

平成30年5月31日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09420

研究課題名(和文) レチノイドX受容体活性化によるCYP11B2抑制を標的にした新規降圧療法の開発

研究課題名(英文) Innovation of novel therapeutics against hypertension targeting CYP11B2 by RXR activation

研究代表者

箱田 明子 (Hakoda, Akiko)

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：70509398

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：PA024はAll誘導性CYP11B2 mRNA発現・転写活性、ならびにアルドステロン分泌を抑制した。またPA024投与により、NGF1B・Nurr1のmRNA発現低下も認められた。Deletion mutantsを用いた解析では、-1521から-106の領域にかけてPA024による転写抑制が認められた。Nurr1過剰発現によりCYP11B2転写抑制はレスキューされた。内因性RXR のノックダウンはPA024によるCYP11B2、Nurr1 mRNA発現抑制を回復し、RXR 過剰発現はPA024によるCYP11B2転写抑制を増強した。さらPA024はTHMの収縮期・拡張期血圧を有意に抑制した。

研究成果の概要(英文)：PA024 dose-dependently suppressed All-induced CYP11B2 mRNA expression/promoter activity. Additionally, high-dose PA024 significantly decreased aldosterone secretion. The suppression of CYP11B2 promoter activity by PA024 was observed in the deletion mutants analyses using the region from -1521 (full length) to -135 including NBRE-1, Ad4, and Ad5 elements. PA024 also suppressed mRNA expression of transcription factors Nurr1 and NGF1B in a dose-dependent manner. Since PA024-mediated suppression of CYP11B2 promoter activity was rescued by Nurr1 overexpression, decrease of Nurr1 expression may contribute to the suppression. PA024 also inhibited mRNA expression of StAR, HSD3<sup>2</sup>, and CYP21A2. Therefore, PA024-mediated suppression of these enzymes may also be involved in the inhibition of aldosterone synthesis. Furthermore, PA024 significantly lowered systemic blood pressure in THM.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：アルドステロン 高血圧 レチノイド RXR CYP11B2

#### 1. 研究開始当初の背景

本邦における高血圧患者は現在約 4,000 万人と推定されるが、そのうち血圧が良好にコントロールされているのは 1,000 万人で、他の 3,000 万人は治療抵抗性高血圧を含むコントロール不良群と考えられている。副腎から分泌されるアルドステロンは昇圧に関する最も重要なホルモンの一つであるが、アンジオテンシン変換酵素阻害剤やアンジオテンシン II (AII) 受容体拮抗薬 (ARB) 等で十分な降圧効果を得られない例も多く、新規治療法が望まれる。

#### 2. 研究の目的

本研究ではレチノイドとアルドステロン合成酵素 CYP11B2 遺伝子の関連性に着目し、レチノイド X 受容体 (RXR) アゴニスト PA024 による CYP11B2 遺伝子発現およびアルドステロン分泌に及ぼす影響の検討、またその分子機構の解明を図り、新たな高血圧治療薬につなげることを目的とする。

#### 3. 研究の方法

AII および種々の濃度の PA024 をヒト副腎皮質癌由来 H295R 細胞に添加した。CYP11B2 mRNA 発現は定量 PCR にて、CYP11B2 プロモーター活性はルシフェラーゼアッセイにて、アルドステロン分泌は EIA にて、蛋白質発現はウエスタンブロッティングにて、細胞増殖は WST-8 アッセイにて、細胞アポトーシスはホモジニアスカスパーゼアッセイにてそれぞれ解析した。また過剰な AII を産生し、慢性的な高血圧を示すつくば高血圧マウス (THM, hRN8-12 × hAG2-5) に PA024 の腹腔内投与を行い in vivo での影響を検討した。

#### 4. 研究成果

PA024 は AII 誘導性の CYP11B2 mRNA 発現、プロモーター活性およびアルドステロン分泌を有意に抑制した。CYP11B2 プロモーターにおける AII 誘導性遺伝子発現には NBRE-1、Ad5、Ad1/CRE の 3 つの重要な cis-elements が存在し各々の転写調節因子が結合する。CYP11B2 5'-flanking region deletion mutants を用いた解析では NBRE-1、Ad5 配列を含む -1521 (全長) から -106 の領域にかけて PA024 による転写抑制が認められ、point mutants を用いた解析では Ad5 配列の変異により PA024 による CYP11B2 プロモーター活性抑制効果が消失した。また PA024 投与により Ad5 配列結合転写因子である NGFIB および NURR1 の mRNA 発現低下も認められ、NURR1 過剰発現により PA024 による CYP11B2 プロモーター活性抑制効果が解除されたことから、Ad5 配列に結合する NURR1 の減少が CYP11B2 転写活性の抑制に関与している可能性が考えられた。一方で PA024 は細胞増殖能、アポトーシスおよび細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度には影響

