

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461397

研究課題名(和文)生活習慣病におけるアルドステロンによる治療抵抗性高血圧の発症機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of mechanisms of aldosterone-induced resistant hypertension in life style-related diseases

研究代表者

柴田 洋孝 (Shibata, Hirotaka)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：20245484

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病は慢性的な高血糖状態から血管障害をきたすが詳細な分子機構は不明である。本研究では、高血糖はミネラルコルチコイド受容体(MR)のN末端領域の糖鎖修飾(O-GlcNAc修飾)を介してユビキチン-プロテアソーム系による蛋白分解を抑制するためにMR蛋白発現レベルが上昇することにより、MR転写活性化をきたすことが明らかとなった。糖尿病における治療抵抗性高血圧や臓器障害がMR拮抗薬により改善することが知られているが、本研究の結果、高血糖によりアルドステロンレベルとは独立して、MR蛋白の安定化による発現レベルの上昇が糖尿病の腎障害に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Chronic hyperglycemia results in multiple vascular complications in diabetes mellitus; however, the precise mechanisms are unknown. The present study showed that hyperglycemia induces O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) modification of mineralocorticoid receptor (MR) at the N-terminus, which is followed by elevation of MR protein levels due to inhibition of the ubiquitin-proteasome pathway-mediated protein degradation, thus resulting in MR transactivation. The pathological MR stabilization may be involved in renal dysfunction in type 2 diabetes mellitus.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：アルドステロン 糖尿病 ミネラルコルチコイド受容体

1. 研究開始当初の背景

アルドステロンは、電解質および血圧調節に関わるミネラルコルチコイドであり、食塩摂取量によりアルドステロン分泌調節が行われる。通常、食塩摂取量が過剰になるとアルドステロン分泌は抑制されるが、その抑制が欠如している原発性アルドステロン症は近年、高血圧症の5%~15%を占め、心血管疾患の罹患率が高いことが示されている。一方、肥満、睡眠時無呼吸症候群、糖尿病、慢性腎臓病などの生活習慣病では、治療抵抗性高血圧を呈する例が多く、ミネラルコルチコイド受容体(MR)拮抗薬の投与が有効である。このように、血中アルドステロン濃度が正常でも、MR活性化により治療抵抗性高血圧や臓器障害をきたすこのような病態を「MR関連高血圧」として提唱してきた。一方、高血糖状態では、グルコースが細胞内にとりこまれた後に、ヘキソサミン合成系により

UDP-N-acetylglucosamine が合成され、多様な蛋白質が O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc)修飾を受けることが合併症に関わっていることが報告されている。そこで、本研究では高血糖状態における MR 蛋白質の O-GlcNAc 修飾と転写活性化の関連について検討を行った。

2. 研究の目的

本研究では、MR 関連高血圧の1つの糖尿病の高血糖状態において、MR 活性化の分子機構を *in vitro* および *in vivo* で明らかにするために、次の3つを目的とした。

(1) 高グルコース条件下における MR 発現レベル、MR 転写活性および O-GlcNAc 修飾

(2) MR の O-GlcNAc 修飾残基の同定および変異体作成による O-GlcNAc 修飾の意義の検討

(3) 2型糖尿病モデル db/db マウスを用いた MR O-GlcNAc 修飾と MR シグナルの検討

3. 研究の方法

(1) 高グルコース条件下における MR 発現

レベルおよび O-GlcNAc 修飾の検討

MR 安定発現細胞株 HEK293-MR を 5mM または 30mM グルコースで培養して、Western blot および免疫共沈降法により MR や MR-O-GlcNAc 修飾レベルを検討した。また、HEK293 細胞に MR 発現プラスミド、MR 応答性レポーター(3xMRE-E1b-luciferase)を過剰発現し、 10^{-10} M aldosterone, PUGNAc (O-GlcNAc 修飾刺激薬)、DON (O-GlcNAc 修飾阻害薬)を用いて処置した。

(2) MR の O-GlcNAc 修飾および O-GlcNAc 修飾残基の同定

MR の O-GlcNAc 修飾は、MR および O-GlcNAc 抗体を用いた免疫共沈降法を用いた。MR の種々の欠失変異体(AF-1a, AF-1b, ID domain)を用いて、同様の免疫共沈降法により MR の O-GlcNAc 修飾を受けるドメインを絞り込んだ。さらに、FLAG-MR 蛋白質をアフィニティカラムで精製後、*in vitro* O-GlcNAc 修飾反応を行い、得られた生成物を LC-MS/MS にて修飾残基の同定を行った。さらに、O-GlcNAc 修飾残基のセリンをアラニンに変異させたプラスミドを作成し、各変異 MR 蛋白質の発現レベルや転写活性を検討した。

