

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591089

研究課題名(和文) 副腎と心臓におけるアルドステロン合成の機序の研究

研究課題名(英文) Research for the mechanism of aldosterone synthesis in the adrenal gland and the heart.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではアルドステロン(Aldo)の副腎外合成系に関して特に心臓での微量合成系を示す実験系の確立を目指した。仔ラット培養心筋細胞系を用いて種々の条件で試みた結果、高濃度の糖を含んだ培養液において短時間刺激でCYP11B2遺伝子の発現が認められることが判明した。一方でAldoの作用に関してLangendorff摘出心灌流実験で検討した。その結果、Aldoの前投与にて虚血再灌流心筋障害を抑制することが示された。さらにAldoの心筋細胞への基本的な作用として細胞内ナトリウムの流入を測定する系の確立を行った。

研究成果の概要(英文)：We aimed at the establishment of the experimental system which showed small quantity of aldosterone (Aldo) synthesized in the heart. Various conditions of culture medium and time course were examined using the cultured neonatal rat cardiomyocytes (NRCs). We found that CYP11B2 gene was expressed by short time stimulation of high glucose. This system will be extensively utilizable in the future research of cardiac Aldo synthesis. On the other hand, an unknown action of Aldo was examined by using the Langendorff system. It was found that the pre-treatment of Aldo attenuated ischemia reperfusion injury, suggesting that Aldo per se has a preconditioning action. Also, we newly established the cell culture system which showed the precise intracellular sodium concentration. By this system, we could measure the absolute increase in the intra-cellular sodium concentration stimulated by Aldo and cortisol. This system is also utilizable for the future studies of cardiac hypertrophy and others.

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：アルドステロン 心筋細胞 高血糖 虚血再灌流障害

1. 研究開始当初の背景

心不全では Renin-Angiotensin-Aldosterone(RAA)系が亢進しているが、その病態生理学的意義は未だ不明な点が多い。臨床的にはアルドステロン(Aldo)の阻害が高血圧や心不全治療に有効であるが、そもそも Aldo の合成と生理作用については幾つもの不明な点が残っている。

まず、Aldo の合成に関する疑問である。Aldo は副腎から分泌される重要なホルモンであり、腎臓における生理学的作用に関しては古くから研究されているが、この古典的な副腎皮質での生合成経路に加えて副腎以外の組織においても産生されているという報告が最近なされている。我々もヒト心臓において Aldo が微量ながら合成および分泌されていると以前に報告しているが、心臓局所における Aldo 産生の概念には異論を唱える研究者もいた。その理由は、そもそも微量な合成量であることと、再現性の高い方法で Aldo 合成酵素(CYP11B2)の発現を評価する実験モデルが確立されていなかったことに由来すると思われる。広く心臓 Aldo 合成系の概念を確立するにはその実験系の確立が不可欠であった。

一方で、Aldo の作用に関しても不明な点がある。最近、我々は Aldo が高浸透圧状態の時の細胞脱水に対してナトリウムイオン/プロトン交換輸送体 1(NHE1)を介して短期的に細胞保護的に働くことを報告している。この作用は非ゲノム作用であると想定しているが、この Aldo の細胞保護機構に関しては今後さらに検討する必要がある。そこで我々は仔ラット培養心筋細胞を用い、in vitroでのAldoの心筋に対する直接的な作用について、インスリンシグナルを中心に検討を重ねてきた。その結果、Aldo はインスリンシグナルを短期と長期、二相性に活性化させる可能性が示唆された。このことからアルドステロンの短期の細胞保護効果が益々考えられるようになった。これらを受けて、心臓組織における Aldo の効果を特に短期非ゲノム作用に焦点をあてて研究すべきであると思われる。

