

## アルドステロンによって生じる臓器障害と酸化ストレス：特に腎障害作用について

西山 成,<sup>\*,a,b</sup> 日下 隆,<sup>b,c</sup> 北島博之<sup>b,d</sup>

## Role of Aldosterone in Oxidative Stress and Renal Injury

Akira NISHIYAMA,<sup>\*,a,b</sup> Takashi KUSAKA,<sup>b,c</sup> and Hiroyuki KITAJIMA<sup>b,d</sup><sup>a</sup>Department of Pharmacology, <sup>b</sup>Hypertension and Kidney Disease Research Center, <sup>c</sup>Department of Pediatrics,<sup>d</sup>Faculty of Engineering, Kagawa University, 1750-1 Ikenobe, Miki-cho, Kita-gun, Kagawa 761-0793, Japan

(Received May 21, 2007)

Recent clinical studies have indicated the utility of mineralocorticoid receptor (MR) antagonists in cardiovascular and renal injuries. Chronic treatment with aldosterone/salt resulted in severe cardiac and renal injuries in rats. Further studies showed that the aldosterone-induced organ injuries were associated with increases in expression of NADPH oxidase components and reactive oxygen species (ROS) levels. Treatment with a selective MR antagonist, eplerenone, prevented the elevation of ROS levels and ameliorated organ injuries. *In vitro* studies also showed that MR is highly expressed in cultured vascular smooth muscle cells, glomerular mesangial cells and renal fibroblasts. In these cells, aldosterone-induced cell injuries were associated with increases in NADPH oxidase activity and superoxide generation. Further, the aldosterone-dependent cell injuries were markedly attenuated by treatment with eplerenone. These accumulating data support the notion that the aldosterone/MR is involved in the pathogenesis of cardiovascular and renal injuries through NADPH oxidase-dependent ROS production.

**Key words**—aldosterone; mineralocorticoid receptor; oxidative stress, NADPH oxidase

## 1. はじめに

レニン・アンジオテンシン系は、アンジオテンシン II の AT<sub>1</sub> 受容体を介した強力な血管収縮作用や細胞障害作用などによって、高血圧の進展のみならず各種臓器障害に強く関与している。実際、降圧剤として頻用されているアンジオテンシン変換酵素 (angiotensin converting enzyme: ACE) 阻害薬や AT<sub>1</sub> 受容体拮抗薬は、様々な病態から臓器を保護して生命予後を改善させる。一方で、アンジオテンシン II は副腎におけるアルドステロンの産生・分泌を刺激することが知られている。従来アルドステロンは腎遠位尿細管のミネラルコルチコイド受容体に作用する、単なる電解質調節ホルモンに過ぎないと考えられていた。ところが最近発表された大規模臨床試験 RALES (Randomized Aldactone Evalua-

tion Study)<sup>1)</sup>により、ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬であるスピロラクトンが心不全の生命予後を著明に改善することが証明された。以後、アルドステロンに対する研究は急展開をみせ、その強力な臓器障害作用が明らかとなってきた。本稿ではアルドステロンの腎臓を中心とした臓器障害作用について、酸化ストレスの関与とともに概説する。

## 2. 臨床研究で明らかとなったアルドステロン/ミネラルコルチコイド受容体による腎障害作用

原発性アルドステロン症患者では蛋白尿が多く観察されるが、血中アルドステロン濃度と蛋白尿の程度が有意に相関することが報告されている。<sup>2)</sup> また、重度蛋白尿を生じている腎症患者では、血中アルドステロン濃度がクレアチニンクリアランスの低下、あるいは腎障害スコアと有意に相関していることが報告された。<sup>3)</sup> しかも、腎症患者では腎組織中ミネラルコルチコイド受容体発現が増加していることも示された。<sup>3)</sup> さらに最近、腎症患者では腎組織中 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 発現が減少していることも報告されたことから、コーチゾールがミネラルコルチコイド受容体に作用してい

<sup>a</sup>香川大学医学部薬理学, <sup>b</sup>同高血圧腎臓疾患リサーチセンター, <sup>c</sup>香川大学医学部小児科, <sup>d</sup>香川大学工学部信頼性情報システム工学科 (〒761-0793 香川県木田郡三木町大字池戸 1750-1)

