

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591097

研究課題名(和文) アルドステロンによる臓器障害の分子基盤

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of aldosterone-induced tissue injury

研究代表者

岩崎 泰正 (IWASAKI YASUMASA)

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号：30303613

研究成果の概要(和文)：アルドステロン(Aldo)による臓器障害の分子基盤を解明する目的で、血管平滑筋細胞(VSMC)を用いた Aldo 標的遺伝子の探索を行った。その結果 1) VSMC にミネラルコルチコイド受容体(MR)および 11β HSD2が存在する;2) AldoはMRを介してイオンチャンネル、Ca関連転写因子、炎症関連、およびRAS系関連遺伝子の発現を誘導する;3) Aldoが効果を発揮するにはグルココルチコイド受容体および関連共役因子の存在が必須である、等の事実を明らかとした。

研究成果の概要(英文)：We have investigated the molecular mechanisms of aldosterone-induced tissue injury using neuronal and vascular smooth muscle cells. We found that aldosterone induced the genes related to ion-channels, Ca-regulated transcription factors, inflammation, and rennin-angiotensin system. We also found that the co-expression of glucocorticoid receptor and/or steroid receptor cofactor(s) is necessary for aldosterone/MR mediated gene transcription.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：内分泌

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、グルココルチコイド、ステロイド、核内受容体、ストレス、転写調節

1. 研究開始当初の背景

アルドステロン(Aldo)はレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系の最終産物として、腎臓におけるミネラルコルチコイド受容体(MR)を介したNa代謝に必須のホルモンである。しかしMR阻害剤が心臓・血管組織など腎以外の組織障害(心不全)にも有効で

あることが報告され、非上皮性細胞がアルドステロンの作用標的であることが示唆された。しかしその作用機序の詳細は明らかでなかった。

2. 研究の目的

非上皮性細胞、特に心血管組織由来の血管

平滑筋細胞 (VSMC) や、ミネラルコルチコイドの標的である神経細胞、腸管細胞における Aldo の作用機序の詳細を、転写調節機構の解明および標的遺伝子の同定を目的として検討した。

3. 研究の方法

ラット VSMC 細胞株 (A10)、神経細胞株 BE (2)C、及び腸管細胞株 T84 を用い、これらの細胞における MR とグルココルチコイド受容体 (GR) の発現を RT-PCR および Western blotting 法で解析した。また A10 細胞において、コルチコステロイド代謝酵素 (11 β -HSD2, 1) の発現、ならびに Aldo で転写活性が誘導される遺伝子を、4つのカテゴリー (イオンチャネル、転写因子、炎症、RAS 系)に分けた上で、網羅的に解析した。

アルドステロン標的遺伝子の探索

転写因子特異的	イオンチャネル	RAA系	炎症関連
SRE	ENaCa α	AT1	MCP1
NFAT	NHE	ACE	ICAM1
cFos	NKCC1	p22 ^{phox}	
AP1	NCX	p47 ^{phox}	IL6
CRE	NaKATPase α	p67 ^{phox}	PAI-1
NF- κ B	NaKATPase β	gp91 ^{phox}	
		Angiotensinogen	Osteopontin

4. 研究成果

1. A10, BE(2)C, および T84 細胞における GR, MR の発現

MR や GR 依存性の転写を解析する上で障害となるのは、使用する細胞が内因性の受容体や共役転写因子をどの程度発現しているかという点である。特に MR に関しては市販の良い抗体が存在しない。そこで米国ミシシッピ大学のゴメス・サンチェス教授より供与された特異性の高い抗 MR 抗体を用いて各種細胞株を解析したところ、神経細胞株 BE (2)C が MR のみを特異的に発現、また血管平滑筋細胞株 A10 が MR, GR とも発現していること、さらに大腸上皮細胞株 T84 は MR, GR とも発現していないことを、Western Blotting 法により確認した (Tsugita M, Iwasaki Y, et al. Life Science 2008)。

2. MR 依存性転写に影響を及ぼす細胞内グルココルチコイド代謝酵素の発現解析

MR リガンドであるアルドステロンが MR を介して作用するためには、コルチゾール不活化酵素 11 β HSD2 が同時に発現している必要がある。そこで A10 細胞における 11 β HSD1、2 の発現を検討したところ、本細胞は 11 β HSD2 および 11 β HSD1 の両者を発現して

