

図3:リンパ性白血病細胞のデキサメサゾンに対する 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 遺伝子発現  
sensitive: グルココルチコイド感受性群 resistant: グルココルチコイド抵抗性群

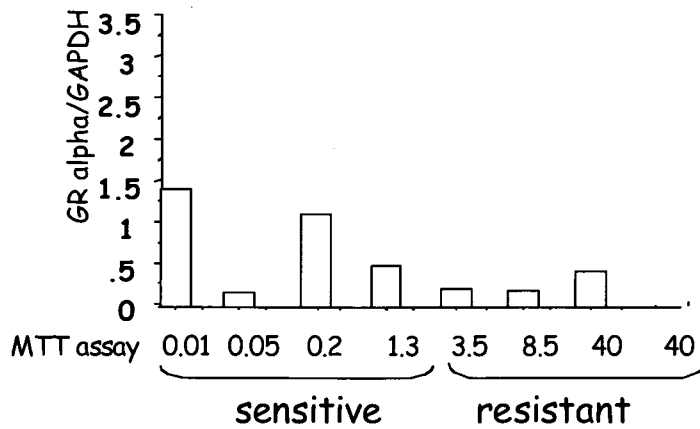


図4:リンパ性白血病細胞におけるグルココルチコイド受容体遺伝子発現

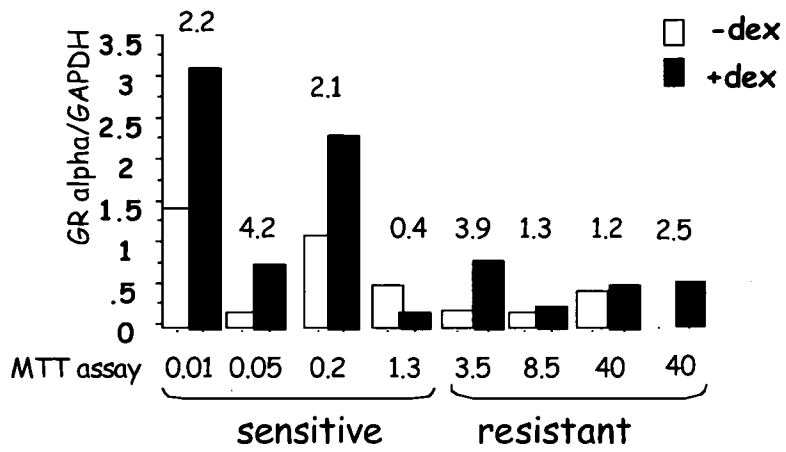


図5:リンパ性白血病細胞のデキサメサゾンに対するグルココルチコイド受容体遺伝子発現

## *CYP11B1* common variants と表現型の関連

宗 友厚、伏見宜俊、黒田英嗣、山田亘子、廣田卓男、村松 学、  
塩谷真由美、川地慎一、佐々木昭彦、諏訪哲也、加納克徳、武田 純  
岐阜大学大学院医学系研究科内分泌代謝病態学分野

### 【研究要旨】

ヒト生命維持に必須のグルココルチコイドであるコルチゾール合成の最終ステップは  $11\beta$  水酸化酵素(B1)が司る。コードする遺伝子 *CYP11B1* は、アルドステロン合成酵素遺伝子のすぐ下流に位置し、高血圧や肥満等との関連が示唆されてきた。本研究では、*CYP11B1* の頻度の高い多型が副腎組織における B1 発現量と関連するのか、さらに中間～臨床的表現型と関連するかどうか、を検討した。R43Q と +225G/A (Y75) 両多型のヘテロ接合体サンプルを制限酵素処理する事によりアレル毎の転写効率を推定したところ、R43 アレルは Q アレルの  $29 \pm 9\%$  ( $\pm$ SD)、+225A アレルは G アレルの  $56 \pm 17\%$ 、と明らかに差を認めた。しかし、real time PCR 法により定量した B1 定常発現レベルには遺伝型による差は検出されなかった。中間表現型と考えられる尿中フリーコルチゾール排泄量 (正常者 157 例) は RR 遺伝型で低値 ( $45 \pm 26$  vs. QQ  $61 \pm 38$   $\mu\text{g}/\text{d}$ ,  $P = .027$ )。臨床的表現型に関しては、Q アレル頻度は正常血圧対照 41.0%・高血圧患者 37.7%と有意な頻度差はなかったが、拡張期血圧は RR 型で高値であった。*CYP11B1* の R43Q 多型は生体内における B1 の転写効率に影響し中間表現型とも関連するが、定常発現レベルは視床下部・下垂体を介した迅速なフィードバックによる影響を受けているもの、と考えられる。

### A. 研究の目的

ヒトの生命維持に必須であるコルチゾール合成の最終ステップを司る  $11\beta$  水酸化酵素 (B1) をコードする遺伝子 *CYP11B1* はアルドステロン合成酵素遺伝子のすぐ下流に位置する。いずれの遺伝子異常もメンデル型高(低)血圧疾患の原因となり、また周知の如くコルチゾール過剰が Cushing 徴候を来すことから、高血圧や肥満等との関連が示唆されてきた。

すでに、*CYP11B1* の多型が B1 酵素活性と関連するとの報告が散見される (1, 2) が、コルチゾール産生のある副腎における B1 発現に対し genotype 効果を有するかどうかは不明である。

本研究では、まず、*CYP11B1* の多型とヒト副腎組織の B1 発現量との関連を検討、一部の多型については実際のヒト生体内での転写効率を推定した。さらに、頻度の高い多型について、遺伝型と中間

表現型や臨床的な表現型、疾病との関連を検討した。

## B. 研究方法

### 1. ヒト副腎組織における検討

岐阜大学医学部附属病院および関連病院にて片側副腎摘出術を受けたアルドステロン産生腺腫 (APA) 患者 27 例 (男性 12 例/女性 15、25~58 歳) およびクッシング症候群 (CS) 患者 18 例 (男性 1 例/女性 17 例、23~59 歳)、コルチゾール自律産生を伴う APA (PAPC) 患者 3 例 (男性 2 例/女性 7 例、29~66 歳)、プレクリニカルクッシング症候群 (PC) 患者 7 例 (男性 5 例/女性 2 例、29~66 歳) の腺腫組織、腎癌手術時に得た正常副腎組織 (N; n=15) を対象とした。各組織は摘出後速やかに $-80^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存した。なお、対象患者からはいずれも予め書面でインフォームドコンセントを得た。

凍結組織から total RNA を抽出し、DNase 処理後、逆転写反応に供し cDNA サンプルを得た。これら組織の B1 mRNA 発現量は real time PCR 法 (Roche LightCycler) により定量 ( $\beta$  2-microglobulin で補正) した。また、これらの cDNA サンプルの direct sequencing により検出した R43Q と +225G/A (Leu75) 両多型のヘテロ接合体サンプルを Msp I と Bfa I で処理、Bioanalyzer で分離し (一例を図 1a) b) に示す)、各 band 濃度を測定、アリル毎の転写効率を推定した。

