

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790952

研究課題名(和文) 糖尿病における糖鎖修飾を介したミネラルコルチコイド受容体活性化機構の解明

研究課題名(英文) The mechanism of mineralocorticoid receptor activation through posttranslational modifications by sugar in diabetes mellitus.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、高血圧や心血管障害に関わるミネラルコルチコイド受容体(MR)が糖鎖修飾(O-GlcNAc修飾)を受けること、さらに本修飾がMRの蛋白発現量と転写活性の調節に重要な役割を果たしていることを、細胞および動物実験によって初めて解明した。糖尿病では、本修飾の増加によってMR蛋白が安定化し、アルドステロンへの感受性が亢進する。これにより血漿アルドステロン濃度の高低に関わらず、臓器障害が進行しやすい状態になると考えられる。本研究結果は、糖尿病に合併する高血圧や腎症、心血管系合併症の病態の一部を説明するものであり、糖尿病におけるMR拮抗薬の積極的な使用を支持する新たな根拠になりうると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We showed for the first time that the mineralocorticoid receptor (MR), which is strongly associated with hypertension and cardiovascular damage, is a target for O-GlcNAc modification, one of posttranslational modifications by sugar. Our results indicate that high glucose conditions enhance O-GlcNAc modification of MR, which is associated with increased MR levels and its transcriptional activities in vitro and in vivo. Based on our results, MR is supposed to be pathologically activated even in the absence of increased circulating levels of aldosterone and the sensitivity of MR to aldosterone is upregulated in diabetes mellitus.

Our findings provide a new evidence for the efficacy of MR antagonists on resistant hypertension, nephropathy and cardiovascular diseases associated with diabetes mellitus in molecular levels.

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：ミネラルコルチコイド受容体 アルドステロン 高血圧 糖尿病 糖鎖修飾

## 1. 研究開始当初の背景

RALES 試験 (Pitt, N Engl J Med, 1999) により、心不全患者におけるスピロノラクトン投与の生命予後改善効果が示されて以来、アルドステロンすなわちミネラルコルチコイド受容体 (MR) 作用を介した心腎血管系の臓器障害作用に高い注目が集まるようになった。この動向を受けて、ここ 10 数年、心腎血管予後改善における MR 拮抗薬の有用性を支持する研究成果が、国内・国外で数々報告されている。糖尿病に合併した臓器障害においては、MR 拮抗薬の有用性を示す報告 (Mehdi, J Am Soc Nephrol, 2009) が複数ある一方、糖尿病性腎症が低レニン・低アルドステロン血症の病態を背景に持つことから高 K 血症を来たすリスクが懸念され、糖尿病症例に対する MR 拮抗薬の投与に否定的な見解も多く見られている。このように糖尿病例に対する MR 拮抗薬の投与に関しては両面の意見があり、糖尿病における MR 活性の変化とそれが病態に及ぼす意義については十分な解明がなされていなかった。

我々は、糖尿病のように高アルドステロン血症を呈さない場合でも MR 拮抗薬が有用である病態を「MR 関連高血圧」という新しい概念で提唱している。この病態の一つの機序として、MR の発現量増加や翻訳後蛋白修飾によるアルドステロン感受性の亢進が推定される。糖尿病に関連する翻訳後蛋白修飾としては、糖鎖修飾の 1 つである O-linked-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) 修飾が知られており、2 型糖尿病の病態を形成する様々な転写因子の発現調節に関わることが報告されている。高グルコース環境は細胞質および核タンパク質の O-GlcNAc 化を誘導する。O-GlcNAc 修飾の標的タンパクとしては、FoxO の他に、エストロゲン受容体などステロイドホルモン受容体も報告されている (Jiang, J Biol Chem, 1997) が、MR の糖鎖修飾 (O-GlcNAc 化) については既報がない。我々は、「糖尿病において、高血糖状態によって誘導される MR の O-GlcNAc 修飾が MR のアルドステロン感受性を亢進させ、臓器障害の加速を招く」という仮説を立て、その検証を行うこととした。

## 2. 研究の目的

本研究は、糖尿病において MR が病的に活性化されているか否か、さらには高血糖状態がどのような機序で MR 活性を変化させ、臓器障害を惹起しうるかを解明することを目的とし、MR の O-GlcNAc 修飾について検討を行った。

## 3. 研究の方法

- (1) 高グルコース負荷および O-GlcNAc レベルの変化時における MR 発現量と転写活

性の評価: MR を導入した COS7 細胞, HEK293 細胞を 5-30 mM glucose 培地で培養し、O-GlcNAc 修飾を促進する PUGNAc 処置や O-GlcNAc transferase (OGT) 過剰発現、同修飾を抑制する 6-diazo-5-oxo-L-norleucin (DON) 処置、O-GlcNAcase (OGA) 過剰発現を行った。回収した細胞を用いて luciferase assay, 定量 RT-PCR, western blot を行った。

