

アルドステロンは心線維芽細胞における、アンジオテンシン 変換酵素遺伝子発現を増加させる

東 吉 志 上 原 良 樹 南 井 孝 介
日 下 雅 文 蓮 田 聡 雄 清 水 光 行

東京慈恵会医科大学内科学講座循環器内科

(受付 平成 18 年 2 月 15 日)

ALDOSTERONE AUGMENTS ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME GENE EXPRESSION IN CULTURED CARDIAC FIBROBLASTS

Yoshiyuki AZUMA, Yoshiki UEHARA, Kousuke MINAI,
Masafumi KUSAKA, Toshio HASUDA, and Mitsuyuki SHIMIZU

*Division of Cardiology, Department of Internal Medicine,
The Jikei University School of Medicine*

Background: Recent studies have showed that the cardiac local renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) plays a pivotal role in cardiac pathophysiology and that spironolactone improves the prognosis of patients with heart failure. Here, we used cultured cardiocytes to examine how aldosterone acts on the cardiac local RAAS.

Methods and Results: Cardiac myocytes and fibroblasts were prepared from neonatal rat using the Percoll gradient method, and messenger(m)RNAs were semiquantified with the reverse transcriptase polymerase chain reaction. Basal mRNA expression of renin, angiotensinogen, and angiotensin-converting enzyme (ACE) was detected in both cardiac myocytes and fibroblasts. Aldosterone markedly and significantly upregulated ACE mRNA in cardiac fibroblasts, but not angiotensinogen or renin mRNA. In cardiomyocytes, none of these RAAS components was upregulated. Moreover, spironolactone completely inhibited aldosterone-induced augmentation of ACE mRNA expression in cardiac fibroblasts.

Conclusions: The cardiac local RAAS has a possible positive feedback mechanism through ACE expression, mainly depending on cardiac fibroblasts. The beneficial effects of spironolactone may partly be due to blockage of the positive feedback circuit.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2006; 121: 133-40)

Key words: renin-angiotensin-aldosterone system, spironolactone, cardiac myocytes, cardiac fibroblasts

I. 緒 言

レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系 (RAAS) は心不全の病態に深く関与している。RAAS の構成因子であるアンジオテンシノーゲン、レニン、アンジオテンシン変換酵素 (ACE)、アルドステロンは循環血中に存在し、これらの血

中濃度と心不全の予後や心機能が相関する¹⁾²⁾。さらに、ACE 阻害薬やアルドステロン阻害薬によって RAAS を阻害することにより、心不全患者の予後が改善することが明らかとなっている³⁾⁴⁾。近年、全身性 RAAS のみならず組織 RAAS の概念が提唱されており⁵⁾、心臓においても ACE、アルドステロンが発現、産生され、特に病的心におい

て顕著であることが明らかとなった^{9)~8)}。心臓を構成するおもな細胞は心筋細胞と線維芽細胞であり、心筋細胞は心筋の収縮、弛緩といった心臓のポンプ機能に貢献し、線維芽細胞はコラーゲンなどの線維成分を分泌し生理的および病的状態における心臓の線維化に関わっている。一方で、これらの細胞が種々の液性因子を産生し、autocrine, paracrine 因子として心臓組織において作用していることも明らかとなっている⁹⁾¹⁰⁾。ACE は *in vitro* の研究においても心筋細胞および線維芽細胞において発現が認められることが明らかとなっており、伸展刺激などによりその発現が調節を受ける^{11)~13)}。このことから高血圧などの圧負荷亢進時には心臓組織 RAAS が活性化することにより、心疾患の病態を増悪させる可能性がある。以上より、心臓組織を構成する主要な細胞であり、autocrine, paracrine 因子を産生する線維芽細胞の心臓組織 RAAS 調節における役割を検討することは重要と考えられる。今回、線維芽細胞における ACE 遺伝子発現に対するアルドステロンの影響について検討した。

