

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：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790534

研究課題名（和文） 中枢神経系における内因性ジギタリスを介した高血圧発症メカニズムの解明

研究課題名（英文） Study on the mechanism of hypertension via endogenous digitalis-like factor in central nervous system

研究代表者

吉賀 正亨（MASAMICHI YOSHIKA）

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：70434834

研究成果の概要（和文）：内因性ジギタリス（EDLF）が末梢組織だけでなく中枢神経系にも存在することが報告されている。特にウアバインは視床下部に存在し、脳内のレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系（RAAS）がその分泌の調節に関与することが報告されている。今回、視床下部不死化細胞を用いて、ウアバインとは異なるブファジエノライドの属すると思われる候補物質の分泌を認めた。さらにブファジエノライドに属するマリノブファゲニンとその関連物質であるマリノブフォトキシンの副腎からの分泌にアンジオテンシンが関与していることを明らかにした。中枢での新規の EDLF の存在の可能性と内因性ジギタリスの中枢、末梢組織の分泌において RASS が重要な役割をはたしていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Endogenous digitalis-like factor (EDLF) exist in the central nerve system as well as peripheral tissue. Ouabain is existed in hypothalamus and regulated by renin angiotensin aldosterone system (RAAS). A novel EDLF belonged to bufadienolide may be secreted from hypothalamus immortalized cell line. Moreover angiotensin should regulate to secret marinobufagenin and marinobufotoxin from adrenal gland.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：臨床検査医学，循環器内科学，高血圧

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・高血圧・生理活性物質・質量分析・脳・神経

1. 研究開始当初の背景

本態性高血圧の成因の1つに内因性ジギタリス様物質(EDLF)がナトリウムポンプ活性を抑制することでカルシウムイオン濃度を上昇させ血管平滑筋を収縮させ、脳内では交感神経活性を亢進させることで血圧を上昇させると考えられている。EDLFは主に副腎で

分泌されているが、中枢神経系、特に視床下部、下垂体にも EDLF が存在することが確認されている。EDLF の候補物質の中で bufadienolide であるマリノブファゲニン (MBG) が従来研究されてきたウアバイン (OUA) より、ナトリウム代謝や血圧上昇に強く関与していると考えられている。我々は

世界で初めて MBG 関連物質であるマリノブフォトキシン (MBT) がヒトにも存在し, MBT が昇圧作用を有することを確認している. さらに脳内のウアバイン (OUA) は髄液中のナトリウムイオン濃度, 脳内レニン・アンジオテンシン系 (RAAS) やミネラルコルチコイド受容体 (MR) を介して分泌が調節を受けていることが報告されている. しかし MBT を含め bufadienolide の中枢分泌機構や末梢組織との関連についてはまったく解明されていない.

2. 研究の目的

- (1) 視床下部培養細胞, 下垂体培養細胞や自然発症高血圧ラットを用いるウアバインだけでなく MBT の中枢での分泌機構を解明し RAAS, MR との関係の解明を行う
- (2) EDLF の末梢の分泌組織である副腎での EDLF 分泌との関連性を検討する.
- (3) 中枢での OUA の分泌調節因子の解明を検討する.

3. 研究の方法

(1) ①現在市販されているマウス視床下部の不死化細胞株である N1 細胞を用いる. 細胞を無血清培地に変更し, 細胞上清を, 30 分, 1 時間, 3 時間, 6 時間, 24 時間後に細胞上清を回収し, ELISA を用い MBG 様免疫活性物質 (MBGi) を測定する.

(1) ②さらにその中心物質を HPLC を用いて溶出時間ごとの分画にわけ, MBT, MBG の溶出位置を ELISA で測定し各ピークを測定する MBT, MBG を測定する. さらに LC/MS を用い定性的にも MBG, MBT の存在を確認する.

(2) ラットを用いた実験でアンジオテンシン II (Ang II) が副腎での EDLF の分泌調節因子となっていることは我々をはじめ確認されている. そこで副腎皮質での bufadienolide の分泌調節における Ang II の関与を副腎皮質の不死化細胞株である Y-1 細胞を用いて, 細胞上清中の Ang II および Ang II 受容体拮抗剤であるオルメサルタンまたは PD123319 を加え細胞上清中の MBG i を測定した.