\*e-mail: akira@kms.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 127 年会シンポジウム S19 で発表したものを中心に記述したものである。

るのではないかと考えられている。<sup>4)</sup>

ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬の腎保護作用に関する臨床報告も既に行われている。ACE 阻害薬を服用している2型糖尿病や慢性腎不全患者に対してスピロラクトンを少量併用すると、血圧には影響を与えないものの有意な蛋白尿の減少を認める。<sup>5,6)</sup> また、ACE 阻害薬慢性投与患者では血中アルドステロン濃度が上昇してくる現象、いわゆる「アルドステロン・ブレイクスルー」(あるいは「アルドステロン・エスケープ」)が生じるが、このような2型糖尿病患者に対するスピロラクトンの併用は蛋白尿を著明に減少させる。<sup>7)</sup> さらに最近ではACE 阻害薬であるエナラプリルよりも、むしろ選択的ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬であるエプレレノンの単剤投与の方が強い蛋白尿抑制効果を示すという報告も出てきている。<sup>8)</sup> 一方、エプレレノン(50–200 mg)とカルシウム拮抗薬であるアムロジピン(2.5–20 mg)は同程度の降圧作用を示すが、尿中微量アルブミン/クレアチニン比はアムロジピンと比較してエプレレノンで有意に抑制されることも示された。<sup>9)</sup> これら一連の臨床結果は、ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬の降圧を介さない腎保護作用を証明するものである。現在までのところ、高カリウム血症が懸念されてミネラルコルチコイド受容体拮抗薬の腎症への適応は承認されるに至っていないが、実際に腎保護効果を有することは間違いない。

### 3. 動物実験で明らかとなったアルドステロン/ミネラルコルチコイド受容体による腎障害作用

アルドステロンによって生じる腎障害に関する研究は、主にラットに対してアルドステロンと1%食塩水を長期投与するモデルを使用して行われているが、<sup>10–12)</sup> deoxycorticosterone acetate (DOCA)/食塩投与高血圧ラットモデルと類似しており、片腎摘出によって病態は著明に悪化する。<sup>11,12)</sup> このモデルでは重篤な蛋白尿を呈し、組織学的にはメサンギウム領域を中心とした腎糸球体の障害や尿細管間質障害などが観察される。<sup>10–13)</sup> このようなアルドステロンによって生じる腎障害は、ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬で抑制される。すなわち、アルドステロンが腎内ミネラルコルチコイド受容体に作用し、これが障害に直結していると考えられる。

脳卒中易発症高血圧自然発症ラットに食塩を負荷

すると悪性高血圧が生じ、重篤な蛋白尿と腎組織障害が出現する。これに対して血圧には影響を与えない低用量のスピロラクトンを投与すると、蛋白尿と腎組織障害は著しく改善された。<sup>14)</sup> また、同モデルに対してACE 阻害薬も同様の効果を示したが、アルドステロンの同時投与は血圧には影響を与えないものの、ACE 阻害薬の腎保護作用を消失させた。<sup>15)</sup> このほかにも糖尿病、<sup>16)</sup> あるいは放射線<sup>17)</sup> や免疫抑制剤<sup>18)</sup> によって生じる腎障害ラットモデルでも、スピロラクトンは血圧を低下させずに腎保護効果を有することが報告されている。さらに最近、食塩感受性高血圧<sup>19)</sup> や糖尿病<sup>20)</sup> モデル動物におけるエプレレノンの腎保護効果も報告されている。

### 4. 非上皮性細胞におけるミネラルコルチコイド受容体発現

ミネラルコルチコイド受容体は腎遠位尿細管に発現していて、アルドステロンによる電解質調節をつかさどっていることは古くより知られている。しかし、アルドステロン投与ラットや他の動物モデルで観察されるミネラルコルチコイド受容体の腎保護作用は、腎遠位尿細管に局限していない。すなわち、従来知られている部位以外にもミネラルコルチコイド受容体が腎内で発現していることが疑われる。そこで、各種腎培養細胞のミネラルコルチコイド受容体発現を検討した。Figure 1(A)にウェスタンブロット法を用いた培養ラット糸球体細胞、ラット腎由来線維芽細胞、ラット血管平滑筋細胞のミネラルコルチコイド受容体の蛋白発現を示す。ミネラルコルチコイド受容体は、これら非上皮性細胞に蛋白レベルで強く発現していた。<sup>21–23)</sup> Figure 1(B)には免疫染色法にて培養メサンギウム細胞におけるミネラルコルチコイド受容体の局在を示している(緑)。ミネラルコルチコイド受容体の局在は、細胞膜のみに発現している $\alpha$ インテグリン(赤)とは一致していなかった。すなわち、ミネラルコルチコイド受容体



