

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月10日現在

機関番号：32651
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23790881
 研究課題名（和文）心臓におけるコルチコステロイド産生調節機構と病態生理作用の解明：糖の関与を中心に
 研究課題名（英文）The regulation of local corticosteroid synthesis and its pathophysiological effect in the heart.
 研究代表者
 名越 智古（NAGOSHI TOMOHISA）
 東京慈恵会医科大学・医学部・助教
 研究者番号：60408432

研究成果の概要（和文）：

心不全の病態生理の中心的な役割を担うアルドステロンの心筋における産生調節機構と作用について、糖との関わりを中心に検討した。心筋においては糖濃度依存性に組織アルドステロン産生が行われ、その刺激はインスリンシグナルを活性化し、短期的にはミネラルコルチコイド受容体非依存性に心保護的に働くことが分かった。これらの結果は糖が貴重なエネルギー基質となる不全心におけるアルドステロンの、食塩を介した体液調節ホルモンに留まらない糖代謝制御ホルモンとしての新たな役割を示唆するものである。

研究成果の概要（英文）：

Aldosterone plays a pivotal role in the pathogenesis of heart failure. We herein investigated the regulation of the local aldosterone synthesis and its pathophysiological effects in the heart. We demonstrated that high glucose conditions promote the expression of aldosterone synthase in cardiomyocytes. Moreover, a short-term aldosterone stimulation is found to be cardioprotective through the acute activation of insulin signaling in a mineralocorticoid receptor-independent manner. These results provide new insight into the previously unknown role of aldosterone, as a compensatory mechanism under the pathological conditions, such as heart failure, where glucose becomes an important preferential substrate for metabolism and ATP generation.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 2,900,000 | 870,000 | 3,770,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：アルドステロン、グルコース、インスリンシグナル、心筋細胞

1. 研究開始当初の背景

アルドステロンは心不全の病態生理において中心的な役割を担っていると考えられる。しかし、その心筋細胞に対する直接的な生理作用については未だ十分に解明されていない。これについては細胞質内ミネラルコルチコイド受容体(MR)と結合し核内へ移行、遺伝子転写を介する長期的ゲノム作用と遺伝子転写活性を介さない短期的非ゲノム作用とに分けて検討を行う必要

がある。心臓において MR 持続活性はゲノム作用を介し、様々な悪影響を及ぼすことが種々の実験系あるいは大規模臨床試験から検討されてきた。一方、未知の部分が多い非ゲノム作用に関しては近年、アルドステロンが高浸透圧状態時の細胞内脱水に対して Na^+/H^+ exchanger(NHE)を介して細胞内 volume を維持し、短期的に細胞保護的に働く可能性が見出された。

最近、糖代謝におけるアルドステロンの位置づけが注目されてきている。インスリンシグナルはその糖代謝を制御する中心的なシステムの一つである。我々はこれまでにアルドステロンがインスリンシグナルの下流蛋白であるAktを短期と長期の二相性に活性化することを発見した。そして、長期作用がMR依存性である一方で短期作用はMR非依存性であることが分かった。これらの反応は高糖濃度環境下で増強される可能性が示唆された。また、糖濃度環境は組織におけるレニン-アンジオテンシン系(RAS)の産生及び活性化にも関わっており、高糖濃度刺激がこれを増強することが報告された。このようにこれまでナトリウムを中心としたvolume調節ホルモンとして考えられてきたアルドステロンの心臓局所における産生及び作用には、食塩同様糖濃度環境が深く関わっている可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究ではこれまで食塩を介したvolume調節ホルモンとして考えられてきた心臓アルドステロンをAktシグナルを介した糖代謝制御ホルモンとして捉え、心臓局所におけるその合成調節と作用について糖濃度環境との関連を含めて検討する予定である。これらを通じて、糖がエネルギー源の中心となるような過酷な環境をもたらす不全心におけるRAAS活性化の生物学的意義を追究し、心不全のさらなる病態解明と、そこから導かれる新たな治療戦略の開発を展開するための研究基盤を確立する。