### 2. *CYP11B1* 遺伝子多型と中間表現型・臨床的表現型との関連解析

プレリミナリーな検討で、Arg43Gln 多

型は、-216A/G、-64T/C、intron 1+20T/A とほぼ完全に link、+224G/A 多型は、intron 1+13C/A、Asp82 の C/T とほぼ完全に link すること、さらに、Arg43Gln と +224G/A 多型も連鎖不平衡にあることが判明した。

岐阜大学医学部附属病院第 3 内科および関連病院に受診し、インフォームドコンセントを得た計 1547 例 (男/女 1200/347 例) を対象とした。内訳は、血圧に関して正常血圧 1003 例・高血圧 (140/90mmHg 以上または降圧剤内服中) 526 例、血糖に関して正常者 (NGT) 869 例・空腹時高血糖 (IFG) 61 例・境界型 (IGT) 205 例・2 型糖尿病 377 例。*CYP11B1* exon 1 の Arg43Gln 多型は Taqman 法によりタイピングし、血圧・糖代謝・生化学データとの関連を検討した。対象のうち 24 時間蓄尿を行った正常者 157 例で中間表現型と考えられる尿中フリーコルチゾール排泄量との関連を検討した。さらに一部の症例 (812 例) で臍部 CT により測定した内臓および皮下脂肪面積 (V 及び S) との関連を検討した。連鎖不平衡の解析には Haploview を用い、遺伝子間の臨床データ解析は、GLM プロシジャ (SAS) を用い性・年齢・BMI を補正後、検討した。なお本研究に含まれる遺伝子解析に関しては既に、「生活習慣病と副腎皮質ステロイド関連遺伝子多型との関連」(平成 14 年 11 月)として岐阜大学医学部の倫理審査委員会の承認済みである。

## C. 研究結果

### 1. 副腎局所での発現

B1 発現レベル (図 2) は CS で高い傾

向( $P = .071$ )、PAPC で高値( $P = .019$ )であったが、ほかの群間には有意差は無かった。

推定転写効率 (図 3) は、R43 アリルは Q アリルの  $29 \pm 9\%$  ( $\pm$ SD)、+225A アリルは G アリルの  $56 \pm 17\%$ 、と明らかに差を認めた。しかしながら、副腎組織中の定常的な B1 発現レベルに関しては遺伝型による差は検出されなかった (図 4)。

## 2. 表現型との関連

中間表現型と考えられる尿中フリーF排泄量は RR 遺伝型で低値 ( $45 \pm 26$  vs. QQ  $61 \pm 38 \mu\text{g/d}$ ,  $P = .027$ ) であった (図 5)。

臨床的表現型に関しては、Q アリル頻度は正常血圧対照 41.0%・高血圧患者 37.7%と有意な関連はなかったが、血圧値は RR 型で拡張期血圧が高く、収縮期血圧も高い傾向にあった (表 1)。空腹時血糖・HbA1C 値には遺伝型による差はなかったが、空腹時インスリン値とインスリン分泌能の指標 (HomaB) は RR 型で QQ 型より高かった (表 1)。内臓脂肪については、RR 型で QQ 型より V 及び V/S 比が高かった (表 1)。総コレステロールや HDL コレステロール、中性脂肪値には遺伝型による差はなかった (表 1)。

## D. 考察

ヒト生体内での推定転写効率は Arg43 アリル及び+225A アリルで明らかに低かったが、定常発現レベルに対しては有意な genotype 効果は検出されなかった。中間表現型への影響は予想通りと云えるが、血圧値や内臓脂肪との関連は、むしろ視床下部・下垂体を介したフィードバック

による overdrive の影響が示唆される。

いずれにせよ、グルココルチコイド作用は生命維持に欠かせないだけでなく、糖尿病・高血圧・高脂血症・肥満などの生活習慣病の素因と発症にかなり関わることが予想される。今回は合成の最終ステップの検討であるが、昨年報告したレセプター前レベルの調節機構<sup>3)</sup>に加え、合成・作用に関わる *CYP17*・*NR3C1* について今後も検討を進める予定である。すなわち「コルチゾール合成代謝の、どのステップに機能に影響するバリエーションがあり、どの疾患あるいはリスクファクターに影響するのか？」を明らかにする必要があると考える。

## E. 結論

*CYP11B1* の R43Q 多型は、ヒト生体内における B1 の転写効率に影響し、中間表現型とも関連するが、定常発現レベルは視床下部・下垂体を介した迅速なフィードバック (ACTH ドライブ) の影響により修飾を受けている。

## [参考文献]

1. Imrie H, Freel M, Mayosi BM, et al. Association between aldosterone production and variation in the 11 $\beta$ -hydroxylase (*CYP11B1*) gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 91(12): 5051-5056, 2006.
2. Barr M, MacKenzie SM, Friel EC, et al. Polymorphic variation in the 11 $\beta$ -hydroxylase gene associates with reduced 11-hydroxylase efficiency. *Hypertension* 49(1): 113-119, 2007.
3. 宗 友厚, 山田 亘子, 村松 学, 他. 11

$\beta$ HSD タイプ1・H6PDH 遺伝子多型と内臓脂肪蓄積 副腎ホルモン産生異常に関する研究班 平成18年度研究報告書 159-167, 2007.

現型ー疾病相関、第15回日本ステロイドホルモン学会、仙台、2007年11月24日.

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yamada Y, Sekihara H, Omura M, et al. : Changes in serum sex hormone profiles after short-term low-dose administration of dehydroepiandrosterone (DHEA) to young and elderly persons. *Endocrine J.* 54(1): 153-162, 2007.
- 2) Ishizuka T, Miura A, Kajita K, et al. : Effect of dehydroepiandrosterone on insulin sensitivity in Otsuka Long-Evans Tokushima-fatty rats. *Acta Diabetol* 44(4): 230-234, 2007.
- 3) 宗 友厚: アルドステロンカスケードと遺伝子多型 医学のあゆみ 221(9): 709-715, 2007.
- 4) 宗 友厚、山田亘子、廣田卓男、他 : 食塩感受性遺伝子 血圧 14(10): 958-962, 2007.