西山 成

香川大学医学部薬理学教授。1969年2月生まれ。香川医科大学卒業・博士課程終了。2000年香川医科大学薬理学助手、2007年2月より教授、現在に至る。この間米国チュレーン大学生理学に留学、現在もfacultyを兼務している。腎・高血圧を中心とした、循環器疾患・生活習慣病に対する病態解明と治療戦略を中心に研究を行っている。

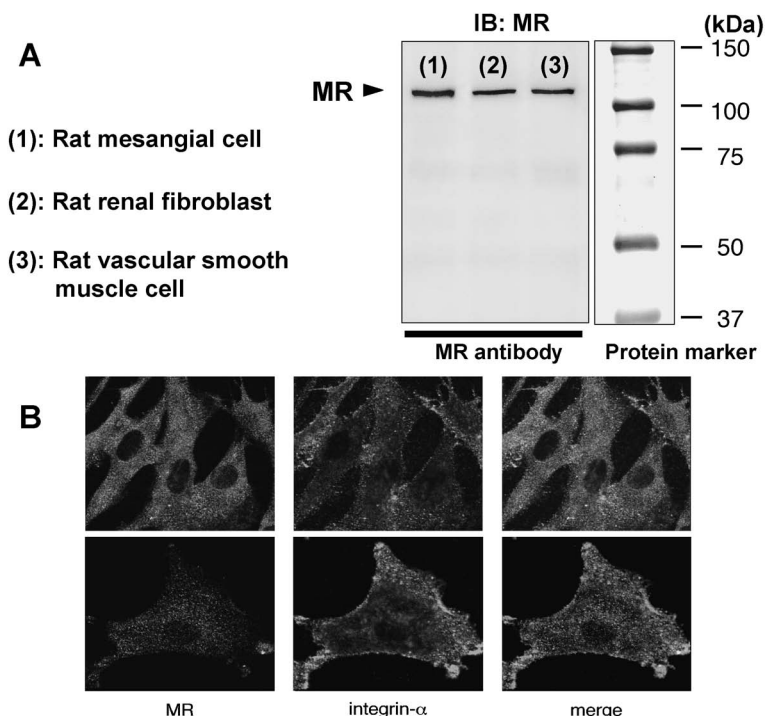


Fig. 1. A: Mineralocorticoid Receptor (MR) Protein Expression in Cultured Rat Mesangial Cells, Renal Fibroblasts and Vascular Smooth Muscle Cells, Measured by Western Blotting Analysis, B: Distribution of MR and  $\alpha_1$ -Integrin in Rat Mesangial Cells. Significant MR protein expression is detected at approximately 110 kDa in total lysates of these cells. Superimposition of the images does not reveal any areas of co-localization of MR and  $\alpha_1$ -integrin (a known membrane marker). Data are from Ref. 21).

は主に細胞質に発現していると考えられた。<sup>21)</sup> 同様の結果が培養ラット血管平滑筋細胞でも観察されている。<sup>23)</sup>

##### 5. アルドステロンによる腎障害と酸化ストレス

腎臓を含めた様々な心血管系臓器の病態において、酸化ストレスの役割が報告されている。また、酸化ストレスは直接細胞を障害するばかりでなく、細胞内のシグナル伝達系に影響を与え、細胞の分化や増殖、アポトーシスなどに関与している。われわれは、血管作動性物質であるアンジオテンシン II,<sup>24)</sup> エンドセリン,<sup>25)</sup> イソプロテレノール<sup>26)</sup> が NADPH オキシダーゼを活性化し、酸化ストレスを生じて組織障害を引き起こすことを報告している。さらに、高血圧に伴う腎障害や糖尿病性腎症などの病態における、NADPH オキシダーゼを介した酸化ストレスの役割を報告している。<sup>27,28)</sup>