3. 研究の方法

(1) 心筋細胞におけるアルドステロンのAktシグナルを介した糖代謝制御機構に関する検討: 仔ラット培養心筋細胞(NRCM)を用い、アルドステロン短期刺激によるMR非依存性Aktシグナル活性化経路の詳細なメカニズムを追究した。

(2) アルドステロンによるAktシグナル短期活性化作用の病態生理学的意義: NRCMの過酸化水素による細胞障害モデルを使用し、アルドステロン短時間刺激がcell viabilityにどのような影響を及ぼすのか、MTS assayを用い、ミトコンドリア機能を指標に評価した。さらに、ラットのLangendorff摘出心灌流実験を用い、アルドステロン短時間刺激が虚血再灌流前後の心機能に及ぼす影響について検討した。

(3) 心筋細胞におけるアルドステロン産生調節機構(糖濃度との関わりを中心に): 副腎外アルドステロン産生機構の一つとして、心筋細胞における局所アルドステロン合成促進因子を検討した。NRCMを用い、様々な培養糖濃度でのアルドステロン合成酵素(CYP11B2)発現を

QRT-PCR法により検討した。

4. 研究成果

(1) 心筋細胞におけるアルドステロンのAktシグナルを介した糖代謝制御機構に関する検討: これまで我々はNRCMにおいてアルドステロンがAktシグナルを短期MR非依存性及び長期MR依存性に二相性に活性化することを報告した。本研究ではアルドステロンによるAktシグナル短期活性化作用の詳細なメカニズムを追究した。アルドステロン10分刺激により上昇したAkt-GSK3のリン酸化はPI3K阻害薬(wortmannin; Wm)やNHE阻害薬(EIPA)で抑制されたが、MR阻害薬(eplerenone; Epl)やグルココルチコイド受容体(GR)阻害薬(RU486)は有意な影響を及ぼさなかった。GRシグナルに関連してコルチコステロンの10分刺激でもAktリン酸化の有意な上昇は認められなかった。また、アルドステロン10分刺激はインスリン受容体を直接活性化する所見は認められなかった。以上から、アルドステロンはMRやGR非依存性にNHE-PI3Kを經由してAktシグナルを活性化することが分かった(図1)。

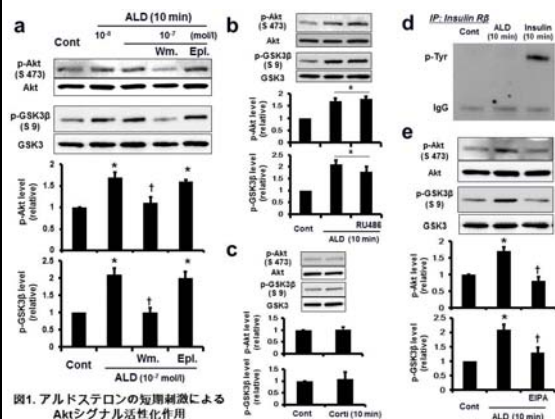


図1. アルドステロンの短期刺激によるAktシグナル活性化作用

(2) アルドステロンによるAktシグナル短期活性化作用の病態生理学的意義: アルドステロン短期刺激によるNHE-PI3K-Akt活性化作用の機能的意義をNRCMの過酸化水素による細胞障害モデルにて検討した。Cell viabilityをMTS assayにて評価したところ、アルドステロンによるMR非依存性PI3K依存性Akt活性化作用に伴う心筋保護作用は、過酸化水素10分刺激の段階から見受けられ、インスリン刺激による細胞保護効果と同程度に30分までに徐々に増強するも、60分の段階では有意な効果は認められなくなった(図2)。

これに引き続き、ラットのLangendorff摘出心灌流装置を用い、アルドステロンを虚血前短時間灌流することで、アルドステロン短期刺激の虚血再灌流障害に及ぼす影響について検討した。アルドステロン灌流はbaselineの心機能には有意な影響は及ぼさなかった。しかし、虚血再灌