(3) 副腎髄質での MBG, MBT の分泌を副腎髄質の不死化細胞株である PC12 細胞を用いて, 前述と同じ方法で検討する.

(4) N1 を用いて, OUA の分泌調節に Ang II が関与するかを検討する.

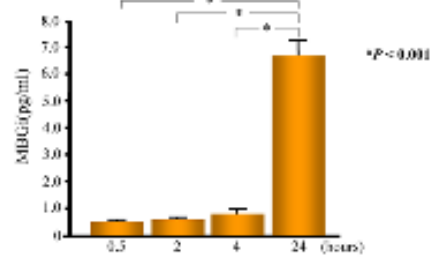
(5) 免疫染色を用いて下垂体にもウアバインの存在がすでに確認されているが, その分泌を培養細胞での検討は報告されていない. 下垂体の不死化細胞である GH3 細胞を用いて, 細胞上清を, 30 分, 1 時間, 3 時間, 6 時

間, 24 時間後に細胞上清を回収し, ELISA を用いウアバイン様免疫活性物質 (OLF) を測定する. さらに HPLC を用い溶出時間ごとの分画にわけその中心物質か確認する.

4. 研究成果

(1) ①N1 細胞から ELISA を用い MBG 様免疫活性物質 (MBGi) の分泌を確認した.

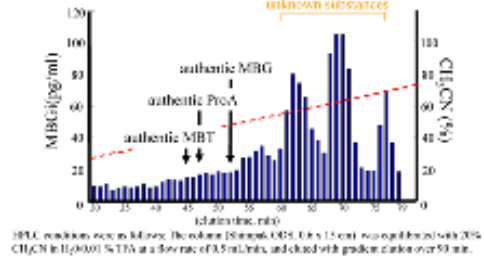
【 MBGi in N1 supernatant 】



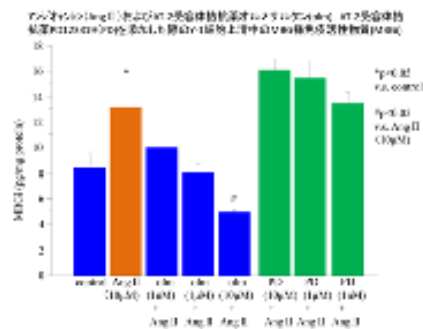
②しかし ELISA, HPLC を用いた検討から, MBGi の中心物質は MBG, MBT, proscillaridin A と異なる溶出位置にピークをみとめた.

このことから新規の MBG 関連物質が視床下部から分泌されている可能性が示唆された. ひきつづき我々はこの物質の分離精製をすすめている.

【 MBGi of each HPLC fractions 】



(2) N1 細胞において Ang II が bufadienolide の分泌増強因子になっていることが確認された, さらにその分泌はオルメサルタンでは抑制されたが PD123319 では抑制されなかったことから, Ang II type 1 受容体が関与を明らかにした.



(3) PC12細胞から MBGi の分泌が確認された。さらに HPLC を用いて、その中心物質が MBT であることを明らかにした。

Fig. 1.

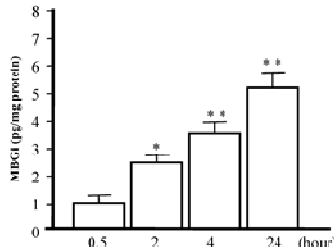


Fig. 2.

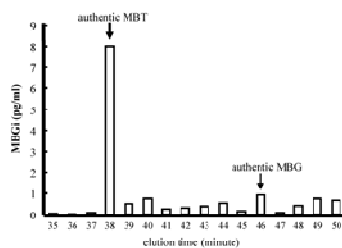


Fig. 3.

