

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5月25日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590955

研究課題名（和文） ミネラルコルチコイド受容体を介したグルココルチコイドによる血管内皮障害機構の解明

研究課題名（英文） Glucocorticoid-induced vascular endothelial dysfunction through activation of mineralcorticoid receptor

研究代表者

赤池 雅史（AKAIKE MASASHI）

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：90271080

研究成果の概要（和文）：ヒト臍帯静脈内皮細胞では、ヒドロコルチゾンおよびメチルプレドニゾロンにより、グルココルチコイド応答配列の転写活性の亢進、superoxide 産生増加および内皮型一酸化窒素合成酵素の発現・活性化の抑制がみられた。これらの作用はスピロノラクトンやエプレレノンによって抑制された。グルココルチコイド過剰はミネラルコルチコイド受容体活性化を介して血管内皮細胞での酸化ストレス増大と一酸化窒素産生低下をきたし、血管内皮機能低下を惹起する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Hydrocortisone and methylprednisolone significantly increased glucocorticoid transcriptional activity and production of superoxide, and decreased expression and activation of endothelial nitric oxide synthase in cultured vascular endothelial cells. These effects were suppressed by spironolactone and eplerenone. Glucocorticoid excess enhanced oxidative stress and attenuated nitric oxide production through activation of mineralcorticoid receptor, leading to vascular endothelial dysfunction.

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	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：グルココルチコイド、ミネラルコルチコイド、血管内皮細胞、酸化ストレス、一酸化窒素

1. 研究開始当初の背景

グルココルチコイドは生体に不可欠なストレス応答ホルモンであるが、ステロイド治療やクッシング病などのグルココルチコイド過剰では高血圧や動脈硬化症などの重篤な心血管病を引き起こす。また、心不全患者ではコルチゾールとアルドステロンの血清

濃度の上昇が生命予後の独立した規定因子である。このように心血管系に及ぼすグルココルチコイド作用は多くの心血管病の病態に関与しているが、なかでも、血管リモデリング過程に最も重要である血管内皮機能に及ぼすグルココルチコイド過剰作用の解明は、心血管病の予防・治療法の開発において

新しい手がかりとなりうると考えられる。

グルココルチコイドは核内受容体であるグルココルチコイド受容体 (GR) に結合し、二量体としてプロモーター上の DNA 特異的配列に結合する結果、標的遺伝子の転写発現調節を行う。我々はグルココルチコイド誘発性高血圧の主要病態が、塩分体液貯留ではなく末梢血管抵抗増大であることに着目し、GR 活性化が血管内皮機能に及ぼす影響を検討してきた。この結果、人では GR 活性化が酸化ストレス亢進と一酸化窒素 (NO) 産生の抑制を介して血管内皮機能を障害することをはじめて報告した (Iuchi T, Akaike M, et al. *Circ Res* 92:81-7, 2003)。

一方、人における活性型内因性グルココルチコイドであるコルチゾール (ハイドロコルチゾン; HC) はミネラルコルチコイド受容体 (MR) に対しアルドステロンと同等の親和性を有している。合成グルココルチコイドであるプレドニゾンやメチルプレドニゾン (mPSL) も MR への結合能を有する。これらは 11β -HSD2 により不活性化されるが、血管内皮細胞では 11β -HSD2 の発現がわずかであるため、MR と結合し、これを活性化する可能性がある。血管系での MR 活性化は、NADPH oxidase からの superoxide 産生を亢進し、NO の消去や内皮型 NO 合成酵素 (eNOS) の uncoupling を介して NO 産生を減少させる作用もある。しかしながら、血管系におけるグルココルチコイド作用については、ほとんどが GR を介する作用の検討であり、特に血管内皮細胞について MR を介したグルココルチコイド作用に着目した検討は皆無である。

2. 研究の目的

本研究ではグルココルチコイドによる MR 活性化作用、特に酸化ストレス亢進と NO 産生抑制作用に着目し、グルココルチコイド過剰による MR 活性化を介した血管内皮機能障害機構の解明を行う。

