

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461381

研究課題名(和文) 副腎アルドステロン合成酵素の発現制御を基盤とした糖尿病性腎症の新規治療法の開発

研究課題名(英文) An approach to identify novel therapeutics against diabetic nephropathy based on aldosterone synthase gene regulation

研究代表者

菅原 明 (Sugawara, Akira)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90270834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で我々は、ヒト副腎H295R細胞においてD-glucoseによる高血糖刺激が、転写因子Nurr-1を介してアルドステロン合成酵素(CYP11B2)遺伝子のプロモーター活性・mRNA発現を増強し、その結果としてアルドステロン分泌を亢進させることを初めて明らかにした。本研究結果から、糖尿病患者における高血糖状態が、アルドステロンの分泌増加を介して高血圧・動脈硬化や糖尿病性腎症の進展に關与している可能性が強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：We here have first demonstrated that high glucose (D-glucose) stimulates aldosterone synthase (CYP11B2) gene transcription and mRNA expression via the induction of transcription factor Nurr-1, and results in the increase of aldosterone secretion using human adrenocortical H295R cells. It is therefore suggested that high glucose levels in diabetic patients may promote hypertension, atherosclerosis, and diabetic nephropathy via the induction of aldosterone secretion.

研究分野：内分泌・代謝学

キーワード：アルドステロン 糖尿病 高血圧 CYP11B2 遺伝子改変マウス DNAマイクロアレイ 糖尿病性腎症
創薬

1. 研究開始当初の背景

近年、本邦においては糖尿病患者の急増に伴い糖尿病性腎症が著増している。一方で、多くの治療抵抗性高血圧症患者において、アルドステロンの過剰分泌または作用亢進がその増悪に関与していることが最近明らかにされつつある。しかしながら、糖尿病・糖尿病性腎症とアルドステロン合成酵素 (CYP11B2) 発現・アルドステロン分泌の連関に関しては未だ不明の点が多い。

2. 研究の目的

本研究の目的は 1) 糖尿病・糖尿病性腎症の発症・進展における CYP11B2 発現・アルドステロン分泌の意義・役割を解明すると共に 2) CYP11B2 発現を抑制する新規薬剤のスクリーニングを行ない、得られた薬剤を糖尿病性腎症モデルである iNOS/RAGE ダブルトランスジェニックマウスに投与して糖尿病性腎症の抑制効果を検討する。

3. 研究の方法

ヒト副腎 H295R 細胞を用いた。CYP11B2 遺伝子の転写活性はルシフェラーゼアッセイにて、mRNA 発現は定量 PCR にて、上清アルドステロン分泌は ELISA にてそれぞれ測定した。iNOS/RAGE ダブルトランスジェニックマウスの尿中アルブミン測定も ELISA にて施行した。

4. 研究成果

我々は、高血糖刺激 (D-glucose) が刺激時間・濃度依存的にヒト副腎 H295R 細胞においてアルドステロン合成酵素遺伝子 (CYP11B2) プロモーター活性・mRNA 発現を増強することを見出した。CYP11B2 プロモーター-deletion mutants を用いた解析から、本作用は CYP11B2 プロモーター上の NBRE-1 領域を介する可能性が示唆された。この NBRE-1 に結合する転写因子である Nurr-1 と NGFIB も、D-glucose 刺激により mRNA 量の増加を示した。更に、D-glucose 刺激によるアルドステロン分泌量の増加や細胞内 Ca 濃度の増加も認められた。D-glucose による CYP11B2 増強作用は ARB や PKC-β 阻害薬 (LY333531) の添加によって抑制されなかった一方で、CaMK 阻害薬 (KN93) により抑制された。また、Ca 拮抗薬はいずれも同作用を抑制したが、T/L 型 Ca 拮抗薬 (塩酸ベニジピン) の作用が最も強力であった。さらに D-glucose による T 型 Ca チャネル mRNA 量の発現増加も認められた。以上の結果から、高濃度 D-glucose 刺激は T 型 Ca チャネルの発現増加を介して CaMK の活性化、Nurr-1・NGFIB の発現増強、ならびに NBRE-1 領域の転写活性亢進を介して、CYP11B2 発現を誘導すると考えられた。以上から、高血糖刺激はアルドステロンの分泌増加を介して高血圧・動脈硬化や糖尿病性腎症の進展に関与する可能性が示唆された。な