流後の左室内圧回復率はアルドステロン灌流群で有意に改善される傾向がみられ、CPK 流出も有意に低下する所見が認められた。

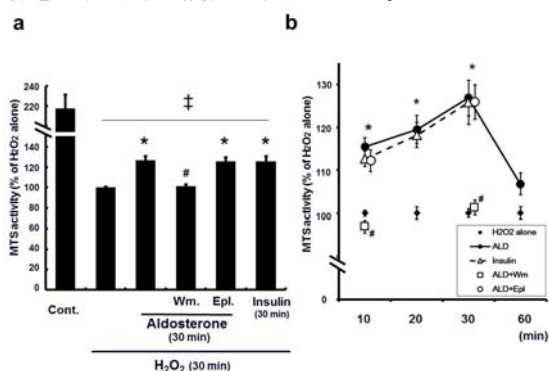


図2. アルドステロン短期刺激による心保護作用

(3) 心筋細胞におけるアルドステロン産生調節機構：高糖濃度環境が心筋細胞でのRAS活性化を促進する、という報告を受けて、培養糖濃度変化によるアルドステロン合成酵素であるCYP11B2の発現をQRT-PCRで検討した。NRCMを25mMの高糖濃度で培養したところ、CYP11B2の発現が5.5mMの糖濃度培養と比較し、有意に上昇した。心筋細胞におけるアルドステロン産生については意見が分かれているが、本研究ではアルドステロンの作用と同様、その局所における産生制御にも糖濃度環境が深く関わっていることが分かった。

本研究では心不全の病態生理において中心的な役割を担っていると考えられるアルドステロンの心筋における産生調節機構と心筋に対する直接的生理作用について、糖との関わりを中心に検討を行った。我々は心筋において糖濃度依存性に、組織アルドステロン産生が行われており、その刺激はインスリンシグナルを活性化し、長期的にはゲノム作用を介し悪影響を及ぼす一方で短期的には逆に非ゲノム作用を介し細胞保護的に働くことを*in vitro*及び*ex vivo*の実験系で示した。RAASと糖代謝は共に不全心で活性化される、いわば生体の防御反応的機構とも捉えられる。その架け橋としてのアルドステロンの役割を解明することで、不全心におけるRAAS活性化の病態生理学的意義を細胞内エネルギー代謝の観点から捉え、＜心臓組織アルドステロン＞の新たな概念を樹立することができるものとする。

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 14 件)

(1) Sekiyama H, Nagoshi T*, Komukai K, Matsushima M, Katoh D, Ogawa K, Minai K,

Ogawa T, Yoshimura M. Transient decrease in serum potassium level during ischemic attack of acute coronary syndrome: Paradoxical contribution of plasma glucose level and glycohemoglobin. *Cardiovasc Diabetol.* 2013;12:4 査読有
DOI: 10.1186/1475-2840-12-4

(2) 名越智古, 吉村道博. ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬. *Nihon Rinsho* 2013;71:594-597 査読無

(3) 吉野拓哉, 名越智古, 吉村道博. RAASの新たな展開. 循環器専門医 2013;21:9-15 査読無

(4) Nagoshi T*, Date T, Fujisaki M, Yoshino T, Sekiyama H, Ogawa K, Kayama Y, Minai K, Komukai K, Ogawa T, Yoshimura M. Biphasic Action of Aldosterone on Akt Signaling in Cardiomyocytes. *Horm Metab Res* 2012;44:931-937 査読有
DOI: 10.1055/s-0032-1316343

(5) Nagoshi T and Yoshimura M. The pathophysiological role of mineralocorticoid receptor in heart failure. *Jpn J Clin Pharm Therap* 2012;43(5):317-322 査読無

(6) Minai K, Komukai K, Arase S, Nagoshi T, Matsuo S, Ogawa K, Kayama Y, Inada K, Tanigawa SI, Takemoto T, Sekiyama H, Date T, Ogawa T, Taniguchi I, Yoshimura M. Cardiac tamponade as an independent condition affecting the relationship between the plasma B-type natriuretic peptide levels and cardiac function. *Heart Vessels* 2012 in press 査読有

(7) Anzawa R, Seki S, Nagoshi T, Taniguchi I, Feuvray D, Yoshimura M. The role of Na⁺/H⁺ exchanger in Ca²⁺ overload and ischemic myocardial damage in hearts from type 2 diabetic db/db mice. *Cardiovasc Diabetol.* 2012;11:33 査読有
DOI: 10.1186/1475-2840-11-33

