

論文内容の要旨

論文題目

マウス副腎アルドステロン(ALD)分泌における AT1bR の役割およびその発現調節におけるアンジオテンシン II と ALD の拮抗作用、ならびに食塩による臓器障害惹起への ALD の関与

指導教員

藤田 敏郎教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 19 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 竹内 牧

背景と目的：

本研究では angiotensin II (AII)刺激によるマウス副腎からの aldosterone (ALD) 産生促進機序の解明、ならびに AII 亢進と過剰な食塩摂取により惹起される腎障害の病態メカニズムの解明を目的とし解析を行った。

心腎血管系障害の進行には、renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS)が大きな役割を果たしている。これまで AII が慢性心不全や高血圧、腎障害などに大きく関与していると言われてきた一方で、近年 RAAS の最終産物である ALD にも注目が集まっている。ALD の古典的作用である電解質、血圧調節作用のみならず、単独で直接的に臓器障害惹起作用を持つということが示されてきた。

ALD は副腎球状層から分泌されるホルモンであり様々な因子により産生が調節されているが、中でも AII は主要な ALD 産生促進因子である。AII による ALD 産生調節には主に副腎のホルモン合成酵素系と、副腎の AII receptor が関与する。

副腎のホルモン合成酵素系の中でも特に CYP11B2 (ALD synthase)は ALD 産生に最も重要な酵素であり、その発現は副腎球状層に限局している。

もう一つの調節因子である AII receptor については、主に AT1R と AT2R という二つの subtype が存在する。AII の古典的作用といわれる主な作用は殆ど AT1R を介しているということが示されおり、AII による副腎からの ALD 産生刺激作用もまた AT1R を介する。ヒトとは異なり齧歯類の AT1R には二つの subtype (AT1aR, AT1bR)が存在する。マウスの AT1aR と AT1bR をコードする遺伝子のアミノ酸シーケンスは 95%の相同性を持ち両者のリガンド結合や活性化特性は

類似しているが、その組織局在には大きな違いがあり全身のほぼすべての臓器においては AT1aR が優位に発現しており、一方で副腎と下垂体前葉でのみ AT1bR が主に発現している。この二つの subtype の個別の機能に関しては未解明であることが多く、AII による副腎 ALD 産生刺激に関しても主に AT1aR を介しているという報告や、AT1aR/AT1bR いずれも必要であるとの報告もありその詳細メカニズムは未解明である。マウスの AT1aR と AT1bR は高い遺伝子ホモロジーを持ちながらもその局在や発現量の相違が、AII の標的組織への機能において異なる作用を行っている可能性が考えられる。この視点から、AII による ALD 産生における AII receptor の役割を解析する目的で実験を行った。

もう一点、臨床的視点から ALD の機能や役割というものに着目し、その臓器障害への寄与を考える。通常生体内では Na 摂取と RAAS 活性化(ALD 産生上昇)は、非常に精巧なバランスで Na や血圧の恒常性を維持しているが血中 ALD 濃度がたとえ正常範囲内であったとしてもその時の体内の食塩の摂取状況に対して不適切に高値である場合に ALD による臓器障害作用が引き起こされるということが示されてきている。

ALD の臓器障害作用と食塩摂取という視点から背景メカニズムを探ることを目的として実験を行った。

方法、結果ならびに考察：

まず AII による ALD 産生に関与する各因子の変化を確認するために、C57 への AII 投与実験を行ったところ、ALD 産生は増加し副腎 3 β HSD6、CYP11B2 発現上昇とともに AII receptor の中でも AT1bR のみの発現上昇が認められた。この時 AT1aR、AT2R 発現には変化がなかった。AII による ALD 産生に AT1bR が何らかの寄与をしている可能性があるという仮説のもとに、この AII 投与による AT1bR 発現上昇の意義やその調節メカニズムをさらに検討することとした。AT1bR 発現上昇を引き起こす要因としては、1)AII による AII receptor を介した直接作用、2)AII により産生増加した ALD による直接作用、3)既報にある glucocorticoid による直接作用、等が考えられたため、各々投与実験を行い AT1bR 発現変化の解析を行った。AII による ALD 産生は AT1R antagonist により完全に抑制され、AII 刺激による CYP11B2 と AT1bR の発現上昇も抑制され、AT2R antagonist には影響を受けなかったことから、AT1R を介していることが示された。また、ALD が MR を介して AT1bR 発現を直接増加させる可能性に関しては、ALD 投与による AT1bR 発現が抑制されたことならびに eplerenone による MR 阻害によって AT1bR 発現がさらに上昇したことから否定的と考えられた。逆に MR (mineralocorticoid receptor)阻害により AT1bR 発現が上昇したこと、及び ALD 投与により発現抑制が認められたことから、ALD に直接的な AT1bR 発現抑制作用がある可能性が考えられた。これは、AT1R antagonist 投与時に抑制された

