

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 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21790897

研究課題名（和文）

ジヒドロピリジン系 Ca 拮抗薬のミネラルコルチコイド受容体拮抗作用に関する検討

研究課題名（英文）

Anti-MR (mineralocorticoid receptor) effect of dihydropyridine Ca channel blocker.

研究代表者

栗原 勲 (KURIHARA ISAO)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：90338038

研究成果の概要（和文）：

本研究により、ジヒドロピリジン系 Ca 拮抗薬（dpCCB）によるミネラルコルチコイド受容体（MR）拮抗作用が、*in vitro* の系のみならず、*in vivo*（ヒト生体内）でも存在することが確認された。また、dpCCB は MR のみならず、グルココルチコイド受容体やプロゲステロン受容体など他のステロイドホルモン受容体にも部分的かつ多様性を持って拮抗作用を有することが確認された。本研究の成果は、これまでも臨床の現場で頻用されてきた降圧薬であるジヒドロピリジン系 Ca 拮抗薬の新たな有益性を明らかにしたという点で、極めて臨床への還元性が高いと考えている。

研究成果の概要（英文）：

The study revealed that anti-MR effect of dihydropyridine Ca channel blocker (dpCCB) can be observed *in vivo* (in human). We also demonstrated that dpCCB antagonized not only MR but also other steroid hormone receptors such as glucocorticoid receptor and progesterone receptor partly and in diverse manner. This finding should have great impact as a translational research in that dpCCB is one of the most commonly used antihypertensives and we demonstrated a novel beneficial aspect of this agents.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：高血圧、アルドステロン（ミネラルコルチコイド）、ステロイドホルモン受容体、Ca 拮抗薬

1. 研究開始当初の背景

近年、心血管疾患におけるアルドステロン作用の有害性が、数々の大規模臨床試験や基礎実験から明らかとなり、臨床の現場においてアルドステロン拮抗薬すなわち MR 拮抗薬の需要が高まっている。

副腎よりアルドステロンの過剰分泌を来たす疾患である原発性アルドステロン症は、このような背景から、内分泌学会や高血圧学会等でも積極的にスクリーニング検査を行うことが奨励されている。その成果もあって、原発性アルドステロン症の診断に至る症例

は年々増えており、現在では全高血圧患者の5～10%を占めるとまで推測されている。本邦の高血圧患者を約4000万人とすると、多くて400万人の患者が罹患していることになり、国民病と言える数字となっている。その約半数(報告によって異なり、当院症例では3割程度)は、副腎腫瘍(アルドステロン産生腺腫)が原因であり、その摘出手術により根治が可能であるが、残り半数は両側副腎よりアルドステロン過剰分泌がみられるため手術治療の対象とならず、MR拮抗薬による薬物治療が開始される。

さらに、必ずしもアルドステロンが過剰でない症例においても、MR拮抗薬が用いられることが増えてきている。重症心不全患者においてMR拮抗薬の投与により生命予後が大きく改善する報告がなされ(RALES試験, N Engl J Med, 1999)。その後も同様の報告が続いており、心不全患者では、高アルドステロン血症を伴わなくても、積極的にMR拮抗薬が用いられている。その他にも、MR拮抗薬が有用性を示す病態は多々存在し、糖尿病性腎症のアルブミン尿改善にも、MR拮抗作用が重要であることを示す報告も出されている。

高血圧診療(特に日本国内)で頻繁に使用される降圧薬であるジヒドロピリジン系Ca拮抗薬(以下dpCCB)は、本来Caチャンネルを介した血管拡張がその主な降圧のメカニズムであるが、2008年Hypertension誌にdpCCBがミネラルコルチコイド受容体(MR)にアンタゴニストとして作用するという*in vitro*の研究結果が発表され、新たな降圧メカニズムとして注目されるようになった。しかしながら、dpCCBがMRに拮抗するその詳細なメカニズムは未解明であり、またこのようなMR拮抗作用が個体(生体)でどの程度の意義があるのかについても、全く検討されていなかった。

MR拮抗薬は、女性化乳房などの副作用や保険適応の関係から、用量(上限)に制限が生じることが多い。dpCCBにもMR拮抗作用が確認できるのであれば、上記のMR拮抗薬による治療を要する疾患・病態に対し、追加の治療薬としてdpCCBの積極的な使用が推奨されるようになり、日常診療の向上や医療経済面の改善において極めて高い価値が予想される。