いること、また TNF α などの炎症刺激により 11 β HSD1 の発現は上昇、逆に 11 β HSD2 の発現は低下することが明らかとなった。したがって A10 細胞はコルチゾールを不活化しアルドステロンが特異的に作用しうる細胞内環境を有していないことが示された。また独自に開発した細胞内グルココルチコイドバイオアッセイ系を用いて細胞内グルココルチコイド濃度の変化を評価した結果、炎症刺激は実際に細胞内でコルチゾンをコルチゾールに活性化させる方向に作用していることを見出した (Tsugita M, Iwasaki Y, et al. Life Science 2008)。

3. 脳内副腎コルチコステロイド作用の分子機序

脳内には MR および GR が広範に発現しているが、その機能の詳細は明らかでない。我々は、鉱質コルチコイド作用を有するコルチコステロンがラット視床下部で転写因子 FosB の発現に抑制的に作用していることを、in vivo および in vivo の系を用いて明らかにした (Das G, Iwasaki Y, Itoi K, et al., J Neuroendocrinol 2009)。この結果より、脳内 GR, MR は誘導型転写因子の発現を介して生体のストレス制御系に重要な役割を果たしていると考えられた。

また我々は BE (2)C 細胞を用いて、脳内における GR, MR の過剰刺激がグルタミン酸 NMDA1 受容体の過剰発現を招来し、神経細胞死を惹起することを明らかにした (He J, Iwasaki Y, et al., Life Science 2008)。すなわち中枢神経系において GR, MR は中枢神経機能維持に不可欠である反面、過剰刺激は細胞死などの臓器障害を招来することを示した。

4. GR isoform (GR β) の臨床的意義

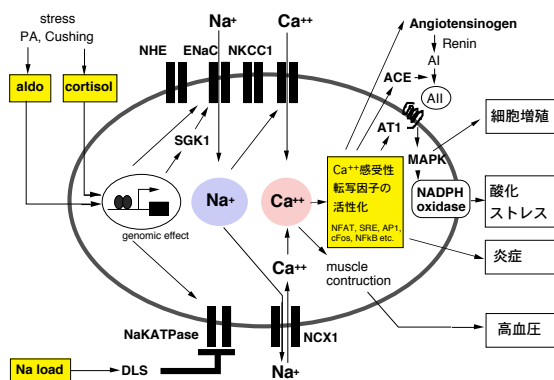
GR には複数のアイソフォームがあり、ステロイド抵抗性への関与が推察されているが、その分子機序は明らかでなかった。我々は主要なアイソフォームである GR α および GR β が、ステロイドホルモン作用のうち主として免疫系で機能する転写抑制に対し選択的に dominant negative 作用を発揮することを始めて明らかにした (Taniguchi Y, Iwasaki Y, et al., Endocrinology 2010)。この結果は、臨床でしばしば問題となるステロイド不応性疾患の病態解明に貢献することが期待される。

5. MR により誘導される遺伝子の網羅的解析

一方 MR の機能に関する研究は GR ほど進んでおらず、未だ未解明の部分が多い。そこで非上皮性細胞における MR の標的遺伝子を網羅的に解析した結果、1) イオンチャネル遺伝子 (NEaCa, NKCC, NHE, Na/KATPase, NCX

など)、Ca 反応性転写因子(NFAT, cFos, NFκB など)、炎症関連遺伝子(MCP1, PAI-1, ICAM1, IL6, osteopontin など)、および RAS 系関連遺伝子 (AGT, ACE, p22phox, p47phox, p91phox, AT1 など) の転写活性が 50-700%上昇した (未発表データ)。この反応は MR 特異的阻害剤 spironolactone で部分的に抑制されることから、MR と GR の両者を介して生じている可能性が示唆された。また Aldo の時間依存性効果を検討した結果、イオンチャンネル遺伝子への効果が比較的早期に出現するのに対し、Ca 依存性転写因子や RAS 系遺伝子への影響は遅発性であった。

これらの結果より、Aldo はイオンチャンネルの発現を増加させることにより VSMC の興奮性を亢進させ細胞内 Ca⁺⁺の上昇を招来し、結果的に Ca⁺⁺依存性転写因子(NFAT, AP1, NF-κB など)の発現や活性を増加させ、炎症関連遺伝子や RAS 系遺伝子の発現を促進することにより、結果的に組織における炎症や線維化を惹起している可能性が高いものと推察された。