を及ぼさなかった。PA024 は AII の作用を介して、アルドステロン合成経路に関わる StAR、HSD3B2、CYP21A2 の mRNA 発現も抑制した。siRNA による内因性 RXRα のノックダウンは PA024 による CYP11B2、NURR1 mRNA 発現抑制効果を回復し、RXRα 過剰発現は PA024 による CYP11B2 mRNA 発現およびプロモーター活性抑制効果を増強したことから PA024 による CYP11B2 転写への負の調節が RXRα を介して行われていることが示唆された。In vivo において PA024 は THM の収縮期および拡張期血圧を有意に抑制した。

#### 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 12 件)

1. Parvin R, Noro E, Saito-Hakoda A, Shimada H, Suzuki S, Shimizu K, Miyachi H, Yokoyama A, Sugawara A. Inhibitory Effects of a novel PPAR-γ agonist MEKT1 on Pomc expression/ACTH secretion in AtT20 cells. PPAR Res. 2018; 2018: Article ID 5346272. doi.org/10.1155/2018/5346272. (査読有)

2. Matsuzawa T, Yoshikawa T, Iida T, Kárpáti A, Kitano H, Harada R, Nakamura T, Sugawara A, Yamaguchi Y, Yanai K. Heparan sulfate in pancreatic β-cells contributes to normal glucose homeostasis by regulating insulin secretion. Biochem Biophys Res Commun. 2018 May 15;499(3):688-695. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.03.213. Epub 2018 Apr 3. (査読有)

3. Aoki S, Saito-Hakoda A, Yoshikawa T, Shimizu K, Kisu K, Suzuki S, Takagi K, Mizumoto S, Yamada S, van Kuppevelt TH, Yokoyama A, Matsusaka T, Sato H, Ito S, Sugawara A. The reduction of heparan sulphate in the glomerular basement membrane does not augment urinary albumin excretion. Nephrol Dial Transplant. 2018; 33: 26-33. doi: 10.1093/ndt/gfx218. (査読有)

4. Yokoyama A, Katsura S, Sugawara A. Biochemical analysis of histone succinylation. Biochem Res Int. 2017; 2017: 8529404. (査読有)

5. Suzuki D, Saito-Hakoda A, Ito R, Shimizu K, Parvin R, Shimada H, Noro E, Suzuki S, Fujiwara I, Kagechika H, Rainey WE, Kure S, Ito S, Yokoyama A, Sugawara A. Suppressive effects of RXR agonist PA024 on adrenal CYP11B2 expression, aldosterone secretion and blood pressure. PLoS One. 2017; 12: e0181055. doi: 10.1371/journal.pone.0181055. eCollection

2017. (査読有)

6. Shimada H, Kogure N, Noro E, Kudo M, Sugawara K, Sato I, Shimizu K, Kobayashi M, Suzuki D, Parvin R, Saito-Ito T, Uruno A, Saito-Hakoda A, Rainey WE, Ito S, Yokoyama A, Sugawara A. High glucose stimulates expression of aldosterone synthase (CYP11B2) and secretion of aldosterone in human adrenal cells. *FEBS Open Bio*. 2017; 7: 1410-1421. doi: 10.1002/2211-5463.12277. eCollection 2017 Sep. (査読有)

7. Parvin R, Saito-Hakoda A, Suzuki S, Noro E, Shimada H, Yokoyama A, Sugawara A. Effects of retinoids on vasculatures. *J Endocrinol Thyroid Res*. 2017; 2: 555587. DOI: 10.19080/JETR.2017.02.555587. (査読有)

8. Ito R, Sato I, Tsujita T, Yokoyama A, Sugawara A. A ubiquitin-proteasome inhibitor bortezomib suppresses the expression of CYP11B2, a key enzyme of aldosterone synthesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017; 489: 21-28. (査読有)

9 Parvin R, Saito-Hakoda A, Shimada H, Shimizu K, Noro E, Iwasaki Y, Fujiwara K, Yokoyama A, Sugawara A. Role of NeuroD1 on the negative regulation of Pomc expression by glucocorticoid. *PLoS One*. 2017; 12: e0175435. doi: 10.1371/journal.pone.0175435. eCollection 2017. (査読有)

