

平成 2 6 年 5 月 2 7 日現在

機関番号：3 2 6 1 2

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：2 4 7 9 0 8 5 5

研究課題名（和文）糖尿病に伴う治療抵抗性高血圧でのPKCシグナルとミネラルコルチコイド受容体の役割

研究課題名（英文）The role of protein kinase C pathway on mineralocorticoid receptor activation in resistant hypertension associated with diabetes mellitus

研究代表者

城 理絵（Jo, Rie）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：3 0 4 6 4 8 6 1

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000 円、（間接経費） 990,000 円

研究成果の概要（和文）：糖尿病では、プロテインキナーゼC（PKC）経路が合併症の進展に関与していることが知られている。本研究では、高グルコース環境においてPKC（特にPKC $\beta$ ）経路の活性化がミネラルコルチコイド受容体（MR）の活性を促進し、糖尿病合併症を進展させることが示唆され、現在開発が中断されているPKC $\beta$ 阻害薬の有効性を支持する一分子機序が解明された。一方、高グルコース環境では活性化されないPKC $\alpha$ 経路もMR活性を強力に亢進させることが明らかとなった。本結果は糖尿病合併症の予防に対してPKC $\beta$ 阻害薬のみでは十分な効果が得られないという臨床的事実を支持しており、PKC $\alpha$ 阻害を合わせた創薬開発の必要性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Protein kinase C (PKC) pathway is known to be strongly associated with the development of diabetic complications. In this study, we showed for the first time that the activation of PKC pathway in high glucose condition induces mineralocorticoid receptor (MR) activation, which develops resistant hypertension and diabetic complications. This finding may partly account for the efficacy of PKC-beta inhibitor, whose clinical trials are currently suspended, on diabetic complications. Additionally, we found that PKC-alpha pathway, which is not activated by high glucose stimulation, also strongly activates MR. This result is consistent with the clinical fact that PKC-beta inhibitor alone does not completely prevent the development of diabetic complications. Our findings indicate that double blockade of PKC-alpha and beta may be necessary for prevention of diabetic complications.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：ミネラルコルチコイド受容体 アルドステロン 糖尿病 プロテインキナーゼC 高血圧

## 1. 研究開始当初の背景

本邦では、高血圧患者数が約 4000 万人と推定され、多くの症例は、ガイドラインに基づきレニン-アンジオテンシン系(RAS)阻害薬あるいはカルシウム拮抗薬による投薬治療を受けているが、これらの治療では血圧のコントロールが難しい症例も存在する。これら治療抵抗性高血圧を呈する症例において、ミネラルコルチコイド受容体(MR)拮抗薬のスピロラクトン投与で、収縮期血圧 20mmHg、拡張期血圧 10mmHg の著明な降圧を認めたとする報告があり、治療抵抗性高血圧の病態においてミネラルコルチコイドすなわちアルドステロンの作用過剰が背景にあることが注目されている。しかしながら、これらの症例は必ずしも高アルドステロン血症を呈してはならず、このことは、血漿アルドステロン濃度が正常であっても、それ以外の何らかの機序により病的な MR 活性化が生じていることを示している。MR 拮抗薬の併用治療により、高血圧や臓器障害を効率的に抑制することから、我々はこれらの病態を「MR 関連高血圧(MR-associated hypertension)」として提唱してきた(Shibata and Itoh, AM J Hypertens, 2012)。心血管リスクの一大因子となる糖尿病は、治療抵抗性高血圧を呈しやすいことで知られているが、糖尿病症例において RAS 系阻害薬に加えて MR 拮抗薬を追加することで微量アルブミン尿が軽減し腎保護作用がみられるとする報告が複数みられ(Schjoedt KJ, Kidney Int. 2005, 2006, Rossing K, Diabetes Care 2005, Epstein M, Clin J Am Soc 2006)。糖尿病の病態においても MR 活性化が存在することが示唆される。糖尿病では、低レニン低アルドステロン血症を呈することが多いことが以前より知られており(Ⅱ型 RTA)。我々の提唱する MR 関連高血圧の病態に該当すると考えられる。糖尿病における MR 活性化の機序は未知であり、本機序を解明し、MR 関連高血圧の分子病態を探究することは、心血管予後改善に向けた新規治療法開発の糸口になると考え、本研究を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

糖尿病では、血管合併症の進展にプロテインキナーゼ C(PKC)の活性化が重要な役割を果たしていることが数多く報告されていること、PKC 阻害薬(ルボキシスタウリン)を用いた臨床試験で糖尿病患者に対して微量アルブミン尿の改善効果が報告されている(Tuttle, Diabetes Care 2005)ことから、糖尿病における MR 活性化の分子機序として、高血糖刺激による PKC の活性化が関与しているという作業仮説を建て、その検証を行うことを本研究の目的とした。これまでに我々は、MR をはじめとする核内受容体の転写活性化機構の研究として、新規転写共役因子の同定および機能解析(J.Mol.Endocrinol. 2004/J.Biol.Chem. 2005/J.Biol.Chem. 2010)や、

