

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
研究期間：2007～2008  
課題番号：19591085  
研究課題名（和文） 酸化ストレスによるミネラルコルチコイド受容体の SUMO 化とアルドステロン作用調節  
研究課題名（英文） Sumoylation of mineralocorticoid receptor and regulation of aldosterone action by oxidative stress  
研究代表者  
柴田 洋孝 (SHIBATA HIROTAKA)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号：20245484

## 研究成果の概要：

アルドステロンは、ミネラルコルチコイド受容体(MR)を介して血液中のナトリウムやカリウムの調節をする。食塩摂取量が過剰になると血管周囲に炎症をおこして脳卒中、心筋梗塞などの心血管疾患を惹起する。本研究の結果、MR の脱 SUMO 化修飾によりアルドステロン感受性が数倍に亢進させることが示されたことから、MR の脱 SUMO 化は血中アルドステロン濃度が正常であっても、高血圧や心血管疾患のリスクを高めることが示唆された。

## 交付額

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
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・内分泌学

キーワード：アルドステロン、ミネラルコルチコイド受容体、SUMO 化

## 1. 研究開始当初の背景

原発性アルドステロン症では、アルドステロンの自律的な過剰分泌により、脳卒中、心筋梗塞などの心血管疾患の頻度が高い。一方、治療抵抗性高血圧、睡眠時無呼吸症候群、肥満などの一部では、アルドステロンが正常範囲でも、ミネラルコルチコイド受容体(MR)拮抗薬により血圧のコントロールが著明に改善することが示されており、MR の蛋白修飾によるアルドステロンの感受性亢進が示唆される。本研究では、MR の SUMO 化、脱 SUMO 化に着目してホルモン作用との関連について検討した。

## 2. 研究の目的

アルドステロンは、核内受容体ミネラルコルチコイド受容体(MR, NR3C2)を介して作用する。MR は、N 末端に AF-1、C 末端に AF-2 の2種類の転写活性化部位を有し、ホルモンが結合すると、AF-2 にリガンド依存性に多様なコアクチベーターが動員されて作用が発現する。MR は Ubc9、PIAS1 による SUMO 化修飾を受け、SEN1P1 による脱 SUMO 化修飾を受ける。しかし、MR の SUMO 化・脱 SUMO 化によるアルドステロン作用調節については詳細は不明である。そこで、SUMO 化部位を段階的に変異させたプラスミドを作成し、レポーターアッセイによりアルドステロ

ン作用に対する影響を検討した。さらに、安定発現細胞株を用いて、内因性 MR 標的遺伝子の発現を検討した。また、MR の脱 SUMO 化を誘導する刺激をスクリーニングし、アルドステロン自体が MR の脱 SUMO 化を誘導することが示された。

### 3. 研究の方法

レポーターアッセイ、Western blot、real time RT-PCR 法などは既報の方法で行った。

### 4. 研究成果

#### (1) MR の脱 SUMO 化(desumoylation)と MR 転写活性化

外因性に野生型および SUMO 化モチーフ4箇所のリジン残基をすべてアルギニンに変異させた K89R/K399R/K494R/K953R MR を作成して、外因性に HEK293 細胞に一過性に発現させたところ、SUMO 化修飾の有意な減少と、アルドステロン依存性の MR 転写活性化の増強を認めた。そこで、これらの SUMO 化欠失 MR 変異体における MR 転写活性化の増強効果が特異的であることを確認するために、数種類の KR 変異体を作成した。K1R (K89R), K12R (K89R/K399R), K123R (K89R/K399R/K494R), K1234R (K89R/K399R/K494R/K953R HEK293 細胞)の4種類を site-directed mutagenesis により作成し、HEK293 細胞に一過性に発現させて、MR 転写活性を検討した。その結果、KR 変異部位が増加するにつれて、アルドステロン依存性の 3xMRE-E1b-Luc および ENaC-Luc レポーター活性化が増強された。これらの結果から、4箇所の KR 変異体 MR の結果は非特異的な活性化ではなく、SUMO 化部位の減少による結果と考えられた。しかし、MMTV-Luc レポーター活性に対しては、これらの SUMO 化欠失変異体と野生型とは有意差を認めなかった(図1)。したがって、MR の脱 SUMO 化(desumoylation)は、アルドステロン存在下で MR 転写活性化を誘導するが、プロモーター特異性があることが示唆された。