AT1bR 発現がそれに追加で ALD 外因性投与を行ったことでさらなる抑制を認めたことから ALD そのものに直接的な AT1bR 発現抑制作用があるということが示された。一方、dexamethasone 投与および GR (glucocorticoid receptor) 阻害によっても ALD 産生は抑制されず AT1bR 発現変化も認められなかったことから glucocorticoid による AT1bR 調節の可能性は否定的である。以上より、AII による ALD 産生促進作用には CYP11B2 発現上昇とともに、AII による AT1R を介した AT1bR 発現上昇が寄与していること、ならびに ALD が直接的な AT1bR 発現抑制作用を持つという新しい知見が得られた。

次に AII 亢進と食塩負荷によって惹起される腎障害への ALD の関与について、恒常的 AII 亢進マウスに対して食塩負荷を行う系にて解析を行った。Tsukuba hypertensive mice (THM) という、ヒトの renin と angiotensinogen のダブルトランスジェニックにより恒常的に AII、ALD が亢進しており正常食塩食下においても心腎血管系障害を引き起こすモデルを用いた。THM は正常食塩食飼育下にててもコントロールに比して血圧上昇ならびに尿中アルブミン排泄増加を生じ、これに食塩負荷を行うことで腎障害の著明な増悪を認めた。THM に対する高食塩負荷により尿中アルブミン量の著明な増加、糸球体・尿細管間質障害が認められ、腎臓の炎症性、線維性マーカーの遺伝子発現上昇が認められた。これらは eplerenone 加療により改善した。THM への食塩負荷では血中 ALD 濃度が正常食塩群よりも低下していたが eplerenone が著明な腎障害改善効果をもたらしたことから、ALD が病態形成に寄与しているということが示唆された。

THM では血中 ALD 濃度が食塩負荷により抑制されているにもかかわらず、腎障害が惹起される原因は何であろうか。

通常生体内では RAAS 活性と Na は精巧なバランスを保ち電解質・血圧の恒常性を維持している。しかし THM では RAS 活性は常に亢進しており、たとえ食塩過剰状態となっても抑制されないため、食塩の状況に対して不適切な RAAS 活性化が認められる。これにより THM への食塩負荷により高血圧ならびに腎障害の増悪が認められると考えられる。

THM HS 群では NS 群に比して血中 ALD 濃度は低下しているが、HS 群へ Olmesartan を投与するとさらに血中 ALD 濃度は抑制され検出感度未満となる。これより、THM の HS 群では食塩状況に対しては不適切な ALD 分泌が生じているものと考えられる。このメカニズム解明のため THM の副腎解析を行った。THM に食塩を負荷すると、C57 に食塩を負荷したときと同様に副腎 AT1bR、CYP11B2 発現が抑制される。しかしながら、C57 の HS 群に比べて THM では恒常的に AII が高値である状態の影響で CYP11B2 と AT1bR 発現の食塩による抑制が不十分であり、これが不適切な ALD 分泌を引き起こしている可能性が考えられた。また、 3β HSD6 発現が THM では C57 に比して増加している。食塩負荷によっても 3β HSD6 発現は抑制されず高いままであり、このことも不適切な

ALD 分泌に寄与しているということが示唆された。

結論：

本研究から、マウス副腎における AII 誘因性の ALD 分泌促進作用の背景には CYP11B2 発現上昇ならびに AT1bR 発現上昇が寄与しているということが示唆された。AT1bR 発現上昇は、AII による AT1R を介したメカニズムが想定されたが、今回同時に ALD によって直接的に AT1bR の発現抑制が認められるという新しい知見が得られた。

また、AII 恒常的高値状態への食塩負荷によって著明な臓器障害を引き起こされることが示されたが、その背景には不適切な ALD 分泌がその一因として寄与していると考えられた。不適切な ALD 分泌を引き起こしているのは、副腎での AT1bR、CYP11B2 発現の食塩による抑制が不十分であること、ならびに 3β HSD6 発現上昇が抑制されないことが寄与している可能性があると考えられた。