- (2) MR の O-GlcNAc 修飾の検出と修飾残基の同定: 免疫共沈降法により Flag-MR 蛋白を精製し、in vitro での OGT 反応生成物を質量分析法 (LC-MS/MS) により修飾残基を同定した。O-GlcNAc 修飾残基特異的なアミノ酸変異体を作成し、(1)と同様の試薬処置を行い、MR の発現量変化を観察した。
- (3) 2 型糖尿病モデルでの MR 発現量に関する検討: *db/db* マウス (9 週齢, n=11)、対照群の *db/+* マウス (9 週齢, n=10) について、腎、大腸組織における MR 蛋白発現量、O-GlcNAc レベル、MR 標的遺伝子の mRNA 量を検討した。
- (4) 2 型糖尿病モデルに対する O-GlcNAc 修飾阻害薬の投与と実験: *db/db* マウス (9 週齢) に DON 3 μg/kg を 5 日間投与し、腎組織における MR 蛋白発現量、O-GlcNAc レベル、MR 標的遺伝子の mRNA 量を検討した。

## 4. 研究成果

- (1) 高グルコース負荷および O-GlcNAc レベルの変化時における MR 発現量と転写活性の評価: 30 mM グルコース、PUGNAc 処置、OGT 過剰発現により  $10^{-10}$ M アルドステロンを介した MR 転写活性は 1.3-3 倍上昇し、MR 標的遺伝子 *SGK1* の mRNA と MR 蛋白発現量は有意に増加した。一方、DON 処置、OGA 過剰発現により MR 転写活性は約 75% 低下し MR 蛋白発現量は減少した。
- (2) MR の O-GlcNAc 修飾の検出と修飾残基の同定: 野生型 MR の O-GlcNAc 修飾は 30 mM グルコース処置で増強し、LC-MS/MS 解析により MR の 295-307 アミノ酸の O-GlcNAc 修飾が示された。この領域内のセリン残基の変異体のうち、S295A MR, S298A MR, S299A MR で O-GlcNAc 修飾の減少とともに蛋白発現量の減少を認め、これらの転写活性は野生型の 20-60% に低下していた。また、これらの変異体では蛋白のコピキチン化が亢進していることが免疫沈降法により示された。以上より、上記 3 残基の O-GlcNAc 修飾が MR の蛋白安定化に関わり、MR の転写活性を正の方向に調節していることが示された。
- (3) 2 型糖尿病モデルでの MR 発現量に関する検討: 血糖値は  $122 \pm 21$  vs  $443 \pm 91$  mg/dl, 血圧は  $106 \pm 21$  vs  $149 \pm 4$  mmHg (対照群: *db/db* 群, mean  $\pm$  SD) と、*db/db* 群で有意に高値であった。*db/db* 群では腎組織の

0-GlcNAc レベルの増加とともに MR 蛋白発現量が対照群の 2.5 倍に増加しており、MR 標的遺伝子 *SGK1* の mRNA が有意に増加していた。MR の mRNA レベルは両群で差がなく、MR の発現量が蛋白レベルで調節されていることが示唆された。なお、既報にて *dbl/db* マウスの血漿アルドステロン濃度は対照群と差がないことが報告されている。

- (4) 2 型糖尿病モデルに対する 0-GlcNAc 修飾阻害薬の投与実験：DON 投与群では、対照群と比較して腎組織の 0-GlcNAc レベルが抑制されるとともに、MR 蛋白発現量の有意な減少を認めた。MR の mRNA レベルは DON 非投与群と投与群で同等であった。

本研究により、MR の 0-GlcNAc 修飾が MR の蛋白発現量の調節を介してその転写活性の制御に重要な役割を果たすことが初めて解明された。糖尿病においては、高血糖を介した 0-GlcNAc 修飾の増加により MR 蛋白が安定化し、アルドステロン感受性が亢進することが *in vitro* および *in vivo* において示された。本研究によって明らかとなった糖尿病における MR 活性亢進の新たな分子機序は、現在、糖尿病症例に対する使用が限定されている MR 拮抗薬の積極的な使用を支持する根拠になると考えられ、実地臨床に還元可能な極めて重要な発見である。

今後は遺伝子改変動物を作成し、腎尿細管や糸球体における MR の 0-GlcNAc 修飾の意義について、さらに研究を進めていく。また糖尿病例に対する MR 拮抗薬の投与の有効性についての臨床研究（糖尿病例と非糖尿病例における MR 拮抗薬に対する感受性の差異についての評価など）を行いたいと考えている。

#### 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 1 件)

- (1) 栗原 勲、伊藤 裕 ハイリスク患者の血圧コントロール不良例 糖尿病合併例への対処と留意点、治療、査読なし、94、2012、1264-1270

[学会発表](計 12 件)