10. Ito R, Shimada H, Yazawa K, Sato I, Imai Y, Sugawara A, Yokoyama A. Hydroxylation of methylated DNA by TET1 in chondrocyte differentiation of C3H10T1/2 cells. *Biochem Biophys Rep*. 2016; 5: 134-140. (査読有)

11. 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. (査読有)

12. Nakamura T, Yoshikawa T, Naganuma F, Mohsen A, Iida T, Miura Y, Sugawara A, Yanai K. Role of histamine H3 receptor in glucagon-secreting  $\alpha$ TC1.6 cells. *FEBS Open Bio*. 2015; 5: 36-41. (査読有)

[学会発表](計 11件)

1. Parvin R, Saito-Hakoda A, Shimada H, Noro E, Suzuki S, Miyachi H, Yokoyama A, Sugawara A. MEKT1, a novel PPAR-gamma agonist, significantly suppressed Pomc expression/ACTH secretion in AtT20 cells. ENDO2018,

2018/3/17, Chicago

2. Yokoyama A, Noro E, Kobayashi M, Shimizu K, Shimada H, Suzuki S, Shima H, Igarashi K, Sugawara A. Identification of novel AR coregulators via endogenous purification. ENDO2018, 2018/3/17, Chicago

3. Shimada H, Noro E, Sato I, Suzuki S, Parvin R, Sakamoto J, Yokoyama A, Sugawara A. Angiotensin II causes synergistic effects for the ligand activation of farnesoid X receptor (FXR). ENDO2018, 2018/3/17, Chicago

4. Noro E, Yokoyama A, Kogure N, Momma R, Shimizu K, Parvin R, Suzuki S, Shimada H, Shima H, Igarashi K, Sugawara A. Involvement of IKK complex in the regulation of a glucose-responsive transcriptional factor ChREBP in pancreatic  $\beta$ -cell. ENDO2018, 2018/3/17, Chicago

5. レハナ・パービン、箱田明子、島田洋樹、清水恭子、野呂英理香、岩崎泰正、横山 敦、菅原 明。グルココルチコイドによる Pomc 遺伝子転写抑制における転写因子 NeuroD1 の作用。第 27 回日本間脳下垂体腫瘍学会、2017 年 2 月 24 日、東京

6. Suzuki S, Noro E, Aoki S, Parvin R, Shimada H, Yokoyama A, Sugawara A. Possible Involvement of ChREBP in the Progression of Diabetic Kidney Disease in the Renal Tubules. ISN Frontiers Meetings 2018, 2018/2/23, Tokyo

7. 鈴木 大、箱田明子、伊藤 亮、清水恭子、小暮直敬、青木 聡、影近弘之、呉 繁夫、伊藤真嘉、横山 敦、菅原 明。レチノイド X 受容体 (RXR) アゴニスト PA024 が副腎 CYP11B2 発現、アルドステロン分泌ならびに血圧に及ぼす影響。第 39 回日本高血圧学会総会、2016 年 10 月 1 日、仙台

8. Suzuki D, Saito-Hakoda A, Ito R, Shimizu K, Kogure N, Kagechika H, Kure S, Yokoyama A, Sugawara A. Suppression of adrenal CYP11B2 expression, aldosterone secretion, and blood pressure by retinoid X receptor (RXR) pan-agonist PA024. The 9th International Aldosterone Forum in Japan, 2018/5/28, Tokyo

9. Suzuki D, Saito-Hakoda A, Ito R, Shimizu K, Kogure N, Kagechika H, Kure S, Yokoyama A, Sugawara A. Inhibitory effects of retinoid X receptor pan-agonist PA024 on adrenal CYP11B2 expression and aldosterone secretion. ENDO2016, 2016/4/1~4, Boston

10. Suzuki D, Saito-Hakoda A, Ito R, Shimizu K, Kogure N, Kagechika H, Kure S, Yokoyama A, Sugawara A. Suppressive effects of retinoid X receptor (RXR) agonist PA024 on adrenal CYP11B2 expression,

aldosterone secretion, and blood pressure.  
41st International Aldosterone Conference,  
2016/3/30~30, Boston

11. 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、藤原幾磨、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、東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

[www.med.tohoku.ac.jp/about/laboratory/189.html](http://www.med.tohoku.ac.jp/about/laboratory/189.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

箱田 明子 (HAKODA, Akiko)

東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講  
師

研究者番号：70509398

### (2) 研究分担者

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

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )