

## 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 6月 7日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590643

研究課題名（和文）アルドステロンの腎障害機構に対する内因性ジギタリスの保護作用

研究課題名（英文）Protective effects of endogenous digitalislike factor on the injury of kidney by aldosterone

研究代表者

小宮山 豊 (KOMIYAMA YUTAKA)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：40140264

研究成果の概要（和文）：本研究は内因性ジギタリス用物質（EDLF）の病態検査学的研究の一環である。アルドステロンの腎障害機構に対する EDLF の保護効果を理解する上で重要な、末梢での EDLF 産生および作用機構で役割を果たす器官である副腎および心臓に関して新しい知見を得るとともに、さらに上位の調節機関であることが強く示唆される神経系細胞 PC12 から marinobufotoxin (MBT) が産生されることを初めて示し、さらに視床下部の不死化細胞である N-1 でのウアバイン様物質産生にかかわるシステムが存在することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：This research is a part of patho-physiological study of endogenous digitalislike factor (EDLF) To realize aldosterone injury on the kidney function, new information of EDLF production in peripheral organ such as adrenal and heart were obtained. And, as a central modulation system of EDLF bio-activity, a production of marinobufotoxin (MBT) in PC12 cell derived from nerve system cell-line was demonstrated as the first report in the world. Moreover, participation of N-1 cell derived from hypothalamus cell line to the ouabain production was demonstrate. This is also the first report.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：病態検査学

キーワード：内因性ジギタリス、アルドステロン、視床下部、腎障害、臨床検査

## 1. 研究開始当初の背景

本研究は内因性ジギタリス用物質（EDLF）の病態検査学的研究の一環である。近年、アルドステロンが腎障害を促進することが明らかになった。今回のアルドステロン有害事象へのEDLF系の改善作用を研

究する可能性があるため、そのメカニズムを特異的受容体拮抗薬なども駆使しつつ、アルドステロンの腎障害機構に対する内因性ジギタリスの保護効果を明らかにできる可能性があった。また、申請者らは、このbufadienolideに属するEDLFのエポキシ形成および解裂、両タイプのEDLFのアミ

ノ酸結合型を保有し、これらを有効利用することができ、研究が進むと考えたのが当初の背景である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、上記背景の中で、特異的受容体拮抗薬など我々が保持する数種のEDLFをも駆使し、アルドステロンの腎障害機構に対する内因性ジギタリスの保護効果を明らかにすることである。このようにEDLFの中でも下記(図1)の構造式でBおよびDのようにスベロイルアルギニンを結合したEDLFに注目しているのは世界的にも我々のグループのみであり、今回はその成果を世界に発表する。

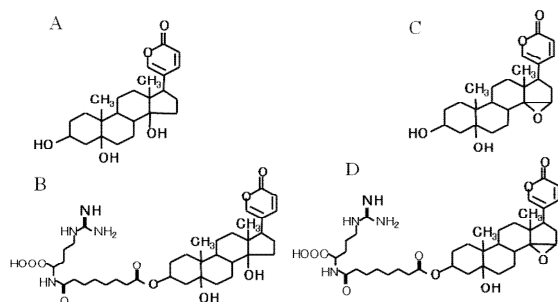


図1 各種EDLFの構造

## 3. 研究の方法

我々が従来実施してきたPC12などcell lineに加え、今回中枢系の新しいcell line N-1細胞などを用い、種々の条件でEDLF系の算出などをELISAとHPLCなどのクロマトによるcharacterization(図2)でどの種類のEDLFが産生されているか、