II. 対象と方法

1. 培養細胞

生後1日から3日までの Sprague-Dawley 系新生児ラットより心筋細胞および線維芽細胞を調製した。摘出した心臓より心室のみを切離し、0.0375% コラゲナーゼ・タイプ2 (Worthington 社)、0.0625% パンクレアチン (GIBCO 社) を用いて細胞を単離した。単離した細胞は Percoll 密度勾配法¹⁴⁾にて心筋細胞および線維芽細胞に分離した。すなわち、比重 1.059 および 1.082 の2種類の Percoll 液 (SIGMA 社) を用いて 3,000 回転で 30 分間遠心し、最上層および中間層よりそれぞれ線維芽細胞、心筋細胞を回収した。細胞数を計測後、5% 胎児ウシ血清 (GIBCO 社) および 10% ウマ血清 (GIBCO 社) を添加した Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) に懸濁し、線維芽細胞は 600 細胞/mm²、心筋細胞は 1,000 細胞/mm² の細胞密度で、それぞれ 10 cm ディッシュ、6 well プレートに播種した。線維芽細胞は 90% コンフルエントに達するごとに 1:8 で継代し、第二継代細胞を以下の実験に用いた。

動物の実験についてはすべて東京慈恵会医科大学動物指針に従って行った。

2. 細胞の刺激

薬物刺激 24 時間前に DMEM (血清無添加) に培地交換し、アルドステロン (SIGMA 社) にて刺激した。アルドステロンはジメチルスルホキシド (DMSO) にて溶解したものを凍結保存とし、実験当日に DMEM にて希釈して細胞の刺激に用いた。非刺激群には、DMSO を刺激群と同濃度となるように添加した。アルドステロン阻害薬であるスピロラクトンを用いる際は、アルドステロンによる刺激 60 分前に培地に添加した。

3. RT-PCR

総 RNA は TRIzol キット (GIBCO 社) を用いて抽出した。細胞をリン酸緩衝食塩水で洗浄後、1 well あたり 0.5 ml の TRIzol 試薬で溶解し、添付のプロトコールに従い RNA を抽出した。RNA 濃度は吸光度を測定し、OD₂₆₀ 値より算出した。

総 RNA 5 μ g を、Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (MMLV-reverse; GIBCO 社) 384 ユニットを用い、24 μ l の 1x RT 緩衝液 (10 mM DTT, 50 mM Tris HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0.5 mM dNTP) 中で 6pM random hexamer をプライマーとして、37°C, 60 分間インキュベートし、1st strand cDNA を得た。1.5 μ l の RT 産物を鋳型として、Taq polymerase (Takara 社) 1.5 ユニットを用い、30 μ l の 1x PCR 緩衝液 (10 mM Tris HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP) 中で PCR を行った。アンジオテンシノーゲン、レニン、ACE、グリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) に対するプライマーは既知の塩基配列をもとにデザインされたものを使用した¹¹⁾(Table)。PCR 条件は、熱変性 94°C、伸長反応 72°C とし、アニーリング条件は各プライマーの melting temperature (T_m) をもとに決定した (レニン; 66°C、アンジオテンシノーゲン; 62°C、ACE; 55°C、GAPDH; 56°C)。PCR サイクル数は予備実験の結果をもとに RNA 量と PCR 産物の相関が直線となるように設定した (Fig. 1)。PCR 産物はエチジウムブロマイド添加 1% アガロースゲルにて電気泳動を行い、得られたバンドを紫外線照射により TOYOBO FAS-II にて記録し、

Table.

