

平成23年 5月 19日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790894

研究課題名 (和文)

骨形成蛋白を介する副腎皮質のアルドステロン分泌とブレイクスルー現象発生機序の解明

研究課題名 (英文) Aldosterone breakthrough caused by chronic blockage of angiotensin II type-1 receptors in human adrenocortical cells: Involvement of bone morphogenetic protein-6 actions

研究代表者

鈴木 二郎 (SUZUKI JIROU)

岡山大学・岡山大学病院・医員

研究者番号：90452573

研究成果の概要 (和文)：ARB 長期投与におけるアルドステロンブレイクスルー現象機序を解明するために副腎局所因子である BMP-6 に着目して検討した。ヒト副腎皮質培養細胞において ARB 長期投与でアルドステロン抑制効果は減弱した。副腎局所で Aldosterone 合成を促進する BMP-6 が、ARB 長期投与では「本来抑制されるべき ARB による BMP-6 システムの抑制」が解除されることによりアルドステロン産生抑制が減弱する可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

We investigated whether aldosterone breakthrough occurs in human adrenocortical H295R cells *in vitro*. We recently reported that bone morphogenetic protein (BMP)-6 enhances Ang II-induced aldosterone production in human adrenocortical cells. Ang II stimulation was blocked by an ARB, candesartan. Interestingly, the candesartan effects on Ang II-induced aldosterone synthesis was attenuated in a course of candesartan treatment for 15 d. The impairment of candesartan effects on Ang II-induced aldosterone production was also observed in Ang II- or candesartanpretreated cells. BMP-6 enhancement of Ang II-induced ERK1/2 signaling was resistant to candesartan. The BMP-6-induced Smad1, -5, and -8 phosphorylation was augmented in the presence of Ang II and candesartan in the chronic phase. Chronic Ang II exposure decreased cellular expression levels of BMP-6 and its receptors mRNAs. Cotreatment with candesartan reversed the inhibitory effects of Ang II on the expression levels of these mRNAs. The breakthrough phenomenon was attenuated by neutralization of endogenous BMP-6 and activin receptor-like kinase-2. Collectively, these data suggest that changes in BMP-6 availability and response may be involved in the occurrence of cellular escape from aldosterone suppression under chronic treatment with ARB.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

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 ・骨形成蛋白 ・シグナル伝達 ・ステロイド合成

1. 研究開始当初の背景

高血圧の治療戦略において Ang II 作用を抑制する RAS 阻害薬が重要な位置を占めてきた。さて「アルドステロンブレイクスルー」現象は、RAS 阻害薬であるアンジオテンシン変換酵素阻害薬：ACEI およびアンジオテンシン II (Ang II) タイプ 1 受容体拮抗薬：ARB の長期投与により、理論上抑制されるはずのアルドステロン (Aldo) の抑制効果が減弱し循環 Aldo レベルが再上昇する現象を示す。ブレイクスルーにより再上昇した Aldo は心腎血管障害などの臓器障害に寄与することが分かってきた。しかしその詳細なメカニズムは不明である。我々は最近、骨形成蛋白 BMP-6 が副腎皮質細胞の Aldo 合成においてアンジオテンシン II (Ang II) と協調作用をもつことを報告した。その観点から、特に副腎皮質に存在する Aldo 分泌調節因子の役割に着目して、アルドステロンブレイクスルーの分子機序の解明を目的とした以下の研究を企画した。

2. 研究の目的

「アルドステロンブレイクスルー」機序の解明を目的とし、副腎皮質におけるアルドステ

ロン合成を刺激する局所因子「骨形成蛋白；BMP-6」に着目して検討を行う。

3. 研究の方法

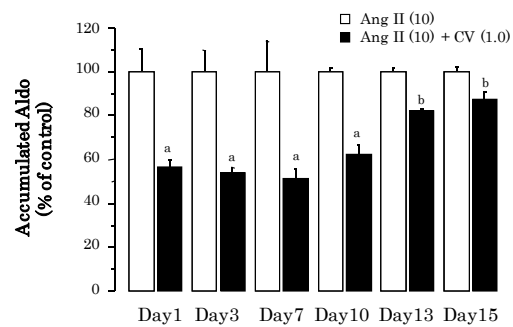
Aldo 産生能を有する副腎皮質細胞株である NCI-H295 細胞を用いて以下の検討をした。