### 2. 学会発表

- 1) Mune T, Suwa T, Yamada N, et al. : *CYP11B1* polymorphisms and mRNA expression in human adrenals. 89th Annual Meeting of American Endocrine Society, Toronto, June 3<sup>rd</sup> 2007.
- 2) 宗 友厚、山田亘子、廣田卓男、他 : *CYP11B1* 多型と副腎内発現レベル及び表現型との関連、第11回日本心血管内分泌代謝学会、品川、2007年11月17日.
- 3) 宗 友厚、山田亘子、廣田卓男、他 : *CYP11B1* 多型と発現レベルー中間表

## G. 知的所有権の所得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

図1. 制限酵素で処理した R43Q および+225G/A (Leu75)ヘテロサンプルの電気泳動例

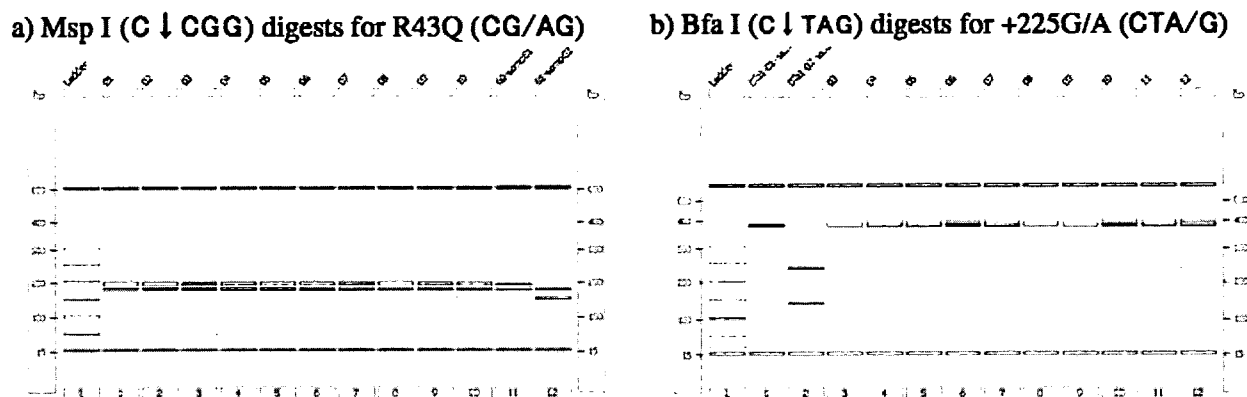


図2. 各種副腎組織における B1 発現レベル

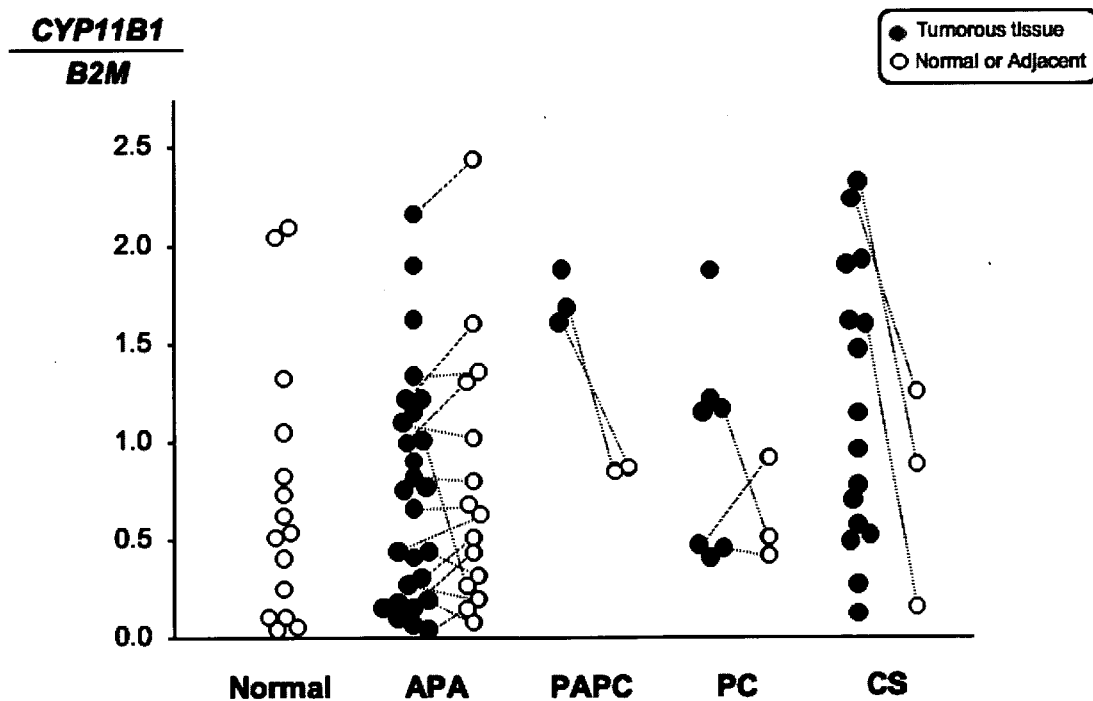


図 3. R43Q および+225G/A (Leu75)多型のアリル毎の推定転写効率と相互関連

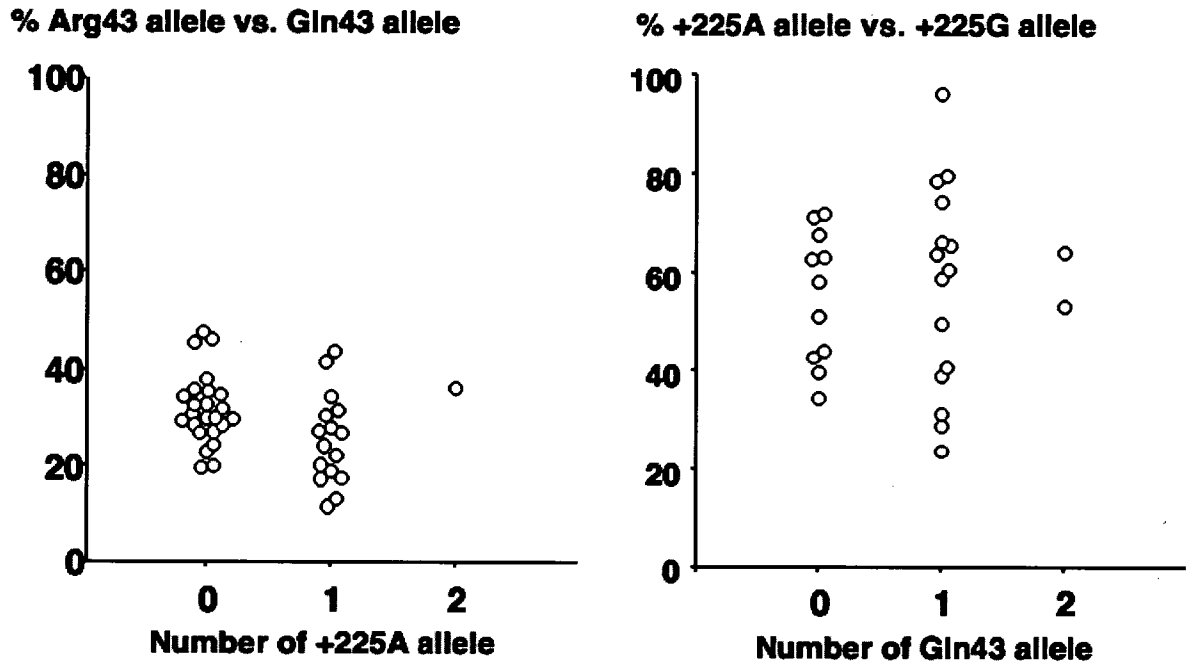


図 4. 遺伝型ごとの正常副腎・アルドステロン産生腺腫・コルチゾール産生腺腫組織中 B1 定常発現レベル

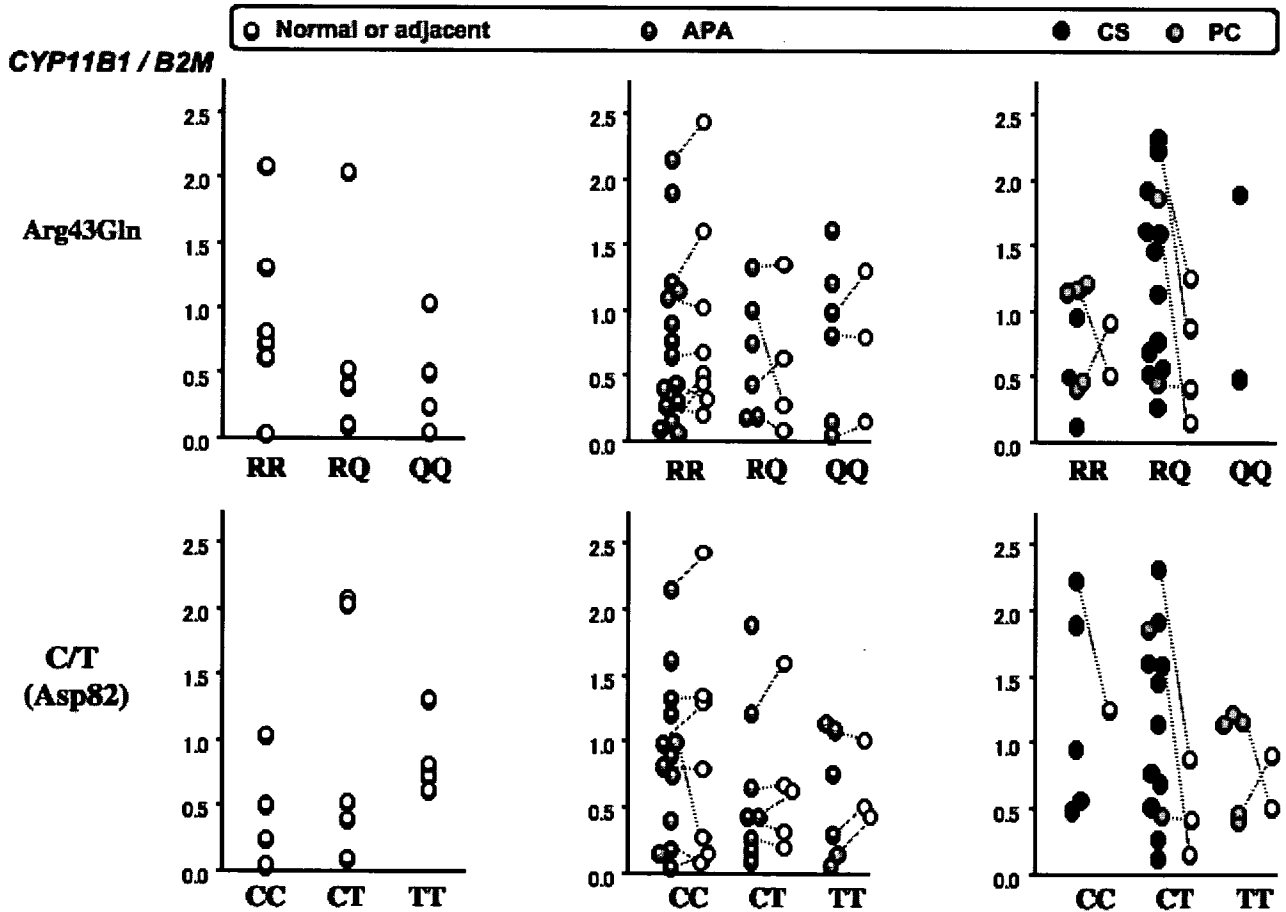




図5. 中間表現型と想定される尿中コルチゾール（およびコーチゾン）排泄量の遺伝型による違い

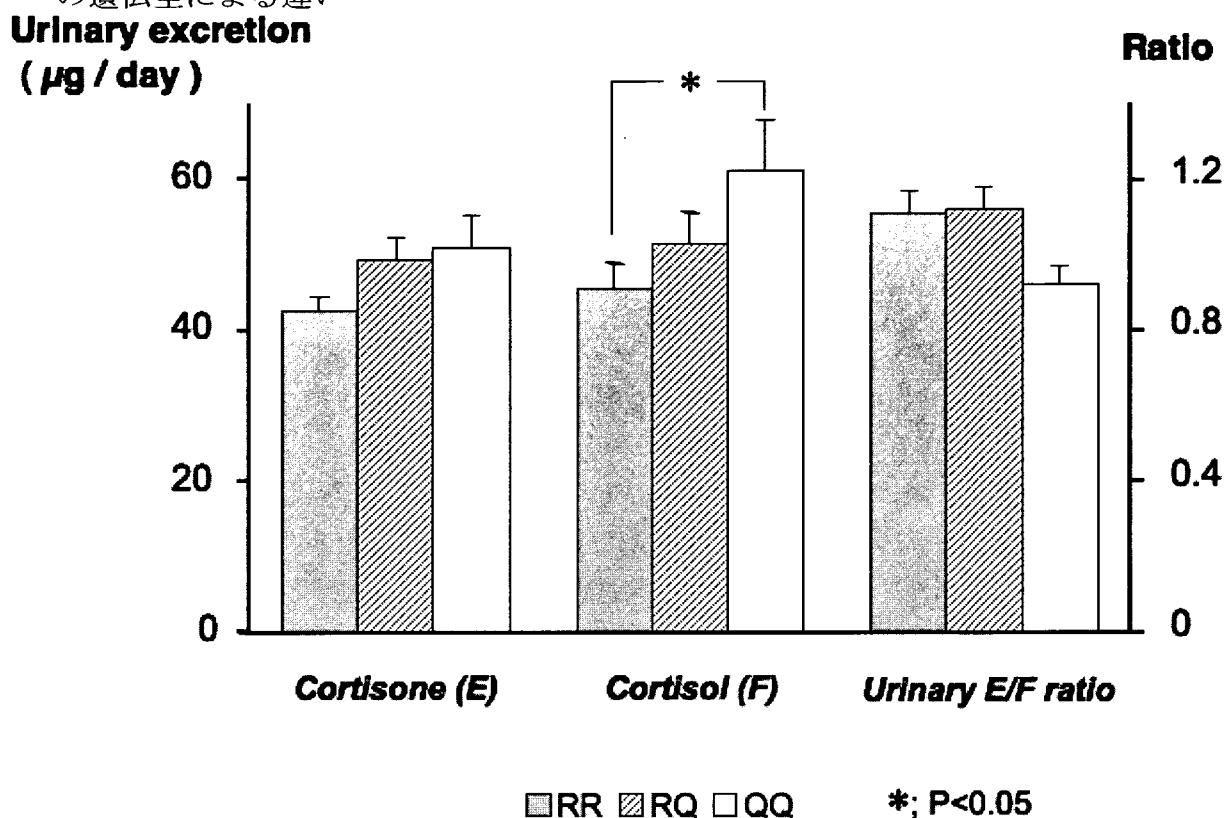


表1. *CYP11B1* の Arg43Gln (R43Q) 遺伝型と臨床生化データとの関連  
mean ± SD, \*, P<0.05, \*\*, P<0.01, †; P=0.056

	RR	RQ	QQ
SBP	130.6 ± 22.2	129.0 ± 21.8	127.3 ± 19.9†
DBP	79.7 ± 13.1	78.9 ± 12.6	77.6 ± 11.9*
FBS	105.2 ± 27.2	105.9 ± 26.9	109.1 ± 36.9
FIRI	7.33 ± 4.00	7.27 ± 5.33	6.32 ± 2.98*
HomaR	1.95 ± 1.33	2.02 ± 2.48	1.71 ± 1.02