2. 研究の目的

本研究は、上記の*in vitro*におけるdpCCBのMR拮抗作用について、その分子機序や他のステロイドホルモン受容体への影響を含めた詳細な作用動態を解明し、また*in vivo*における作用の検証および意義の解明を目的とする。

Hypertension誌の報告では、結晶解析の結果から、dpCCBがMRのリガンド結合部位には

まりうる構造をしていることを指摘しており、そうであるなら、MRと高い相同性を有する他のステロイドホルモン受容体にも同様の拮抗作用を示しうると考え、dpCCBの受容体選択性について検討することを目的とした。実際、既知のMR拮抗薬であるスピロノラクトンは、MR以外にもアンドロゲン受容体やプロゲステロン受容体とも親和性を有することが知られており、その作用は女性化乳房など本薬剤特有の副作用の原因として臨床において重要視されている。

また、MR拮抗作用のメカニズムに関しては、Caチャンネル作用の関与についても検討を行う。

*in vivo*における検証としては、個体レベルでのdpCCB投与が、MR作用に影響を及ぼすか否かを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

dpCCBのMR拮抗メカニズムについての解析では、Luciferaseアッセイを中心とした*in vitro*の転写アッセイを用いて検討を行った。COS-7細胞に、外因性にミネラルコルチコイド応答配列を含むレポーター遺伝子をtransfectionし、MRあるいは他のステロイドホルモン受容体も同時にtransfectionした系で、アルドステロン作用あるいは他のステロイドホルモン作用をLuciferase(レポーター)活性で定量した。また、内因性MR標的遺伝子であるSGK-1のmRNA定量でも検討を行った。転写活性へのdpCCBの影響と同時に、受容体の核内移行への影響についても検討も行った。

Caチャンネル作用の関与については、Caキレート剤を負荷し、細胞内Ca動態を凍結した状態で、上記の転写アッセイを行い、確認した。

*in vivo*におけるdpCCBのMR拮抗作用については、当院の原発性アルドステロン症患者の臨床プロフィールを用いて、dpCCBのアルドステロン作用に対する影響を疫学的に検討した。アルドステロン作用の指標としては尿中K排泄(TTKG)を用い、主に腎局所における作用を検討した。dpCCB内服群と非内服群の間で、尿中K排泄の程度を比較し、有意差検定を行った。尿中K排泄については、患者ごとのアルドステロン分泌量など、個体間の他のファクターの差の影響も受けうるため、同一患者において、dpCCBから(*in vitro*では)MR拮抗作用が確認されない非ジヒドロピリジン系Ca拮抗薬へ変薬を行い、その前後で尿中K排泄を指標としたMR作用の変化についても検討を行った。

4. 研究成果

dpCCBは、MRのみならず他のステロイドホルモン受容体にも、薬剤によって様々な程度

で拮抗作用を示すことが明らかになった。dpCCB としては最もシンプルな構造を有する二モジピンが、MR 拮抗作用としては最も強力であり、その一方プロゲステロン拮抗作用を最も強く示したのは、他の dpCCB であった。興味深いことに、スピロラクトンにみられるアンドロゲン受容体拮抗作用は、dpCCB にはみられなかった。MR 拮抗作用において、dpCCB は MR のリガンド依存性核内移行を阻害することが観察され、一方、既知の MR 拮抗薬であるエプレレノンやスピロラクトンでは、MR 核内移行に対して異なる影響を示すことから、本作用は、既知の MR 拮抗薬とは異なるメカニズムを介した作用であると考えられた。

また、Ca チャネル作用の関与については、Ca キレート剤として BAPTA-AM を用い、BAPTA-AM 投与下でも、同様の MR 拮抗作用がみられたことから、Ca チャネル作用とは独立した dpCCB の作用であることが明らかになった。