ラットに対してアルドステロンと 1% 食塩水を慢性投与した場合に観察される腎障害では、腎臓組織内の NADPH オキシダーゼの各種膜コンポーネントの mRNA 発現は増加しており、酸化ストレスのマーカーである thiobarbituric acid-reactive sub-

stances (TBARS) の含有量も増加している。<sup>10)</sup> 一方、これら NADPH オキシダーゼの膜コンポーネントの mRNA 発現の亢進と、酸化ストレスのマーカーである TBARS の増加は、エプレレノン同時投与により完全に抑制された (Fig. 2)。<sup>10)</sup> したがって、アルドステロンがミネラルコルチコイド受容体を介して NADPH オキシダーゼ発現を増加させ、酸化ストレスの産生を増大させていることが示唆された。さらに、エプレレノンや抗酸化剤であるテンポールの投与は酸化ストレスを減少させ、蛋白尿や腎組織障害を著明に改善したことから、アルドステロンによる腎障害がミネラルコルチコイド受容体を介した NADPH オキシダーゼ・酸化ストレス活性化によって生じている可能性が示唆された (Fig. 3)。<sup>10)</sup> なお、同様の結果が血管や心臓でも観察されている。<sup>29,30)</sup>

アルドステロンの長期投与は腎組織の NADPH オキシダーゼの活性化を伴った酸化ストレスの亢進を生じ、糸球体メサンギウム領域の障害を生じた。そこでわれわれは、アルドステロンが培養メサンギウム細胞の NADPH オキシダーゼを活性化して、

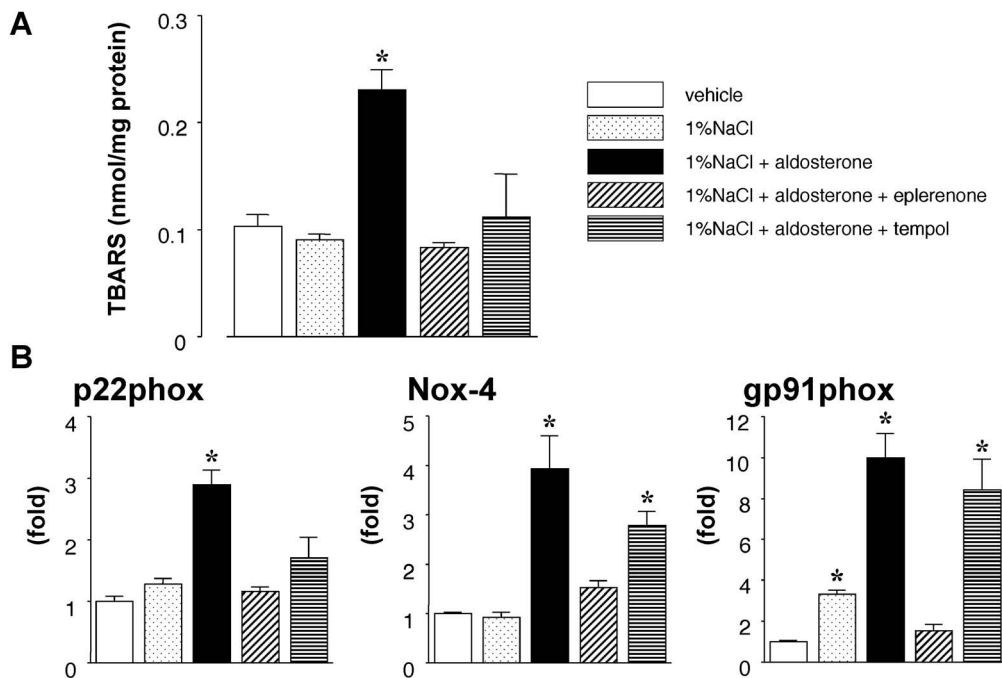


Fig. 2. Thiobarbituric Acid-reactive Substances (TBARS) (A) Contents and mRNA Levels of NADPH Oxidase Membrane Components (B) in Renal Cortical Tissues

1%NaCl/aldosterone-treated rats show increased both TBARS contents and mRNA levels of NADPH oxidase membrane components (p22phox, Nox-4 and gp91phox). Data of p22phox, Nox-4 and gp91phox mRNA expression are expressed as the relative differences in vehicle/1%NaCl-, 1%NaCl/aldosterone-, 1%NaCl/aldosterone/eplerenone- or 1%NaCl/aldosterone/tempol-treated rats compared to vehicle-infused rats after normalization to the expression of GADPH. \**p* < 0.05 vs. vehicle-treated rats. Data are from Ref. 10).