HomaB	73.4 ± 44.3	69.6 ± 37.6	62.6 ± 34.2**
HbA1C	5.95 ± 1.75	5.95 ± 1.58	5.92 ± 1.61
T Chol	202.5 ± 34.9	203.8 ± 34.8	200.5 ± 35.3
HDL	54.2 ± 15.6	54.0 ± 15.2	56.4 ± 16.6
TG	147.3 ± 99.2	140.6 ± 91.4	135.8 ± 74.4
V	103.1 ± 46.2	93.9 ± 46.2	95.2 ± 44.5*
S	137.0 ± 66.7	127.8 ± 59.6	139.2 ± 68.4
V/S	0.847 ± 0.382	0.783 ± 0.344	0.751 ± 0.333*

# アルドステロンの血管新生抑制作用についての研究

宮森 勇、藤井 美紀、居軒 功、稲葉 聡

福井大学医学部第3内科

## 【研究要旨】

アルドステロンの内皮細胞の形態形成、血管新生に果たす役割について研究を行った。Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) と Bovine aortic endothelial cells (BAECs) を用いて2種類の管腔形成アッセイを行った。また、HUVECs においてアルドステロンの MR、KDR (VEGFR-2)、PPAR $\gamma/\delta$  などの血管新生に重要な遺伝子の発現に及ぼす影響を検討した。アルドステロンは血管内皮細胞の形態形成、すなわち *in vitro* での血管新生を抑制した。また、アルドステロンは KDR、PPAR $\gamma/\delta$  の mRNA レベルを抑制した。本研究ではアルドステロンは血管新生抑制作用を有し、その分子機序として、PPAR $\gamma/\delta$ 、KDR の mRNA レベルを低下させることが推察された。

## A. 研究目的

新生血管には既存血管の内皮細胞から新しい血管が発生する血管新生と、骨髄由来の血管内皮前駆細胞などの内皮細胞以外の細胞から内皮細胞に分化して新しく血管ができる血管形成がある。

血管新生は生体において様々な病態生理学的現象に関わっており、胚形成、癌の増殖、糖尿病網膜症、関節リウマチなどにおいてその重要性が示されている。心血管系においても血管新生は重要であり、虚血性心疾患、動脈硬化、うつ血性心不全での関与が示唆されている。

サイトカインや成長因子、Vascular endothelial growth factor (VEGF) などの様々な因子が炎症や低酸素状態により産生され血管新生が亢進し、既存の毛細血管から細胞が増殖、伸展し、新しい毛

細血管を形成することが示されている。