- (1) 城 理絵、栗原 勲、柴田洋孝、伊藤 裕 「ミネラルコルチコイド受容体 (MR) の翻訳後修飾による活性化機構 - 糖尿病と MR 関連高血圧-」 第 8 回炎症・脂質代謝・メタボリサーチフォーラム、2014.2.22 (東京)
- (2) 柴田 洋孝、栗原 勲、横田 健一、城 理絵、林 毅、三石 木綿子、大山 貴子、

中村 俊文、伊藤 裕 「ステロイドホルモンと生活習慣病 ミネラルコルチコイド受容体関連高血圧と臓器障害」 第 21 回日本ステロイドホルモン学会、2013.11.16 (大阪)

- (3) 柴田 洋孝、栗原 勲、横田 健一、城 理絵、林 毅、三石 木綿子、大山 貴子、中村 俊文、伊藤 裕 「レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系研究の最先端治療抵抗性高血圧とミネラルコルチコイド受容体」 第 36 回日本高血圧学会総会、2013.10.24-26 (大阪)
- (4) Jo R, Shibata H, Kurihara I, Yokota K, Murai-Takeda A, Mitsuishi Y, Hayashi T, Ohyama T, Nakamura T, Itoh H  
“Mineralocorticoid receptor is pathologically activated through its 0-GlcNAc modification in hyperglycemic conditions.” International symposium of aldosterone and related substances in hypertension 2013, 2013.4.28 (仙台)
- (5) 三石 木綿子、柴田 洋孝、栗原 勲、横田 健一、武田 彩乃、林 毅、城 理絵、大山 貴子、中村 俊文、伊藤 裕 「上皮成長因子受容体を介したミネラルコルチコイド受容体活性化機構」 第 86 回日本内分泌学会総会、2013.4.25-27 (仙台)
- (6) 林 毅、柴田 洋孝、栗原 勲、横田 健一、武田 彩乃、三石 木綿子、城 理絵、大山 貴子、中村 俊文、伊藤 裕 「糖尿病におけるプロテインキナーゼ C(PKC)シグナルによるミネラルコルチコイド受容体(MR)活性化機構」 第 86 回日本内分泌学会総会、2013.4.25-27 (仙台)
- (7) 城 理絵、柴田 洋孝、栗原 勲、横田 健一、武田 彩乃、三石 木綿子、林 毅、大山 貴子、中村 俊文、伊藤 裕 「糖尿病におけるミネラルコルチコイド受容体(MR)の糖鎖修飾による活性化機構」 第 86 回日本内分泌学会総会、2013.4.25-27 (仙台)
- (8) Takeshi Hayashi, Hirotaka Shibata, Isao Kurihara, Yuko Mitsuishi, Ayano Murai-Takeda, Rie Jo, Takako Ohyama, Hiroshi Itoh “Protein Kinase C Beta Plays an Important Role in High Glucose - Induced Stabilization of Mineralocorticoid Receptor.” The Endocrine Society's 94th Annual Meeting & Expo. 2012.6.26 (Houston, US)
- (9) Takeshi Hayashi, Hirotaka Shibata, Isao Kurihara, Yuko Mitsuishi, Ayano Murai-Takeda, Rie Jo, Takako Ohyama, Hiroshi Itoh “High glucose induces stabilization of mineralocorticoid receptor through the activation of

protein kinase C beta.” 38th Annual Meeting of the International Aldosterone Conference. 2012.6.22 (Houston, US)

- (10) 城 理絵、柴田 洋孝、栗原 勲、横田 健一、武田 彩乃、三石 木綿子、林 毅、本杉 裕一郎、大山 貴子、伊藤 裕  
「高グルコース環境におけるミネラルコルチコイド受容体の糖鎖修飾とアルドステロン感受性の変化」第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会、2012. 5. 17( 横浜)
- (11) 城 理絵、柴田 洋孝、栗原 勲、横田 健一、武田 彩乃、三石 木綿子、林 毅、本杉 裕一郎、大山 貴子、伊藤 裕  
「高グルコース環境におけるアルドステロンの作用増強機構-ミネラルコルチコイド受容体の糖鎖修飾の役割-」第 85 回日本内分泌学会総会、2012.4.21 ( 名古屋)
- (12) 林 毅、柴田洋孝、栗原 勲、横田 健一、武田彩乃、三石木綿子、城 理絵、大山貴子、伊藤 裕「高グルコース刺激による PKC シグナルの活性化はミネラルコルチコイド受容体(MR)の蛋白量を増加させ、MR の転写活性化をきたす」第 85 回日本内分泌学会学術総会、2012.4.20 ( 名古屋)

〔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〕

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

栗原 勲 (Kurihara Isao)  
慶應義塾大学・医学部・講師