(3) 糖尿病モデルマウス db/db における MR シグナルの検討

2型糖尿病モデルマウスとして db/db を用い、対照は db/+を用いた。腎組織を摘出し、MR や total O-GlcNAc, sgk1 レベルを Western blot にて検討した。

4. 研究成果

(1) 高グルコース条件下における MR 発現レベルおよび O-GlcNAc 修飾の検討

HEK293-MR 細胞の培地中グルコース濃度は 5mM において、MR 蛋白質レベルはアルドステロン処置で著明に減少し、PUGNAc 処置で増加、DON 処置で減少を認めた。30mM グルコース濃度下では、それらの MR 蛋白質レベルが 5mM の時と比べて増加を認めた(図1)。

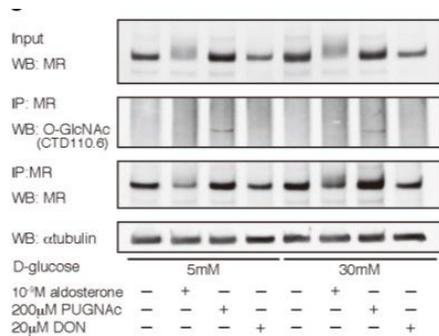


図1 培地中グルコース濃度によるMR蛋白レベルおよびO-GlcNAc修飾レベルの検討

(2) MRのO-GlcNAc修飾およびO-GlcNAc修飾残基の同定

MRのO-GlcNAc修飾は、通常培養条件下では検出できず、PUGNAc処置で刺激した時に検出され、DON処置で消失した(図1)。

MRの転写活性について、レポーターアッセイで検討した結果、10⁻¹⁰Mアルドステロンで約20倍の転写活性化を認め、25mMグルコース条件下では、その約3倍の増強を認めた(図2A)。さらに、PUGNAc処置で増強し、DON処置で減弱を認めた(図2B)。

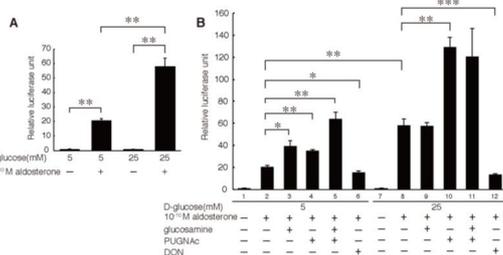


図2 A. 培地中グルコース濃度によるMR転写活性、B. 培地中グルコース濃度、O-GlcNAc修飾の変化によるMR転写活性

(3) 糖尿病モデルマウスdb/dbにおけるMRシグナルの検討

糖尿病モデルとしてdb/dbマウスおよび対照マウスdb/+を用いて腎臓組織におけるMRシグナルを検討した。高血糖を示すdb/dbマウス腎臓ではMR蛋白レベルが約2倍に上昇を認め、DON処置で内因性O-GlcNAc修飾を抑制すると対照レベルに減少した。さらに、MRの下流のSgk1蛋白レベルもMR蛋白レベルと並行した変化を認めた(図3)。MR mRNAレベルは群間の差を認めなかった。

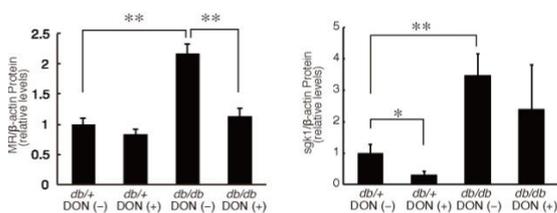


図3 db/dbおよびdb/+マウスにおけるMRシグナル

以上の結果より、高グルコース条件下ではアルドステロンによるMR転写活性化が約2~3倍に増強されることが示された。その分子機構としては、アルドステロンの受容体であるMR蛋白がO-GlcNAc修飾を受けることにより、ユビキチン-プロテアソーム系による蛋白分解が抑制されて、病的に安定化することが主な機序として示された。実際に、糖尿病モデルマウスのdb/dbの腎臓組織において、MR蛋白レベルの増加を介して、Sgk1蛋白が並行して増加することが糖尿病における腎障害に関わっていることが示された。

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)

Nishimoto K, Seki T, Kurihara I, Yokota K, Omura M, Nishikawa T, Shibata H, Kosaka T, Oya M, Suematsu M, Mukai K. Case report:

Nodule development from subcapsular aldosterone-producing cell clusters causes

hyperaldosteronism. J Clin Endocrinol Metab, 査読有、2016、101: 6-9, DOI:

10.1210/jc.2015-3285

Funder JW, Carey RM, Mantero F, Murad MH, Reincke M, Shibata H, Stowasser M, Young WF Jr. The management of primary aldosteronism:

case detection, diagnosis, and treatment: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline.