アルドステロンはミネラルコルチコイドとして塩分や水の再吸収を行う以外に、近年、様々な生物学的作用を有していることが報告されている。即ち、酸化ストレスを亢進させることにより動脈硬化や内皮機能障害を惹起すること、コラーゲン代謝やマトリックスへの沈着、サイトカインや成長因子の産生を介して心血管組織のリモデリングに関与しているが、現時点では血管新生におけるアルドステロンの役割は明らかではない。

本研究の目的は、アルドステロンが血管新生を刺激するのか抑制するのかを *in vitro* と *in vivo* において明らかにし、更に、血管内皮細胞においてその分子メカニズムを解析することである。

## B. 研究方法

### (1) Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)の管腔形成能

HUVECはLonza社より購入し、EGM-2MV培地で培養した。0.1%BSA含有MCDB131培地で24時間処理した後、コントロール、アルドステロン ( $10^{-9}$ ~ $10^{-7}$ M)、アルドステロン  $10^{-8}$ M+エプレレノン  $10^{-5}$ M (選択的ミネラルコルチコイド受容体遮断薬)を添加し一晩培養した。マトリゲルをゲル化させておいた24wellプレートにHUVECsを  $5 \times 10^4$  個の濃度で播き、VEGF 20ng/mlの存在下、非存在下で培養した。4時間後に形成された管腔を撮影し、長さを比較した。

### (2) Bovine aortic endothelial cells (BAECs)の管腔形成能

BAECsはCellsystems社より購入し、CSC培地で培養した。I型コラーゲンをゲル化させておいた24wellプレートにBAECsを  $7.5 \times 10^4$  個の濃度で播き、10%FBS含有1×M199培地で16時間培養後、更にI型コラーゲンを細胞に重層しゲル化させ、細胞をI型コラーゲンゲルで挟み込む状態にした。アルドステロン ( $10^{-9}$ ~ $10^{-7}$ M)、アルドステロン  $10^{-8}$ M+エプレレノン  $10^{-5}$ Mを添加した0.1%BSA含有1×M199培地をプレートに加え、VEGF 20ng/mlの存在下、非存在下で一晩培養した。16時間後に形成された管腔を撮影し、長さを比較した。

### (3) HUVECsのアルドステロンやエプレレノンにおける遺伝子発現 (RT-PCR法)

HUVECsを0.1%BSA含有MCDB131培地で24時間処理した後、コントロール、アルドステロン ( $10^{-9}$ ~ $10^{-7}$ M)アルドステロン