SUMO 化修飾などの蛋白修飾による MR 感受性変化の検討(J.Biol.Chem. 2007)を行ってきた。高血糖によりリン酸化キナーゼである PKC が活性化することは、MR に特定のリン酸化修飾を引き起こし、そのことが MR 活性化をもたらすという可能性を考えた。MR 蛋白のリン酸化修飾による活性化については、CDK5(cyclin-dependent kinase 5)により神経細胞の MR がリン酸化されて BDNF(brain-derived neurotrophic factor)の発現が亢進するという報告(Kino et al. Mol Endocrinol 2010)がある。本研究においても、MR のリン酸化という蛋白修飾の視点をふまえ、PKC 経路の MR 活性化への関与を検討した。

## 3. 研究の方法

培養細胞を用いた *in vitro* の実験として、

- (1) 高グルコースおよび PKC 刺激による MR 転写活性および内因性 MR 標的遺伝子発現の評価を行った。前者については、MR を安定発現させた HEK293 細胞株を用い、3xMRE-Luciferase レポーター遺伝子を導入し、reporter assay を行った。また後者については、SGK1 や ENaC といった既知の MR 標的遺伝子の発現変化につき、定量的 real time RT-PCR を用いて検討した。
- (2) MR 活性化の機序として、MR の mRNA および蛋白レベルの発現量の評価を行った。前者については、上記と同様に定量的 real time RT-PCR の手技を用いて発現評価を行った。後者については、Western blot 法を用いて定量を行った。
- (3) PKC 刺激に伴う MR のリン酸化修飾の検出を行った。処置後、細胞より抽出した蛋白に対し、MR 抗体を用いた免疫沈降(IP)を行い、その後セリンあるいはスレオニン残基を認識する抗体を用いた Western blot を行った(CoIP)。またコピキチンを検出する抗体を用いて、MR のコピキチン化の検出も行った。

さらに *in vivo* での検討として、

- (4) 糖尿病モデル動物(db/db マウス)における MR 標的遺伝子および MR 発現量の評価を、各々上記と同様の定量的 real-time RT-PCR 法、Western Blot 法を用いて行い、MR の活性化について確認した。
- (5) 高血糖状態における PKC 活性化の状態を、PKC 蛋白の膜移行を指標に評価し、PKC 活性化と MR 活性化の関連を検討した。

## 4. 研究成果

- (1) HEK293 細胞を用いた *in vitro* の実験系において、高グルコース刺激による MR 転写活性の上昇が、Luciferase reporter assay および内因性 MR 標的遺伝子発現定量(SGK1 など)で確認された。MR 活性化の機序として、MR mRNA 発現の有意な上昇は認めなかったが、MR 蛋白レベル

の上昇を認めた。また classical PKC 経路の活性化薬として知られている TPA 投与において、同様に MR の活性化および MR 蛋白の安定化が確認された。興味深いことに、PKC 経路は、PKC および PKC いずれの活性化においても、MR を活性化するが、高グルコース刺激においては、PKC のみ活性化されることが、PKC および の siRNA を用いた検討より確認された。このことから、糖尿病においては、PKC の活性化を通じて、MR が活性化されていることが示唆された。

- (2) MR 蛋白発現上昇の機序として、MR のユビキチン化を介したプロテオソーム分解の抑制が関与していることが、MG132 (可逆的プロテオソーム阻害薬)を用いた検討で確認された。また、ColP アッセイにより PKC 活性化で MR がリン酸化を受けることが確認された。特定のリン酸化部位の同定には至らなかった。
- (3) 糖尿病モデルマウスである db/db マウスを用いた検討で、高血糖下で MR 活性化および MR 蛋白発現が上昇することが確認された。また高血糖により PKC が活性化されることも確認された。これらの結果より、*in vivo*においても高グルコース刺激により PKC が活性化され、PKC 活性化を介して MR が活性化されることが示唆された。

以上から、糖尿病においては、細胞内シグナルの 1 つとして PKC (特に PKC ) の活性化がみられ、さらにその活性化が MR の活性化をもたらし、糖尿病合併症の進展を促進することが示唆された。一方、PKC の経路は高グルコース環境では活性化されないものの、PKC を介しても強力に MR 活性化がもたされることを見出し、PKC を活性化する他の環境要因として、喫煙などの関与を現在検討している。本研究により、PKC 阻害薬が糖尿病合併症治療に有効であることを支持する一分子機序が解明され、現在治療薬の開発が止まっている PKC 阻害薬の糖尿病治療における意義が再確認された。さらに、MR 活性化における PKC の関与を示したことは、糖尿病合併症の予防に対して PKC 阻害薬のみで十分な効果が得られないという臨床的事実を支持しており、今後は PKC 阻害を合わせた創薬開発を目指す必要があることが示唆された。