さらに、ヒト生体内において、dpCCB は用量依存性に尿中 K 排泄を低下させ、dpCCB 投与により少なくとも腎局所においては MR 作用が減弱していると考えられた。同一個体内でも、dpCCB から非ジヒドロピリジン系 Ca 拮抗薬への変薬で、尿中 K 排泄の増加を認め、dpCCB が MR 拮抗作用を有していることが確認された。ヒト生体においても、本作用が確認されたことから、本研究は、今後の Ca 拮抗薬の新たな有益性を示唆する結果となった。原発性アルドステロン症や心不全・糖尿病性腎症など、MR 拮抗薬による治療が有効な common disease に対し、Ca 拮抗薬 (dpCCB) の新たな役割を提言する成果であり、臨床的還元性の高い有意義な検討であったと考えている。

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3件)

1. Suda N, Shibata H, Kurihara I, Ikeda Y, Kobayashi S, Yokota K, Murai Takeda A, Nakagawa K, Oya M, Murai M, Rainey WE, Saruta T, Itoh H. Coactivation of SF-1 Mediated Transcription of Steroidogenic Enzymes by Ubc9 and PIAS1. *Endocrinology*. 2011. 152(6):2266-77 査読有り
2. Murai Takeda A, Shibata H, Kurihara I, Kobayashi S, Yokota K, Suda N, Mitsuishi Y, Jo R, Kitagawa H, Kato S, Saruta T, Itoh H. NF- κ C functions as a corepressor of agonist bound

mineralocorticoid receptor. *J Biol Chem*. 2010. 285(11):8084-93. 査読有り

3. Yamaguchi S, Shibata H, Miyashita K, Kurihara I, Murai Takeda A, Mitsuishi Y, Motosugi Y, Saito Y, Hayashi K, Itoh H. Gastrointestinal pseudo-obstruction after debulking surgery of malignant pheochromocytoma, improved by intravenous administration of alpha adrenergic receptor blocker, phentolamine. *Hypertens Res*. 2010. 33(7):753-4. 査読有り

[学会発表](計4件)

1. 柴田洋孝, 栗原勲, 三石木綿子, 林毅, 城理絵, 横田健一, 武田彩乃, 本杉裕一郎, 大山貴子, 伊藤裕. 核内受容体と内分泌代謝疾患 Update 治療抵抗性高血圧におけるミネラルコルチコイド受容体の蛋白修飾による活性化機構. 日本内分泌学会学術総会、2011年4月23日、神戸
2. 栗原勲, 柴田洋孝, 武田彩乃, 三石木綿子, 本杉裕一郎, 林毅, 城理絵, 宮下和季, 本間桂子, 伊藤裕. 原発性アルドステロン症の病型診断における血中18-水酸化ステロイド測定の有用性. 日本ステロイドホルモン学会、2010年11月27日、名古屋
3. Isao Kurihara, Hirotaka Shibata, Yuko Mitsuishi, Ayano Murai Takeda, Yuichiro Motosugi, Takashi Hayashi, Rie Jo, Hiroshi Itoh. Dihydropyridine calcium channel blockers have selective antagonist activity of steroid hormone receptors through blocking nuclear translocation of the receptor. 国際内分泌学会、2010年3月29日、京都
4. 三石木綿子, 柴田洋孝, 栗原勲, 横田健一, 武田彩乃, 城理絵, 林毅, 本杉裕一郎, 伊藤裕. EGFによるミネラルコルチコイド受容体のアルドステロン感受性亢進の分子機構 治療抵抗性高血圧における役割. 日本内分泌学会学術総会、2010年3月26日、京都
5. 栗原勲, 柴田洋孝, 三石木綿子, 武田彩乃, 本杉裕一郎, 伊藤裕. ジヒドロピリジン系 Ca 拮抗薬は Ca チャネル作用とは独立した新規ミネラルコルチコイ

ド受容体拮抗作用を有する。日本高血圧学会、2009年10月1日、大津

6. 栗原勲、柴田洋孝、三石木綿子、横田健一、武田彩乃、本杉裕一郎、林毅、城理絵、伊藤裕。ジヒドロピリジン系 Ca 拮抗薬のミネラルコルチコイド受容体拮抗作用の検討。東京アルドステロンフォーラム、2009年7月17日、東京
7. 栗原勲、柴田洋孝、三石木綿子、武田彩乃、本杉裕一郎、伊藤裕。レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系の新展開 ジヒドロピリジン系 Ca 拮抗薬のミネラルコルチコイド受容体拮抗作用の検討。日本内分泌学会学術総会、2009年4月23日、前橋

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

栗原 勲

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：90338038