$10^{-8}$ M+エプレレノン  $10^{-5}$ Mを添加し一晩培養し、ISOGEN (ニッポンジーン)にてRNAを回収した。1.5  $\mu$ gのmRNAを用いSuper Script III (Invitrogen)にて逆転写反応を行い、LA Taq (TaKaRa)でPCRを行い、半定量的にミネラルコルチコイド受容体であるMR、VEGF受容体であるKDR、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体であるPPAR $\gamma$ とPPAR $\delta$ 、マトリックスメタロプロテアーゼであるMMP-2、MMP-9、MT-1MMP、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害蛋白であるTIMP-2、コントロールとしてGAPDHを増幅した。

## C. 研究結果

(1) HUVECsの管腔形成能。アルドステロンは  $10^{-8}$ Mで管腔形成を抑制した。この抑制作用はエプレレノン  $10^{-5}$ Mを共存させミネラルコルチコイド受容体をブロックすると消失し、血管新生はむしろ亢進した(図1)。また、アルドステロンはVEGF 20ng/mlで刺激した管腔形成を抑制した。エプレレノン  $10^{-5}$ Mを共存させると、このアルドステロンの血管新生抑制作用は消失した(図2)。

(2) BAECの管腔形成能。同様にアルドステロンはVEGF 20ng/mlで誘発したBAECのI型コラーゲンゲル内での管腔形成を抑制し、この抑制作用はエプレレノンにより消失した(図3)。以上からアルドステロンは血管内皮細胞の形態形成、すなわちin vitroでの血管新生をMRを介して抑制することが示された。

(3) アルドステロン、エプレレノンはMRの発現には影響しなかった。VEGFのmRNAレベルはアルドステロン  $10^{-8}$ Mおよび

び  $10^{-8}\text{M}$  でやや増加した。KDR の mRNA レベルはアルドステロン  $10^{-8}\text{M}$  と  $10^{-7}\text{M}$  刺激で減少し、エプレレノン  $10^{-8}\text{M}$  を共存させると、この低下作用は消失した (図 4)。MMP-9 と TIMP-2 の発現レベルはアルドステロン  $10^{-8}\text{M}$  にて減少し、エプレレノンの共存下に増加した (図 5)。PPAR $\gamma$  と PPAR $\delta$  の発現はアルドステロン  $10^{-8}\text{M}$  および  $10^{-7}\text{M}$  刺激で減少し、エプレレノンはこの抑制作用を消失させ、発現レベルはコントロールレベルに回復した (図 6)。

#### D. 考案

アルドステロンは様々な生物学的作用を有し、心血管系組織の再構築に関与していることが報告されている。しかし、血管新生におけるアルドステロンの役割は必ずしも明らかではない。今回の検討で、アルドステロンは内皮細胞の形態形成、即ち、*in vitro* における血管新生を抑制することが示された。

また、RT-PCR 法による検討で、そのメカニズムとして、KDR (VEGFR-2) の発現がアルドステロンによって抑制されていることが示唆された。更に、アルドステロンは HUVECs における PPAR $\gamma$  と PPAR $\delta$  の発現も抑制した。今後、アルドステロンが PPAR $\gamma$  あるいは PPAR $\delta$  の発現抑制を介して KDR の発現を抑制し、血管新生を抑制している可能性があるとの仮説を立て、*in vivo* の実験も含めて検証していく予定である。

#### E. 結語

アルドステロンは *in vitro* において血管新生を抑制し、その機序として PPAR $\gamma$

あるいは PPAR $\delta$  の発現抑制を介して KDR (VEGFR-2) の発現レベルの低下が推察された。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

- 1) Zenimaru Y, Takahashi S, Takahashi M, Yamada K, Iwasaki T, Hattori H, Imagawa M, Ueno M, Suzuki J, Miyamori I. : Glucose deprivation accelerates VLDL receptor-mediated TG-rich lipoprotein uptake by AMPK activation in skeletal muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008, 2.
- 2) M. Kadowaki, S. Mizuno, Y. Demura, S. Ameshima, I. Miyamori, \*T. Ishizaki : Effect of hypoxia and beraprost sodium on human pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation : the role of p27 kip1. *Respir Res*, 8(77), 2007, 12.
- 3) T. Konoshita, +S. Fuchs, Y. Makino, +S. Wakahara, I. Miyamori : A proximal direct repeat motif characterized as a negative regulatory element in the human renin gene. 102, 1043-1050, 2007, 11.
- 4) N. Morikawa, +Y. Kawai, K. Arakawa, +T. Kumamoto, I. Miyamori, +H. Akao, +M. Kitayama, +K. Kajinami, +J-D. Lee, +H. Takeshita, +Y. Kominato, \*T. Yasuda : Serum deoxyribonuclease activity can be used as a novel marker of treatment

myocardial ischemia results in vasospastic angina pectoris induced by provocation test. *Europ Heart J*, 28(24):2992-7, 2007, 10.

5 ) S. Wakahara, T. Konoshita, S. Mizuno, M. Motomura, C. Aoyama, Y. Makino, +N. Kato, +I. Koni, I. Miyamori : Synergistic expression of angiotensin-converting enzyme (ACE) and ACE2 in human renal tissue and confounding effects of hypertension on the ACE to ACE2 ratio, *Endocrinology*, 148 (5), 2453-2457, 2007, 5.

# アルドステロンが及ぼす血管内皮細胞

## HDL 依存性 NO 産生への影響

村尾孝児、井町仁美、村岡都美江、石田俊彦  
香川大学医学部内分泌代謝・血液・免疫・呼吸器内科

### 【研究要旨】

我々はマウス SR-B1 相同遺伝子である CLA-1 がヒト HDL 受容体であり、副腎で強く発現されていることを報告してきた。一方 CLA-1 の発現は副腎のみならず血管内皮細胞に認められ、HDL が CLA-1 に結合することで血管内皮細胞型 NOS の活性化が惹起されることを報告された。我々も血管内皮細胞の CLA-1 発現量と NOS の活性化が相関することを報告してきた。今回は検討では、aldosterone は血管内皮細胞の CLA-1 の発現を抑制し、HDL 誘導性 NO の産生を抑制した。その細胞内情報伝達系としては PI3-K/Akt/FoxO1 を介する経路が推定された。またストレンゲージプレチスモグラフの検討により、原発性アルドステロン症患者においては NO 産生が低下していることが示された。アルドステロンは血管内皮細胞における CLA-1 の発現を調整することにより、HDL 誘導性 NO 産生を制御する可能性が示唆された。このことは、副腎性ステロイドホルモンによる血管収縮に関与する可能性が示唆された。

### A. 研究目的

1996 年 Acton らによりマウス scavenger receptor class B type 1 (SR-B1) が HDL 受容体であると報告された。我々はマウス SR-B1 相同遺伝子である CLA-1 がヒト HDL 受容体であり、副腎で強く発現されていることを報告してきた。最近、血管内皮細胞に CLA-1 が発現しており、HDL による内皮型 NOS (eNOS) の活性化に CLA-1 が仲介していることが報告された。今回の目的は、アルドステロンによる血管内皮細胞における CLA-1 の発現および NO 産生について検討をお

