

令和元年6月14日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03252

研究課題名(和文) 脂肪細胞由来の未知の液性昇圧因子を標的とした肥満高血圧の新規診断・治療法の開発

研究課題名(英文) The identification of undetermined adipocyte-derived factor(s) that stimulate aldosterone synthase gene (CYP11B2) expression

研究代表者

菅原 明 (Sugawara, Akira)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：90270834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 6,300,000円

研究成果の概要(和文)：肥満高血圧の制御は、国民の健康寿命延伸・医療費削減の両面から喫緊の課題である。近年、脂肪細胞由来の未知の液性昇圧因子が副腎に作用することによりアルドステロン合成酵素(CYP11B2)発現を亢進させ、肥満高血圧症の原因となっている可能性が示唆されている。同因子の単離・同定のために、まず、ヒト副腎H295R細胞にマウス脂肪細胞より取得した培養上清を添加し、CYP11B2の発現誘導を指標に分子量による分画を行った。得られたCYP11B2発現誘導能を有する画分を質量分析装置にて解析することにより液性因子の同定を行った結果、著明にCYP11B2の発現を誘導する新規の昇圧因子"X"が同定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満患者における高血圧の制御は、国民の健康寿命延伸・医療費削減の両面から喫緊の課題である。本研究課題の遂行により新規昇圧因子"X"が得られたが、今後は本因子を基盤とした肥満高血圧の新規診断・治療法の開発を進める。これらの遂行により、肥満高血圧に起因する心血管イベントの発症を二次的に抑制することが可能となり、患者さんへの福音となるとともに、本邦の医療費抑制にも大きく貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Obese patients are well known to be highly complicated with hypertension. Recently, "undetermined" adipocyte-derived factor(s) have been recognized as one of the causes of the obesity-related hypertension independent of angiotensin II. In the present study, we aim to identify the undetermined adipocyte-derived factor(s) that stimulate aldosterone synthase gene (CYP11B2) expression and aldosterone secretion that may induce hypertension. We first differentiated mouse fibroblast 3T3-L1 cells into adipocytes, and collected their supernatants. The supernatants were then incubated with human adrenocortical carcinoma H295R cells, and their ability to stimulate CYP11B2 mRNA expression was indicated. Thereafter, the supernatants were fractionated by ultrafiltration to obtain active fractions that stimulate CYP11B2 expression, and proteins included in the fractions were analyzed by LC-MS/MS. We finally obtained factor "X" which was demonstrated to stimulate CYP11B2 expression significantly.

研究分野：内分泌・代謝学

キーワード：アルドステロン 肥満 高血圧 脂肪細胞 CYP11B2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

メタボリック症候群・肥満患者における高血圧の制御は、国民の健康寿命延伸・医療費削減の両面から喫緊の課題である。とりわけ、肥満と高血圧には密接な関連性が示唆されており、近年、脂肪細胞由来の未知の液性昇圧因子が直接副腎に作用することによりアンジオテンシン II とは独立して CYP11B2 発現・アルドステロン分泌を亢進させ、治療抵抗性を示す肥満高血圧の病因となっている可能性が非常に高いと考えられることから、同因子を早急に単離・同定し、それらを基盤とした肥満高血圧の新規診断・治療法を確立することは、国民の健康福利・医療経済の両面から急務である。

### 2. 研究の目的

本脂肪細胞由来液性因子の同定・構造決定を行い、肥満により増加する脂肪細胞と高血圧を関連付ける因子の同定を通して、肥満高血圧の発症の分子メカニズムを解明する。また、同因子をターゲットとした肥満高血圧の新規診断・治療法を開発する。

### 3. 研究の方法

マウス線維芽細胞由来 3T3-L1 細胞を脂肪細胞に分化させ、脂肪細胞の培養上清を取得する。取得した上清は、ヒト副腎癌由来 H295R 細胞を用いたスクリーニング系により CYP11B2 mRNA 発現量を測定する。CYP11B2 発現亢進が確認された上清は分画を行い、LC-MS/MS 法により副腎 CYP11B2 発現誘導因子の同定を行った。加えて、LC-MS/MS 法により同定された副腎 CYP11B2 発現誘導候補因子の cDNA を単離し、過剰発現ベクターを作成する。その後、HEK293T 細胞を用いて副腎 CYP11B2 発現誘導候補因子を過剰発現させる系を構築する。HEK293T に過剰発現させた後、その上清を H295R 細胞に添加し CYP11B2 mRNA 発現量を測定することで、真の CYP11B2 発現誘導因子の同定を行った。