Design of Primers		
Gene	Primer Sequences	PCR products
Angiotensinogen	Sense : 5'-TTCAGGCCAAGACCTCCC-3' Antisense : 5'-CCAGCCGGGAGGTGCAGT-3'	308 bp
Renin	Sense : 5'-CTGGGAGGCAGTGACCCTCAACATTACCAG-3' Antisense : 5'-GAGAGCCAGTATGCACAGGTCATCGTTCCT-3'	372 bp
ACE	Sense : 5'-GCTTCCCCAACAAGACTGCCA-3' Antisense : 5'-CCACATGTCTCCAGCAGATG-3'	380 bp
GAPDH	Sense : 5'-TCCTGCACCACCAACTGCTTAGCC-3' Antisense : 5'-TAGCCCAGGATGCCTTTAGTGGG-3'	376 bp

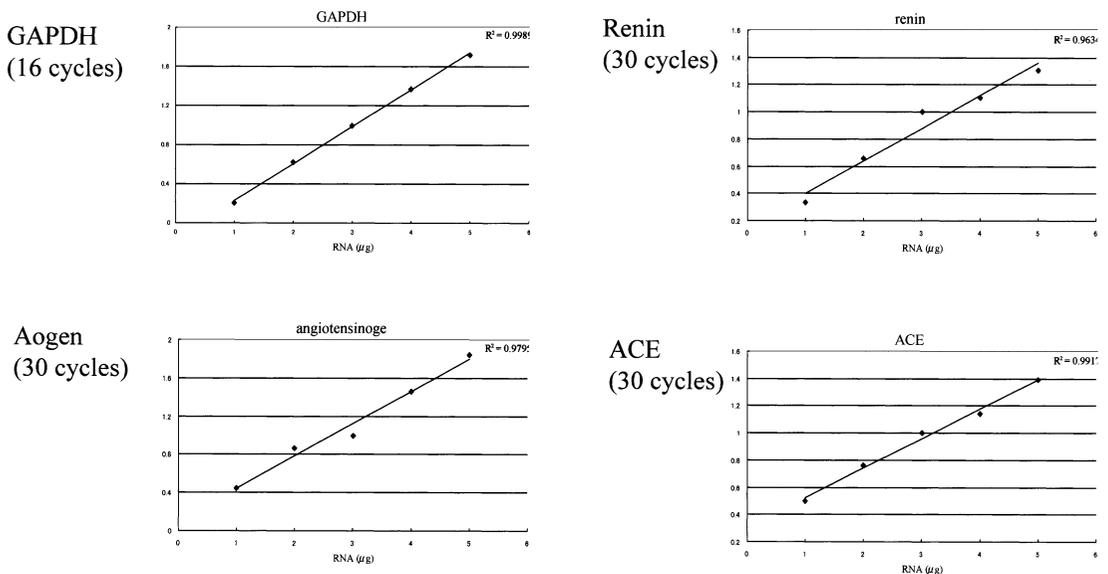


Fig. 1. Linearity of RT-PCR amplification. The linearity of semi-quantitative RT-PCR to total RNA applied (1 to 5 ug) for the components of renin-angiotensin-aldosterone system was examined. These graphs show correlation between RT-PCR products and the input of total RNA. Straight lines represent best fit obtained by the linear regression analysis: *r* value indicates correlation coefficient.

NIH Image Ver. 1.61 を用いて解析した。

4. 統計的処理

測定値は平均値±標準誤差で表わした。有意差検定は *t* 検定を用い、*p* < 0.05 をもって、統計学的有意差ありとした。

III. 結 果

1. 心臓線維芽細胞においてアルドステロン刺激は ACE 遺伝子発現を亢進させる

最終濃度 10⁻⁶M のアルドステロンで線維芽細胞を刺激し、48 時間後に抽出した RNA を半定量

的 RT-PCR 法にて解析した。10⁻⁶M のアルドステロンは RAAS の構成要素のうちアンジオテンシノーゲン、レニンの遺伝子発現には影響を与えなかったが、ACE の遺伝子発現を約 2 倍に亢進させた (Fig. 2)。この作用は、アルドステロンの濃度に依存性であった (Fig. 3)。

2. アルドステロンは心筋細胞における ACE 遺伝子発現に影響しない

線維芽細胞においてアルドステロンが ACE 遺伝子発現を亢進させたことから、心筋細胞についても同様に検討した。線維芽細胞とは対照的に、心

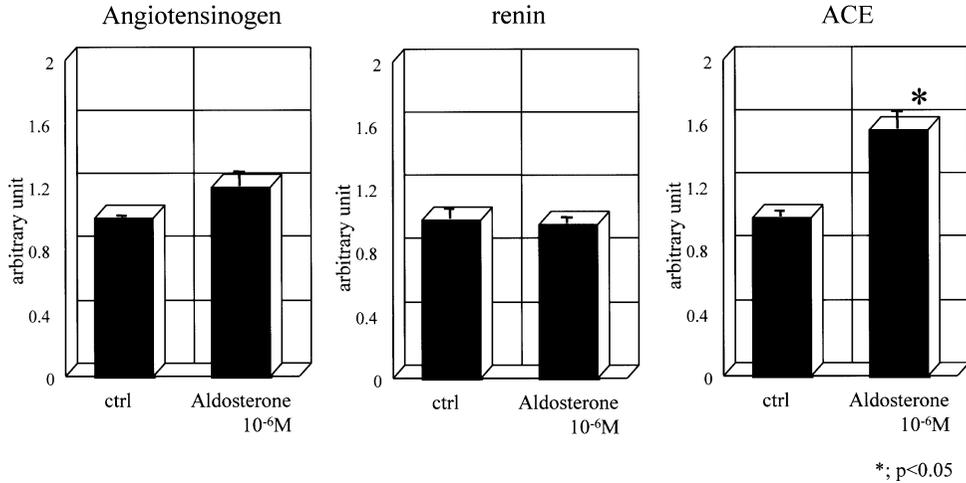


Fig. 2. Effects of aldosterone on the gene expression of the components of renin-angiotensin-aldosterone system in cardiac fibroblasts. Cardiac fibroblasts were incubated in the presence of aldosterone ($10^{-6}M$) for 48 hr. The treatment resulted in the augmentation of the gene expression of ACE, but not angiotensinogen and renin.

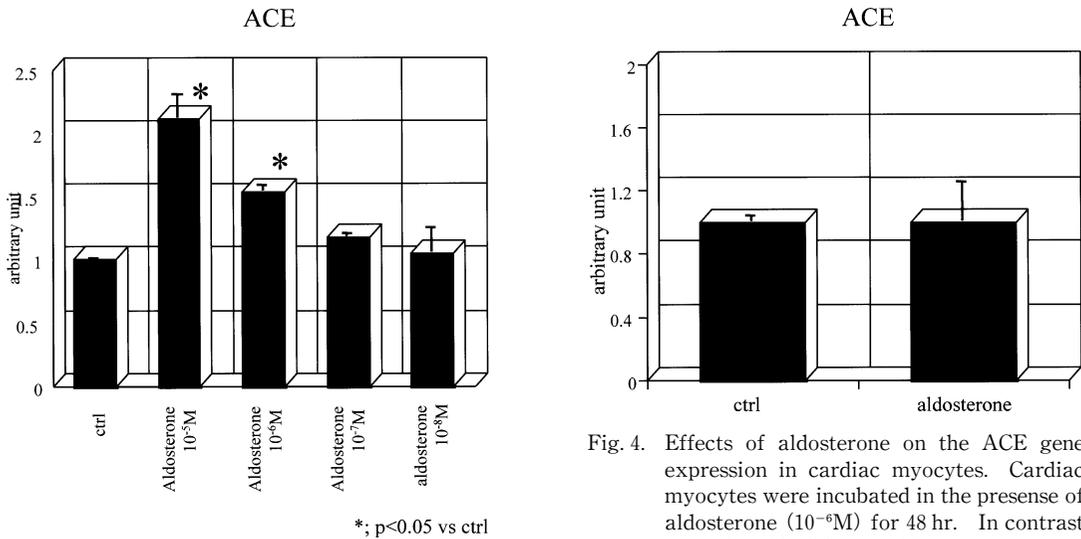


Fig. 3. Dose-dependent effect of aldosterone on ACE gene expression.

