

アルドステロン分泌因子 BMP-6 の制御による 新たな食塩感受性高血圧の治療を目指した基礎研究

大塚 文男

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

概要 食塩感受性高血圧の成因として、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系(RAA系)の関与は大きい。副腎皮質から分泌される電解質コルチコイドホルモンである「アルドステロン」は食塩感受性の決定に重要な役割を担う。RAA系を抑制する降圧薬として、アンジオテンシン変換酵素阻害薬(ACEI)やアンジオテンシン II(Ang II)タイプ 1 受容体拮抗薬(ARB)による有効性が知られるが、アルドステロンの抑制効果が減弱して循環レベルが再上昇する「アルドステロンブレイクスルー現象」も生じうる。ブレイクスルーにより再上昇したアルドステロンは、結果として心腎血管障害などの臓器障害を惹起し、食塩感受性高血圧の臓器障害をさらに進行させることが臨床的に問題となる。しかしながら、この現象の発生メカニズムの詳細は現時点では不明である。

我々はこれまで、副腎皮質からのアルドステロン合成において Ang II と協調作用をもつ BMP-6 の存在について報告し、副腎皮質に発現する BMP-6 が Ang II によるアルドステロン産生を刺激し、一方で activin は ACTH によるアルドステロン産生を促進するというメカニズムを明らかにした。今回の研究では、ラット(male Sprague-Dawley rats)を用いて、内因性 BMP-6 阻害によるアルドステロン産生能の変化を *in vivo* において検証した。BMP-6-KLH ハプテン投与によって BMP-6 抑制モデルを作成し、アルドステロン分泌能の変化および副腎組織でのアルドステロン合成酵素の発現変化を中心に検討した。

結果として、BMP-6-KLH 投与群において、尿中アルドステロン排泄量の有意な減少が認められた。しかし Ang II 投与ラットでは、BMP-6 抑制による尿中アルドステロン分泌の抑制作用は減弱した。BMP-6 を抑制したラット副腎において、アルドステロン合成酵素 CYP11B2 mRNA レベルの有意な抑制を認め、尿中アルドステロン排泄量と副腎における CYP11B2 の発現レベルは正の相関を呈した。さらに、BMP-6-KLH 投与ラットにおける血漿中のアルドステロン(Aldo)/コルチコステロン(B)比は、BMP-6 抑制群において有意な低下を認めた。

これらの結果を通じて、*in vivo* における内因性の BMP-6 は、副腎皮質におけるアルドステロン産生能において1つのキーファクターであることが示された。副腎に発現する BMP-6 および関連因子を血中・genome において決定することで、食塩感受性高血圧やブレイクスルー発生の指標とするための臨床応用への可能性を期待し、さらに研究を進めている。

1. はじめに

食塩感受性高血圧の成因として、生体における内分泌因子レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系(RAA系)の関与は大きい。副腎皮質から分泌される電解質コルチコイドホルモンである「アルドステロン」は食塩感受性の決定に重要な役割を担う。古典的なアルドステロンの昇圧作用は、腎臓でのナトリウム(Na)・水貯留による循環血漿量

の調節によるものであるが、近年アルドステロン受容体であるミネラルコルチコイド受容体(MR)が脳・心臓・血管にも見出され、腎臓を介する古典的な昇圧作用に加えて、非上皮組織を介したアルドステロンの中枢性・末梢性昇圧作用の存在も示された。さらに抗アルドステロン薬を用いた大規模臨床試験である RALES/EPHESUS 研究では抗アルドステロン薬が心不全の生命予後を有意に改善する

