

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25670396

研究課題名(和文)心副腎連関の分子機序の解明

研究課題名(英文)Cellular mechanism of cardio-adrenal interaction

研究代表者

佐野 元昭 (SANO, MOTOAKI)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：30265798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、心不全の増悪に伴う副腎組織の「低酸素化」と「マクロファージの浸潤」の2つを現象に着目した。副腎組織が低酸素化すると β 3アドレナリン受容体の発現が亢進し、カテコラミン感受性を獲得する。 β 3アドレナリン受容体からのシグナルは細胞内の脂肪滴からアルドステロンの合成基質であるコレステロールの切り出しを行っていると考えられる。培養細胞において低酸素刺激はCYP11B2の発現上昇を認める。また一度副腎組織中にマクロファージが浸潤すれば、副腎皮質細胞との液性因子を介した細胞間相互作用によりRAS非依存的にアルドステロン合成亢進が起きることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Chronic salt overload in Dahl-salt sensitive rats stimulates aldosterone production via local activation of renin-angiotensin system (RAS). β 3-adrenergic receptor was highly upregulated concomitant with the progression of cardio-renal injury. Adrenal glands became hypoxic as cardio-renal injury progress and both hypoxia induced the expression of β 3-adrenergic receptor via HIF activation in adrenocortical cells. Macrophages were infiltrated in the adrenal cortex in rats with cardio-renal injury and macrophage ablation reduced aldosterone production. Co-culture with macrophages or a supernatant of macrophages stimulated CYP11B2 expression in adrenocortical cells. Acquisition of catecholamine-responsiveness via the induction of β 3-adrenergic receptor under tissue ischemic and crosstalk between macrophages and adrenocortical cells accounts for the RAS-independent aldosterone production associated with cardio-renal injury.

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：循環器・高血圧 細胞・組織 分析科学

1. 研究開始当初の背景

慢性心不全はナトリウムと水分が過剰に蓄積され、体循環系または肺循環系に浮腫が存在している病態で交感神経系やレニン・アンジオテンシンアルドステロン系 (RAAS) に代表される神経内分泌因子が著しく亢進し、その病態を悪化させている。中でも血漿アルドステロン濃度は慢性心不全の予後を増悪する危険因子としてよく知られている。Dahl 食塩感受性 (DS) ラットは高食塩食負荷により高血圧・心血管系障害を引き起こし、最終的に心不全を呈し死亡する心不全モデル動物として広く知られている。我々は高食塩食負荷 DS ラットの副腎において、心不全の病態形成に一致して、副腎局所のレニン・アンジオテンシン系の活性化、副腎組織の低酸素、 β_3 受容体発現亢進、炎症性細胞浸潤に伴って、アルドステロンの合成が異常亢進する現象を発見した (Biphasic time course of the changes in aldosterone biosynthesis under high-salt conditions in Dahl salt-sensitive rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(5):1194-203.)。本研究ではこの高食塩食負荷 DS ラットで観察されたアルドステロン異常産生におけるレニン・アンジオテンシン系の活性化以外の分子機序について検討することを試みた。

2. 研究の目的

Dahl 食塩感受性ラットに高食塩食負荷すると血圧が 200mmHg 以上に上昇し代償性心肥大を経て心不全を発症する。高食塩負荷により当初は循環血液中のレニン・アンジオテンシン系と副腎におけるアルドステロン産生は抑制されるが、心不全発症時期に一致して副腎組織中のレニン・アンジオテンシン系とアルドステロン産生が活性化する現象を見出した。高食塩食負荷 Dahl 食塩感受性ラットにアンジオテンシン受容体拮抗薬を投与すると心機能低下とアルドステロン産生が活性化を抑制することが出来た (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012)。本研究では、この心不全モデルラットを用いて心不全におけるレニン・アンジオテンシン系、交感神経系、免疫系の過剰応答によるアルドステロン産生機序の全貌を明らかにすることを目的とした。特に、心不全期の副腎にみられる「2つの変化」に着目して研究を進める。一つは、心不全ラットの副腎への著名なマクロファージの浸潤。もう一つは、心不全ラットの副腎皮質における β_3 アドレナリン受容体発現の亢進である。マクロファージの浸潤と β_3 -アドレナリン受容体発現の亢進は、ヒトの重症心不全患者の副腎でも同様に観察された。