こなった。

### B. 研究方法

細胞培養および CLA-1 の発現

血管内皮細胞 (HUVECs) を既報の方法に従い分離、培養をおこなった。HUVECs にアルドステロンを添加、whole cell extract, mRNA を抽出し、Western blot 法、Real-time PCR 法にて CLA-1 の発現を定量した。

プラスミドの作成 : wild type CLA-1 promoter および FoxO1 binding site 欠損 mutant CLA-1 promoter を Luciferase

reporter gene に挿入し、Luciferase 活性を測定して転写活性とした。また FoxO1 発現ベクターは既報の方法にて作成した。発現ベクターおよび reporter gene はリポソーム法にて遺伝子導入した。

eNOS 活性の測定：NOS の活性は既報の automated NO detector-high-performance liquid chromatography system (ENO-20, Eicom Co, Ltd., Kyoto, Japan)にて測定した。

ストレンゲージプレチスモグラフ：既報の方法にて反応性充血をもちいて血管内皮細胞における NO 産生能を評価した。

### C. 研究結果

1, CLA-1 遺伝子転写におよぼすアルドステロンの影響

アルドステロンは濃度依存的に血管内皮細胞の CLA-1 蛋白発現を抑制した。アルドステロン 100 nMにて最大の抑制効果を認めたことより、以後の実験は 100 nM を使用した。またアルドステロン 100 nM 刺激により、血管内皮細胞における CLA-1 転写活性が抑制された (図 1A)。

2, 細胞内情報伝達系 PI3-K/Akt/FoxO1 が血管内皮細胞の CLA-1 転写活性に及ぼす影響について

PI3-K 内の p110, Akt の活性型の co-transfection により CLA-1 の転写活性が抑制された。また PI3-K を抑制する PTEN の発現ベクターの co-transfection では CLA-1 の転写活性が上昇した (図 1B)。また Akt の下流に位置する転写因子 FoxO1 の強制発現にて CLA-1 転写活性は上昇し (図 2A)、FoxO1 の結合領域の変

異によりアルドステロンにより CLA-1 転写活性の抑制が阻害された (図 2B)。

3, 原発性アルドステロン症における NO 産生能

原発性アルドステロン症において手術前後における NO 産生能をストレンゲージプレチスモグラフにて評価した。検討した症例では、手術によるアルドステロンが減少することにより NO 産生能が上昇した (図 3)。

### D. 考察

マウス SR-B1 およびヒト CLA-1 はステロイド産生組織で発現されており、特に副腎において強く発現されている。我々は CLA-1 が副腎細胞にコレステロールを供給することにより、ステロイドホルモン合成に寄与することを報告してきた。最近、CLA-1 は副腎のみならず血管内皮細胞に発現することが報告された。血管内皮細胞での機能は、HDL の作用を仲介し、内皮型 NOS を活性化し、NO 産生を促進することが指摘された。我々も動脈硬化惹起因子である angiotensin II が血管内皮細胞における CLA-1 の発現を抑制し、HDL により誘導される NOS の活性化を阻害し、動脈硬化を促進していることを報告してきた。今回の検討は、アルドステロンに関して検討をおこなった。原発性アルドステロン症において高血圧だけでなく動脈硬化性疾患の発症および合併が高頻度有ることが指摘されている。我々の検討では、angiotensin II 同様にアルドステロンは、血管内皮細胞における CLA-1 の発現を抑制し、HDL に誘導させる NOS の活性を抑制することを明らかにし

た。またこの作用は、細胞内情報伝達系 PI3-K/Akt/FoxO1 の経路を介することも明らかにした。過剰に存在するアルドステロンは血管内皮細胞における CLA-1 発現を抑制し、eNOS の活性を抑制する可能性が示唆された。以上の結果より、血管内皮細胞に発現されている CLA-1 は高血圧、動脈硬化形成に重要な役割をになっており、アルドステロンはその機能を調節する可能性が示唆された。

## E. 結論

ヒト HDL 受容体 CLA-1 は血管内皮細胞に発現して発現しており、HDL による内皮型 NOS の活性化に重要な役割を演じている。アルドステロンは、血管内皮細胞の CLA-1 発現を抑制し、NO 産生を抑制する可能性が示唆され、高血圧、動脈硬化に重要な役割を演じることが推定された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1, Murao K, Imachi H, Yu X, Cao WM, Nishiuchi T, Chen K, Li J, Ahmed RA, Wong NC, Ishida T

Interferon- $\alpha$  decreases expression of human scavenger receptor class BI, possible HCV receptor in hepatocytes. GUT, (in press)

2, Yu X, Murao K, Imachi H, Cao WM, Li J, Matsumoto K, Nishiuchi T, Ahmed RA, Wong NC, Kosaka H, Unterman TG, Ishida T.

Regulation of scavenger receptor class BI gene expression by angiotensin II in vascular endothelial cells.

Hypertension, 49:1378-84, 2007

3, Yoshida K, Murao K, Imachi H, Cao WM,

Yu X, Li J, Ahmed RA, Kitanaka N, Wong NC, Unterman TG, Magnuson MA, Ishida T. Pancreatic glucokinase is activated by insulin-like growth factor-I.

Endocrinology, 148:2904-13, 2007

4, Murao K, Yu X, Imachi H, Cao WM, Chen K, Matsumoto K, Nishiuchi T, Wong NC, Ishida T

Hyperglycemia suppresses hepatic scavenger receptor class B type I expression.

Am J Physiol Endocrinol Metab, 294:E78-87, 2008

5, Murao K, Yu X, Cao WM, Imachi H, Chen K, Muraoka T, Kitanaka N, Li J, Ahmed RA, Matsumoto K, Nishiuchi T, Tokuda M, Ishida T.

D-Psicose inhibits the expression of MCP-1 induced by high-glucose stimulation in HUVECs.

Life Sci, 81:592-9, 2007

6, Murao K, Imachi H, Sato M, Dobashi H, Tahara R, Haba R, Kakehi Y, Ishida T.

A case of pheochromocytoma complicated with slowly progressive type 1 diabetes mellitus and chronic thyroiditis.

Endocrine. 2008 Feb 7; [Epub ahead of print]

7, Matsumoto K, Murao K, Imachi H, Nishiuchi T, Cao W, Yu X, Li J, Ahmed RA, Iwama H, Kobayashi R, Tokumitsu H, Ishida T.

The role of calcium/calmodulin-dependent protein kinase cascade on MIP-1 $\alpha$  gene expression of ATL cells.

