に変動するシグナルを検索した。その結果、心リモデリングに関与する候補遺伝子としてNADPH oxidase 4 (Nox4) がGC-A KOマウスの心臓において食塩依存的に発現上昇していることが認められ (図 1)、さらに DHE 染色を用いた検討で、それらのマウスの心筋で酸化ストレスのマーカーが上昇している

ことが認められた。また、薬理的阻害実験として高食塩+ALD負荷のGC-A KOマウスにNアセチルシステイン (NAC) を投与する、それらの心リモデリングの増悪が有意に改善できることが確認できた。GC-Aシグナルはマウス心筋においてMR系シグナルを強く抑制しその下流でNox4 を介した酸化ストレスの産生を抑制している可能性が示唆された。本研究の結果から、現在社会で食塩過剰摂取の中、ヒトの原発性アルドステロン症における心筋障害 (リモデリング) 軽減に、減塩治療やナトリウム利尿ペプチド製剤 (hANP 製剤)、本邦は未承認であるがNEP阻害剤などが効果を持つかを検討することが今後の課題となる。

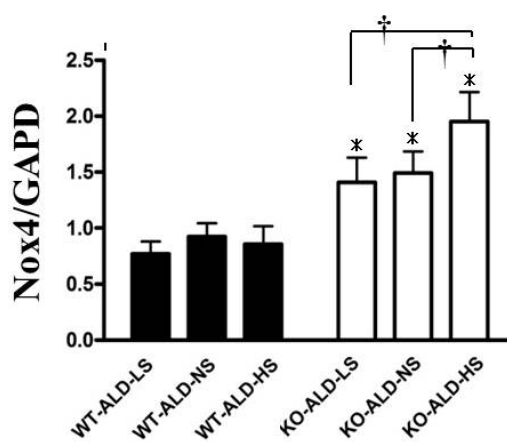


図1

#### 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 0 件)  
現在投稿中

〔学会発表〕 (計 1 件)

Somekawa S, Hitoshi N, Matsumoto T, Sung J H, Nishida T, Soeda T, Takemoto Y, Onoue K, Okayama S, Ishigami K, Takeda Y, Kawata H, Horii M, Uemura S, Saito Y GC-A Signaling Attenuates Salt Toxicity on Aldosterone-Induced Cardiac Remodeling. International Symposium on Cardiovascular Endocrinology and Metabolism (CVEM) 2010

6. 研究組織

(1)研究代表者

染川 智 (SOEMKAWA SATOSHI)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：90543167