Fig. 4. Effects of aldosterone on the ACE gene expression in cardiac myocytes. Cardiac myocytes were incubated in the presence of aldosterone ($10^{-6}M$) for 48 hr. In contrast to cardiac fibroblasts, ACE gene expression remained unchanged.

筋細胞においてはアルドステロンは ACE 遺伝子発現に影響を及ぼさなかった (Fig. 4).

3. スピロラクトンは線維芽細胞におけるアルドステロンの効果を阻害する

アルドステロン受容体拮抗薬であるスピロラクトンで前処置すると、線維芽細胞におけるアルドステロンによる ACE 遺伝子発現亢進は抑制された。 $10^{-4}M$ のスピロラクトンは $10^{-5}M$ のアル

ドステロンによる ACE 遺伝子発現亢進を完全に抑制し、この効果はスピロラクトンの濃度に依存した (Fig. 5, 6).

IV. 考 察

アルドステロンが ACE 遺伝子発現を亢進することから、局所 RAAS における positive feedback 機構の存在が示唆された。これまでアルドス

テロンが心臓由来の細胞において ACE 遺伝子発現を亢進させるという報告はあるものの、これが心筋細胞あるいは線維芽細胞のいずれに由来するものか明らかではなかった¹⁵⁾。本研究から心筋細胞でなく線維芽細胞がアルドステロンによる ACE 遺伝子発現亢進に寄与していることが示さ

れた。

今回の *in vitro* 実験で ACE 遺伝子発現を亢進させたアルドステロン濃度は 10^{-6} ~ 10^{-5} M であり、その血中濃度から比較するときわめて高濃度である。しかし、組織におけるアルドステロンは血中よりも分解速度が遅く、また一部は細胞内に保持されることから、心臓組織中のアルドステロン濃度は血中の約 17 倍とされている¹⁶⁾。心不全などの病態においてはさらにアルドステロン濃度が上昇している可能性も考慮すると、本実験での結果は不全心における局所 RAAS の状態に適合できると考えられる。

アルドステロンはミネラルコルチコイド受容体 (MR) に結合し、核内で遺伝子プロモーター領域の TGTTCT をコンセンサス配列にもつ MR 応答配列 (MRE) に作用してかかる遺伝子発現を亢進させる¹⁷⁾。ACE 遺伝子のシス調節配列は転写開始点より 3.6 kb 以上上流であるか、または遺伝子領域内に存在する必要がある¹⁸⁾。ところがラット ACE 遺伝子のプロモーター領域における MRE の部分は -730 bp 付近であることから機能的ではないため、アルドステロンは間接的に ACE 遺伝子発現を亢進させている可能性が示唆される。Serum-and glucocorticoid-regulated kinase (sgk) は MRE を介して刺激後早期に発現が亢進するリン酸化酵素である。セリン/スレオニンキナーゼの一つである Sgk は、cyclic AMP response element binding protein (CREB) を第 133 セリン残基においてリン酸化することが最近

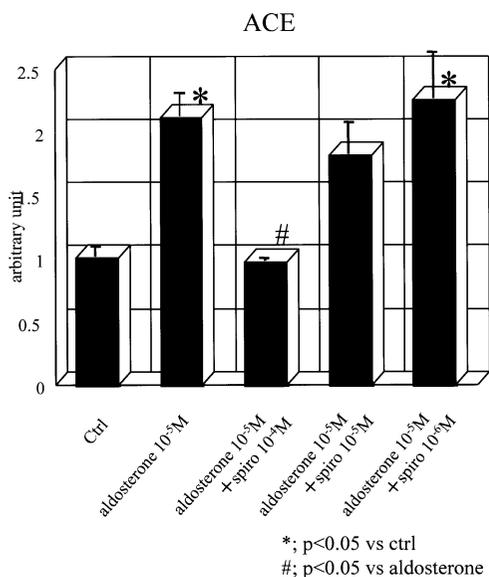


Fig. 5. Inhibitory effect of spironolactone on the aldosterone-induced augmentation of ACE gene expression. Spironolactone was added to the medium 60 min before the application of aldosterone. Spironolactone inhibits the augmentation of ACE gene expression induced by aldosterone in a dose dependent manner.