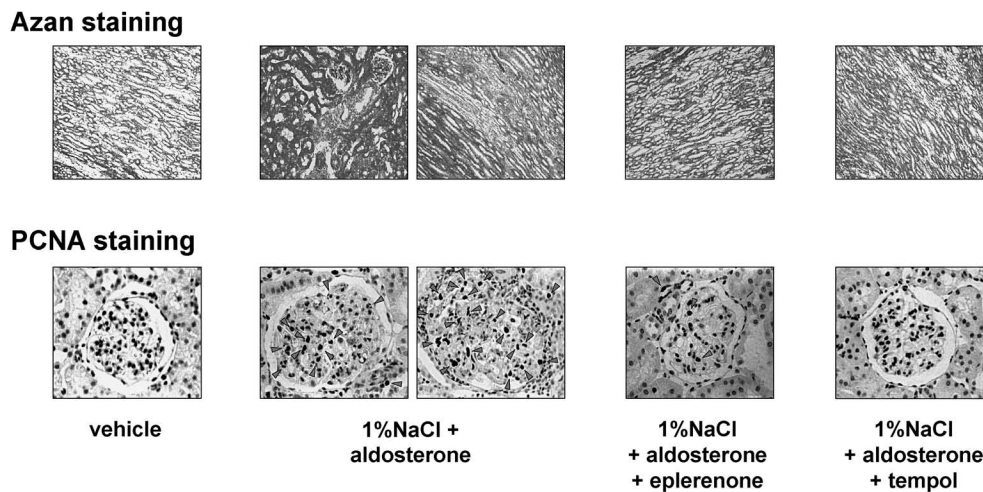


Fig. 3. Photomicrographs of Kidney

Aldosterone/1%NaCl-treated rats exhibit damaged glomeruli characterized by mesangial matrix expansion and cell proliferation. Treatment with eplerenone or tempol markedly ameliorates these glomerular changes in aldosterone/1%NaCl-treated rats. Data are from Ref. 13).

直接酸化ストレスを生じ得るか否かについて検討を行った.<sup>31)</sup> その結果, アルドステロンは用量依存的に培養メサンギウム細胞の NADPH オキシダーゼを活性化し, 活性酸素の産生を増大させることが明らかとなった (Fig. 4(A)). また, アルドステロン

による NADPH オキシダーゼの活性化と活性酸素産生は, エプレレノンで抑制された. 一方, 動物実験ではアルドステロンの長期投与が腎組織 NADPH オキシダーゼ発現を増加させたことから, 培養メサンギウム細胞でアルドステロンのこれ