ことが報告され、アルドステロンの臓器障害因子としての側面についても認識されてきた。

食塩感受性高血圧に対する治療の側面から、RAA系を抑制する降圧薬として、アンジオテンシン変換酵素阻害薬(ACEI)やアンジオテンシン II(Ang II)タイプ 1 受容体拮抗薬(ARB)による有効性が知られるが、一方で ACEI や ARB 薬剤の長期投与により、理論上抑制されるはずのアルドステロンの抑制効果が減弱して循環レベルが再上昇する「アルドステロンブレイクスルー現象」が生じうることも認識されてきた。ブレイクスルーにより再上昇したアルドステロンは、結果として心腎血管障害などの臓器障害を惹起し、食塩感受性高血圧の臓器障害をさらに進行させることが臨床的に問題となる。しかしながら、この現象の発生メカニズムの詳細は現時点では不明である。アルドステロンは、副腎皮質球状層においてコレステロールを基質として合成され、主な合成・分泌の調節因子として、アンジオテンシン II(Ang II)、カリウム(K)及び副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)が知られているが、さらに副腎局所に存在する種々の因子(autocrine/paracrine factors)により巧妙に制御されていると考えられる。

2. 研究の背景

我々は最近、副腎皮質からのアルドステロン合成において Ang II と協調作用をもつ新規の因子として、副腎皮質の球状層を主体に発現する BMP-6 (bone morphogenetic protein-6) の存在について報告した⁽¹⁾。我々は、まず副腎皮質組織および細胞において、TGF- β スーパーファミリーに属する成長因子である BMP-6 や activin のリガンド・受容体および結合蛋白を含む機能的 BMP/activin システムが存在することを証明した⁽²⁾。次いで、アルドステロン産生能を有する副腎皮質 NCI-H295R 細胞を用いた検討では、副腎皮質に発現する BMP-6 が Ang II によるアルドステロン産生を刺激し、一方で activin は ACTH によるアルドステロン産生を促進するという新しいアルドステロン分泌メカニズムについて明らかにした。さらに、BMP-6 が副腎皮質において、Ang II により活性化される MAPK 経路のリン酸化を促進して、アルドステロン合成酵素(CYP11B2)の転写・発現を誘導し、アルドステロンの分泌を増強することを明らかにした⁽³⁾。この BMP-6 によるアルドステロン合成の増強作用は、K や ACTH でのア

ルドステロン合成刺激には影響しないことから、Ang II に特異的である。一方で、Ang II が副腎皮質の内因性 BMP-6 の発現を減弱させることも明らかとなり、Ang II-BMP-6 間にフィードバックの存在が示唆された⁽⁴⁾。慢性的な Ang II 刺激下においてアルドステロン分泌能を評価する副腎細胞培養系での検討では、BMP-6 シグナルの活性化が ERK を増強して、ARB 投与にも関わらずアルドステロンの再上昇を惹起する可能性、つまりブレイクスルーの機序に副腎皮質に内在する BMP-6 作用の増強が関与している可能性が初めて示された⁽⁵⁾。

3. 研究の目的

これまでの我々のデータから推察して、BMP-6 は高血圧治療時に問題となるアルドステロンブレイクスルー現象にも関与している。本研究期間では、食塩感受性高血圧に強く関連するアルドステロン分泌機構の探求を通じてブレイクスルー現象の分子機序に着目し、*in vitro/in vivo* の両研究によりアルドステロン分泌調節の分子機序を探求し食塩感受性高血圧の発生機序に迫る。本研究では、食塩感受性高血圧の鍵となる副腎アルドステロン調節機序の解明を目的とし、副腎皮質に発現する局所因子でありアルドステロン合成・分泌において Ang II との協調作用を示す BMP-6 の生理的役割に焦点を当てる。

4. 方法と結果

ラット(male Sprague-Dawley rats)を用いて、内因性 BMP-6 阻害によるアルドステロン産生能の変化を *in vivo* において検証した。ラットに BMP-6-KLH ハプテン:rat BMP-6 (mature domain: QSQDVSRGSSASDYN, 15 amino acids) antigen conjugated with keyhole limpet hemocyanin (KLH) at the C-terminus (Sigma-Genosys Japan)を連続的に皮下投与して、能動免疫法によって BMP-6 抑制モデルを作成したのち、アルドステロン分泌能の変化および副腎組織でのアルドステロン合成酵素の発現変化を中心に検討した。図 1A に示すように、BMP-6-KLH およびコントロール-KLH 投与によるラット体重・副腎重量・腎重量に変化を認めなかった。また、図 1B に示すように、BMP-6-KLH 投与群において、血清中に抗 BMP-6 抗体を検出した。尿中アルドステロン排泄量は、BMP-6 抑制群において、図 2A および 3A に示すように投