3. 研究の方法

(1) グルココルチコイドによる GR/MR 転写活性亢進に及ぼす MR ブロッカーの効果

HC 非添加のプレートキット EGM-2 で培養したヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC, 三光純薬) に HC あるいは mPSL 10^{-5} M を添加し、GR/MR 応答配列による dual-luciferase reporter assay (SA Biosciences) を用いて 16 時間後に転写活性を測定した。HC あるいは mPSL 添加の 8 時間前にスピロラクトン (Spi) あるいはエプレレノン (Epl) を 10^{-7} M、 10^{-6} M、 10^{-5} M で添加し、その効果を検討した。

(2) グルココルチコイドによる superoxide 産生亢進に及ぼす MR ブロッカーの効果

HUVEC に HC あるいは mPSL 10^{-5} M を添加し、

dihydroethidium (DHE) 染色を用いて superoxide の産生を評価した。さらに HC あるいは mPSL 添加の 8 時間前にスピロラクトンあるいはエプレレノン 10^{-5} M を添加しその効果を検討した。

(3) グルココルチコイドによる eNOS 発現・活性化低下に及ぼす MR ブロッカーの効果

HUVEC に HC あるいは mPSL 10^{-5} M を添加し、ウエスタンブロッティングにより eNOS の発現ならびにその Ser1177 のリン酸化を検討した。さらに HC あるいは mPSL 添加の 8 時間前にスピロラクトンあるいはエプレレノン 10^{-7} M、 10^{-6} M、 10^{-5} M を添加しその効果を検討した。

(4) グルココルチコイドによる Rac-1 活性化に及ぼす MR ブロッカーの効果

エプレレノン 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} M を添加し、その 8 時間後から HC を 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} M の最終濃度で添加して、NADPH oxidase のコンポーネントである Rac-1 活性を pull-down assay により評価した。

4. 研究成果

(1) グルココルチコイドによる GR/MR 転写活性亢進に及ぼす MR ブロッカーの効果

HC および mPSL は GR/MR 転写活性を濃度依存性に亢進した。この転写活性の亢進は、スピロラクトンあるいはエプレレノンにより濃度依存性に抑制された (図 1、図 2)。

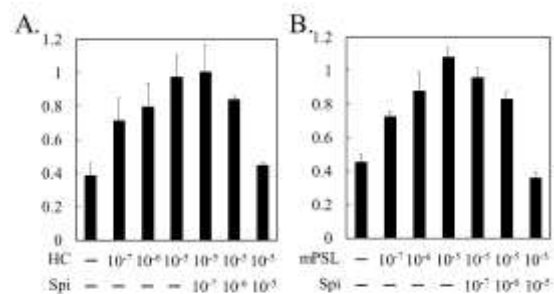


図1. グルココルチコイド転写活性に及ぼすスピロラクトンの効果

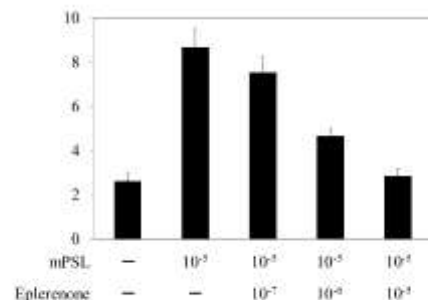


図2. グルココルチコイド転写活性に及ぼすエプレレノンの効果

(2) グルココルチコイドによる superoxide 産生亢進に及ぼす MR ブロッカーの効果

HC および mPSL は superoxide 産生を増加させた。その作用はスピロラクトンあるいはエプレレノンにより抑制された(図 3、図 4)。

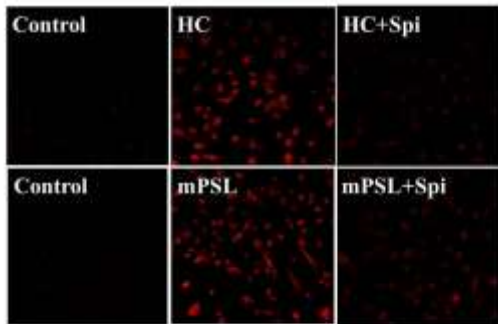


図3. グルココルチコイドによる活性酸素産生に及ぼすスピロラクトンの効果

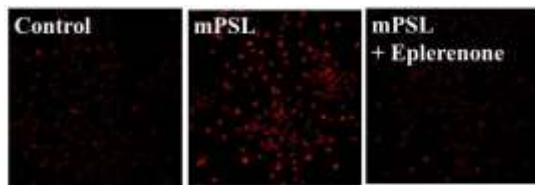


図4. グルココルチコイドによる活性酸素産生に及ぼすエプレレノンの効果

(3) グルココルチコイドによる eNOS 発現・活性化低下に及ぼす MR ブロッカーの効果

HC および mPSL は eNOS の発現とリン酸化・活性化を濃度依存性に抑制した。その抑制作用はスピロラクトンあるいはエプレレノンにより改善した (図 5、図 6)。