別途、Aldo の心臓に対する作用に関しては、さらに研究を進めていく必要がある。一般的に細胞膜を隔てた細胞内外の Na^+ の濃度勾配は細胞内の他のイオン濃度や代謝物に大きな影響を与える。心臓においては、虚血、心不全、心肥大などの病的状態において、細胞内ナトリウムイオン濃度 $[\text{Na}^+]_i$ は上昇することが知られている。病的状態と $[\text{Na}^+]_i$ 上昇の因果関係や、 $[\text{Na}^+]_i$ が上昇する分子的機序については未解明な点が多いものの、 $[\text{Na}^+]_i$ 上昇が心筋細胞にとって種々の影響を及ぼすことが報告されている。近年、副腎皮質ステロイドホルモンの心血管系に及ぼす作用が注目されている。我々はこれまでに Aldo は細胞内にナトリウムを流入させることを概略的に示している。非ゲノム作用およびゲ

ノム作用ともに細胞内ナトリウム濃度を上昇させる。前者は保護的に作用し、後者は障害性に作用すると想定している。しかしながら、我々はその $[\text{Na}^+]_i$ の絶対量の測定には未だ至っておらず、今後の研究の展開として重要な課題として残っていた。 $[\text{Na}^+]_i$ に関しては測定が困難であり、その系の確立から行う必要があった。

2. 研究の目的

Aldo の合成と作用に関してそれぞれ検討した。

Aldo の合成系の検討: Aldo の心臓での合成に関する検討をすすめるためには、その実験系の確立が急務であり、我々は培養条件を種々変化させて仔ラット心筋細胞培養系における Aldo 合成系の実験系の確立を試みた。Aldo の作用の検討 (1): Aldo にはゲノム作用と非ゲノム作用が存在するが、特に非ゲノム作用に関しては不明な点が多い。我々は、非ゲノム作用には細胞保護機構が存在していると考えており、Langendorff 摘出灌流心を用いてその検討を行った。

Aldo の作用の検討 (2): Aldo、コルチコステロンおよび合成グルココルチコイドのデキサメサゾンが心筋細胞の $[\text{Na}^+]_i$ に及ぼす影響について検討した。これまでに適当な実験系がないことから、その系の確立を行うところから開始した。

3. 研究の方法

Aldo の合成系の検討: 仔ラット培養心筋細胞を用いて

我々は仔ラット心筋初代培養細胞を用いて Aldo 産生について最適な条件を探索する必要があり、培養液の組成、培養時間など種々の条件の組み合わせを試みた。最終的には糖濃度に着目して検討を行った。糖濃度を正常から高濃度に条件を変え、また時相についても 2 から 24 時間の間、細胞に刺激した後 Aldo 合成酵素(CYP11B2)遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法にて検討した。また、培養液中の微量な Aldo 濃度を酵素免疫測定法を用いて測定した。

Aldo の作用の検討 (1): Langendorff を用いた検討

Langendorff 摘出灌流心の実験系を用いて検討した。Aldo の直接的効果について左室圧及び虚血再灌流後の左室圧の回復を測定して心機能の面から評価した。また、Aldo 短時間刺激による心臓組織におけるインスリンシグナル活性についてリン酸化などを中心とした分子生物学的手法により評価した。

Aldo の作用の検討 (2): 細胞内 Na^+ 濃度の検討

マイクロプレートリーダーを用いて接着培養細胞の $[\text{Na}^+]_i$ を効率的に測定する実験手法の確立を試みた。新生児ラット培養心筋細胞において 24 時間の副腎皮質ステロイドホルモン添加が $[\text{Na}^+]_i$ に及ぼす作用を定量的に