お、化合物ライブラリーのスクリーニングならびに iNOS/RAGE ダブルトランスジェニックマウスを用いた解析も、現在遂行中である。

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 28 件)

Saito-Hakoda A, Uruno A, Yokoyama A, Shimizu K, Parvin R, Kudo M, Saito-Ito T, Sato I, Kogure N, Suzuki D, Shimada H, Yoshikawa T, Fujiwara I, Kagechika H, Iwasaki Y, Kure S, Ito S, Sugawara A. Effects of RXR agonists on cell proliferation/apoptosis and ACTH secretion/Pomc expression. PLoS One. 2015; 10: e0141960. doi: 10.1371/journal.pone.0141960. eCollection 2015. (査読有)

Nakamura T, Yoshikawa T, Naganuma F, Mohsen A, Iida T, Miura Y, Sugawara A, Yanai K. Role of histamine H3 receptor in glucagon-secreting αTC1.6 cells. FEBS Open Bio. 2014; 5: 36-41. doi: 10.1016/j.fob.2014.12.001. eCollection 2015.

Uruno A, Saito-Hakoda A, Yokoyama A, Kogure N, Matsuda K, Parvin R, Shimizu K, Sato I, Kudo M, Yoshikawa T, Kagechika H, Iwasaki Y, Ito S, Sugawara A. Retinoic acid receptor-α up-regulates proopiomelanocortin gene expression in AtT20 corticotroph cells. Endocr J. 2014; 61: 1105-1114. <http://doi.org/10.1507/endocrj.EJ14-0115> (査読有)

Yokoyama A, Igarashi K, Sato T, Takagi K, Otsuka I. M, Shishido Y, Baba T, Ito I, Kanno J, Ohkawa Y, Morohashi K, Sugawara A. Identification of Myt1 as a subunit of the neural cell type-specific LSD1 complex. J Biol Chem. 2014; 289: 18152-18162. doi: 10.1074/jbc.M114.566448. Epub 2014 May 14. (査読有)

Kudo M, Matsuda K, Sugawara K, Iki Y, Kogure N, Saito-Ito T, Shimizu K, Sato I, Takeo Yoshikawa T, Uruno A, Ito R, Yokoyama A, Saito-Hakoda A, Ito S, Sugawara A. ARB affects nicotine-induced gene expression profile in human coronary artery endothelial cells. World J Hypertens. 2014; 4: 7-14. doi: 10.5494/wjh.v4.i1.7 (査読有)

Matsuda K, Uruno A, Kogure N, Sugawara K, Shimada H, Nezu M, Saito-Ito T, Iki Y, Kudo M, Shimizu K, Sato I, Yoshikawa T, Satoh F, Ito R, Yokoyama A, Rainey WE, Saito-Hakoda A, Ito S,

Sugawara A. Angiotensin II receptor blockers differentially affect CYP11B2 expression in human adrenal H295R cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2014; 383: 60-68. doi: 10.1016/j.mce.2013.12.004. Epub 2013 Dec 12. (査読有)

Felizola SJ, Nakamura Y, Ono Y, Kitamura K, Kikuchi K, Onodera Y, Ise K, Takase K, Sugawara A, Hattangady N, Rainey WE, Satoh F, Sasano H. PCP4: a regulator of aldosterone synthesis in human adrenocortical tissues. *J Mol Endocrinol*. 2014; 52: 159-167. doi: 10.1530/JME-13-0248. Print 2014 Apr. (査読有)

Nakamura Y, Hattangady NG, Ye P, Satoh F, Morimoto R, Ito-Saito T, Sugawara A, Ohba K, Takahashi K, Rainey WE, Sasano H. Aberrant gonadotropin-releasing hormone receptor (GnRHR) expression and its regulation of CYP11B2 expression and aldosterone production in adrenal aldosterone-producing adenoma (APA). *Mol Cell Endocrinol*. 2014; 384: 102-108. doi: 10.1016/j.mce.2014.01.016. Epub 2014 Jan 25. (査読有)