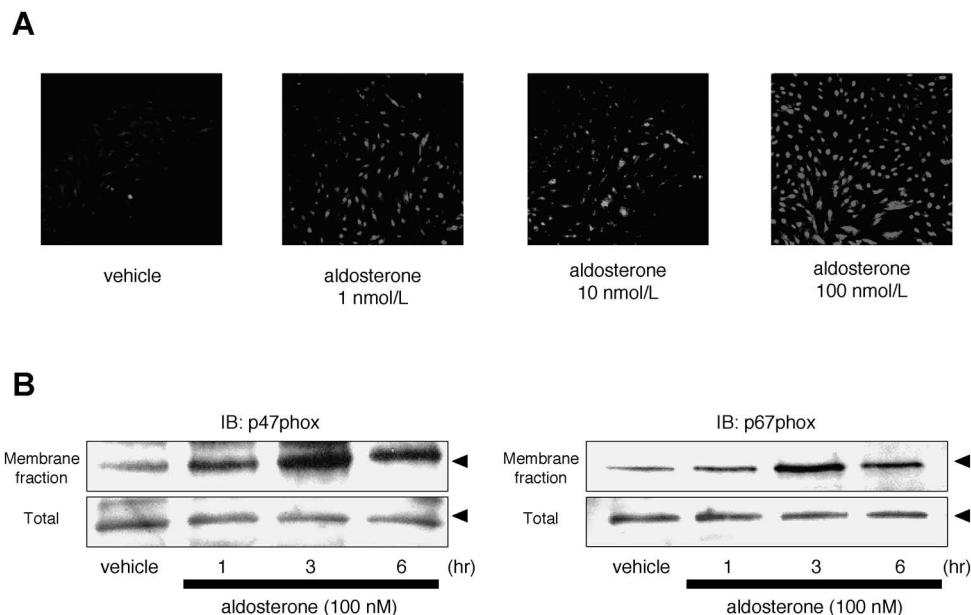


Fig. 4. A: Effect of Aldosterone on Dihydroethidium Staining in Rat Mesangial Cells (RMCs), B: Effects of Aldosterone on Membranous Translocation of p47phox and p67phox Proteins in RMC

The oxidative fluorescent dihydroethidium was used to evaluate intracellular superoxide anion levels. Incubation with aldosterone (100 nmol/l) for 3 h increased p47phox and p67phox protein levels in the membrane fraction. \* $p < 0.05$  vs. control. Data are from Ref. 31).

ら発現に対する影響を検討した。ところが、アルドステロンを非常に高い濃度 (100 nmol/l) で投与しても NADPH オキシダーゼの膜分画コンポーネントである p22phox, Nox-1, Nox-4 の遺伝子発現になんら影響を与えなかった。一方、アルドステロンは培養メサンギウム細胞の細胞質コンポーネントである p47phox と p67phox の細胞膜への移行させること (Fig. 4(B)), その作用はエプレレノンで完全に抑制されることを見出した。<sup>31)</sup> これらの結果は、アルドステロンが NADPH オキシダーゼの細胞質コンポーネントを細胞膜へと移動させ、NADPH オキシダーゼ活性化を生じて活性酸素を産生させることを示唆するものである。以上、アルドステロンは比較的短時間に NADPH オキシダーゼの細胞質コンポーネントを細胞膜へと移動させるが、長期間作用すると NADPH オキシダーゼのコンポーネントの発現も増加させ、NADPH オキシダーゼ活性化を生じて活性酸素を産生させるものと考えられた (Fig. 5)。さらに最近では、同様の研究結果が血管平滑筋細胞や内皮細胞などでも報告されている。<sup>32,33)</sup> このように、アルドステロンは非上皮系の細胞に存在するミネラルコルチコイド受容体に作用し、いくつかの機序を介して NADPH オキシダーゼを活性化させ、酸化ストレスを産生するのであろう。

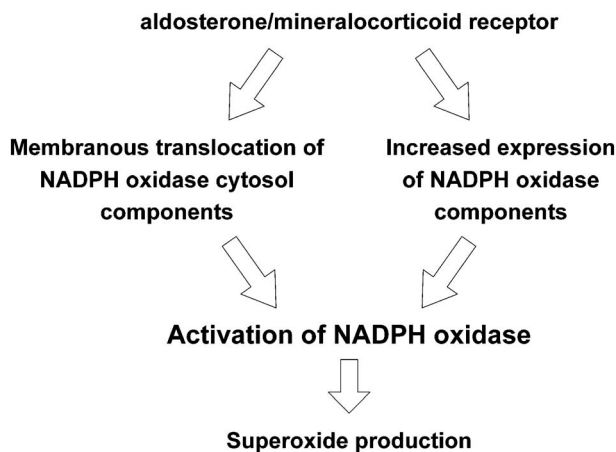


Fig. 5. Potential Mechanisms by which Aldosterone/mineralocorticoid Receptor Activates NADPH Oxidase and Induces Oxidative Stress

### 6. おわりに

以上、アルドステロン/ミネラルコルチコイド受容体の臓器障害作用について腎臓を中心に概説した。ここ数年間でアルドステロンの働きに対する概念は大きく変わり、パラダイムシフトが生じた。したがって、それぞれの病態に対処していく上で、アンジオテンシン II にのみ焦点を置いたレニン・アンジオテンシン系ではなく、アルドステロンを含めたレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系の

