

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8月23日現在

機関番号：15301
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791058
 研究課題名（和文） BMP-6に着目したアルドステロン分泌の制御とその応用
 研究課題名（英文） Roles of bone morphogenetic protein-6 in aldosterone regulation by adrenocortical cells.
 研究代表者
 塚本 尚子（TSUKAMOTO NAOKO）
 岡山大学・岡山大学病院・助教
 研究者番号：90601302

研究成果の概要(和文)：「アルドステロンブレイクスルー現象」の発生メカニズムの詳細は現時点では不明である。今回の研究では、ラットを用いて内因性 BMP-6 阻害によるアルドステロン産生能の変化を *in vivo* にて検証した。BMP-6 抑制モデルを作成し、アルドステロン分泌能の変化および副腎組織でのアルドステロン合成酵素の発現変化を中心に検討した。結果として、*in vivo* における内因性の BMP-6 は、副腎皮質におけるアルドステロン産生能において1つのキーファクターであることが示された。

研究成果の概要(英文)： In the present study, we examined the *in vivo* role of BMP-6 in regulation of aldosterone by neutralizing endogenous BMP-6 in rats treated with immunization against BMP-6. It was suggested that endogenous BMP-6 is functionally linked to aldosterone synthesis in the adrenal cortex *in vivo*.

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	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：内分泌学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：内科学、内分泌、副腎、ステロイド、成長因子

1. 研究開始当初の背景

我々は最近、副腎皮質からのアルドステロン合成において Ang II と協調作用をもつ新規の因子として、副腎皮質の球状層を主体に発現する BMP-6 の存在について報告した。我々は、まず副腎皮質組織および細胞におい

て、TGF- β スーパーファミリーに属する成長因子である BMP-6 や activin のリガンド・受容体および結合蛋白を含む機能的 BMP/activin システムが存在することを証明した。次いで、アルドステロン産生能を有する副腎皮質 NCI-H295R 細胞を用いた検討

では、副腎皮質に発現する BMP-6 が Ang II によるアルドステロン産生を刺激し、一方で activin は ACTH によるアルドステロン産生を促進するという新しいアルドステロン分泌メカニズムについて明らかにした。さらに、BMP-6 が副腎皮質において、Ang II により活性化される MAPK 経路のリン酸化を促進して、アルドステロン合成酵素(CYP11B2)の転写・発現を誘導し、アルドステロンの分泌を増強することを明らかにした。この BMP-6 によるアルドステロン合成の増強作用は、K や ACTH でのアルドステロン合成刺激には影響しないことから、Ang II に特異的である。一方で、Ang II が副腎皮質の内因性 BMP-6 の発現を減弱させることも明らかとなり、Ang II と BMP-6 間にフィードバックの存在が示唆された。慢性的な Ang II 刺激下においてアルドステロン分泌能を評価する副腎細胞培養系での検討では、BMP-6 シグナルの活性化が ERK を増強して、ARB 投与にも関わらずアルドステロンの再上昇を惹起する可能性、つまりブレイクスルーの機序に副腎皮質に内在する BMP-6 作用の増強が関与している可能性が初めて示された

2. 研究の目的

これまでの我々のデータから推察して、BMP-6 は高血圧治療時に問題となるアルドステロンブレイクスルー現象にも関与している可能性がある。本研究期間では、食塩感受性高血圧に強く関連するアルドステロン分泌機構の探求を通じてブレイクスルー現象の分子機序に着目し、*in vitro/in vivo* の両研究によりアルドステロン分泌調節の分子機序を探求し食塩感受性高血圧の発生機序に迫る。本研究では、食塩感受性高血圧の鍵となる副腎アルドステロン調節機序の解明

を目的とし、副腎皮質に発現する局所因子でありアルドステロン合成・分泌において Ang II との協調作用を示す BMP-6 の生理的役割に焦点を当てる。

3. 研究の方法

ラット (male Sprague-Dawley rats) を用いて、内因性 BMP-6 阻害によるアルドステロン産生能の変化を *in vivo* にて検証した。ラットに BMP-6-KLH ハプテン:rat BMP-6 (mature domain: QSQDVSRGSSASDYN, 15 amino acids) antigen conjugated with keyhole limpet hemocyanin (KLH) at the C-terminus (Sigma-Genosys Japan)を連続的に皮下投与して、能動免疫法によって BMP-6 抑制モデルを作成したのち、アルドステロン分泌能の変化および副腎組織でのアルドステロン合成酵素の発現変化を中心に検討した。

4. 研究成果

BMP-6-KLH およびコントロール-KLH 投与によるラット体重・副腎重量・腎重量に変化を認めなかった。また、BMP-6-KLH 投与群において、血清中に抗 BMP-6 抗体を検出した。尿中アルドステロン排泄量は、BMP-6 抑制群において、投与 8 週までに有意に減少した。しかしながら、Ang II 投与ラットでは、BMP-6 抑制による尿中アルドステロン分泌の抑制作用は減弱した。この機序を検討したところ、BMP-6 を抑制したラット副腎において、アルドステロン合成酵素 CYP11B2 mRNA レベルの有意な抑制を認めた。また、尿中のアルドステロン排泄量と副腎における CYP11B2 の発現レベルは正の相関を呈した。さらに、BMP-6-KLH 投与ラットにおける血漿中のアルドステロン (Aldo) とコルチコステロン (B) は有意な変化を示さなかったが、Aldo/ B 比

は、BMP-6 抑制群において有意な低下を認めた。

これらの結果を通じて、in vivo における内因性の BMP-6 は、副腎皮質におけるアルドステロン産生能において1つのキーファクターであることが示された。この BMP-6 によるアルドステロン分泌への影響は、Ang II の処理下では減弱することから、我々の以前の in vitro での副腎皮質細胞での結果、つまり Ang II 作用下では BMP-6/BMP 受容体シグナルが減弱することと矛盾しないものと考えられた。