J Clin Endocrinol Metab、査読有、2016、101: 1889-1916, DOI: 10.1210/jc.2015-4061

Yang J, Fuller PJ, Morgan J, Shibata H, Clyne CD, Young MJ. GEMIN4 functions as a coregulatory of the mineralocorticoid receptor.

J Mol Endocrinol, 査読有、2015、54: 149-160, DOI: 10.1530/JME-14-0078

Ozaki T, Maeshima K, Kiyoga Y, torigoe M, Imada C, Hamasaki H, Haranaka M, Ishii K, Shibata H. Large-vessel involvement in granulomatosis with polyangiitis successfully treated with rituximab: a case report and

literature review Mol Rheumatol, 査読有、2015、2: 1-6, DOI: なし

Wei H, Chiba S, Moriwaki C, Kitamura H, Ina K, Aosa T, Tomonari K, Gotoh K, Masaki T, Katsuragi I, Noguchi H, Kakuma T, Hamaguchi K, Shimada T, Fujikura Y, Shibata H. A clinical approach to brown adipose tissue in the para-aortic area of the human thorax. *PLoS One*, 査読有、2015, 10: e0122594, DOI: 10.1371/journal.pone.0122594

Moriwaki C, Chiba S, Wei H, Aosa T, Kitamura H, Ina K, Shibata H, Fujikura Y. Distribution of histaminergic neuronal cluster in the rat and mouse hypothalamus. *J Chem Neuroanat*, 査読有、2015, 68: 1-13, DOI: 10.1016/j.jchemneu.2015.07.001

Aoki K, Teshima Y, Kondo H, Saito S, Fukui A, Fukunaga N, Nawata T, Shimada T, Takahashi N, Shibata H. Role of indoxyl sulfate as a predisposing factor for the atrial fibrillation in renal dysfunction. *J Am Herat Assoc*, 査読有、2015, 4: e002023, DOI: 10.1161/JAHA.115.00203

Aosa T, Chiba S, Kitamura H, Ina K, Tatsukawa S, Moriwaki C, Wei H, Gotoh K, Masaki T, Kakuma T, Shibata H, Fujikura Y. Pore alterations of the endothelial lining of rat fenestrated intestinal capillaries exposed to acute stress. *Histol Histopathol*, 査読有、2015, Jan 5, 11716, epub ahead of print, DOI: なし

Yang J, Fuller PJ, Morgan J, Shibata H, McDonnell DP, Clyne CD, Young MJ. Use of phage display to identify novel mineralocorticoid receptor-interacting proteins. *Mol Endocrinol*, 2014, 査読有、28: 1571-1584, DOI: 10.1210/me.2014-1101

Kiyonaga Y, Maeshima K, Imada C, Haranaka M, Ishii K, Shibata H. Steroid-sparing effects of etanercept in a patient with steroid-dependent adult-onset Still's disease. *Intern Med*, 2014, 査読有、53: 1209-1213, DOI: なし

Hattori S, Miyajima A, Hirasawa Y, Kikuchi E,

Kurihara I, Miyashita K, Shibata H, Nakagawa K, Oya M. Surgical outcome of laparoscopic surgery, including laparoendoscopic single-site surgery for retroperitoneal paraganglioma compared with adrenal pheochromocytoma. *J Endourol*, 2014, 査読有、28: 686-692, DOI: 10.1089/end.2013.0706

Hirasawa Y, Miyajima A, Hattori S, Miyashita K, Kurihara I, Shibata H, Kikuchi E, Nakagawa K, Oya M. Laparoendoscopic single-site adrenalectomy versus conventional laparoscopic adrenalectomy: a comparison of surgical outcomes and an analysis of a single surgeon's learning curve. *Surg Endosc*. 2014, 査読有、28: 2911-9, DOI: 10.1007/s00464-014-3553-3.