3. 研究の方法

Dahl 食塩感受性ラットに高食塩食を負荷すると血圧が上昇し代償性心肥大を経て投与 2 ヶ月後に心不全を発症する。高食塩負荷に

より当初は循環血液中のレニン・アンジオテンシン系と副腎におけるアルドステロン産生は抑制されるが、心不全発症時期に一致してアルドステロン産生が活性化する現象を見出した。ACTH 値や血清 K 値には変化を認めなかった。アルドステロン産生が活性化した心不全期の副腎では、副腎組織中のレニン・アンジオテンシン系に加えて、 β_3 アドレナリン受容体発現の亢進、マクロファージの強い浸潤が観察された。

(1) 副腎皮質 β_3 アドレナリン受容体発現の亢進とアルドステロン産生の関係

生後 5 週目から 2 ヶ月間高食塩食負荷した Dahl 食塩感受性ラットと正常食塩食で飼育を続けた Dahl 食塩感受性ラットの副腎の遺伝子発現様式の変化を DNA マイクロアレイで解析した。正常食塩食で飼育を続けた Dahl 食塩感受性ラットの副腎では、 α_1 、 α_2 、 β_1 、 β_2 、 β_3 アドレナリン受容体の発現レベルは低く、2 ヶ月間高食塩負荷した Dahl 食塩感受性ラットの副腎では β_3 アドレナリン受容体の発現だけが著名に上昇していた。この結果は、定量的 PCR 法や免疫染色法でも確認された。さらに、ヒトの副腎組織を観察したところ非心不全患者に比べて慢性心不全患者 (移植待機中) において、 β_3 アドレナリン受容体の発現亢進が免疫染色法で確認された。以上の結果から、心不全における β_3 アドレナリン受容体誘導が心不全期の副腎ステロイド代謝に影響を与えている可能性が示唆された。ヒト副腎皮質由来 H295R 細胞をアドレナリン、ノルアドレナリンで刺激しても、アルドステロン合成酵素 CYP11B2 の発現に変化は見られなかった。Forskolin を投与して直接 cyclic AMP を増加させると CYP11B2 の発現が増加したことから、ヒト副腎皮質由来 H295R 細胞には、カテコラミン受容体が機能的に欠失していると考えられた。H295R 細胞において β_3 アドレナリン受容体の発現を誘導する因子を検討した結果、低酸素刺激が β_3 アドレナリン受容体の発現を最も強く誘導することを発見した。

(1)- H295R 細胞において低酸素刺激で β_3 アドレナリン受容体が誘導される分子機序を解明する。H295R 細胞を低酸素化で培養して β_3 アドレナリン受容体の発現の発現を増加させた状態で、アドレナリン、ノルアドレナリン刺激が CYP11B2 の発現を誘導するか否かを検討する。

(1)- 2 ヶ月間高食塩負荷して心不全を発症した Dahl 食塩感受性ラットに Pimonidazole を投与した後、抗 pimonidazole 抗体を用いることで in vivo における副腎の低酸素状態を検討する。

(1)- β_3 アドレナリン受容体遮断薬が、高食塩負荷して心不全を発症した Dahl 食塩感受性ラットにおける異常アルドステ

ロン産生を抑制出来るか否か検討する。

(2) 副腎皮質マクロファージの浸潤とアルドステロン産生の関係

高食塩食負荷して心不全を発症した Dahl 食塩感受性ラットの副腎ではマクロファージの強い浸潤を認めた。慢性心不全患者（移植待機中）の副腎にもマクロファージの強い浸潤を認めたため、マクロファージと副腎皮質細胞の細胞間クロストークが心不全期の副腎アルドステロン合成代謝経路に影響を与えている可能性を想定した。

高食塩食負荷した Dahl 食塩感受性ラットにアンジオテンシン受容体拮抗薬を投与すると高食塩食投与 2 ヶ月後のアルドステロン産生活性化が抑制されたが、同時に、副腎組織中へのマクロファージの浸潤も抑制された。以上の結果から、副腎へのマクロファージの浸潤には組織レニン・アンジオテンシン系の活性化が関与していると考えられた。