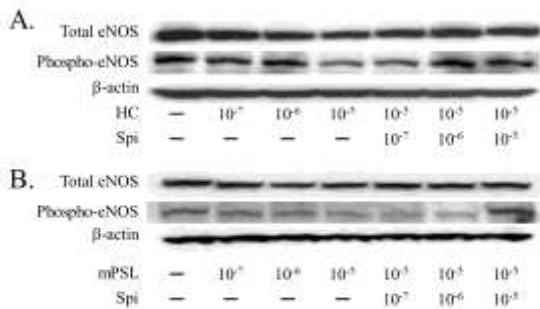


図5. グルココルチコイドによるNOS発現・活性化抑制に及ぼすスピロラクトンの効果

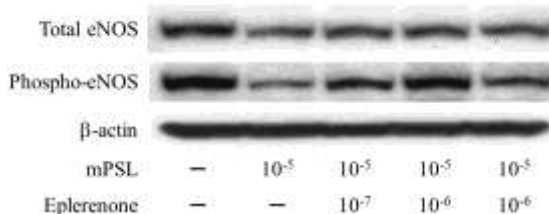


図6. グルココルチコイドによるNOS発現・活性化抑制に及ぼすエプレレノンの効果

(4) グルココルチコイドによる Rac-1 活性化に及ぼす MR ブロッカーの効果

予備的な検討段階ではあるが、HC は濃度依存性に Rac-1 を活性化し、その作用は、エプレレノン濃度依存性に抑制された。

以上の結果は、グルココルチコイド過剰が血管内皮細胞において MR 活性化により酸化ストレス亢進や eNOS 発現・活性化の抑制を介して、血管内皮細胞機能を障害することを示すものである(図 7)。GR は血管内皮細胞の生存に必須であるため、現時点では GR 阻害薬を臨床応用することは困難であるが、MR ブロッカーは、すでに循環器診療で広く用いられている薬剤であり、グルココルチコイドによる血管内皮細胞機能低下を効果的に改善し、グルココルチコイド過剰による心血管合併症の予防・治療薬となる可能性がある。

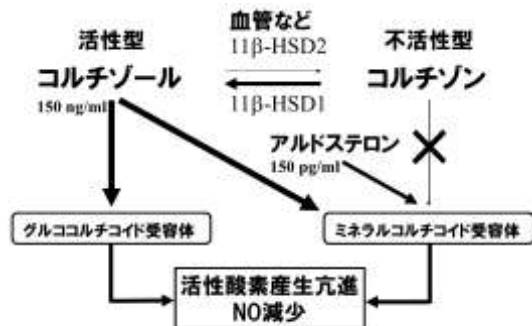


図7. グルココルチコイド誘発性血管内皮細胞機能障害の発生機序

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 18 件)

- ① Yagi S, Akaike M, Aihara K, Iwase T, et al. High plasma aldosterone concentration is a novel risk factor of cognitive impairment in patients with hypertension. *Hypertens Res*, 査読あり, 34(1), 2011, 74-78. DOI:10.1038/hr.2010.179
- ② Hashizume S, Akaike M, Azuma H, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor α in megakaryocytes reduces platelet-derived growth factor-BB in platelets. *J Atheroscler Thromb*, 査読あり, 18, 2011, 138-147. <http://dx.doi.org/10.5551/jat.5868>
- ③ Yagi S, Akaike M, Aihara K, Iwase T, et al. Effect of Low-dose (1mg/day) "Pitavastatin" on Left Ventricular Diastolic Function and Albuminuria in Patients with Hyperlipidemia. *Am J Cardiol*, 査読あり, 107(11), 2011, 1644-1649. <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjcard.2011.01.054>
- ④ Yagi S, Akaike M, Aihara K, Iwase T, et al.