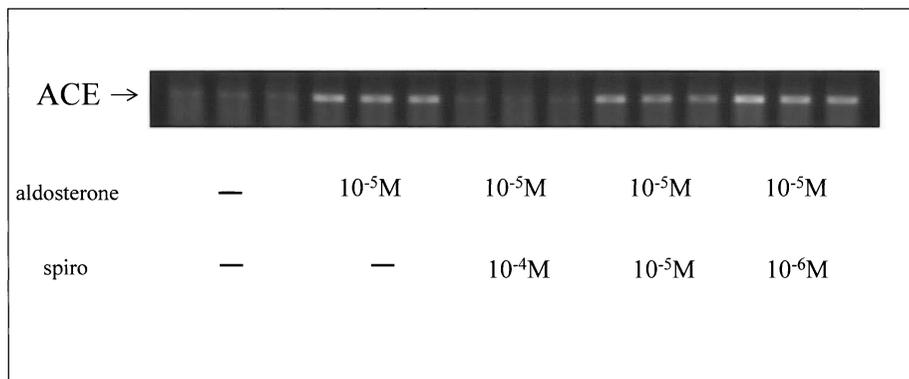


Fig. 6. Representative data from RT-PCR for ACE. Bands of PCR products are seen at 380 bp. These indicate marked increases in ACE gene expression in cardiac fibroblast treated with aldosterone, and the suppressive effect of spironolactone.

GATCCTCCTTG TGAACCTT CATA GGTA CCACCTTC AGAATCC CCTCTTAC A	1254
CCT CCACCAGCACAGC CTGC TTCCTCCACAAACACAACAGCTCGCGGAT G	1204
GGAAAAATACACAC GTAA CCCACAA CCCTCAAAT TCTGGGAG CCCAA GCAA	1154
TGGTGC ACCTAAG CTCTCA CCAGGTGG CCCTGTGCTAGCC ACCTTCTCCTC	1104
TCTC TCTACCT CCACCAGCC CCC TAGG ACCTCTTC TCTGGG ACATGTAC	1054
CCAGGC CAGCACAATCTCT CTGAGTCTC CAGAT CACATAACCT CCTG TAT	1004
GAACT CTGT CACC ACATCTGCCAAGG AC AAGGGT CCCACA CCTCTTTGG	954
GGGCACGG TCCTGGT GCTAAGAAGTTA GCCT CCACAGC CTCCTGGTGCCT	904
CAAGAGGACACGATCCTA CCTCCCCA GGCTTGTCAC TTTGAGGGACAG G	854
TGGAGGAGACGAGGA AATGACTGGGAGTGGAG <u>ACCTGAGGTGAC TTGA</u>	804
<u>AGCCGATC</u> TGTCT CAGGGGTAATTTCT CCATTTT TAAAAA GCAGGGGGGT	754
TGCTG TAGTCTC TGAGGCATGTTT TAGCTC TCAAA GCT TGCAACTGC GAG	704
GTTT TAGGGCTT TGT TGGGACAACGCAT GATGGTTCT TGCGAGCT GAAC A	654
ACCGA CTGTACCTGTGTAC CCAAAGA GTAGG GCAGA TGTGCCA GTGTTC	604
GTGGCC TAT TCTAT GGCTCC CCCC TCGT AGA GCAGA ATAGACCCTATT TC	554
GAG GCATCCC AACACCACGCCC AAGGTGAACTGGCCGTGGCATCTG C	504
AGTACCTAGCCAAGGCG CCTGTCAGGA CACCTAAGC TTCCTGCACCCAG G	454
CAGGGC ACCCTTCCCTCCATAA CCTGGCAACG TTAAG TCCATCCTGGTGC	404
CACCAGC CAGC CACCCCGCCCTTGTCACTCA AGAGCCC GGAAAGGCT	354
TGGA GGGTTATGCCAA ACCTCC TGG GCT CTGTGGCCTGAGA ATAAG TGGT	304
GGC GGC CAGAGGGCACGGTT GGGC CGCAGCAC TGTGTTTGC AGCC CGCA G	254
GACCCCTT TCTA GCT TCCT CAGCGAG AGCTCG <u>ACCTAACTCATCCT</u> TTCC	204
ACCC AAGCTGTTCCC AAGCC CCTCAG GGCTACCCTTGCCCGGGG CGGGC G	154
GGGAAT CAGCGG GCT CGCGC TGC CGGGACTT TGGAG CAGAGGGAAGC	104
GCGGAGGGCGGGGA GG TGGGGGTG TGT CGGGAGGCGCGGTGACTGGGT	54
TTTAT AATCCG CAGGGCGGTGC CGGCGC GGGAGAAGGGGCAGC GCCG CAC	4
CGC	1