次に、自然免疫（マクロファージを中心とする骨髄球の関与）と獲得免疫（T 細胞を中心とするリンパ球系）のいずれが、心不全期におけるアルドステロンの異常産生に關与しているかを明らかにするために、高食塩食負荷した Dahl 食塩感受性ラットに FTY720 (Fingolimod) の投与を行った。FTY720 は免疫抑制剤で、リンパ球がリンパ節から体液中に出るのを妨げて免疫を抑制する。FTY720 を投与すると末梢血液中のリンパ球数は減少したが単球数は反対に増加した。興味深いことに FTY720 投与により高食塩負荷した Dahl 食塩感受性ラットにおいて、より早期に副腎における組織レニン・アンジオテンシン系の活性化、マクロファージの浸潤が起こり、ラットは早期に心不全で死亡した。以上の結果から、単球系の活性化は、副腎における異常アルドステロン産生を促進する方向に作用し、反対に T 細胞系は副腎における異常アルドステロン産生を抑性する方向に作用していると考えられた。

ヒト副腎皮質由来 H295R 細胞とマウスマクロファージ様単核細胞 RAW264.7 (RAW) 細胞の共培養の実験を行った。その結果、共培養する RAW 細胞の播種数依存性に H295R 細胞におけるアルドステロン合成酵素 CYP11B2 の発現が誘導されることが分かった。アルドステロン合成酵素 CYP11B2 の発現誘導は、RAW 細胞の培養上清でも観察されたこと、RAW 細胞の培養上清にアンジオテンシン受容体拮抗薬を加えておいても、アルドステロン合成酵素 CYP11B2 の発現誘導は観察されたことから、RAW 細胞から分泌されたアンジオテンシン II 以外のメディエーターが H295R 細胞における CYP11B2 の発現を促進していると考えられた。

(2) - 高食塩負荷した Dahl 食塩感受性

ラットにリポソーム封入クロドロネートを投与してマクロファージを枯渇したときに、アルドステロン産生がいかなる影響を受けるかを確認する。

(2) - アンジオテンシン II の下流でマクロファージの浸潤をもたらすケモカインを同定する。

4. 研究成果

本萌芽研究において、我々は、心不全の増悪に伴う副腎組織の「低酸素化」と「マクロファージの浸潤」の 2 つを現象に着目した。副腎組織が低酸素化すると 3 アドレナリン受容体の発現が亢進し、カテコラミン感受性を獲得する。3 アドレナリン受容体からのシグナルは細胞内の脂肪滴からアルドステロンの合成基質であるコレステロールの切り出しを行っていると考えられる。培養細胞において低酸素刺激は CYP11B2 の発現上昇を認める。また一度副腎組織中にマクロファージが浸潤すれば、副腎皮質細胞との液性因子を介した細胞間相互作用により RAS 非依存的にアルドステロン合成亢進が起きることを明らかにした。(図 1)

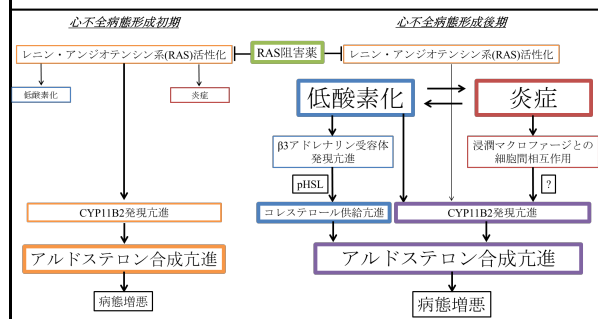


図 1. RAS 非依存性アルドステロン合成の分子機序

昨今、腎動脈交感神経切除が全身への遠心性交感神経活動が低下させ、血圧を低下させることが報告されているが、同時に心不全治療にも有効であることが報告され、交感神経系の過剰な活性化が心不全の病態形成にかかわる役割について、今まで以上に脚光が集まっている。交感神経系の Beta 受容体には、Beta-1, Beta-2, Beta-3 受容体が知られているが、各々異なった病態生理学的役割が報告されている。Beta-1 は最もよく研究され、心筋細胞に対して陽性の変力、変時作用を持つことが知られている。Beta-2 は、気管支に発現し、気管支拡張作用を持つことが知られているが、最近、腎臓尿管の Beta-2 受容体が食塩感受性を制御していることが報告され注目が集まっている (Mu. S. Nat Med. 2011)。一方、Beta-3 受容体に関しては、脂肪細胞に発現し脂肪融解に關与しているという知見以外、その機能に関しては明らかにされていなかった。しかし、様々な心血管病変において Beta-3 受容体発現が増加することからその病態生理学的意義に注目が集ま