Ezetimibe ameliorates metabolic disorder and microalbuminuria in patients with hypercholesterolemia. *J Atheroscler Thromb*, 査読あり, 17(2), 2010, 173-180.
<http://dx.doi.org/10.5551/jat.2378>

- ⑤ Yagi S, Akaike M, Aihara K, Ishikawa K, Iwase T, et al. Endothelial nitric oxide synthase-independent Protective Action of Statin Against Angiotensin II-induced Atrial Remodeling via Reduced Oxidant Injury. *Hypertension*, 査読あり, 55(4), 2010, 918-923. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.146076
- ⑥ Ikeda Y, Aihara K, Akaike M, et al. Androgen-androgen receptor system counteracts doxorubicin-induced cardiotoxicity in male mice. *Mol Endocrinol*, 査読あり, 24, 2010, 1338-1348.
DOI: 10.1210/me.2009-0402
- ⑦ Sumitomo-Ueda Y, Aihara K, Ise T, Yoshida S, Ikeda Y, Uemoto R, Yagi S, Iwase T, Hirata Y, Akaike M, et al. Heparin Cofactor II protects against angiotensin II-induced cardiac remodeling via attenuation of oxidative stress in mice. *Hypertension*, 査読あり, 56(3), 2010, 430-436. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.152207
- ⑧ Aihara K, Azuma H, Akaike M, et al. Heparin Cofactor II Is an Independent Protective Factor Against Peripheral Arterial Disease in Elderly Subjects With Cardiovascular Risk Factors. *J Atheroscler Thromb*, 査読あり, 16(2), 2009, 127-134.
<http://dx.doi.org/10.5551/jat.1552>
- ⑨ Fujimura M, Akaike M, Iwase T, Yoshida S, Sumitomo Y, Yagi S, Ikeda Y, Hashizume S, Aihara K, et al. Decrease in Plasma Brain Natriuretic Peptide Level in the Early Phase after the Start of Carvedilol Therapy is a Novel Predictor of Long-term Outcome in Patients with Chronic Heart Failure. *Acta Cardiol*, 査読あり, 64(5), 2009, 589-595.
- ⑩ 赤池雅史, 松本俊夫. 大腿骨頭壊死症の最近の話題「ステロイド投与下におけるスタチンと血管内皮」. *整形・災害外科* (査読なし) 52, 2009, 957-963.

[学会発表] (計 11 件)

- ① 赤池雅史. A randomized, double-blind, pilot study to evaluate the efficacy and safety of *Citrus sudachi* peel in metabolic syndrome, XVI International Symposium on Atherosclerosis 2012.3.27, Sydney Convention and Exhibition Centre (オーストラリア、シドニー)
- ② 赤池雅史. グルココルチコイド誘発性血管内皮細胞障害に対するアルドステロン受容

体拮抗薬の効果、第84回日本内分泌学会学術総会、2011.4.23、神戸国際会議場 (神戸市)

- ③ 赤池雅史. ピタバスタチンによる血管内皮細胞での一酸化窒素合成酵素の発現亢進作用とその機序の検討、第33回日本高血圧学会総会、2010.10.16、福岡国際会議場 (福岡市)
- ④ 赤池雅史. Glucocorticoid Excess Causes Vascular Endothelial Cell Dysfunction through Activation of Mineralocorticoid Receptor, International Society of Heart Research, 2010.5.16、京都国際会議場 (京都市)
- ⑤ 赤池雅史. ミネラルコルチコイド受容体を介したグルココルチコイド過剰による血管内皮細胞障害作用、第32回日本高血圧学会総会、2009.10.1、大津プリンスホテル (大津市)
- ⑥ 赤池雅史. グルココルチコイド誘発性血管内皮細胞障害におけるミネラルコルチコイド受容体の関与、第82回日本内分泌学会学術総会、2009.4.25、前橋商工会議所 (前橋市)

[図書] (計 1 件)

- ① 赤池雅史、金芳堂、特発性大腿骨頭壊死症の基本と up to date、2010, 268

[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

<http://square.umin.ac.jp/TOKUSHIM/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤池 雅史 (AKAIKE MASASHI)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授
研究者番号：90271080

(2) 研究分担者

岩瀬 俊 (IWASE TAKSHI)
徳島大学・病院・助教
研究者番号：10403718

栗飯原 賢一 (AIHARA KEN-ICHI)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・講師
研究者番号：70372711
(H23 研究分担者)

八木 秀介 (YAGI SHUSUKE)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教
研究者番号：00507650
(H21 研究分担者)