与8週までに有意に減少した。しかしながら、**図 2B** および **3B** に示すように、Ang II 投与ラットでは、BMP-6 抑制による尿中アルドステロン分泌の抑制作用は減弱した。この機序を検討したところ、BMP-6 を抑制したラット副腎において、アルドステロン合成酵素 *CYP11B2* mRNA レベルの有意な抑制を認めた (**図 4A**)。また、尿中のアルドステロン

排泄量と副腎における *CYP11B2* の発現レベルは正の相関を呈した (**図 4B**)。さらに、BMP-6-KLH 投与ラットにおける血漿中のアルドステロン (Aldo) とコルチコステロン (B) は有意な変化を示さなかったが、Aldo/B 比は、BMP-6 抑制群において有意な低下を認めた。

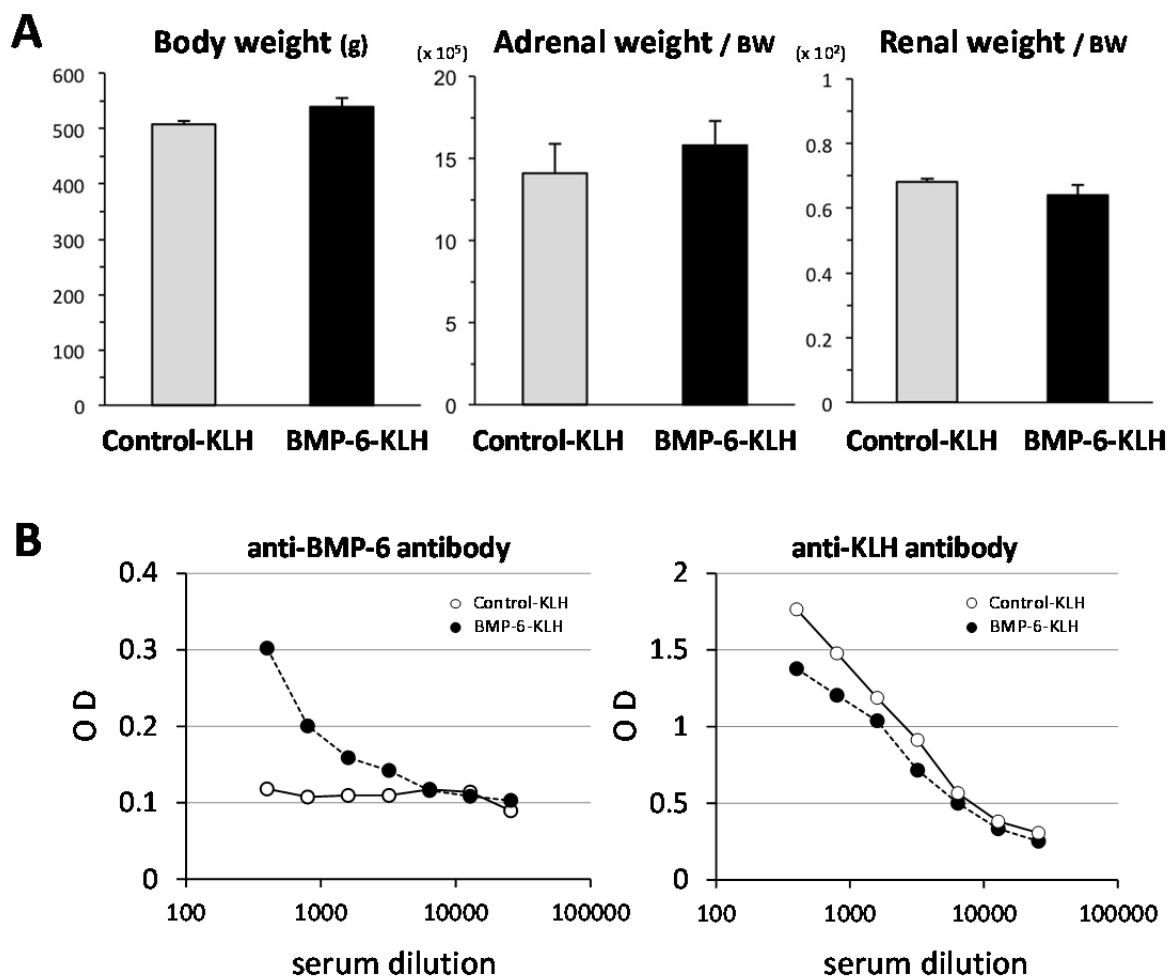


Fig. 1. Effects of BMP-6-KLH administration on body weight, adrenal weight and immunological response. A) Body weight (g), bilateral adrenal and kidney weights (g), and body weight ratios were measured after an 8-week immunization period. Results are shown as means \pm SEM. B) Serum antibodies specific to mature BMP-6 were determined by ELISA using a plate coated with BMP-6 or KLH. Plates were incubated with serial dilutions (1:400 to 25,600) of the serum samples, and the presence of polyclonal anti-BMP-6 and anti-KLH antibodies was detected using enzymatic reaction with alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rat IgG antibody.

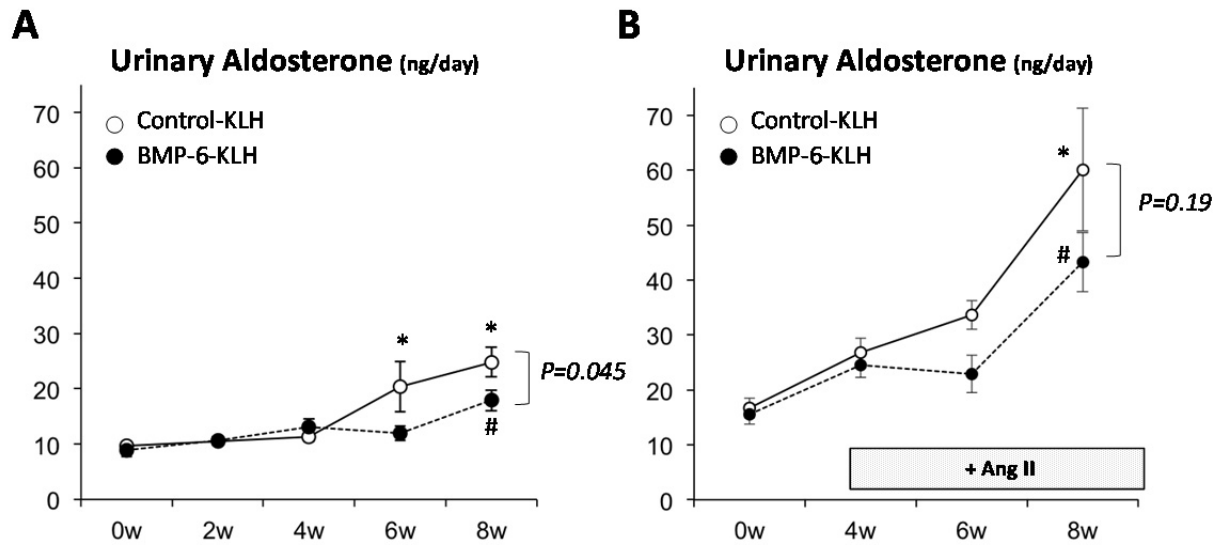


Fig. 2. Effects of BMP-6 inhibition on urinary aldosterone excretion. Three-week-old male SD rats were actively immunized with rat mature BMP-6 antigen conjugated with KLH. Urinary samples accumulated for 24 hours were collected before and at weeks 2 to 8 after immunization in the absence (A) or presence (B) of Ang II administration. Aldosterone levels in 24-hour urine samples were determined by radioimmunoassay. Results are shown as means \pm SEM; *, $P < 0.05$ vs. 0-w level of control-KLH group; #, $P < 0.05$ vs. 0-w level of BMP-6-KLH group.