り始めている。これまで、Beta-3 受容体の副腎ステロイド代謝に対する役割に注目した研究の報告はなく新規性は極めて高い。

マクロファージの浸潤は、動脈硬化だけでなく、肥満患者の脂肪組織、肝臓、心筋梗塞後の損傷治癒・左室リモデリング過程でも認められ、各臓器における慢性炎症の主たる担い手として注目が集まっている。心不全における副腎組織の組織学的、分子生物学的検討は意外にもこれまで手をつけられておらず、心不全と副腎皮質へのマクロファージの浸潤の関連を明らかにしたのは我々が初めてである。アルドステロンの異常産生に関しては東京大学藤田教授のグループが肥満高血圧モデルで観察しているが、彼らは内臓脂肪から ARF(アルドステロン刺激因子)が放出されると予測している(Nagase M, J Am Soc Nephrol. 2006)。つまり、脂肪組織と副腎との臓器連関に着目しているが、肥満高血圧モデルの脂肪組織内にはマクロファージが浸潤しており、我々が副腎内における副腎皮質細胞とマクロファージの細胞間コミュニケーションを介してアルドステロン分泌を促す因子として探索している分子は ARF(アルドステロン刺激因子)と共通の分子である可能性がある。

また、臓器へのマクロファージの浸潤や Beta-3- アドレナリン受容体の発現亢進は、副腎皮質だけでなく心臓も含めた多臓器にも観察されることから、心不全で認められる普遍的な現象であると考えられる。その分子機序と病態生理学的意義の解明は、心不全の病態を理解する上でも重要である。

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 0 件)
現在、論文執筆中。

〔学会発表〕(計 3 件)

(1)Kentaro Ito, Fumiko Mitani, Shintaro Morizane, Tomohiro Matsuhashi, Yoshinori Katsumata, Xiaoxiang Yan, Tsunehisa Yamamoto, Nobuhito Goda, Keiichi Fukuda, Motoaki Sano. The Unexpected Mechanism of Aldosterone Production in Salt-sensitive Dahl rats with Heart Failure. ISHR. 2013/6/29, San Diego, USA (La Valencia Hotel)

(2)Kentaro Ito, Fumiko Mitani, Shintaro Morizane, Tomohiro Matsuhashi, Yoshinori Katsumata, Xiaoxiang Yan, Tsunehisa Yamamoto, Nobuhito Goda, Keiichi Fukuda,

Motoaki Sano. The Unexpected Mechanism of Aldosterone Production in Salt-sensitive Dahl rats with Heart Failure. International Symposium for Aldosterone and Related Substances in Hypertension (Poster) 2013/4/27-28, Sendai

(3)Kentaro Ito, Fumiko Mitani, Shintaro Morizane, Tomohiro Matsuhashi, Yoshinori Katsumata, Xiaoxiang Yan, Tsunehisa Yamamoto, Nobuhito Goda, Keiichi Fukuda, Motoaki Sano. Emergence of 3-adrenergic Receptor and Macrophage Infiltration in the Adrenal Glands Contributed to the Unfavorable Aldosterone Production in Heart Failure The 6th IAFJ Award Finalists' Oral Presentation 5th International Aldosterone Forum Japan 2013/4/21 Tokyo

〔図書〕(計 1 件)

(1)佐野元昭、松橋智弘、勝俣良紀、伊藤健太郎 心不全とアルドステロン、コルチゾール CIRCULATION Up-to-Date 誌、8 巻 4 号の Current Review [Heart Failure 編] 56(420)-61(425) 2013 年 メディカ出版

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐野 元昭 (Motoaki Sano)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号：30265798

(2)研究分担者

なし ()

(3)連携研究者

なし ()