

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890308

研究課題名(和文) アンギオテンシン 代謝産物によるアルドステロン分泌制御機構の研究

研究課題名(英文) The study of aldosterone production machinery by angiotensin II metabolite

研究代表者

沖 健司 (Oki, Kenji)

広島大学・大学病院・病院助教

研究者番号：30638995

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：血圧を調節するアルドステロンは、副腎皮質球状帯においてアンギオテンシンII (A-II) の刺激を受けて合成・分泌される。副腎皮質癌細胞株を用いたin vitroの研究で、A-IIの代謝産物がA-IIを介したアルドステロン合成を負に調節することを同定した。そして、アルドステロン合成を調整する代謝産物はアンギオテンシン1-7であり、その作用はMAS受容体を介していることを解明した。これらの結果はMAS受容体を介した新たなアルドステロン合成機構を示しており、新たな降圧薬の創薬につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Aldosterone which regulates blood pressure is produced by angiotensin II (A-II) in zona glomerulosa of adrenal cortex. We previously demonstrated that the metabolite of A-II negatively regulated A-II mediated aldosterone production in human adrenocortical cancer cell line. In this study, we clarified that the metabolite was angiotensin 1-7 and it inhibit aldosterone production after A-II stimulation. The function of angiotensin 1-7 on aldosterone production was mediated by MAS receptor. We showed a new aldosterone production machinery via MAS receptor and our results might be useful for new target of anti-hypertensive agents.

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：アルドステロン アンギオテンシンII 高血圧

1. 研究開始当初の背景

アルドステロンは、遠位尿細管で Na の再吸収を促進し、尿量や体液量の調節を行っており、血圧を規定する重要なホルモンである。レニン-アンジオテンシン系は、アルドステロン分泌を制御し、アンジオテンシン II (A-II) が副腎皮質球状帯の AT1R (A-II type1 受容体) に結合することで、アルドステロン分泌は促進される。

アンジオテンシン I は 10 個のアミノ酸から構成され、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) により分解され、8 つのアミノ酸から成る A-II が合成される。しかし、副腎皮質局所における A-II の代謝産物やその代謝に関わる機序について、全く報告されていなかった。その理由として、A-II の代謝産物である数個のアミノ酸を的確に同定することが困難であったためと考えられている。

応募者は、Wisconsin University の Dr. Cambell 研究室との共同研究で、High-pressure liquid chromatography (HPLC) を用いることにより、ヒト副腎皮質癌細胞株 (HAC15, H295R の subclone) における A-II 代謝産物の組成とタイムコースを明らかにした。さらに、その後の *in vitro* における予備研究で、A-II が完全に代謝された後の上清が、A-II 負荷後のアルドステロン合成酵素 (CYP11B2) の mRNA 発現やアルドステロン分泌を抑制することを同定した。そして、分泌されたアルドステロンやコルチゾールなどの個々のステロイドホルモンが、アルドステロン分泌に影響をしないことを確認しており、上述の結果は A-II の代謝産物による直接の影響と考えられる。

これらの結果から、レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系に新たな調節機構が存在することが示唆され、A-II を介したアルドステロン分泌に、A-II 代謝産物によるネガティブフィードバック機構が存在することが考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、アルドステロン分泌を負に調節する A-II 代謝産物を同定し、さらに、同定した A-II 代謝産物がアルドステロン分泌を制御する機構を *in vitro* で明らかにすることを目的とする。A-II 代謝産物によるアルドステロン産生のネガティブフィードバック機構を明らかにすることにより、新規降圧薬の創薬につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

In vitro における研究に、アルドステロン産生能を有する HAC15 (ヒト副腎皮質細胞癌細胞株) を用いた。アルドステロン分泌の評価は、上清中のアルドステロン濃度を ELISA により測定し、CYP11B2 mRNA 発現解析を real time PCR を行うことにより評価した。

(1) A-II 代謝後の上清によるアルドステロン分泌に与える影響の検討

A-II が完全に代謝された後の培地を用い、A-II と共培養することにより、A-II が代謝された上清がアルドステロン分泌に与える影響を検討した。

(2) A-II 代謝産物がアルドステロン分泌に与える影響

A-II の代謝産物の化学物質 (アンジオテンシン、アンジオテンシン 1-7、アンジオテンシン 3-7) を用い、個々の化学物質が A-II との共培養下でアルドステロン分泌に与える影響を検討した。

(3) MAS 受容体を介したアルドステロン分泌能の評価

MAS 受容体阻害薬 (H2888) を用い、アンジオテンシン 1-7 による A-II 投与下におけるアルドステロン分泌による影響を検討した。

(4) MAS 受容体の下流シグナルである MAPK に与える影響の評価

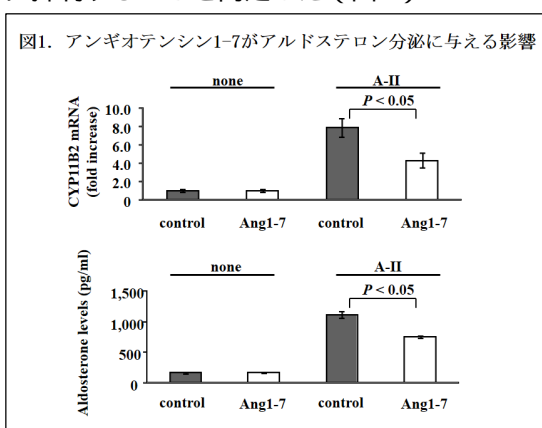
MAPK の評価は、ウエスタンブロッティングによる ERK1/2 のリン酸化を検出することで検討した。