アルドステロンによる臓器障害の抑止は高血圧治療の重要な課題である。臨床で問題となるアルドステロンブレイクスルー現象の発生機序にアプローチすることで、食塩感受性高血圧の治療においてアルドステロンを効果的に制御できる ARB/ACEI 薬剤の選択指針を明らかにし、降圧薬治療への反応性・抵抗性の新たな指標を探索したいと考えている。また副腎に発現する BMP-6 および関連因子を血中・genome において決定することで、食塩感受性高血圧やブレイクスルー発生の指標とするための臨床応用を目指し、さらに検討を重ねている。

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10件)

① Matsumoto Y, Otsuka F, Takano-Narazaki M, Katsuyama T, Nakamura E, Tsukamoto N, Inagaki K, Sada KE, Makino H. Estrogen facilitates osteoblast differentiation by upregulating bone morphogenetic protein-4 signaling. *Steroids*. 査読有, 78, 2013, 513-520.

② Nakamura E, Otsuka F, Inagaki K, Tsukamoto N, Ogura-Ochi K, Miyoshi T, Toma K, Takeda M, Makino H. Involvement of bone morphogenetic protein activity in somatostatin actions on ovarian steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 査読有, 134, 2013, 67-74.

③ Matsumoto Y, Otsuka F, Inagaki K, Tsukamoto N, Takano-Narazaki M, Miyoshi T, Nakamura E, Ogura-Ochi K, Takeda M, Makino H. An in vivo role of bone morphogenetic protein-6 in aldosterone production by rat adrenal gland. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 査読有, 132, 2012, 8-14.

④ Miyoshi T, Otsuka F, Nakamura E, Inagaki K, Ogura-Ochi K, Tsukamoto N, Takeda M, Makino H. Regulatory role of kit ligand-c-kit interaction and oocyte factors in steroidogenesis by rat granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol*. 査読有, 358, 2012, 18-26.

⑤ Suzuki J, Otsuka F, Matsumoto Y, Inagaki K, Miyoshi T, Takeda M, Tsukamoto N, Nakamura E, Ogura K, Makino H. Enhanced expression of bone morphogenetic protein system in aldosterone-treated mouse kidneys. *Hypertens Res*. 査読有, 35, 2012, 312-7.

⑥ Nakamura E, Otsuka F, Inagaki K, Miyoshi T, Matsumoto Y, Ogura K, Tsukamoto N, Takeda M, Makino H. Mutual regulation of growth hormone and bone morphogenetic protein system in steroidogenesis by rat granulosa cells. *Endocrinology*. 査読有, 153, 2012, 469-80.

⑦ Otsuka F, Tsukamoto N, Miyoshi T, Iwasaki Y, Makino H. BMP action in the pituitary: its possible role in modulating

somatostatin sensitivity in pituitary tumor cells. Mol Cell Endocrinol. 査読有, 349, 2012, 105-10.

⑧ Takano M, Otsuka F, Matsumoto Y, Inagaki K, Takeda M, Nakamura E, Tsukamoto N, Miyoshi T, Sada KE, Makino H. Peroxisome proliferator-activated receptor activity is involved in the osteoblastic differentiation regulated by bone morphogenetic proteins and tumor necrosis factor- α . Mol Cell Endocrinol. 査読有, 348, 2012, 224-32.

⑨ Takeda M, Otsuka F, Takahashi H, Inagaki K, Miyoshi T, Tsukamoto N, Makino H, Lawson MA. Interaction between gonadotropin-releasing hormone and bone morphogenetic protein-6 and -7 signaling in L β T2 gonadotrope cells. Mol Cell Endocrinol. 査読有, 348, 2012, 147-54.

⑩ Tsukamoto N, Otsuka F, Miyoshi T, Inagaki K, Nakamura E, Terasaka T, Takeda M, Ogura T, Iwasaki Y, Makino H. Functional interaction of bone morphogenetic protein and growth hormone releasing peptide in adrenocorticotropin regulation by corticotrope cells. Mol Cell Endocrinol. 査読有, 344, 2011, 41-50.

[学会発表] (計6件)

① 塚本尚子、筋強直性ジストロフィー合併原発性副甲状腺機能亢進症の一例、第21回臨床内分泌代謝 Update、2013年1月18日、大宮ソニックシティ

② 塚本尚子、コルチコトロープ細胞における ACTH 分泌調節に及ぼすメラトニンと BMP-4 の役割、第39回日本神経内分泌学会、2012年9月28日、北九州国際会議場 (YIA

受賞)

③ 塚本尚子、下垂体コルチコトロープにおける ACTH 分泌制御機構 : GHRP/CRH と BMP-4 の機能関連、第85回日本内分泌学会学術総会、2012年4月21日、名古屋国際会議場

④ 塚本尚子、妊娠・出産の経過中に検出されたマクロプロラクチン血症の一例、第21回臨床内分泌代謝 Update、2012年1月28日、アクトシティ浜松

⑤ 塚本尚子、GHRP-2 による ACTH 分泌調節機序の検討と BMP-4 の関与、第38回日本神経内分泌学会、2011年11月25日、都道府県会館

⑥ Naoko Tsukamoto, A Novel Interaction of Bone Morphogenetic Protein and Growth Hormone-Releasing Peptide in Regulating Adrenocorticotropin Production by Corticotrope Cells, ENDO2011, June 4 2011, Boston Convention Center (USA) .

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚本 尚子 (TSUKAMOTO NAOKO)
岡山大学・岡山大学病院・助教
研究者番号 : 90601302