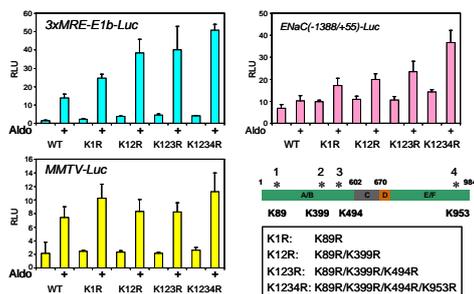


図1 野生型 MR および SUMO 化欠失 MR による MR 転写活性化

さらに、前述の一過性発現によるレポーターアッセイの結果が、生体での反応を反映するかを検討するために、すべての細胞が上記野生型または SUMO 化欠失変異体 MR を発現する安定発現細胞株(293-wtMR, 293-KRmutMR cell)

を樹立した。これらの安定発現細胞株を用いて、内因性 MR 標的遺伝子である Sgk mRNA レベルを real time RT-PCR で検討した結果、293-MR 細胞ではアルドステロンの添加の約1時間後に Sgk mRNA レベルのピークを認めた。そして、293-KRmut MR 細胞において、293-MR 細胞の約4倍の Sgk mRNA レベルを認めた。これらの結果から、MR の脱 SUMO 化は内因性 MR 標的遺伝子の発現量を増加させることが示された(図2)。

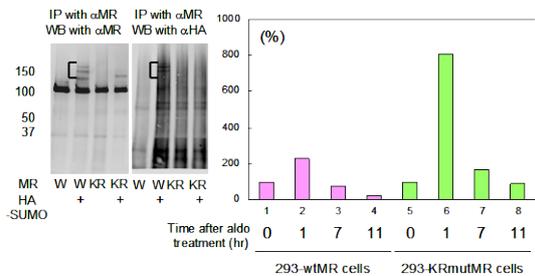


図2 野生型および SUMO 欠失変異体 MR の安定発現細胞株における Sgk mRNA の活性化

#### (2) MR の SUMO 化・脱 SUMO 化の調節

最近、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による酸化ストレス刺激が蛋白質の脱 SUMO 化を誘導することが報告された。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を培養細胞に添加して MR の SUMO 化の状態を検討した結果、現時点では有意な MR の脱 SUMO 化を認めなかった。そこで、MR のリガンドによる影響を検討した結果、10<sup>-8</sup>M aldosterone 処置により、MR の脱 SUMO 化を認めた(図3)。これは、アルドステロンが MR に結合して、立体構造の変化が誘導されて AF-2 部位の活性化が誘導されるが、その構造変化や AF-2 部位に動員されるコアクチベーター群により、SUMO 結合を阻害している可能性が示唆された。

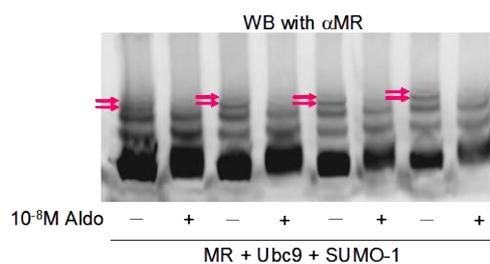


図3 アルドステロンによる MR の脱 SUMO 化調節

MR の脱 SUMO 化(desumoylation)は、アルドステロン作用を増強する蛋白修飾であることが示された。

臨床的に原発性アルドステロン症では、食塩過剰摂取のもとで心血管リスクホルモンとなることが知られている。しかし、血中アルドステロン濃度が正常であっても、アルドステロンの受容体の感受性が亢進すれば、原発性アルドステロン症

と同様の心血管疾患のリスクが高まることになる。本研究では、MR の蛋白修飾として、特に脱SUMO 化修飾によりアルドステロンの感受性が亢進することを明らかにすることができた。

次の問題は、MR の脱SUMO 化を誘導する刺激は何かであるが、酸化ストレス自体の可能性が提唱されているが、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 自身による直接効果は現時点では確認されておらず、今後の研究で明らかにされることが期待される。しかし、アルドステロン自体によるMR の活性化に加えて、MR の脱SUMO 化という興味深い修飾が明らかとなり、このようなMR 修飾が実際の臨床の病態で明らかにすることにより心血管疾患を防ぐことが可能となる。