- (1) Ang II 刺激下での ARB ; candesartan (CV) 長期投与における Aldo 合成の経時的な変化を検討
- (2) さらに単位時間での Aldo 分泌能を明らかにするために、24h 毎に conditioned medium を回収し、単位時間での Aldo 分泌量を決定し、Day 1 からの Aldo 蓄積量に対する変化との比較検討を行った。
- (3) ARB による副腎皮質細胞レベルでのブレイクスルーが観察された場合は、ARB 処理をした control 群、Ang II 群、Ang II + ARB 群より経時的に細胞から total RNA/protein を抽出し、発生前と後での AT1 受容体およびステロイド合成酵素 (StAR, P450scc, 3β-HSD, P450aldo) の発現レベルの変化を mRNA レベル/蛋白レベルで定量的 real-time PCR/Western blot によって確認する。
- ④ 加えて、BMP-6 シグナルの変化：BMP-6、BMP 受容体 (ALK-2, ALK-3, ActRII,

ActRIIB, BMPRII)、Smad1/5/8 の発現変化および Smad1/5/8 リン酸化シグナルの変調を検討する。⑤次いで、Ang II 刺激下での BMP-6 による Aldo 産生の増強作用に対する ARB の影響について、Ang II の細胞内シグナルである mitogen-activated protein kinase (MAPK) : ERK1/2, p38, SAPK/JNK の活性化の変化に着目して、特異的リン酸化抗体を用いた Immunofluorescence 法、Western blotting 法により検討し、Smad1/5/8 経路に特異的な Id1-, BRE-, Tlx2-luciferase を用いた reporter gene assay により BMP シグナル強度を定量的に評価する。⑥さらに、ブレイクスルー現象の発生機序に内因性の BMP-6 が関与する可能性を検討するために、内因性 BMP-6 作用を非侵襲的に阻害する実験を行う。長期の Ang II、Ang II+ARB 処理に BMP 受容体 (ALK-2、ALK-6、BMPRII) の extracellular domain (ECD) 及び BMP-6 中和抗体を添加し、control-IgG との Aldo 合成の比較を検討する。また、siRNA による BMP-6 および BMP-6 受容体の knock-down 効果についても検証する。

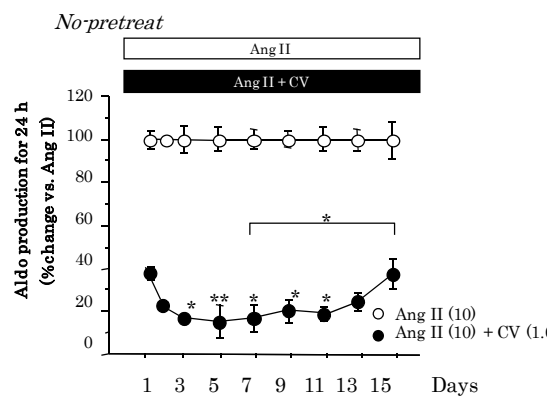
4. 研究成果

(1) H295R 細胞において AngII により刺激されたアルドステロン合成は CV により短期的 (培養 2-6 日目まで) には抑制されたが、その抑制効果は CV 添加 7 日目から減弱し始め 13-15 日目にはアルドステロン合成抑制効果は減弱し、副腎細胞レベルにおいて「アルドステロンブレイクスルー」現象を認めた (図 1)。



(2) さらに 24 時間毎に回収した medium 内の Aldo 濃度も同様に長期処理で抑制の解除を認めた (図 2)。

(図 2)

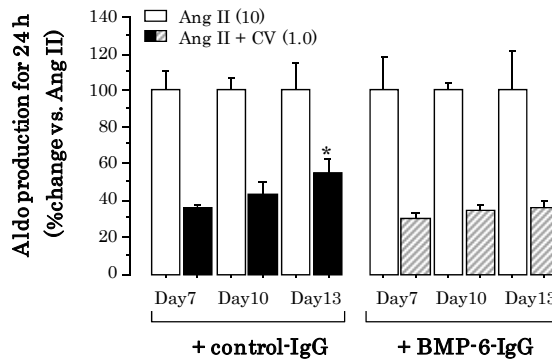
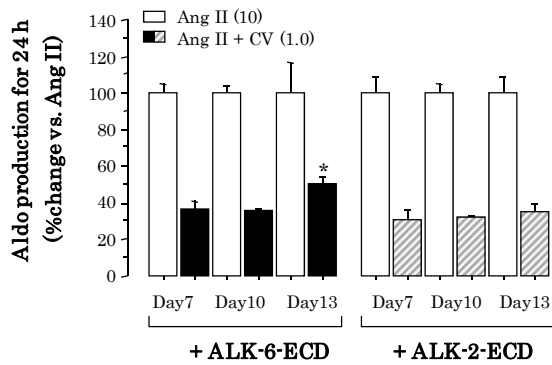