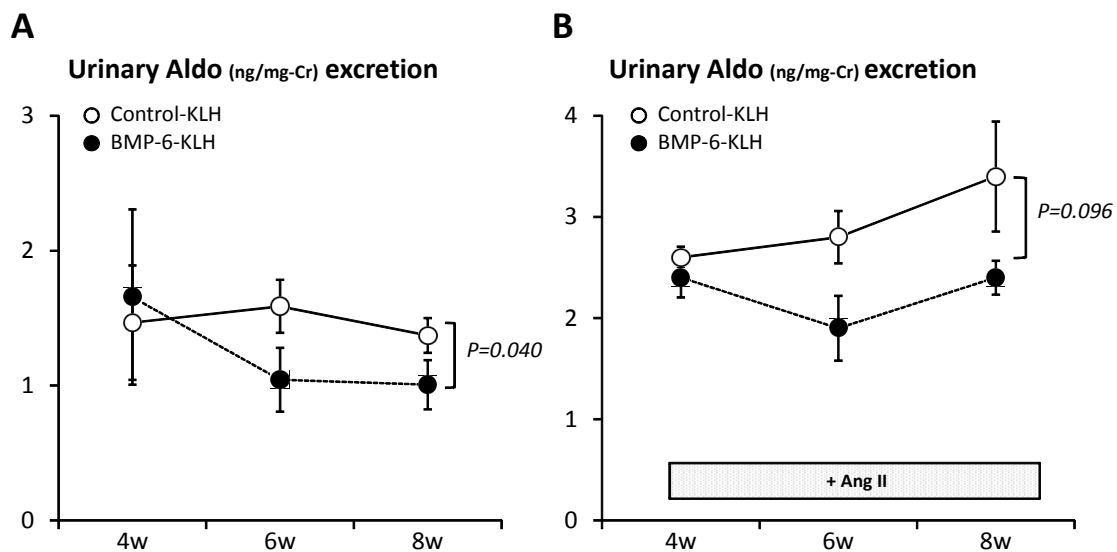


Fig. 3. Effects of BMP-6 inhibition on ratio of urinary aldosterone to creatinine. Three-week-old male SD rats were actively immunized with rat mature BMP-6 antigen conjugated with KLH. A) SD rats were serially immunized with 0.1 mg/animal of either KLH antigen alone (control-KLH group) or mature BMP-6-conjugated KLH (BMP-6-KLH group). B) Rats were immunized by the same protocol with treatment of Ang II (200 ng/kg-bw/min) for 4 weeks using a subcutaneously implanted osmotic mini-pump. Urinary samples accumulated for 24 hours were collected before and at weeks 4 to 8 after immunization. Aldosterone and creatinine levels in 24-hour urine samples were determined by radioimmunoassay and enzyme assay, respectively. Results are shown as means \pm SEM.