6. MR 依存性転写調節の分子機序と標的遺伝子

最後に我々は MR 依存性転写調節機構の分子機序の解明を試みた。その結果、予想外にも、MR のみを発現する BE(2)C 細胞ないし MR, GR 両者とも発現しない T84 細胞では、MR 発現ベクターを導入し MR 蛋白を外因性に発現させても、Aldo による転写誘導効果は全く認められなかった。この結果は、MR に共役する何らかの因子が必要である可能性を示している。

そこで、各種核内受容体の共発現実験を行った結果、GR を共発現させた場合にのみ、Aldo による著明な転写誘導効果が認められた。この結果は、GR が MR とヘテロダイマーを形成するか、MR ホモダイマーの共役因子として機能している可能性を示唆している (Tsugita, Iwasaki, et al., Mol Cell Endocrinology 2009)。

また核内受容体と共役することが知られている各種転写共役因子を共発現させた条件下で Aldo による MR 依存性転写活性を BE(2)C 細胞で検討したところ、CBP や p300 の共発現は明らかな効果を示さなかった。しかし PGC1α, PGC1β, SRC1, SRC3 の共発現下では Aldo による MR 依存性転写能の回復が認められ、特に SRC3 の共発現の効果が最も強力であった (未発表データ)。

また、SRC3 と MR の蛋白間相互作用部位を明らかにする目的で、N 末端のアミノ酸を順次削除した変異 MR を作成し、同様の検討を行った。その結果、N 末端から 15-42 番目のアミノ酸部位を削除すると SRC3 の共存効果が消失した。この結果は、MR と SRC3 との共存効果に、MR の N 末端ドメインが重要な役割を果たしている可能性が示唆された (未発表データ)。

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 14 件)

1. Nakayama S, Nishiyama M, Iwasaki Y, Shinahara M, Okada Y, Tsuda M, Okazaki M, Tsugita M, Taguchi T, Makino S, Stenzel-Poore MP, Hashimoto K, Terada Y. Corticotropin-releasing hormone (CRH) transgenic mice display hyperphagia with increased Agouti-related protein mRNA in the hypothalamic arcuate nucleus. **Endocr J** 2011;58:279-286. (査読あり)
2. Iwasaki Y, Taniguchi Y, Nishiyama M, Taguchi T, Tsugita M, Okazaki M, Nakayama S, Hashimoto K, Kambayashi M, Terada Y. Glucocorticoid receptor-β and -γ exert dominant negative effect on gene repression but not on gene induction. **Endocrinology** 2010; 151:3204-3213. (査読あり)
3. Tsugita M, Iwasaki Y, Nishiyama M, Taguchi T, Shinahara M, Taniguchi Y, Kambayashi M, Nishiyama A, Gomez-Sanchez CE, Terada Y, Hashimoto K. Glucocorticoid receptor plays an indispensable role in mineralocorticoid receptor-dependent transcription in GR-deficient BE(2)C and T84 cells in vitro.