Yagishita Y, Fukutomi T, Sugawara A, Kawamura H, Takahashi T, Pi J, Uruno A, Yamamoto M. Nrf2 protects pancreatic β -cells from oxidative and nitrosative stress in diabetic model mice. *Diabetes*. 2014; 63: 605-618. doi: 10.2337/db13-0909. Epub 2013 Nov 1. (査読有)

Ito R, Katsura S, Shimada H, Tsuchiya H, Hada M, Okumura T, Sugawara A, Yokoyama A. TET3-OGT interaction increases the stability and the presence of OGT in chromatin. *Genes Cells*. 2014; 19: 52-65. doi: 10.1111/gtc.12107. Epub 2013 Dec 4. (査読有)

Nakamura T, Yoshikawa T, Noguchi N, Sugawara A, Kasajima A, Sasano H, Yanai K. The expression and function of histamine H3 receptor in pancreatic β -cells. *Br J Pharmacol*. 2014; 171: 171-185. doi: 10.1111/bph.12429. (査読有)

Katsura S, Okumura T, Ito R, Sugawara A, Yokoyama A. Identification of posttranslational modifications in peroxisome proliferator-activated receptor γ using mass spectrometry. *PPAR Res*. 2014; 2014: 468925. doi: 10.1155/2014/468925. Epub 2014 Jun 25. (査読有)

Kudo M, Satoh F, Aoki S, Morimoto R, Iwakura Y, Ono Y, Matsuda K, Sugawara A, Yoshida K, Sato K, Ito S. Assisting the diagnosis of Cushing syndrome by pattern recognition methods, using a combination

of eight routine tests, and their multiple correlation with serum cortisol. *Biomedicine & Aging Pathology*. 2014; 4: 257-264. doi:10.1016/j.biomag.2014.04.001 (査読有)

Saito-Hakoda A, Kogure N, Yoshikawa T, Shimizu K, Iki Y, Sato I, Kudo M, Uruno A, Matsuda K, Parvin R, Sugawara K, Yokoyama A, Ito S, Sugawara A. Is heparan sulfate in the glomerular basement membrane necessary for the etiology of diabetic nephropathy? *J Biomol Res Ther*. 2014; 3: e127. doi:10.4172/2167-7956.1000e127 (査読有)

〔学会発表〕(計 74 件)

小暮直敬、菅原香織、工藤正孝、島田洋樹、箱田明子、伊藤 亮、横山 敦、菅原 明：高血糖刺激による副腎アルドステロン合成酵素遺伝子 (CYP11B2) 発現亢進。第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会 2015 年 5 月 22 日、海峡メッセ下関、下関

箱田明子、宇留野晃、清水恭子、レハナ・パービン、横山 敦、吉川雄朗、工藤正孝、影近弘之、岩崎泰正、伊藤貞嘉、菅原 明：種々のレチノイド X 受容体アゴニストは、AtT20 細胞の増殖・アポトーシス・Pomc 発現・ACTH 分泌に異なる影響を及ぼす。第 88 回日本内分泌学会学術総会 2015 年 4 月 23 日、ホテルニューオータニ東京、東京

鈴木 大、箱田明子、清水恭子、レハナ・パービン、宇留野晃、青木 聡、佐藤郁子、島田洋樹、小暮直敬、藤原幾麿、伊藤貞嘉、影近弘之、横山 敦、菅原 明：レチノイド X 受容体アゴニスト PA024 が副腎 CYP11B2 発現・アルドステロン分泌に及ぼす影響の検討。第 88 回日本内分泌学会学術総会 2015 年 4 月 25 日、ホテルニューオータニ東京、東京

工藤正孝、青木空真、森本 玲、岩倉芳倫、小野美澄、菅原 明、佐藤文俊、佐藤憲一、伊藤貞嘉：ブクリニカルクッシング症候群のスクリーニングと手術施行時期について～パターン認識手法による血液基本的検査データの解析による試み～。第 88 回日本内分泌学会学術総会 2015 年 4 月 25 日、ホテルニューオータニ東京、東京