## 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 2 件)

- (1) 城 理絵、柴田洋孝 選択的アルドステロン拮抗薬の位置づけ、診断と治療、査読なし、101(3)、2013、413-419
- (2) 城 理絵、柴田洋孝 原発性アルドステ

ロン症の画像診断の適用、ホルモンと臨床、査読なし、59(7)、2013、639-644

〔学会発表〕(計 12 件)

- (1) 城 理絵、栗原 勲、柴田洋孝、伊藤 裕 「ミネラルコルチコイド受容体 (MR) の翻訳後修飾による活性化機構 -糖尿病と MR 関連高血圧-」第 8 回炎症・脂質代謝・メタボリサーチフォーラム、2014.2.22 (東京)
- (2) 柴田 洋孝、栗原 勲、横田 健一、城 理絵、林 毅、三石 木綿子、大山 貴子、中村 俊文、伊藤 裕 「ステロイドホルモンと生活習慣病 ミネラルコルチコイド受容体関連高血圧と臓器障害」第 21 回日本ステロイドホルモン学会、2013.11.16 (大阪)
- (3) 柴田 洋孝、栗原 勲、横田 健一、城 理絵、林 毅、三石 木綿子、大山 貴子、中村 俊文、伊藤 裕 「レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系研究の最先端 治療抵抗性高血圧とミネラルコルチコイド受容体」第 36 回日本高血圧学会総会、2013.10.24-26 (大阪)
- (4) Jo R, Shibata H, Kurihara I, Yokota K, Murai-Takeda A, Mitsuishi Y, Hayashi T, Ohyama T, Nakamura T, Itoh H "Mineralocorticoid receptor is pathologically activated through its O-GlcNAc modification in hyperglycemic conditions." International symposium of aldosterone and related substances in hypertension 2013, 2013.4.28 (仙台)
- (5) 三石 木綿子、柴田 洋孝、栗原 勲、横田 健一、武田 彩乃、林 毅、城 理絵、大山 貴子、中村 俊文、伊藤 裕 「上皮成長因子受容体を介したミネラルコルチコイド受容体活性化機構」第 86 回日本内分泌学会総会、2013.4.25-27 (仙台)
- (6) 林 毅、柴田 洋孝、栗原 勲、横田 健一、武田 彩乃、三石 木綿子、城 理絵、大山 貴子、中村 俊文、伊藤 裕 「糖尿病におけるプロテインキナーゼ C(PKC)シグナルによるミネラルコルチコイド受容体(MR)活性化機構」第 86 回日本内分泌学会総会、2013.4.25-27 (仙台)
- (7) 城 理絵、柴田 洋孝、栗原 勲、横田 健一、武田 彩乃、三石 木綿子、林 毅、大山 貴子、中村 俊文、伊藤 裕 「糖尿病におけるミネラルコルチコイド受容体(MR)の糖鎖修飾による活性化機構」第 86 回日本内分泌学会総会、2013.4.25-27 (仙台)
- (8) Takeshi Hayashi, Hirotaka Shibata, Isao Kurihara, Yuko Mitsuishi, Ayano Murai-Takeda, Rie Jo, Takako Ohyama, Hiroshi Itoh "Protein Kinase C Beta Plays an Important Role in High Glucose - Induced Stabilization of

Mineralocorticoid Receptor. ” The Endocrine Society's 94th Annual Meeting & Expo. 2012.6.26 (Houston, US)

- (9) Takeshi Hayashi, Hirotaka Shibata, Isao Kurihara, Yuko Mitsuishi, Ayano Murai-Takeda, Rie Jo, Takako Ohyama, Hiroshi Itoh “ High glucose induces stabilization of mineralocorticoid receptor through the activation of protein kinase C beta. ” 38th Annual Meeting of the International Aldosterone Conference. 2012.6.22 (Houston, US)

- (10) 城 理絵、柴田 洋孝、栗原 勲、横田 健一、武田 彩乃、三石 木綿子、林 毅、本杉 裕一郎、大山 貴子、伊藤 裕 「高グルコース環境におけるミネラルコルチコイド受容体の糖鎖修飾とアルドステロン感受性の変化」第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会、2012. 5. 17( 横浜 )

- (11) 城 理絵、柴田 洋孝、栗原 勲、横田 健一、武田 彩乃、三石 木綿子、林 毅、本杉 裕一郎、大山 貴子、伊藤 裕 「高グルコース環境におけるアルドステロンの作用増強機構-ミネラルコルチコイド受容体の糖鎖修飾の役割-」第 85 回日本内分泌学会総会、2012.4.21 ( 名古屋 )

- (12) 林 毅、柴田洋孝、栗原 勲、横田 健一、武田彩乃、三石木綿子、城 理絵、大山貴子、伊藤 裕 「高グルコース刺激による PKC シグナルの活性化はミネラルコルチコイド受容体(MR)の蛋白量を増加させ、MR の転写活性化をきたす」第 85 回日本内分泌学会学術総会、2012.4.20(名古屋)

〔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〕

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

城 理絵 ( Jo Rie )

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号 : 30464861