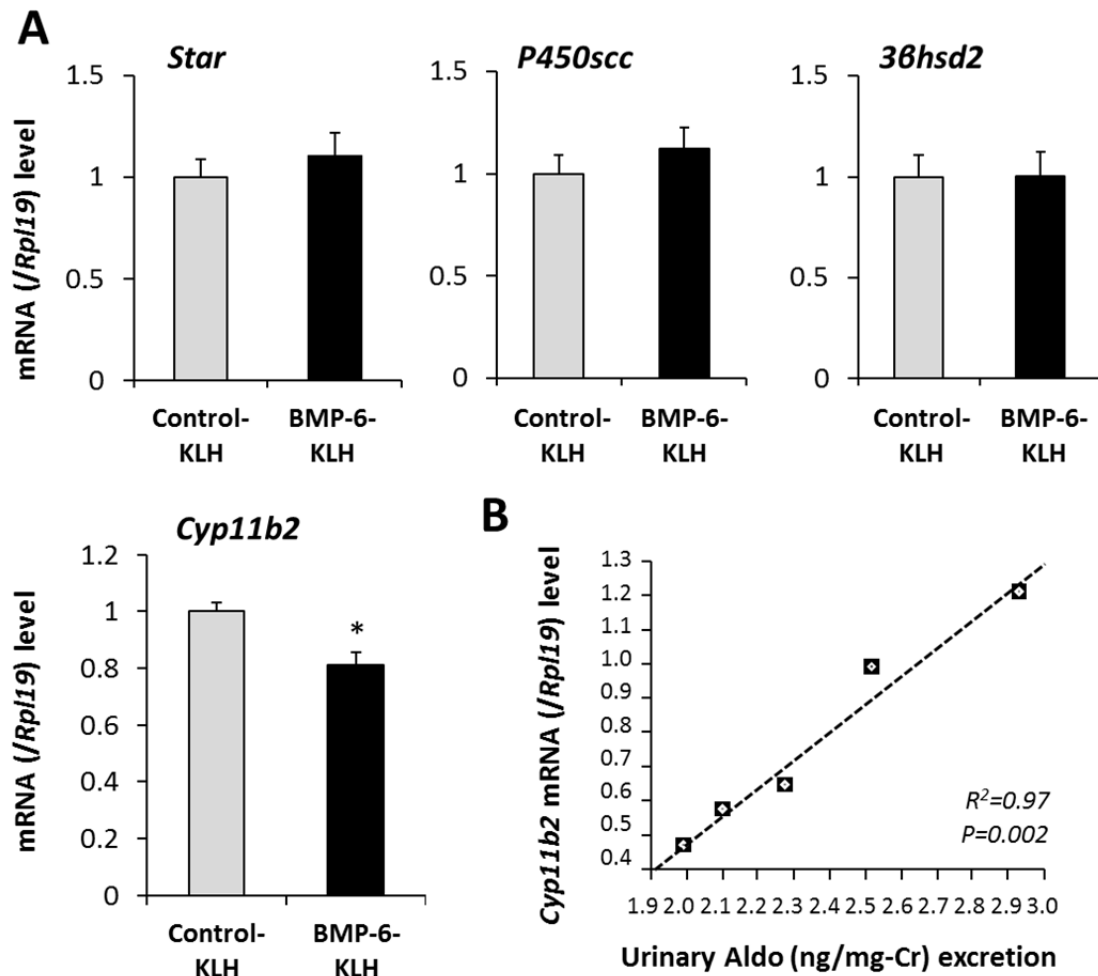


Fig. 4. Effects of BMP-6 inhibition on expression of adrenal steroidogenic enzymes. A) Three-week-old male SD rats were actively immunized with rat mature BMP-6 antigen conjugated with KLH. SD rats were serially immunized with 0.1 mg/animal of either KLH antigen alone (control-KLH group) or mature BMP-6-conjugated KLH (BMP-6-KLH group). Adrenal tissues and plasma samples were collected after an 8-week immunization period. Expression levels of adrenal *Star*, *P450scc*, *3βhsd2* and *Cyp11b2* mRNA were determined by real-time PCR. Expression levels of the target genes were standardized by Rpl19 level in each sample. Results are shown as means ± SEM; *, $P<0.05$ vs. control-KLH group. B) Linear regression analysis was performed for the expression level of *Cyp11b2* mRNA in adrenal tissue and urinary excretion of aldosterone in the BMP-6-KLH group rats treated with Ang II for 4 weeks (n=5).