## 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 33 件)

- ① S.Nagasaki, T.Suzuki, Y.Miki, H.Shibata, (5 番目) Chicken obalumin upstream promoter transcription factor II in human breast carcinoma: a possible regulator of lymphangiogenesis via VEGF-C expression. *Cancer Science*, 100:639-645, 2009. 査読有り
- ② M. Sone, H. Shibata, K. Homma, H. Itoh, Close examination of steroidogenesis disorders in a DOC- and progesterone -producing adrenocortical carcinoma. *Endocrine* 35:25-33, 2009. 査読有り
- ③ 柴田洋孝, 市原淳弘, 伊藤 裕. レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系の調節機構 診断と治療, 97:680-687, 2009 査読無
- ④ 三石木綿子, 柴田洋孝. クッシング症候群、クッシング病は体型のみで診断可能か *Modern Physician*, 29:473-477, 2009. 査読無
- ⑤ 市原淳弘, 柴田洋孝, 伊藤 裕. 内分泌性高血圧を見逃さないようにはどうするか *治療* 91:477-480, 2009. 査読無
- ⑥ 柴田洋孝. クッシング症候群の診断ガイドライン *ホルモンと臨床* 56:7-15, 2009. 査読無
- ⑦ 柴田洋孝. 泌尿器科医のための内分泌学 事始め 副腎ホルモン *臨床泌尿器科* 63:139-146, 2009. 査読無
- ⑧ K.Fujii, A.Higo, H.Hirose, H.Shibata, (6 番目) Life style factors and the radial artery augmentation index in post-menopausal women. *Ann.Nutr.Metab.* 53:61, 2008. 査読有り
- ⑨ 柴田洋孝. ステロイド合成阻害薬の基礎と臨床. *カレントセラピー* 27:59-62, 2008. 査読無
- ⑩ 栗原 勲, 柴田洋孝, 伊藤 裕. アルドステロン産生腺腫の診断と治療. *カレントセラピー* 27:8-13, 2008. 査読無
- ⑪ 柴田洋孝. 原発性アルドステロン症の内科的治療. *成人病と生活習慣病* 38:1424-1431, 2008. 査読無

- ⑫ 栗原 勲, 柴田洋孝, 伊藤 裕. 総論 ホルモンとは—産生、分泌、ホルモンレセプター、シグナル伝達 *臨床検査* 52:1097-1102, 2008 査読無
- ⑬ 武田彩乃, 柴田洋孝, 栗原 勲, 伊藤 裕. 原発性アルドステロン症の局在診断—<sup>131</sup>I-アドステロールシンチグラム の有用性. *ホルモンと臨床* 56:75-82, 2008. 査読無
- ⑭ 柴田洋孝. 原発性アルドステロン症の治療—ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬の有用性. *ホルモンと臨床* 56:95-104, 2008. 査読無
- ⑮ 柴田洋孝. メタボリック症候群の修飾因子としてのアルドステロン *Mebio*, 25: 72-81, 2008. 査読無
- ⑯ 柴田洋孝. 内科必携画像診断—褐色細胞腫. *内科*, 101(6):1656-1659, 2008. 査読無
- ⑰ 柴田洋孝. 内科必携画像診断—原発性アルドステロン症. *内科*, 101(6):1652-1655, 2008. 査読無
- ⑱ 柴田洋孝. 内科必携画像診断—Cushing 症候群. *内科*, 101(6):1648-1651, 2008. 査読無
- ⑲ 柴田洋孝. 副腎不全の原因と分類 *日本内科学会雑誌*, 97:702-707, 2008. 査読無
- ⑳ 柴田洋孝. 高血圧と「原発性アルドステロン症」 *総合臨床*, 57:497-501, 2008. 査読無
- ㉑ 柴田洋孝. ミネラルコルチコイド受容体と疾患 *ゲノム医学*, 8:33-36, 2008. 査読無
- ㉒ P.Ye, B.Mariniello, F.Mantero, H.Shibata, G protein-coupled receptors (GPCR) in aldosterone-producing adenomas (APA): a potential cause of hyperaldosteronism *J.Endocrinol.* 195:39-48, 2007. 査読有り
- ㉓ K.Yokota, H.Shibata, I.Kurihara, H.Itoh. Coactivation of the N-terminal transactivation of mineralocorticoid receptor by Ubc9. *J Biol Chem* 282:1998-2010, 2007. 査読有り
- ㉔ I.Saito, M.Mori, H.Shibata. Prevalence of metabolic syndrome in young men in Japan. *J Atheroscler Thromb* 14:27-30, 2007. 査読有り
- ㉕ 武田彩乃, 柴田洋孝, 横田健一, 伊藤 裕. 悪性褐色細胞腫・慶應義塾大学での経験. *ホルモンと臨床* 55: 25-30, 2007. 査読無
- ㉖ 柴田洋孝, 太田敦美, 村田 満, 伊藤 裕. 健康診断における高血圧および正常血圧者におけるアルドステロン/レニン比の検討. *血圧* 14:80-82, 2007. 査読無
- ㉗ 柴田洋孝. 副腎偶発腫瘍. *内分泌・糖尿病科* 25(4):307-314, 2007. 査読無
- ㉘ 柴田洋孝. アルドステロンと遺伝子制御. *医学のあゆみ* 221(9): 703-708, 2007. 査読無
- ㉙ 柴田洋孝, 伊藤 裕. メタボリックシンドロームとアルドステロン. *医学のあゆみ* 221: 747-751, 2007. 査読無
- ㊀ 柴田洋孝. 薬剤誘発性高血圧. *血圧*, 14(7): 53-57, 2007. 査読無
- ㊁ 柴田洋孝. 婦人科医に求められる高血圧のケア. *臨床婦人科産科*, 61: 929-933, 2007. 査