### 4. 研究成果

脂肪細胞培養上清中に CYP11B2 発現誘導因子の存在が示唆された。分子量による分画及び、H295R 細胞を用いたスクリーニング系により、分子量 100kDa 以下の画分に CYP11B2 発現誘導能を見出した。CYP11B2 発現誘導能は 50kDa 以下の画分には認められなかったことから、CYP11B2 発現誘導因子は分子量 50kDa 以上 100kDa 以下の因子である可能性が示唆された。また、分子量 100kDa 以下の画分中に含まれている CYP11B2 転写誘導能を持つ候補因子を LC-MS/MS 法により同定した。その結果、52 種の候補因子を得た。さらにシグナルペプチドを有すると推測される 12 種の候補因子に絞り込んだ。それぞれの因子に関して cDNA を単離した後に pEF1-Myc-His 発現ベクターに組み込んで HEK293T 細胞にトランスフェクションし、得られた上清を H295R 細胞に添加したところ、一因子 (X 因子) のみで CYP11B2 発現の著明な発現誘導が認められた (図 1, 2)。今後、X 因子の更なる機能解析を進めるとともに、X 因子をターゲットとした肥満高血圧の新規診断・治療法の開発を進める予定である。

図 1

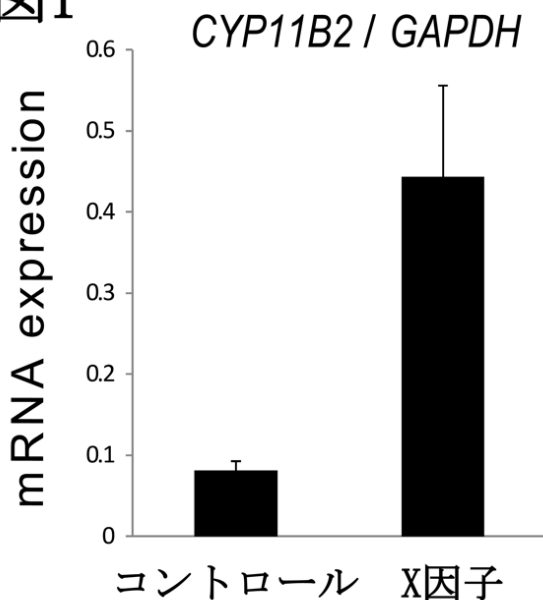
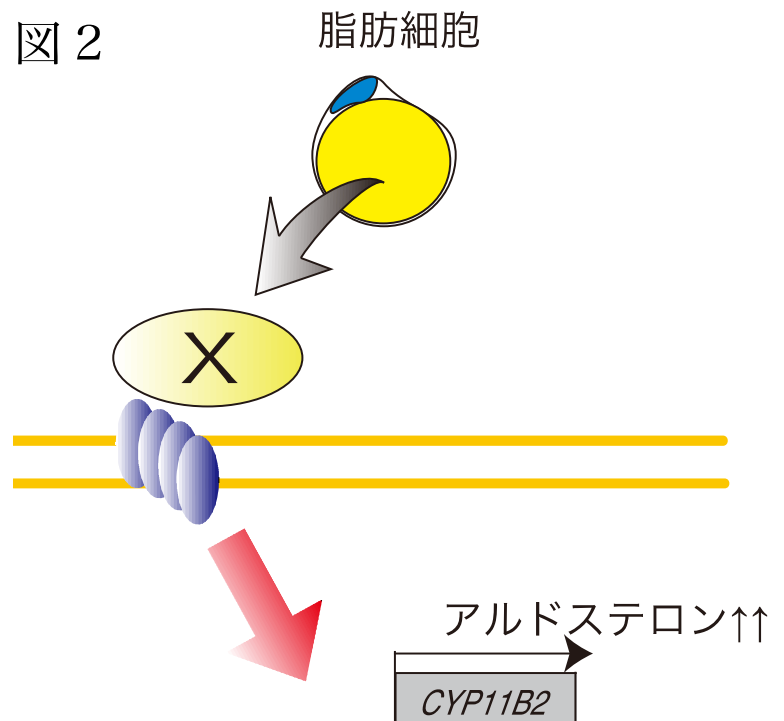