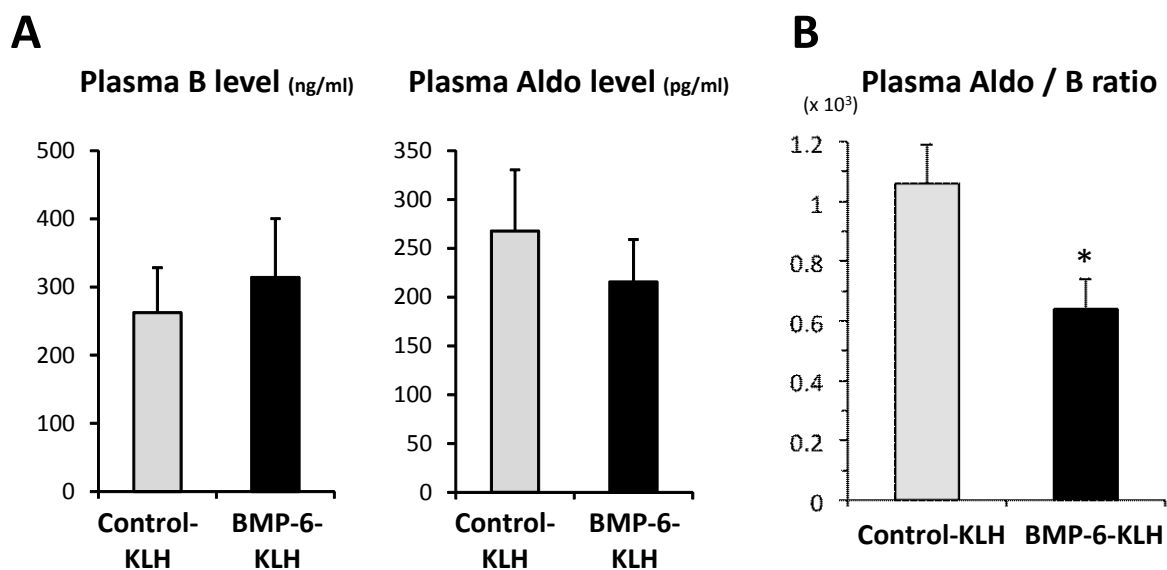


Fig. 5. Effects of BMP-6 inhibition on plasma corticosterone and aldosterone levels. Three-week-old male SD rats were actively immunized with rat mature BMP-6 antigen conjugated with KLH. SD rats were serially immunized with 0.1 mg/animal of either KLH antigen alone (control-KLH group) or mature BMP-6-conjugated KLH (BMP-6-KLH group). A) Corticosterone (B) and aldosterone (Aldo) levels in plasma were determined by radioimmunoassay. B) The ratio of plasma Aldo/B was also examined. Results are shown as means \pm SEM; *, $P < 0.05$ vs. control-KLH group.

5. 研究総括と方向性

これらの結果を通じて、*in vivo* における内因性の BMP-6 は、副腎皮質におけるアルドステロン産生能において1つのキーファクターであることが示された。この BMP-6 によるアルドステロン分泌への影響は、Ang II の処理下では減弱することから、我々の以前の *in vitro* での副腎皮質細胞での結果⁽⁶⁾、つまり Ang II 作用下では BMP-6/BMP 受容体シグナルが減弱することと矛盾しないものと考えられた。

アルドステロンによる臓器障害の抑止は高血圧治療の重要な課題である。臨床で問題となるアルドステロンブレイクスルー現象の発生機序にアプローチすることで、食塩感受性高血圧の治療においてアルドステロンを効果的に制御できる ARB/ACEI 薬剤の選択指針を明らかにし、降圧薬治療への反応性・抵抗性の新たな指標を探索したいと考えている。また副腎に発現する BMP-6 および関連因子を血中・genome において決定することで、食塩感受性高血圧やブレイクスルー発生の指標とするための臨床応用を目指し、その基礎となる研究を計画した。