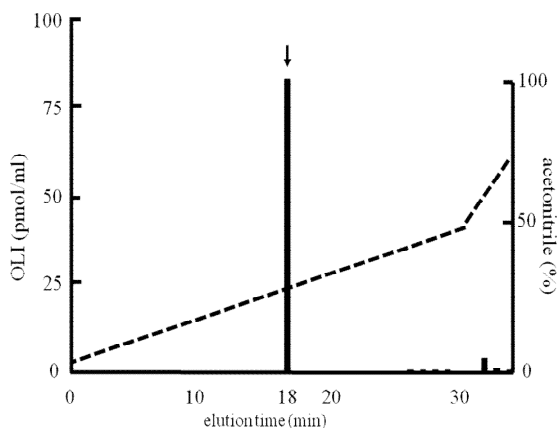


図2 HPLCによるOLIのcharacterization

さらに、その産生にAldosteroneやその受容体拮抗薬はどのように働かなどとともに、動物実験でのWhole body研究も実施した。

## 4. 研究成果

アルドステロンの近位尿細管細胞アポトーシス惹起機構に対するMBT、MBGおよびTCBおよびアルドステロン受容体拮抗薬の作用については、明確な結論を得るに至っていない。しかし、アルドステロンの腎障害機構に対するEDLFの保護効果を理解する上で重要な、末梢でのEDLF産生および作用機構で役割を果たす器官である副腎および心臓に関して新しい知見を得るとともに、さらに上位の調節機関であることが強く示唆される神経系細胞PC12からMBTが産生されることを初めて示し、さらに視床下部の不死化細胞であるN-1でのウアバイン様物質産生にかかわるシステムが存在することを明らかにした。

すなわち、今回新たにMBTが副腎髄質に存在することを質量分析的に定性的、さらに定量的にはELISAで示し、副腎髄質におけるEDLFの産生・分泌機構にMBGおよびMBT両者が関与すること、さらに、実験的心不全におけるNa/Ca exchangerが新たな治療ターゲットになること、およびouabainの関与についての側面を示した。特筆すべきは今までほとんど明確でなかった中枢系の細胞であるN-1細胞でウアバイン様物質が下図(図3)のように継続的に分泌することを明らかにし、その存在を明確にした。

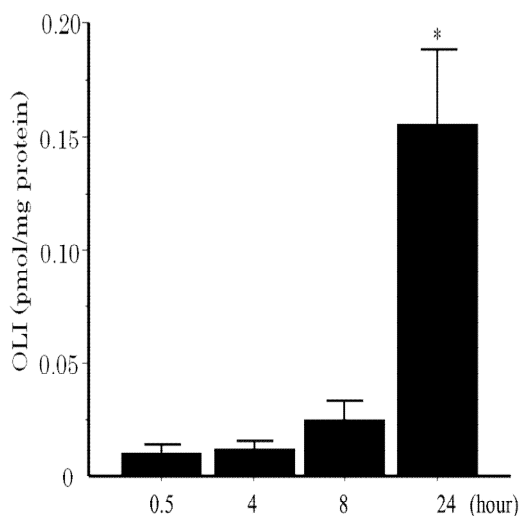


図3 N1細胞によるOLI産生・分泌  
(本研究の成果は、EDLFに関して世界的に注目すべき成果であると、本分野の第1人者であるカナダのOttawa大学のFrans HH Leenen教授が昨年来日された際に高く評価された。)