Exp Hematol. 2008 Jan 29; [Epub ahead of print]

### 2. 学会発表

1, 井町仁美、村尾孝児、吉田和矢、藤原



真子、石田俊彦

Angiotensin II による P13-K/Akt/FoxO1 を介した HDL 受容体の発現調節について  
第 80 回日本内分泌学会学術総会、東京、平成 19 年 6 月

2, 井町仁美、村尾孝児、藤原真子、村岡都美江、北中則子、石田俊彦

肝臓におけるチアゾリジン誘導体の HDL 受容体発現調節について

第 80 回日本内分泌学会学術総会、東京、平成 19 年 6 月

3, Ahmed RA, Murao K, Imachi H, Li J, Ishida T.

Thiazolidinedione increase the expression of human scavenger receptor class B Type I (SR-B I) in Hep G2 cells  
14th Japan-Korea Symposium on Diabetes Mellitus、京都、2007.11

4, Li J, Murao K, Imachi H, Muraoka T, Ahmed RA, Ishida T

PREB, prolactin regulatory element binding protein is involved in cAMP-mediated adiponectin gene expression in 3T3-L1 cells.

14th Japan-Korea Symposium on Diabetes Mellitus、京都、2007.11

5, 村岡都美江、村尾孝児、井町仁美、吉田和矢、北中則子、永尾 幸、西内崇、西内由紀子、石田俊彦

膵  $\beta$  細胞において転写因子 FoxO1 は Glucokinase (GK) 発現を調節する

第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会、仙台、平成 19 年 5 月

6, 井町仁美、村尾孝児、村岡都美江、北中則子、吉田和矢、永尾 幸、西内由紀子、石田俊彦

PPAR- $\gamma$ -ligand は肝臓における HDL 受容体発現を増強する

第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会、仙台、平成 19 年 5 月

7, 村尾孝児、井町仁美、村岡都美江、吉田和矢、北中則子、永尾 幸、西内崇将、

西内由紀子、石田俊彦

血管内皮細胞において転写因子 FoxO1 は HDL 受容体 CLA-1 の発現を調節する  
第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会、仙台、平成 19 年 5 月

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

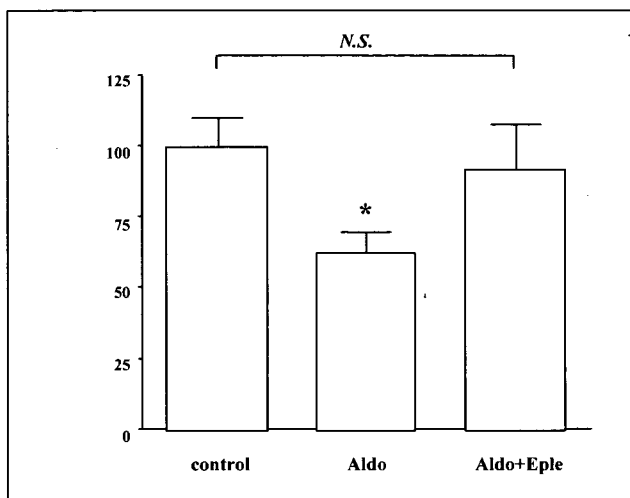
なし

### 3. その他

なし

図 1,

A) CLA-1 転写活性におよぼすアルドステロンの影響



B) PI3-K, Akt の CLA-1 転写活性に及ぼす影響について

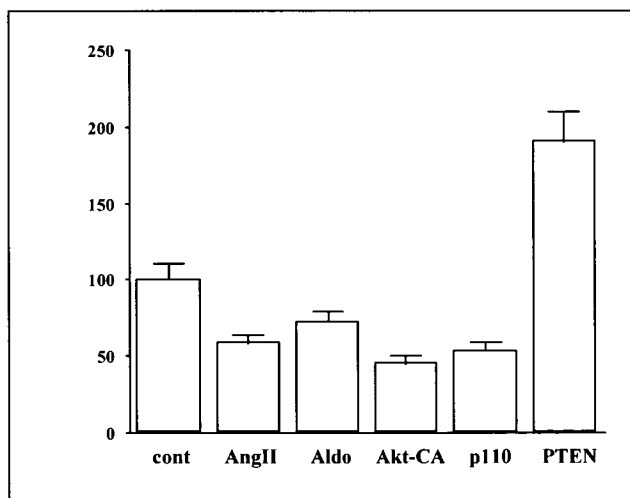
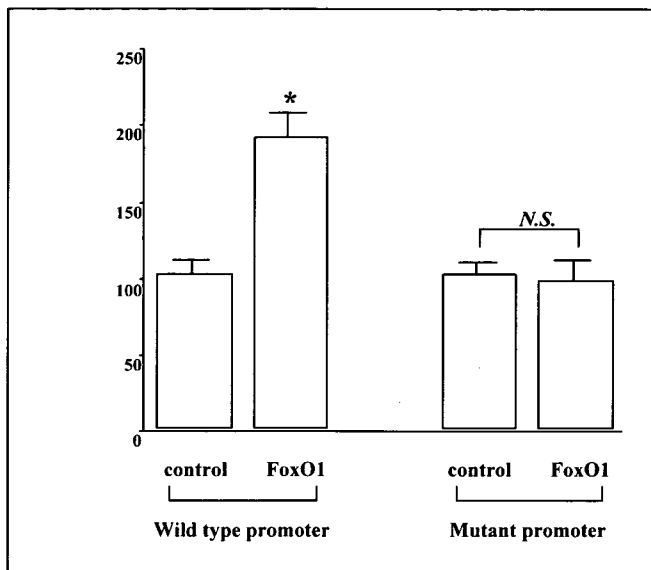


図 2,

A) 転写因子 FoxO1 の CLA-1 転写活性に及ぼす影響について



B) FoxO1 結合領域変異と CLA-1 転写活性

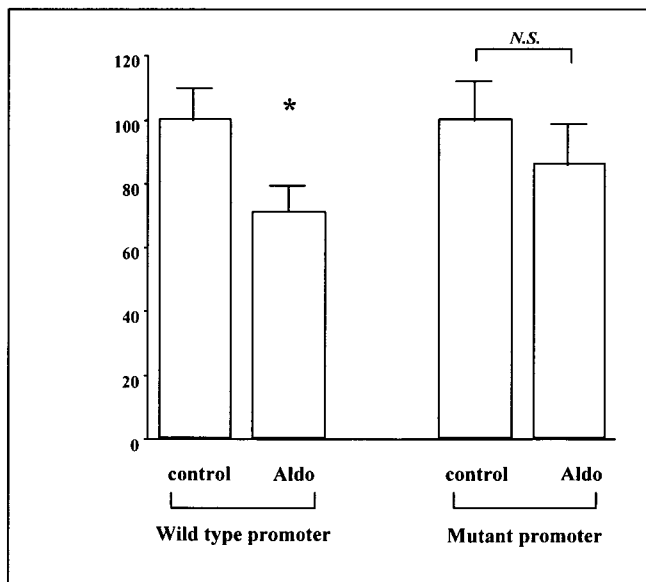


図 3, ストレンゲージプレチスモグラフによる原発性アルドステロン症患者における NO 産生能について