謝 辞

本研究内容は、J Steroid Biochem Mol Biol に掲載予定であり、論文中に、本財団への謝辞を述べさせていただきます。

参考文献

1. Otsuka F 2010 Multiple endocrine regulation by bone morphogenetic protein system. *Endocr J* 57: 3-14
2. Suzuki J, Otsuka F, Inagaki K, Takeda M, Ogura T, Makino H 2004 Novel action of activin and bone morphogenetic protein in regulating aldosterone production by human adrenocortical cells. *Endocrinology* 145: 639-649
3. Inagaki K, Otsuka F, Suzuki J, Kano Y, Takeda M, Miyoshi T, Otani H, Mimura Y, Ogura T, Makino H 2006 Involvement of bone morphogenetic protein-6 in differential regulation of aldosterone production by angiotensin II and potassium in human adrenocortical cells. *Endocrinology* 147: 2681-2689
4. Inagaki K, Otsuka F, Suzuki J, Otani H, Takeda M, Kano

- Y, Miyoshi T, Yamashita M, Ogura T, Makino H 2007
Regulatory expression of bone morphogenetic protein-6
system in aldosterone production by human
adrenocortical cells. Regul Pept 138: 133-140
5. Otani H, Otsuka F, Inagaki K, Suzuki J, Miyoshi T, Kano
Y, Goto J, Ogura T, Makino H 2008 Aldosterone
breakthrough caused by chronic blockage of angiotensin
II type 1 receptors in human adrenocortical cells:
Possible involvement of bone morphogenetic protein-6
actions. Endocrinology 149: 2816-2825
6. Otani H, Otsuka F, Inagaki K, Suzuki J, Makino H 2010
Roles of bone morphogenetic protein-6 in aldosterone
regulation by adrenocortical cells. Acta Med Okayama
64: 213-218

Basic Study for Investigating Novel Regulatory Effects of BMP-6 on Salt-Sensitive Hypertension

Fumio Otsuka

Department of General Medicine, Okayama University Graduate School of Medicine,
Dentistry and Pharmaceutical Sciences

Summary

Aldosterone is synthesized in the zona glomerulosa of the adrenal cortex. We previously reported the presence of a functional BMP system including BMP-6 in human adrenocortical cells. BMP-6 contributes to Ang II-induced aldosterone production by activating Smad signaling, in which endogenous BMP-6 action is negatively controlled by Ang II *in vitro*. In the present study, we examined the *in vivo* role of BMP-6 in regulation of aldosterone by neutralizing endogenous BMP-6 in rats treated with immunization against BMP-6. Three-week-old male rats were actively immunized with rat mature BMP-6 antigen conjugated with keyhole limpet hemocyanin (KLH). The immunization treatment had no effect on bilateral adrenal weight or its ratio to body weight. Urinary aldosterone excretion was time-dependently increased during the 8-week observation period in the control group. Of note, the level of urinary aldosterone excretion in BMP-6-KLH-immunized rats was significantly reduced compared to that in the control group, suggesting that endogenous BMP-6 contributes to the induction of aldosterone production *in vivo*. Moreover, the level of urinary aldosterone / creatinine after 8-week treatment was significantly lowered by treatment with BMP-6-KLH. In contrast, with chronic Ang II treatment, urinary aldosterone and creatinine-corrected values at 8 weeks were not significantly different between the two groups, suggesting that the effects of BMP-6-KLH were impaired under the condition of chronic treatment with Ang II. The mRNA levels of *Cyp11b2*, but not those of *Star*, *P450scc* and *3 β hsd2*, were significantly decreased in adrenal tissues isolated from BMP-6-KLH-immunized rats after 8-week treatment. Furthermore, the ratio of plasma aldosterone level to corticosterone was significantly decreased by immunization with BMP-6-KLH. Collectively, the results indicate that endogenous BMP-6 is functionally linked to aldosterone synthesis by the zona glomerulosa in the adrenal cortex *in vivo*.