(3) CV は AngII による ERK1/2 の活性化を阻害した。一方で BMP-6 は細胞内シグナルである smad1/5/8 のリン酸化を刺激し、CV による AngII の ERK1/2 活性化阻害を減弱した。

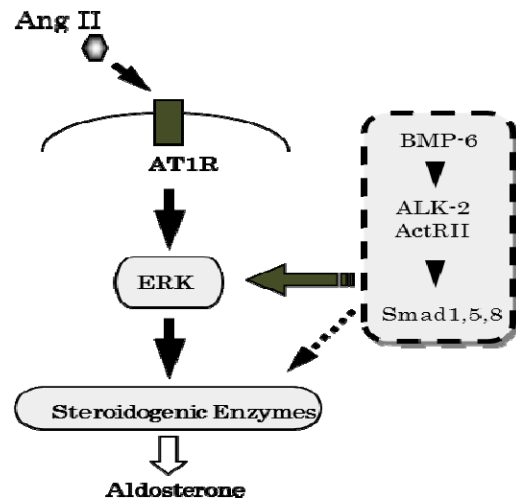
(4) AngII のみで 15 日間処理した細胞では BMP-6 mRNA の発現は減弱し、BMP 細胞シグナルである Smad のリン酸化は減弱を認めた。

(5) AngII のみで 15 日間処理した細胞では BMP-6 mRNA の発現は減弱し、BMP 細胞シグナルである Smad のリン酸化は減弱を認めたが、CV 処理によりその減弱は抑制された。また AngII 長期処理では BMP-6・BMP レセプターの mRNA 発現は抑制されたが CV 処理によりその抑制効果は減弱した。(6) 内因性の BMP 作用を阻害するため BMP I 型受容体細胞外ドメイン処理、

抗BMP中和抗体処理を行った。AngII+CV
15日処理において中和抗体、細胞外ドメイン
添加によりアルドステロンの再上昇反応が減
弱した。



以上の結果より、in vitroにおいても「アルドステロンブレイクスルー」を認め、AngII長期刺激により副腎皮質におけるBMP-6システムの抑制を認めた。ARB慢性投与では副腎皮質細胞において本来抑制されるべき「AngIIによるBMP-6システムの抑制」を解除することにより、アルドステロン産生抑制が減弱する可能性が示唆された。BMP-6の抑制をターゲットとした治療薬の開発が、高血圧臨床において重要な課題である「アルドステロンブレイクスルー」を抑制し、新たな高血圧治療の選択しとなり得る可能性も示唆される。今後はマウスなどの動物実験モデルでもアルドステロンブレイクスルー及びBMPシステムの関与の検討を行っていく必要があると考えられた。



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 4 件)

- ① Otani H, Otsuka F, Inagaki K, Suzuki J, Makino H. Roles of bone morphogenetic protein-6 in aldosterone regulation by adrenocortical cells. *Acta Medica Okayama*, 査読有, 2010, 64, 213-218.
- ② Miyoshi T, Suzuki J, et al. Functional relationship between fibroblast growth factor-8 and bone morphogenetic proteins in regulating steroidogenesis by rat granulosa cells. *Molecular and cellular endocrinology*, 査読有, 2010, 325, 84-92
- ③ Tsukamoto N, Suzuki J, et al. Effects of bone morphogenetic protein (BMP) on adrenocorticotropin production by pituitary corticotrope cells: Involvement of upregulation of BMP receptor signaling by somatostatin analogues. 査読有, 2010, 151, 1129-1141.
- ④ Goto J, Suzuki J, et al. Enhancement of aldosterone-induced catecholamine production by bone morphogenetic protein-4 through activating Rho and SAPK/JNK pathway in adrenomedullar cells. *Am. J. Physiol. Endocrinology & Metabolism*, 査読有, 2009, 296, 904-916

〔学会発表〕（計 2 件）

- ① Suzuki J, Otsuka F, et al. A role of bone morphogenetic proteins in aldosterone-induced glomerular injury, Endo 2010, 2010/6/21
- ② 鈴木二郎、他、アルドステロンによる腎系球体障害におけるBone Morphogenetic Proteinの役割、第 13 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会、2009/10/23

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 二郎 (SUZUKI JIROU)
岡山大学・岡山大学病院・医員
研究者番号：90452573