- Mol Cell Endocrinol** 2009;302:18-25. (査読あり)
4. Das G, Uchida K, Kageyama K, Iwasaki Y, Suda T, Itoi K. Regulation by glucocorticoid of the FosB/ Δ FosB-immunoreactivity in the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus. **J Neuroendocrinol** 2009; 21:822-831. (査読あり)
 5. He J, Iwasaki Y, Nishiyama M, Taguchi T, Tsugita M, Taniguchi Y, Kambayashi M, Hashimoto K. Multisignal regulation of the rat NMDA1 receptor subunit gene - A pivotal role of glucocorticoid-dependent transcription. **Life Sci** 82:1137-1141, 2008. (査読あり)
 6. Iwasaki Y, Takayasu S, Nishiyama M, Tsugita M, Taguchi T, Asai M, Yoshida M, Kambayashi M, Hashimoto K. Is the metabolic syndrome an intracellular Cushing state? Effects of multiple humoral factors on the transcriptional activity of the hepatic glucocorticoid-activating enzyme (11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1) gene. **Mol Cell Endocrinol** 285:10-18, 2008. (査読あり)
 7. Tsugita M, Iwasaki Y, Nishiyama M, Taguchi T, Shinahara M, Taniguchi Y, Kambayashi M, Hashimoto K. Differential regulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and type 2 gene transcription by proinflammatory cytokines in vascular smooth muscle cells. **Life sci** 2008;83:426-432. (査読あり)
 8. 岩崎泰正. バソプレシン (AVP)。成瀬光栄、平田結喜緒、楽木宏実編。内分泌性高血圧診療マニュアル。診断と治療社。2010;p14-15. (査読なし)
 9. 岩崎泰正、何静、西山充、田口崇文、次田誠、岡崎瑞穂、中山修一、橋本浩三、寺田典生。副腎コルチコステロイドは神経細胞においてNMDA受容体遺伝子の発現を促進する。 **ACTH RELATED PEPTIDES** Vol. 21, 2010;23-24. (査読なし)
 10. 岩崎泰正. 鉱質コルチコイド受容体と糖質コルチコイド受容体。Heart View 2009;11:48-52. (査読なし)
 11. 次田誠、岩崎泰正、寺田典生. 食塩の吸収・排泄とその異常。成人病と生活習慣病 2009;39:233-237. (査読なし)
 12. 岩崎泰正. 選択的アルドステロンブロッカーの臓器保護作用をみる。猿田享男、編。選択的アルドステロンブロッカーのすべて。先端医学社。2009;p29-34. (査読なし)
 13. 岩崎泰正. アルドステロンによる臓器障害の分子基盤。Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌 2008; p131-139. (査読なし)
 14. 岩崎泰正、橋本浩三. ミネラルコルチコイド受容体の機能と病態。飯入太朗、編。アルドステロン研究の新展開。2008;p5-9. (査読なし)
- [学会発表] (計 8 件)
- 国際学会
1. Tsugita M, Iwasaki Y, Nishiyama M, Taguchi T, Shinahara M, Taniguchi Y, Okzaki M, Nakayama S, Mambayashi M, Takao T, Nishiyama A, Gomez-Sanchez EP, Hashimoto K, Terada Y. Glucocorticoid receptor play an indispensable role in mineralocorticoid receptor-dependent transcription / role of GR in MR-dependent transcription. 14th International Congress of Endocrinology, March 26-30, 2010, Kyoto, Japan
 2. Tsugita M, Iwasaki Y, Nishiyama M, Taguchi T, Okazaki M, Taniguchi Y, Nakayama S, Zhao LF, Kambayashi M, Takao T, Hashimoto K, Terada Y. The target genes of aldosterone in vascular smooth muscle cells. The 92th Annual

Meeting of the Endocrine Society. 2010,
June 19-22. San Diego, USA.

国内学会

1. 次田誠、岩崎泰正、西山充、田口崇文、谷口義典、岡崎瑞穂、中山修一、高尾俊弘、寺田典生。血管平滑筋細胞におけるアンジオテンシノーゲン（AGT）発現調節と機能的意義。83回日本内分泌学会総会。2010年3月25-28日。京都市。
2. 谷口義典、島村芳子、緒方巧二、井上紘輔、香川亨、堀野太郎、森田達仁、岩崎泰正、寺田典生。ステロイド抵抗性の分子メカニズム。第53回日本腎臓学会総会。2010年6月16-18日。神戸市。
3. 次田誠、岩崎泰正、田口崇文、堀野太郎、西山充、高尾俊弘、寺田典生。血管平滑筋細胞におけるバソプレシン作用の標的遺伝子。第33回日本高血圧学会総会。2010年10月15-17日。福岡市。
4. 次田誠、谷口義典、田口崇文、西山充、品原正幸、岡崎瑞穂、中山修一、寺田典生、岩崎泰正。ミネラルコルチコイド受容体の機能におけるステロイド受容体コアクチベーターの役割。第82回日本内分泌学会学術総会。2009年4月23-25日。前橋市。
5. 次田誠、岩崎泰正、西山充、田口崇文、寺田典生。フェノフィブラートは11β-HSD1を阻害し細胞内グルココルチコイド活性を抑制して血管保護的に作用する。第13回日本心血管内分泌代謝学会。2009年10月16-17日。埼玉県。
6. 谷口義典、岩崎泰正、次田誠、中山修一、岡崎瑞穂、品原正幸、田口崇文、西山充、高尾俊弘、橋本浩三。変異グルココルチコイド受容体の機能解析。第81回日本内分泌学会学術総会。2008年5月16-18日。青森市。

〔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
なし

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
岩崎 泰正 (IWASAKI YASUMASA)
高知大学・教育研究部医療学系・教授
研究者番号： 30303613
- (2) 研究分担者 なし
- (3) 連携研究者 なし