Kogure N, Matsuda K, Uruno A, Sugawara K, Sato I, Shimizu K, Parvin R, Yoshikawa T Kudo M, Saito-Hakoda A, Ito R, Yokoyama A, Ito S, Sugawara A. High-glucose stimulates aldosterone synthase gene (CYP11B2) expression via the induction of T-type calcium channels in H295R cells. *ICE/ENDO* 2014, 2014 6/21-24, Chicago, USA

Ito R, Matsuda K, Uruno A, Yokoyama A, Sugawara A. The innovation of a novel drug screening system for the inhibitors of aldosterone synthase gene (CYP11B2)

expression. ICE/ENDO 2014, 2014 6/21-24, Chicago, USA

Kogure N, Matsuda K, Uruno A, Sugawara K, Sato I, Shimizu K, Parvin R, Kudo M, Saito-Hakoda A, Ito R, Yokoyama A, Ito S, Sugawara A. Induction of aldosterone synthase gene (CYP11B2) expression by high-glucose in H295R cells. 40th Meeting of the International Aldosterone Conference, 2014 6/20, Chicago, USA

Ito R, Shimada H, Matsuda K, Uruno A, Yokoyama A, Sugawara A. The development of a novel high-throughput screening (HTS) system for the discovery of aldosterone synthase gene (CYP11B2) inhibitors. 40th Meeting of the International Aldosterone Conference, 2014 6/19, Chicago, USA

小暮直敬、菅原香織、松田 謙、宇留野晃、佐藤郁子、清水恭子、レハナ・パービン、島田洋樹、吉川雄朗、工藤正孝、箱田明子、伊藤 亮、横山 敦、伊藤貞嘉、菅原 明：高血糖刺激による副腎アルドステロン合成酵素遺伝子 (CYP11B2) 発現。第 37 回日本高血圧学会総会 2014 年 10 月 18 日、パシフィコ横浜、横浜

伊藤 亮、島田洋樹、松田 謙、宇留野晃、横山 敦、菅原 明：アルドステロン合成酵素遺伝子 (CYP11B2) をターゲットとした新規創薬。第 37 回日本高血圧学会総会 2014 年 10 月 18 日、パシフィコ横浜、横浜

菅原香織、小暮直敬、松田 謙、宇留野晃、佐藤郁子、清水恭子、レハナ・パービン、島田洋樹、吉川雄朗、工藤正孝、箱田明子、伊藤 亮、横山 敦、伊藤貞嘉、菅原 明：高血糖刺激は副腎 11 β -水酸化酵素遺伝子 (CYP11B1) の発現を誘導する。第 37 回日本高血圧学会総会 2014 年 10 月 18 日、パシフィコ横浜、横浜

〔図書〕(計 14 件)

菅原 明、箱田明子：レチノイン酸と ACTH 産生腫瘍。平田結喜緒、成瀬光栄編：クッシング症候群診療マニュアル(改訂第 2 版)。Pp.253-254、診断と治療社、2015

菅原 明、伊藤貞嘉：放射線治療。平田結喜緒、成瀬光栄編：クッシング症候群診療マニュアル(改訂第 2 版)。Pp.102-104、診断と治療社、2015

菅原 明：ミネラルコルチコイド。秋澤忠男他編：南山堂医学大辞典(第 20 版)。Pp.2381-2382、南山堂、2015

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

和文

<http://www.med.tohoku.ac.jp/org/health/84/index.html>

英文

<http://www.med.tohoku.ac.jp/english/about/laboratory/377.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅原 明 (SUGAWARA AKIRA)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：90270834

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

伊藤 貴子 (SAITO-ITO TAKAKO)
東北大学・病院・助教
研究者番号：10375173

工藤 正孝 (KUDO MASATAKA)
東北大学・病院・准教授
研究者番号：20509583

箱田 明子 (SAITO-HAKODA AKIKO)
JR 仙台病院・小児科・医長
研究者番号：70509398

松田 謙 (MATSUDA KEN)
石巻赤十字病院・内科・副部長
研究者番号：60645935