読無

⑫柴田洋孝、齊藤郁夫. 薬剤誘発性高血圧 Heart View, 11:62-65, 2007. 査読無

⑬柴田洋孝、伊藤 裕. 偽アルドステロン症の重症副作用への疾患別対応. 日本内科学会雑誌 96: 805-810, 2007. 査読無

[学会発表] (計 22 件)

①柴田洋孝、栗原 勲、三石木綿子、伊藤 裕. 原発性アルドステロン症における副腎静脈サンプリングの適応と時期: 慶應義塾大学病院における経験第 19 回臨床内分泌代謝 Update, 2009 年 3 月 13 日、東京

②柴田洋孝、太田敦美、河邊博史、伊藤 裕. 高血圧者および正常血圧者におけるアルドステロン/レニン比高値の臨床的意義: 2施設の健康診断受診者 1396 名における検討. 第 12 回日本心血管内分泌代謝学会, 2008 年 11 月 28 日~29 日、熊本

③柴田洋孝、太田敦美、河邊博史、伊藤 裕. 高血圧者および正常血圧者におけるアルドステロン/レニン比高値の臨床的意義. 第 16 回日本ステロイドホルモン学会学術総会, 2008 年 11 月 22 日、福井

④柴田洋孝、太田敦美、河邊博史、伊藤 裕. 高血圧症における血漿活性レニン濃度を用いたアルドステロン/レニン比の検討: 2つの異なる健康診断 1396 名における検討. 第 31 回日本高血圧学会総会, 2008 年 10 月 9 日~11 日、札幌

⑤柴田洋孝. 高血圧治療におけるアルドステロンブロックの意義: 高血圧とアルドステロン 第 31 回日本高血圧学会総会・イブニングセミナー, 2008 年 10 月 9 日~11 日、札幌

⑥柴田洋孝. 原発性アルドステロン症に対するミネラルコルチコイド受容体拮抗薬の効用. 第 12 回東京アルドステロンフォーラム, 2008 年 7 月 18 日、東京

⑦ H. Shibata, K. Yokota, A. Murai-Takeda, H. Itoh. Genetic and epigenetic regulation of mineralocorticoid receptor action by Ubc9. 21<sup>st</sup> Naito Conference on Nuclear Dynamics and RNA, 2008 年 6 月 24 日~27 日、山梨

⑧H. Shibata, A. Ohta, M. Murata, H. Itoh. Active renin concentration versus plasma renin activity to define aldosterone-to-renin ratio in mild to moderate hypertension. 34<sup>th</sup> Meeting of the International Aldosterone Conference, 2008 年 6 月 13 日~14 日、San Francisco