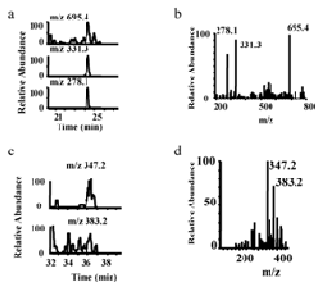
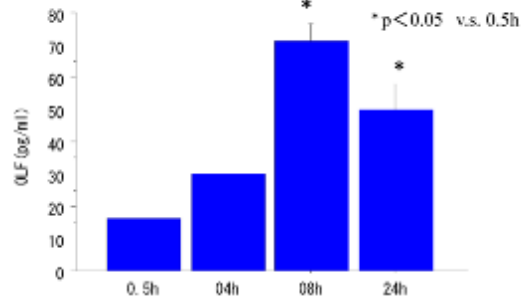


Fig1. 細胞上清中の MBGi の変化 Fig2. 細胞上清の HPLC による分画ごとの MBGi Fig3. a), b) 細胞上清中の MBT の質量分析パターン c), d)細胞上清中の MBG の質量分析パターン

(4) N1細胞に Ang II を添加したところウアバインの分泌の増加を確認したことから、Ang II が視床下部におけるウアバインの分泌増強因子となっていることが確認された。

(5) GH3 細胞からウアバイン様免疫活性物質 (OLF) の分泌を認めた。さらに HPLC を用いその中心物質の検討をおこなったところウアバインであることを明らかにした。このことから、下垂体からもウアバインが分泌されていることをモデル細胞を用いて明らかにした。

GH3細胞上清中のウアバイン様物質の増加



このように、末梢組織だけでなく、中枢神経系にも存在する EDLF において、新規の候補物質の検索と、産生分泌組織の検討をおこない RAAS との関係さまざまな組織のモデル細胞でおこなった。本検討の結果は、いまだ十分解明されていない EDLF の産生・分泌メカニズムの解明と、中枢および末梢組織での EDLF を介した高血圧発症メカニズムの解明への足掛かりとなる成果である。

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 5 件)

- ① Yoshika M, Komiyama Y, Takahashi H. An ouabain-like factor is secreted from immortalized hypothalamic cells in an aldosterone-dependent manner. *Neurochem Int.* **59**:104-8. 2011 (査読有)
- ② Takahashi H, Yoshika M, Komiyama Y, Nishimura M. 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 (査読有)
- ③ Yoshika M, Komiyama Y, Takahashi

H. Isolation of marinobufotoxin from the supernatant of cultured PC12 cells. Clin Exp Pharmacol Physiol. **38**: 334-7. 2011 (査読有)

- ④ Kamimura D, Ohtani T, Sakata Y, Komiyama Y, Yoshika M, Takahashi H, Komuro I, Yamamoto K. et al. Ca²⁺ entry mode of Na⁺/Ca²⁺ exchanger as a new therapeutic target for heart failure with preserved ejection fraction. Eur Heart J. 2011. [Epub ahead of print] (査読有)
- 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 (査読無)

[学会発表] (計7件)

- ① 吉賀正亨, 小宮山豊, 高橋伯夫 視床下部由来細胞株を用いた内因性ジギタリス様物質であるウアバイン分泌に関する検討 第9回腎と高血圧 Update 2011年12月3日 東京
- ② 吉賀正亨, 小宮山豊, 高橋伯夫 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総会 2011年11月26日 大阪
- ③ 吉賀正亨, 小宮山豊, 高橋伯夫 高血圧発症機序における内因性ジギタリスの臨床検査学的研究 第58回日本臨床検査医学会学術集会 2011年11月18日 岡山
- ④ 吉賀正亨, 小宮山豊, 高橋伯夫 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回日本臨床化学会年次学術集会 2011年8月27日 札幌

- ⑤ 吉賀正亨, 小宮山豊, 高橋伯夫 中枢神経系における内因性ジギタリス様物質である Ouabain 分泌に関する検討 第33回日本高血圧学会総会 2010年10月15日 福岡
- ⑥ Masamichi Yoshika, Yutaka Komiyama, Hakuo Takahashi EVIDENCE FOR A MARINOBUFAGENIN-LIKE IMMUNOREACTIVITY IN CENTRAL NERVOUS SYSTEM 14th International SHR Symposium Montreal, Canada 2010年9月24日
- ⑦ 吉賀正亨, 小宮山豊, 高橋伯夫 高血圧発症機序における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10日 東京

[その他]

ホームページ等

<http://research.kmu.ac.jp/kmuhp/KgApp?kyoinId=ygdgbe>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉賀 正亨 (YOSHIKA MASAMICHI)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：70434834

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：