図 2



## 5 . 主な発表論文等

### [雑誌論文](計 9 件)(査読あり)

- Shimada H, Noro E, Suzuki S, Sakamoto J, Sato I, Parvin R, Yokoyama A, Sugawara A. Effects of adipocyte-derived factor(s) on the adrenal cortex. *Curr Mol Pharmacol*. 2019 (in press)
- Shimada H, Yokoyama A, Sato I, Sakamoto J, Noro E, Suzuki S, Kudo M, Sugawara A. Angiotensin II causes synergistic effects on the ligand activation of farnesoid X receptor through serine phosphorylation. *Int J Mol Sci*. 2019 (in press)
- Noro E, Yokoyama A, Kobayashi M, Shimada H, Suzuki S, Hosokawa M, Takehara T, Parvin R, Shima H, Igarashi K, Sugawara A. Endogenous purification of NR4A2 (Nurr1) identified Poly(ADP-ribose) polymerase 1 as a prime coregulator in human adrenocortical H295R cells. *Int J Mol Sci*. 2018; 19. pii: E1406. doi: 10.3390/ijms19051406.
- 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- $\gamma$  agonist MEKT1 on Pomc expression/ACTH secretion in AtT20 cells. *PPAR Res*. 2018; 2018: 5346272. doi: 10.1155/2018/5346272. eCollection 2018.
- 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.
- Yokoyama A, Katsura S, Sugawara A. Biochemical analysis of histone succinylation. *Biochem Res Int*. 2017; 2017: 8529404. doi: 10.1155/2017/8529404. Epub 2017 Nov 1.
- 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.
- 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.
- 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. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.05.109. Epub 2017 May 19.

### [学会発表](計 8 件)

- Sakamoto J, Shimada H, Yokoyama A, Sugawara A. An approach to identify the undetermined adipocyte-derived factor(s) that stimulate aldosterone synthase gene (CYP11B2) expression. 2019年5月11日、ISARSH2019、仙台
- Shimada H, Sato I, Sakamoto J, Yokoyama A, Sugawara A. Angiotensin II causes synergistic effects for the ligand activation of farnesoid X receptor (FXR). 2019年5月11日、ISARSH2019、仙台
- Hoshi K, Ito R, Sato I, Sakamoto J, Shimada H, Yokoyama A, Sugawara A. High-throughput screening of novel therapeutics against primary aldosteronism. 2019年5月11日、ISARSH2019、仙台
- 星 啓太、伊藤 亮、佐藤郁子、坂本 純、島田洋樹、横山 敦、菅原 明。CYP11B2 を標的とした原発性アルドステロン症の新規創薬の試み。2019年5月11日、第92回日本内分泌学会学術総会、仙台
- 菅原 明。2019年5月10日、第92回日本内分泌学会学術総会 教育講演 35、仙台
- Shimada H, Sato I, Sakamoto J, Yokoyama A, Sugawara A. An approach to identify the undetermined adipocyte-derived factor(s) that stimulate aldosterone synthase gene (CYP11B2) expression. 2019年5月10日、第92回日本内分泌学会学術総会 日韓内分泌学会特別口演セッション、仙台
- 島田洋樹、野呂英理香、佐藤郁子、鈴木 歩、坂本 純、横山 敦、菅原 明。アンジオテンシン II は FXR のリガンド活性化と相乗的な効果をもたらす。2018年4月28日、第91回日本内分泌学会学術総会、宮崎
- 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). (Poster) END02018, 2018/3/17, Chicago

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称：アルドステロン合成酵素発現阻害剤

発明者：菅原明、伊藤亮

権利者：国立大学法人東北大学

種類：特許

番号：特願 2017-064702

出願年：2017年

国内外の別：国内

取得状況(計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

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)研究分担者 なし

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：横山 敦

ローマ字氏名：(YOKOYAMA, atushi)

研究協力者氏名：工藤 正孝

ローマ字氏名：(KUDO, masataka)

研究協力者氏名：土井 隆行

ローマ字氏名：(DOI, takayuki)

研究協力者氏名：伊藤 亮

ローマ字氏名：(ITO, ryo)

研究協力者氏名：島田 洋樹

ローマ字氏名：(SHIMADA, hiroki)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。