⑨ H. Shibata, A. Ohta, M. Murata, H. Itoh. Relations of aldosterone-to-renin ratio and blood pressure in a hospital-based medical checkup. The Endocrine Society's 90<sup>th</sup> Annual Meeting, 2008 年 6 月 15 日~18 日、San Francisco

⑩ 柴田洋孝、横田健一、武田彩乃、伊藤 裕. 原発性アルドステロン症の薬物治療成績と臨床

像. 第 81 回日本内分泌学会学術総会, 2008 年 5 月 16 日~18 日、弘前

⑪柴田洋孝、横田健一、武田彩乃、伊藤 裕. ミネラルコルチコイド受容体のジェネティックおよびエピジェネティック調節機構. 第 81 回日本内分泌学会学術総会・シンポジウム, 2008 年 5 月 16 日~18 日、弘前

⑫ 三石木綿子、柴田洋孝、横田健一、伊藤 裕. 褐色細胞腫の生化学的診断の再評価: 当院の 56 例の検討. 第 81 回日本内分泌学会学術総会, 2008 年 5 月 16 日~18 日、弘前

⑬横田健一、柴田洋孝、武田彩乃、伊藤 裕. ミネラルコルチコイド受容体の SUMO 化修飾による転写調節. 第 81 回日本内分泌学会学術総会, 2008 年 5 月 16 日~18 日、弘前

⑭栗原 勲、柴田洋孝、Ming-Jer Tsai, 伊藤 裕. プログステロン・エストロゲン作用におけるオーファン受容体 COUP-TFII の役割~子宮特異的 COUP-TFII ノックアウトマウスの解析を通して 第 81 回日本内分泌学会学術総会, 2008 年 5 月 16 日~18 日、弘前

⑮ H. Shibata, K. Yokota, I. Kurihara, S. Kato, H. Itoh. An alternative mechanism of desumoylation-mediated mineralocorticoid receptor transactivation. The 1<sup>st</sup> International Aldosterone Forum in Japan, 2008 年 5 月 11 日、東京

⑯ H. Shibata, A. Takeda-Murai, K. Yokota, H. Itoh. A repressive role of NF- $\kappa$ B in mineralocorticoid receptor-mediated signaling. Keystone Symposia: Nuclear receptors steroid sisters, 2008 年 3 月 30 日~4 月 3 日、Whistler, Canada

⑰柴田洋孝、横田健一、武田彩乃、伊藤 裕. 原発性アルドステロン症の診断における副腎静脈サンプリングの再検討. 第 11 回日本心血管内分泌代謝学会総会, 2007 年 11 月 16 日~17 日、東京

⑱ H. Shibata, K. Yokota, A. Murai-Takeda, H. Itoh. Transcriptional coregulators for the N-terminal transactivation of mineralocorticoid receptor. The 25<sup>th</sup> JES Summer Seminar on Endocrinology & Metabolism, 2007 年 7 月 17 日~18 日、淡路島

⑲ 横田健一、柴田洋孝、武田彩乃、伊藤 裕. 原発性アルドステロン症の診断における経口食塩負荷試験、立位フロセミド負荷試験および迅速 ACTH 試験の有用性. 第 80 回日本内分泌学会学術総会, 2007 年 6 月 14 日~16 日、東京

⑳ 須田徳子、柴田洋孝、本間桂子、伊藤 裕. 副腎性クッシング症候群患者におけるミネラルコルチコイド産生. 第 80 回日本内分泌学会学術総会, 2007 年 6 月 14 日~16 日、東京

㉑武田彩乃、柴田洋孝、横田健一、伊藤 裕. リガンド依存性にミネラルコルチコイド受容体に動員される転写共役因子の機能解析. 第 80 回

日本内分泌学会学術総会、2007年6月14日～16日、東京

⑳柴田洋孝、横田健一、武田彩乃、伊藤 裕  
原発性アルドステロン症の診断における副腎静脈サンプリングの適応：二次検査の有用性の検討。第80回日本内分泌学会学術総会、2007年6月14日～16日、東京

〔図書〕(計26件)

①柴田洋孝. 性腺疾患(精巣疾患)、新臨床内科学、第9版、p.825-827、医学書院、2009

②柴田洋孝. 原発性アルドステロン症、今日の治療指針2009、p.576-578、医学書院、2009

③柴田洋孝、伊藤 裕. 副腎疾患 今日から実践！内科確定診断完全マスター p.286-296、MEDICAL VIEW、2009.