また数に示すようにその分泌機構に本研究課題のメインテーマであるアルドステロンが調節機構としてかかわっていることを明らかにした(図4)。

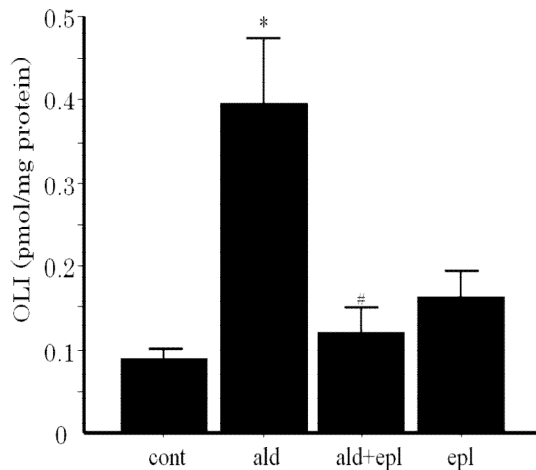


図4 N1細胞におけるOLI産生とアルドステロンおよびその受容体系の役割

#### 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. Takahashi H, Komiyama Y, Yoshika M et al.: The central mechanism underlying hypertension: a review of the roles of sodium ions, epithelial sodium channels, the renin-angiotensin-aldosterone system, oxidative stress and endogenous digitalis in the brain. *Hypertens Res* 34: 1147-60, 2011
2. Yoshika M, Komiyama Y, Takahashi H et al.: An ouabain-like factor is secreted from immortalized hypothalamic cells in an aldosterone-dependent manner. *Neurochem Int* 59: 104-108, 2011
3. Kamimura D, Komiyama Y, Yoshika M, Takahashi H et al.:  $Ca^{2+}$  entry mode of  $Na^{+}/Ca^{2+}$  exchanger as a new therapeutic target for heart failure with preserved ejection fraction. *Eur Heart J Epub*, 1-9, 2011
4. Yoshika M, Komiyama Y, Takahashi H et al.: Isolation of marinobufotoxin from the supernatant of cultured PC12 cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 38: 334-337, 2011
5. 吉賀正亨、小宮山豊、高橋伯夫: 内因性ジギタリス. *検査と技術* 39: 561-564, 2011
6. 吉賀正亨、小宮山豊、高橋伯夫: 自然発症高血圧ラットにおける内因性ジギタリス様物質、マリノブフォトキシンの動態 血圧調節におけるレニン・アンジオ

テンシン系の関与について. *心臓* 41: 401-404, 2009

[学会発表] (計6件)

1. 吉賀正亨、高橋伯夫、小宮山豊: 新規内因性ジギタリスである telocinobufotoxin の昇圧作用の検討. 第15回日本心血管内分泌代謝学会学術集会. 2011年11月18日、千里ライフサイエンスセンター、吹田
2. 吉賀正亨、高橋伯夫、小宮山豊: 高血圧発症機序における内因性ジギタリスの臨床検査医学的研究. 第58回日本臨床検査医学会学術集会. 2011年11月18日、岡山コンベンションセンター、岡山
3. 吉賀正亨、高橋伯夫、小宮山豊: 副腎細胞を用いたアンジオテンシン2受容体拮抗薬の内因性ジギタリス分泌に関する検討. 第51回日本臨床化学学会年次学術集会. 2011年8月26日、札幌医科大学、札幌
4. 吉賀正亨、高橋伯夫、小宮山豊: 高血圧発症機序における新規内因性ジギタリスの臨床検査学的研究. 第57回日本臨床検査医学会学術集会 2010年9月11日、京王プラザホテル、東京
5. Yoshika M, Komiyama Y, Takahashi H et al.: A mineralocorticoid receptor blocker, eplerenone decreases plasma levels of marinobufagenin-like immunoreactivity in rat. *International Symposium on Cardiovascular Endocrinology and Metabolism*. 2010年4月1日、奈良県新公会堂、奈良
6. 吉賀正亨、小宮山豊、高橋伯夫: 高速液体クロマトグラフィーを用いた内因性ジギタリス様物質マリノブフォトキシンの分泌機構の検討. 第45回高血圧関連疾患モデル学会学術総会. 2009年9月4日、東京ステーションコンファレンス、東京

[その他]

ホームページ等

関西医科大学 教員情報

<http://research.kmu.ac.jp/kmuhp/Koza?kyoinId=syeim>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小宮山 豊 (KOMIYAMA YUTAKA)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号: 40140264

(2)研究分担者

吉賀 正亨 (YOSHIKA MASAMICHI)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：70434834

(3)連携研究者

高橋 伯夫 (TAKAHASHI HAKUO)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：80094431