役割を考えていかなければならない。一方、最近の臨床研究によってミネラルコルチコイド受容体拮抗薬の腎保護作用について報告が相次いでいるものの、その薬理学的作用機序についてはほとんど明らかとなっていない。今後の詳細な検討によって、アルドステロン/ミネラルコルチコイド受容体によって生じる腎障害の病態生理、並びにミネラルコルチコイド受容体拮抗薬の薬理作用が解明されることが期待される。

**謝辞** 本研究はソルト・サイエンス研究財団、平成 18, 19 年度香川大学プロジェクト研究の支援によって行われているものである。

#### REFERENCES

- 1) Pitt B., Zannad F., Remme W. J., Cody R., Castaigne A., Perez A., Palensky J., Wittes J., *N. Engl. J. Med.*, **341**, 709–717 (1999).
- 2) Bianchi S., Bigazzi R., Campese V. M., *Am. J. Kidney Dis.*, **46**, 45–51 (2005).
- 3) Quinkler M., Zehnder D., Eardley K. S., Lepenies J., Howie A. J., Hughes S. V., Cockwell P., Hewison M., Stewart P. M., *Circulation*, **112**, 1435–1443 (2005).
- 4) Quinkler M., Zehnder D., Lepenies J., Petrelli M. D., Moore J. S., Hughes S. V., Cockwell P., Hewison M., Stewart P. M., *Eur. J. Endocrinol.*, **153**, 291–299 (2005).
- 5) Chrysostomou A., Becker G., *N. Engl. J. Med.*, **345**, 925–926 (2001).
- 6) Rossing K., Schjoedt K. J., Smidt U. M., Boomsma F., Parving H. H., *Diabetes Care*, **28**, 2106–2112 (2005).
- 7) Sato A., Hayashi K., Naruse M., Saruta T., *Hypertension*, **41**, 64–68 (2003).
- 8) Williams G. H., Burgess E., Kolloch R. E., Ruilope L. M., Niegowska J., Kipnes M. S., Roniker B., Patrick J. L., Krause S. L., *Am. J. Cardiol.*, **93**, 990–996 (2004).
- 9) White W. B., Duprez D., St. Hillaire R., Krause S., Roniker B., Kuse-Hamilton J., Weber M. A., *Hypertension*, **41**, 1021–1026 (2003).
- 10) Nishiyama A., Yao L., Nagai Y., Miyata K., Yoshizumi M., Kagami S., Kondo S., Shokoji T., Kiyomoto H., Kimura S., Kohno M., Abe Y., *Hypertension*, **43**, 841–848 (2004).
- 11) Sun G. P., Kohno M., Guo P., Nagai Y., Miyata K., Fan Y. Y., Kimura S., Kiyomoto H., Ohmori K., Li D. T., Abe Y., Nishiyama A., *J. Am. Soc. Nephrol.*, **17**, 2193–2201 (2006).
- 12) Fan Y. Y., Baba R., Nagai Y., Miyatake A., Hosomi N., Kimura S., Sun G. P., Kohno M., Fujita M., Abe Y., Nishiyama A., *Hypertens. Res.*, **29**, 169–178 (2006).
- 13) Nishiyama A., Abe Y., *J. Pharmacol. Sci.*, **100**, 9–16 (2006).
- 14) Rocha R., Chander P. N., Khanna K., Zuckerman A., Stier Jr. C. T., *Hypertension*, **31**, 451–458 (1998).
- 15) Rocha R., Stier Jr. C. T., Kifor I., Ochoa-Maya M. R., Rennke H. G., Williams G. H., Adler G. K., *Endocrinology*, **141**, 3871–3878 (2000).
- 16) Han S. Y., Kim C. H., Kim H. S., Jee Y. H., Song H. K., Lee M. H., Han K. H., Kim H. K., Kang Y. S., Han J. Y., Kim Y. S., Cha D. R., *J. Am. Soc. Nephrol.*, **17**, 1362–1372 (2006).
- 17) Brown N. J., Nakamura S., Ma L., Nakamura I., Donnert E., Freeman M., Vaughan D. E., Fogo A. B., *Kidney Int.*, **58**, 1219–1227 (2000).
- 18) Feria I., Pichardo I., Juarez P., Ramirez V., Gonzalez M. A., Uribe N., Garcia-Torres R., Lopez-Casillas F., Gamba G., Bobadilla N. A., *Kidney Int.*, **63**, 43–52 (2003).
- 19) Kobayashi N., Hara K., Tojo A., Onozato M. L., Honda T., Yoshida K., Mita S., Nakano S., Tsubokou Y., Matsuoka H., *Hypertension*, **45**, 538–544 (2005).
- 20) Guo C., Martinez-Vasquez D., Mendez G. P., Toniolo M. F., Yao T. M., Oestreicher E. M., Kikuchi T., Lapointe N., Pojoga L., Williams G. H., Ricchiuti V., Adler G. K., *Endocrinology*, **147**, 5363–5373 (2006).
- 21) Nishiyama A., Yao L., Fan Y., Kyaw M., Kataoka N., Hashimoto K., Nagai Y., Nakamura E., Yoshizumi M., Shokoji T., Kimura S., Kiyomoto H., Tsujioka K., Kohno M., Tamaki T., Kajiya F., Abe Y., *Hypertension*, **45**, 710–716 (2005).
- 22) Nagai Y., Miyata K., Sun G. P., Rahman M., Kimura S., Miyatake A., Kiyomoto H., Kohno M., Abe Y., Yoshizumi M., Nishiyama