測定した。

4. 研究成果

Aldoの合成系の検討:仔ラット培養心筋細胞を用いて

培養液の組成や培養時間など種々に条件設定を行った後に、糖濃度と培養時間が鍵となることが徐々に判明してきた。糖濃度変化に関しては5.5mMによる培養を基準として、15mMでは変化がみられなかったが25mMによる刺激下においてAldo合成酵素の発現に上昇がみられた。時相において2時間より上昇傾向を認めていき、4時間でピーク: 1.80 ± 0.25 倍を認めた(n=18)。8, 12, 24時間においてはいずれも有意差はみられなかったが、時間経過とともに差が徐々に減弱する傾向がみられた。培養細胞の培養細胞液中のAldo測定については、分泌されるAldoがごく微量であるためにジクロロメタンによる濃縮を20-30倍行い、計測した。4時間値にて高血糖群は低血糖群と比べて約1.25倍の分泌を認めた。しかしこの分泌は8時間値では差がみられなくなった。高血糖刺激においては4時間という比較的短い時相においてAldo合成酵素の発現、分泌がみられ、Aldo合成を検討するin vitroの系を確立しえた。長時間の培養においてはナトリウム利尿ペプチド(NP)の分泌が増大し、それがAldo合成を抑制することが微量Aldo合成系を見えにくくしている要因であると我々は想定している。

Aldoの作用の検討(1): Langendorffを用いた検討

Aldoの作用に関する検討も進めた。これまでに仔ラット培養心筋細胞実験系において酸化ストレスに対してAldoが短期的に保護的に作用(非ゲノム作用)することを見出している。長期的にはAldoは細胞障害性に働き(ゲノム作用) 鉱質コルチコイド受容体(MR)阻害薬が有効であることも示した。本研究ではさらに心臓組織におけるAldoの短期的非ゲノム作用に関してLangendorff摘出心灌流実験を用いて検討した。虚血再灌流後左心室圧や心筋逸脱酵素濃度測定により評価した。その結果、Aldoの短時間刺激群は対照群と比較して有意に虚血再灌流後左室圧を改善し、クレアチンキナーゼ(CK)が有意に低下した。このことからAldoの短期作用は虚血再灌流後心筋障害に対して保護的であることが示唆された。本現象はAldoの心筋虚血に対する保護的効果、つまりプレコンディショニングとも言うべき効果であろう。また、この保護的作用はMineralocorticoid Receptor (MR)阻害薬には影響を受けないことも判明し、主に非ゲノム作用であると思われる。各種細胞内シグナル伝達系を検討した結果、p38 MAPKがAldo投与直後に一過性に活性化し、その後は心筋障害に伴い再活性化した。つまり二相性の活性化を示したが、p38 MAPK阻害薬による検討から最初のAldoによ

る活性化は心保護的に働いている可能性が高い。本研究により、心筋においてAldoは心筋虚血再灌流障害に対してMR非依存性にp38 MAPKを介して一過性に心筋保護的に働く可能性が示された。

Aldoの作用の検討(2): 細胞内Na⁺濃度の検討

生理的濃度のグルココルチコイドは[Na⁺]_iを濃度依存的に上昇させた。ブロッカーを用いた検討により、これはGlucocorticoid Receptor (GR)を介した作用であることを確認した。一方、グルココルチコイドはGRを介して肥大関連遺伝子の発現を亢進させ、形態学的にも細胞肥大を誘導することを確認した。細胞内へのNa⁺流入に関与する主なイオントランスポーターについて、遺伝子および蛋白レベルでの発現を検討した結果、デキサメサゾンによりmRNAおよび蛋白レベルでNCX1の発現が亢進することを確認した。結論として、生理的濃度のグルココルチコイドはGRを介して[Na⁺]_iを上昇させた。この反応にはNCX1の発現亢進が関与している可能性が示唆された。

研究成果のまとめ

Aldoの仔ラット心臓での合成系の実験系の確立に成功したことから、今後の研究に広く応用されるものと思われる。一方で各種ステロイドにてAldoによる細胞内Na⁺濃度の上昇が確認された。アルドステロンの細胞内シグナルは複雑であるが、上流にてNa⁺の動態が鍵となっている可能性が示唆される。Na⁺に引き続き細胞内Ca²⁺濃度の上昇が起き、さらに種々の細胞内シグナル伝達に受け継がれると思われる。結果として、種々のストレスに対して早期には主に非ゲノム作用を介して細胞保護的に、そして長期的には主にゲノム作用を介して細胞障害性に働くことが想定される。このゲノム作用を阻害することは循環器疾患治療に広く有効であろう。