④柴田洋孝. コルチゾール基礎知識2 クッシング症候群診療マニュアル、診断と治療社、p.19-21、2009.

⑤柴田洋孝. サブクリニカルクッシング症候群症候群の診断基準の課題 クッシング症候群診療マニュアル、診断と治療社、p.197-198、2009.

⑥柴田洋孝. 副腎腫瘍と遺伝子異常 クッシング症候群診療マニュアル、診断と治療社、p.261-262、2009.

⑦柴田洋孝、伊藤 裕. クッシング症候群最新医学 別冊 新しい診断と治療のABC 二次性高血圧、p.169-179、2008.

⑧武田彩乃、柴田洋孝、伊藤 裕. 副腎性高血圧の機序とその対処、降圧薬の選択は？専門医のための薬物療法 Q & A:循環器、中外医学社、p.81-83、2008.

⑨三石木綿子、柴田洋孝、伊藤 裕. 低Kや高Ca血症を呈する高血圧、何を考えどのような検査をするか？ 専門医のための薬物療法 Q & A:循環器、中外医学社、p.84-86、2008.

⑩横田健一、柴田洋孝、伊藤 裕. 異常な発汗、頭痛、動悸がともなう高血圧はなにを考慮するような検査をするか？ 専門医のための薬物療法 Q & A:循環器、中外医学社、p.87-88、2008.

⑪柴田洋孝. 診断一症状、スクリーニング、機能検査。褐色細胞腫診療マニュアル、診断と治療社、p.20-21、2008

⑫柴田洋孝、齊藤郁夫. 原発性アルドステロン症における腎障害。日常臨床に役立つ高血圧診療のエビデンス p.90-91、先端医学社、2008.

⑬柴田洋孝. クッシング症候群。今日の治療指針2008、p.584-585、2008.

⑭柴田洋孝. 副腎癌 内科学(朝倉書店)、p.1411-1413、2007

⑮柴田洋孝. 副腎偶発腫瘍 内科学(朝倉書店)、p.1413-1415、2007

⑯伊藤 裕、柴田洋孝、須田徳子. 副腎機能障害 内分泌・代謝シークレット、メディカルサイエンスインターナショナル、p.276-313、2007.

⑰柴田洋孝. アルドステロンの合成。原発性アルドステロン症診療マニュアル、診断と治療社、p.5-6、2007

⑱武田彩乃、柴田洋孝. フルドロコルチゾン試験。原発性アルドステロン症診療マニュアル、診断と治療社、p.57-58、2007.

⑲武田彩乃、柴田洋孝. 食塩負荷・尿中アルドステロン測定。原発性アルドステロン症診療マニュアル p.62-63、2007.

⑳三石木綿子、柴田洋孝. 副腎静脈サンプリング。原発性アルドステロン症診療マニュアル、診断と治療社、p.110-113、2007.

㉑横田健一、柴田洋孝. 合併症・予後 原発性アルドステロン症診療マニュアル、診断と治療社、p.164-166、2007.

㉒横田健一、柴田洋孝. 不整脈で発見されたPA 原発性アルドステロン症診療マニュアル、診断と治療社、p.182-183、2007.

㉓柴田洋孝、伊藤 裕. メタボリック・シンドローム 高血圧ナビゲーター、メディカルレビュー社、p.30-31、2007.

㉔柴田洋孝. クッシング症候群。今日の治療指針2008、p.584-585、2008.

㉕柴田洋孝、伊藤 裕. メタボリック・シンドローム 高血圧ナビゲーター、メディカルレビュー社、p.30-31、2007.

㉖柴田洋孝. 二次性高血圧 高血圧ナビゲーター、メディカルレビュー社、p.120-123、2007.

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕特になし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

柴田 洋孝 (SHIBATA HIROTAKA)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号:20245484

### (2)研究分担者

伊藤 裕 (ITOH HIROSHI)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号:40252457

### (3)連携研究者

なし