Mitsutomi K, Masaki T, Shimasaki T, Gotoh K, Chiba S, Kakuma T, Shibata H. Effects of a nonnutritive sweetener on body adiposity and energy metabolism in mice with diet-induced obesity. *Metabolism*, 2014, 査読有、63: 69-78, DOI: 10.1016/j.metabol.2013.09.002

Hasegawa M, Miyajima A, Jinzaki M, Maeda T, Takeda T, Kikuchi E, Shibata H, Oya M. Visceral fat is correlated with prolonged operative time in laparoendoscopic single-site adrenalectomy and laparoscopic adrenalectomy. *Urology*, 2013, 査読有、82: 1312-1318, DOI: 10.1016/j.urology.2013.05.0603

〔学会発表〕(計20件)

柴田洋孝、原発性アルドステロン症の診療ガイドラインとエキスパートオピニオン、第88回日本内分泌学会学術総会、2015年4月23日～4月25日、ホテルニューオータニ(東京都千代田区)

柴田洋孝、アルドステロンを標的として肥満・高血圧の治療～N型Ca拮抗薬の隠し味～、第88回日本内分泌学会学術総会、2015年4月23日～4月25日、ホテルニューオータニ(東京都千代田区)

柴田洋孝、糖尿病合併高血圧患者におけるCCBの可能性 - MR拮抗作用を含めて -、第58回日本腎臓学会学術総会、2015年6月7日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

柴田洋孝、メタボリックシンドロームに対

する MR 拮抗薬の有用性、第 119 回日本循環器学会近畿地方会、2015 年 6 月 20 日、大阪国際会議場（大阪府大阪市）

柴田洋孝、メタボ型高血圧を合併した心不全に Ca 拮抗薬は有効か？、第 19 回日本心不全学会学術総会、2015 年 10 月 22 日～10 月 24 日、グランフロント大阪コンベンションセンター（大阪府大阪市）

柴田洋孝、MR 拮抗薬の現状と今後の展開、第 38 回日本高血圧学会学術総会、2015 年 10 月 9 日～10 月 11 日、愛媛県県民文化会館（愛媛県松山市）

Ando H, Role of Confirmatory tests for primary aldosteronism subtype diagnosis, 41st International Aldosterone Conference, 2016 年 3 月 30 日～3 月 31 日、The Revere Hotel Boston Common (Boston, USA)

柴田洋孝、肥満症におけるアルドステロン、コルチゾール分泌異常、第 23 回日本ステロイドホルモン学会学術集会、2016 年 1 月 15 日、倉敷市芸文館（岡山県倉敷市）

柴田洋孝、ミネラルコルチコイド受容体活性化に関する最近の話題、第 87 回日本内分泌学会学術総会、2014 年 4 月 24 日～4 月 26 日、福岡サンパレス（福岡県福岡市）

柴田洋孝、ミネラルコルチコイド作用と生活習慣病、第 87 回日本内分泌学会学術総会、2014 年 4 月 24 日～4 月 26 日、福岡国際会議場（福岡県福岡市）

Shibata H, Pathological activation of mineralocorticoid receptor by O-GlcNAc modification in diabetes mellitus, The XVth Conference on the Adrenal Cortex, 2014 年 6 月 17 日～6 月 20 日、Double Tree Chicago by Hilton-Magnificent Mile (イリノイ州シカゴ、米国)

柴田洋孝、生活習慣病におけるミネラルコルチコイド受容体活性化の意義、第 37 回日本高血圧学会総会、2014 年 10 月 17 日～10 月 19 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

柴田洋孝、メタボリックシンドロームの陰に潜むアルドステロン作用、第 37 回日本高血圧学会総会、2014 年 10 月 17 日～10 月 19 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

柴田洋孝、メタボリックシンドロームにおける MR の機能、第 22 回日本ステロイドホルモン学会学術総会、2014 年 11 月 3 日、都道府県会館（東京都千代田区）

柴田洋孝、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学術総会、2013 年 11 月 16 日、千里ライフサイエンスセンター（大阪府大阪市）

柴田洋孝、原発性アルドステロン症の診断・治療における薬物療法、第 86 回日本内分泌学会学術総会、2013 年 4 月 25 日～4 月 27 日、仙台国際センター（宮城県仙台市）

城 理絵、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 回日本内分泌学会学術総会、2013

年 4 月 25 日～4 月 27 日、仙台国際センター（宮城県仙台市）

林 毅、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 回日本内分泌学会学術総会、2013 年 4 月 25 日～4 月 27 日、仙台国際センター（宮城県仙台市）

Shibata H, Mineralocorticoid receptor is pathologically activated through its O-GlcNAc modification in hyperglycemic conditions, 40th International Aldosterone Conference, 2013 年 6 月 13 日～6 月 14 日、The Palace Hotel (San Francisco, USA)

Shibata H, Adipocyte-derived factors as a potential cause of idiopathic hyperaldosteronism, Progress in Primary Aldosteronism 3, 2013 年 7 月 3 日～7 月 5 日、Carl Friedrich von Siemens Stiftung (Munich, Germany)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田洋孝 (SHIBATA, Hirotaka)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：20245484

(2) 研究分担者

伊藤 裕 (ITOH, Hiroshi)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：40252457