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)Yoshino T, Nagoshi T, Anzawa R, Kashiwagi Y, Ito K, Katoh D, Fujisaki M, Kayama Y, Date Taro, Hongo K, Yoshimura M. Preconditioning actions of aldosterone through p38 signaling modulation in isolated rat hearts. J Endocrinol 2014; in press. DOI: 10.1530/J0E-14-0067. 査読有

(2)Katoh D, Hongo K, Ito K, Yoshino T, Kayama Y, Komukai K, Kawai M, Date T, Yoshimura M. A technique for quantifying intracellular free sodium ion using a microplate reader in combination with sodium-binding benzofuran isophthalate and probenecid in cultured neonatal rat

cardiomyocytes. BMC Res Notes 2013;6:556 .
2013 DOI : 10.1186/1756-0500-6-556. 査読有

(3) Fujisaki M, Nagoshi T, Nishikawa T, Date T, Yoshimura M. Rapid induction of aldosterone synthesis in cultured neonatal rat cardiomyocytes under high glucose conditions. BioMed Res Inter. 2013 ; 2013 : 161396. DOI:10.1155/2013/161396. 査読有

(4) Sekiyama H, Nagoshi T, Komukai K, Matsushima M, Katoh D, Ogawa K, Minai K, Ogawa T, Yoshimura M. Transient decrease in serum potassium level during ischemic attack of acute coronary syndrome: Paradoxical contribution of plasma glucose level and glycohemoglobin. Cardiovasc Diabetol. 2013 ; 12:4. DOI:10.1186/1475-2840-12-4. 査読有

(5) Nagoshi T, Date T, Fujisaki M, Yoshino T, Sekiyama H, Ogawa K, Kayama Y, Minai K, Komukai K, Ogawa T, Yoshimura M. Biphasic action of aldosterone on Akt signaling in cardiomyocytes. Horm Metab Res 2012; 44(13):931-7. DOI:10.1055/s-0032-1316343. 査読有

(6) Anzawa R, Seki S, Nagoshi T, Taniguchi I, Feuvray D, Yoshimura M. The role of Na⁺/H⁺ exchanger in Ca²⁺ overload and ischemic myocardial damage in hearts from type 2 diabetic db/db mice. Cardiovasc Diabetol .2012 ; 11:33. DOI:10.1186/1475-2840-11-33. 査読有

(7) Nagoshi T, Yoshimura M, Rosano GM, Lopaschuk GD, Mochizuki S. Optimization of cardiac metabolism in heart failure. Curr Pharm Des .2011; 17(35):3846-53. DOI: 10.2174/138161211798357773. 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

(1) 吉野拓哉、吉村道博、他 . Aldosterone Preconditioning is Protective during Ischemia-Reperfusion through Modulation of p38 MAPK Signaling in Isolated Rat Heart. 第 78 回日本循環器学会学術集会 . 2014 年 3 月 22 日 . 東京都千代田区 東京国際フォーラム

(2) 吉野拓哉、吉村道博、他 . Rapid Induction of Aldosterone Cascade Exerts Cardioprotective Effect During ex vivo Ischemia-reperfusion Injury in a Mineralocorticoid Receptor-independent Manner. アメリカ心臓病学会学術集会 . 2013 年 11 月 19 日 . アメリカ合衆国テキサス州ダ

ラス .

(3) 吉村道博 . アルドステロンの合成と作用に関する新しい知見 . 第 43 回日本心臓血管動物質学会 (招待講演) . 2014 年 2 月 16 日 . 神戸国際会議場 .

(4) 吉村道博 . 食塩と循環器疾患に関する最新の話題 . 第 77 回日本循環器学会学術集会 . 2013 年 3 月 17 日 . パシフィコ横浜 .

(5) 吉村道博 . Significance of Monitoring Potassium Level in Parallel with Glucose Level in Acute Coronary Syndrome. 第 77 回日本循環器学会学術集会 . 2013 年 3 月 16 日 . パシフィコ横浜 .

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 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 0 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〕
ホームページ等

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