4. 研究成果

HAC15 において、A-II を投与すると、6 時間の経過で、A-II は完全に代謝されることを同定した。A-II が完全に消失した上清を HAC15 に投与した際、アルドステロン分泌に変化は認めなかった。次に、A-II が完全に消失した上清と A-II を HAC15 に共培養すると、A-II 代謝産物の用量依存性に A-II によるアルドステロン分泌は減弱することがわかった。さらに、real time PCR でステロイド合成酵素の発現解析を行ったところ、A-II 代謝産物の上清投与群では、アルドステロン合成酵素 (CYP11B2) の発現が低下しており、CYP11B2 の抑制によりアルドステロン分泌が阻害さ

れていると考えた。これらの結果から、A-IIの代謝産物は、アルドステロン分泌の直接調節作用を有さないものの、A-IIを介したアルドステロン分泌に対し CYP11B2 発現を抑制することにより、その合成を抑制していることがわかった。

続いて、A-IIの代謝産物の化学物質（アンジオテンシン，アンジオテンシン 1-7，アンジオテンシン 3-7）を用い、個々の化学物質がアルドステロン分泌に与える影響を検討した。アンジオテンシン やアンジオテンシン 3-7 では、A-IIによるアルドステロン分泌を阻害しなかったが、アンジオテンシン 1-7 は A-II によるアルドステロン分泌を部分的に抑制することを同定した（図1）。



アンジオテンシン 1-7 は MAS 受容体を介した作用が報告されていることから、MAS 受容体阻害薬 (H2888) を用いたところ、アンジオテンシン 1-7 による A-II 投与下におけるアルドステロン合成阻害作用は消失した。つまり、A-IIの代謝産物であるアンジオテンシン 1-7 は、A-IIのアルドステロン合成を負に調節し、MAS 受容体を介していることがわかった。

MAS 受容体は MAPK を介した細胞内シグナル伝達に活性化することが報告されている (Zhuo JL, et al. Peptides 2011; 32: 1551-65)。そこで、アンジオテンシン 1-7 投与下における A-II 刺激で MAPK に与える影響を ERK1/2 のリン酸化をウエスタンブロットで検出することにより評価した。アンジオテンシン

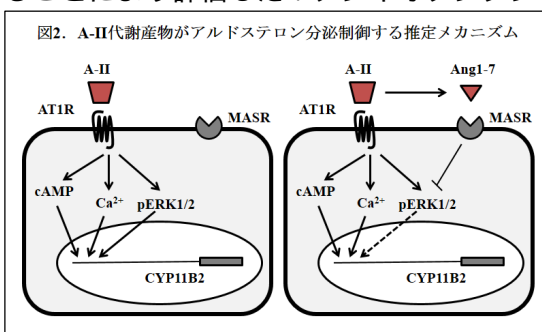


図2. A-II代謝産物がアルドステロン分泌抑制する推定メカニズム

1-7 を負荷することにより、A-II により活性化される ERK1/2 のリン酸化は部分的に抑制されることがわかった（図2）。

つまり、A-IIの代謝産物であるアンジオテンシン 1-7 は、A-IIのアルドステロン分泌に対し負のフィードバック機構を有し、その作用は MAS 受容体を介していることを同定した。この結果は、今後の A-II を介したアルドステロン分泌を制御する創薬の基盤になると考えられる。

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6件)

1. Oki K, et al. Influence of adrenal subclinical hypercortisolism on hypertension in patients with adrenal incidentaloma. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2012; 120: 244-7. (査読有り)
2. Oki K, et al. Potassium Channel Mutant KCNJ5 T158A Expression in HAC-15 Cells Increases Aldosterone Synthesis. *Endocrinology*. 2012; 153: 1774-82. (査読有り)
3. Oki K, et al. The potassium channel Kir3.4 participates in angiotensin II-stimulated aldosterone production by a human adrenocortical cell line. *Endocrinology*. 2012; 153: 4228-35. (査読有り)
4. Oki K, et al. Angiotensin II and III metabolism and effects on steroid production in the HAC15 Human Adrenocortical Cell line. *Endocrinology*. 2013; 154: 214-21. (査読有り)
5. Shiwa T, Oki K, et al. Significantly high level of late-night free cortisol to creatinine ratio in urine specimen in patients with subclinical Cushing's syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2013; 79: 617-22. (査読有り)
6. Gomez-Sanchez CE, Oki K. Minireview: potassium channels and aldosterone dysregulation: is primary aldosteronism a potassium channelopathy? *Endocrinology*. 2014; 155: 47-55. (査読有り)

〔学会発表〕(計3件)

1. 沖健司，他．Kir3.4(KCNJ5)によるアルドステロン分泌調節機構．第20回日本ステ

- ロイドホルモン学会 ,2012/11/18 .仙台市 .
2. 沖健司 .アルドステロン分泌の分子機構 .
第86日本内分泌学会総会 ,2013/4/25-27 .
金沢市 .
 3. Oki K, et al. miR-21 suppression attenuate cell proliferation and decrease aldosterone production via StAR repression in human adrenocortical cells. International Symposium of Aldosterone and Related Substances in Hypertension, 2013/4/27-28. Sendai, Japan.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

沖 健司 (OKI KENJI)
広島大学・大学病院・病院助教
研究者番号：30638995