- A., *Hypertension*, **46**, 1039–1045 (2005).
- 23) Ishizawa K., Izawa Y., Ito H., Miki C., Miyata K., Fujita Y., Kanematsu Y., Tsuchiya K., Tamaki T., Nishiyama A., Yoshizumi M., *Hypertension*, **46**, 1046–1052 (2005).
- 24) Kimura S., Zhang G. X., Nishiyama A., Shokoji T., Yao L., Fan Y. Y., Rahman M., Abe Y., *Hypertension*, **45**, 438–444 (2005).
- 25) Yao L., Kobori H., Rahman M., Seth D. M., Shokoji T., Fan Y., Zhang G. X., Kimura S., Abe Y., Nishiyama A., *Hypertens. Res.*, **27**, 493–500 (2004).
- 26) Zhang G. X., Kimura S., Nishiyama A., Shokoji T., Rahman M., Yao L., Nagai Y., Fujisawa Y., Miyatake A., Abe Y., *Cardiovasc. Res.*, **65**, 230–238 (2005).
- 27) Nishiyama A., Yoshizumi M., Hitomi H., Kagami S., Kondo S., Miyatake A., Fukunaga M., Tamaki T., Kiyomoto H., Kohno M., Shokoji T., Kimura S., Abe Y., *J. Am. Soc. Nephrol.*, **15**, 306–315 (2004).
- 28) Nagai Y., Yao L., Kobori H., Miyata K., Ozawa Y., Miyatake A., Yukimura T., Shokoji T., Kimura S., Kiyomoto H., Kohno M., Abe Y., Nishiyama A., *J. Am. Soc. Nephrol.*, **16**, 703–711 (2005).
- 29) Pu Q., Neves M. F., Virdis A., Touyz R. M., Schiffrin E. L., *Hypertension*, **42**, 49–55 (2003).
- 30) Rahman M., Nishiyama A., Guo P., Nagai Y., Zhang G. X., Fujisawa Y., Fan Y. Y., Kimura S., Hosomi N., Omori K., Abe Y., Kohno M., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **318**, 1323–1329 (2006).
- 31) Miyata K., Rahman M., Shokoji T., Nagai Y., Zhang G. X., Sun G. P., Kimura S., Yukimura T., Kiyomoto H., Kohno M., Abe Y., Nishiyama A., *J. Am. Soc. Nephrol.*, **16**, 2906–2912 (2005).
- 32) Nagata D., Takahashi M., Sawai K., Tagami T., Usui T., Shimatsu A., Hirata Y., Naruse M., *Hypertension*, **48**, 165–171 (2006).
- 33) Callera G. E., Touyz R. M., Tostes R. C., Yogi A., He Y., Malkinson S., Schiffrin E. L., *Hypertension*, **45**, 773–779 (2005).