(8) Nakane T, Kawai M, Komukai K, Kayama Y, Matsuo S, Nagoshi T, Minai K, Date T, Ogawa T, Yagi H, Yoshimura M. Contribution of extracardiac factors to the inconsistency between plasma b-type natriuretic peptide levels and the severity of pulmonary congestion on chest x-rays in the diagnosis of heart failure. *Intern. Med.* 2012;51:239-248 査読有

- (9) Komukai K, Minai K, Arase S, Ogawa T, Nakane T, **Nagoshi T**, Kayama Y, Abe Y, Morimoto S, Ogawa K, Fujii S, Sekiyama H, Date T, Kawai M, Hongo K, Taniguchi I, Yoshimura M. Impact of body mass index on clinical outcome in patients hospitalized with congestive heart failure. *Circ J*. 2012;76:145-151 査読有
- (10) **名越智古**、吉村道博. カリウム保持性利尿薬・選択的アルドステロン拮抗薬. *Medicina* 2012;49:80-81 査読無
- (11) **名越智古**、吉村道博. 心不全のエネルギー代謝: 糖代謝を中心に. *Circulation Up-to-Date* 2012;7:36-41 査読無
- (12) **名越智古**、吉村道博. 糖尿病と心不全. *Anti-aging Science* 2012;4:10-15 査読無
- (13) **Nagoshi T***, Yoshimura M, Rosano GM, Lopaschuk GD, Mochizuki S. Optimization of Cardiac Metabolism in Heart Failure. *Curr. Pharm. Des.* 2011;17:3846-3853 査読有
- (14) Yagi H, Kawai M, Komukai K, Ogawa T, Minai K, **Nagoshi T**, Ogawa K, Sekiyama H, Taniguchi I, Yoshimura M. Impact of chronic kidney disease on the severity of initially diagnosed coronary artery disease and the patient prognosis in the Japanese population. *Heart Vessels*.2011;26(4):370-8 査読有

〔学会発表〕 (計 4 件)

- (1) **Nagoshi T**, Yoshino T, Date T, Yoshimura M. Cardio-adrenal Interaction: Cross-talk of Aldosterone Cascade with Akt Signaling in Cardiomyocytes. Japanese Circulation Society 2013 **Plenary Session** 6-3 (PL06-5) 3/17/2013 at Yokohama
- (2) Yoshino T, **Nagoshi T**, Anzawa R, Katoh D, Fujisaki M, Kayama Y, Date T, Yoshimura M. Temporal and Protective Effects of Aldosterone Through a Mineralocorticoid Receptorindependent Akt Signaling Activatin in the Heart. *Circulation* 2012; Abstract 12195, American Heart Assosication 11/6/2012 at Los Angeles
- (3) **Nagoshi T**, Date T, Fujisaki M, Yoshino T, Sekiyama H, Ogawa K, Minai K, Komukai K, Ogawa T, Yoshimura M. Biphasic Character of Aldosterone in

Cardiomyocytes Through the Akt Signaling Activation. *Circulation* 2011;124: Abstract 11268, American Heart Assosication 11/14/2011 at Orlando

- (4) **Nagoshi T**, Date T, Yoshimura M. Novel, Nongenomic, and Protective Cascade of Aldosterone via Na⁺/H⁺ exchanger 1, PI3-kinase, and Akt Signaling in Cardiomyocytes. Japanese Circulation Society 2011 **Symposium** 11-5 (SY11-5) 8/4/2011 at Yokohama

〔図書〕 (計 2 件)

- (1) 加藤大介、**名越智古**、吉村道博. アルドステロンの心血管・代謝作用. *内分泌性高血圧 (最新医学別冊)* 最新医学社 2012, p116-124
- (2) **名越智古** 抗アルドステロン薬. *心不全の病態と薬の使い方* 中外医学社 2011:101-109

〔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 なし

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
名越 智古 (NAGOSHI TOMOHISA)
東京慈恵会医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 60408432
- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
なし