Fig. 7. Nucleotide sequence of the 1303-bp rat ACE promoter region. The sequence of ACE promoter region was referred and cited from National Center for Biotechnology Information (NCBI) home page (Accession number: AY344961). A mineralocorticoid receptor responsive elements (TGTTCT) was found at -734 bp, whereas two CRE-like sequences (underlined) were located at -172 bp and -770 bp. The homology search was performed using GENETYX-MAC 11.2.0.

報告された¹⁹⁾。ラット ACE プロモーター領域には CRE-like sequence が存在しており²⁰⁾²¹⁾ (Fig. 7), アルドステロンが SGK を介して ACE 遺伝子発現を亢進している可能性が考えられる。

アルドステロンは MR のみならずグルココルチコイド受容体 (GR) にも結合する。GR は MR と同様に TGTTCT コンセンサス配列に結合することにより遺伝子発現を調節する¹⁷⁾。Sheppard らによれば、心臓では肝臓と同様に MR と比較して GR の発現が優位である²²⁾。本研究におけるアルドステロンの作用が、MR あるいは GR を介したのかについては、今後検討していく必要がある。

V. 結 語

アルドステロンは心臓線維芽細胞における ACE 遺伝子発現を亢進し、スピロラク톤はこ

の作用を阻害した。スピロラク톤は局所 RAAS における正のフィードバック回路を阻害することにより、心不全患者の予後を改善する可能性がある。

稿を終えるにあたり、直接御指導、御校閲を賜りました東京慈恵会医科大学循環器内科望月正武教授に謹んで謝意を表します。

文 献

- 1) Swedberg K, Eneroth P, Kjeksus J, Wilhelmssen L. Hormones regulating cardiovascular function in patients with severe congestive heart failure and their relation to mortality. CONSENSUS Trial Study Group. *Circulation* 1990; 82: 1730-6.
- 2) Vaughan DE, Lamas GA, Pfeffer MA. Role

- of left ventricular dysfunction in selective neurohumoral activation in the recovery phase of anterior wall acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1990 ; 66 : 529-32.
- 3) Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 1999 ; 341 : 709-17.
 - 4) Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, et al. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2003 ; 348 : 1309-21.
 - 5) Dzau VJ. Tissue renin-angiotensin system in myocardial hypertrophy. *Arch Intern Med* 1993 ; 153 : 937-42.
 - 6) Iwai N, Shimoike H, Kinoshita M. Cardiac renin-angiotensin system in the hypertrophied heart. *Circulation* 1995 ; 92 : 2690-6.
 - 7) Hokimoto S, Yasue H, Fujimoto K, Yamamoto H, Nakao K, Kaikita K, et al. Expression of angiotensin-converting enzyme in remaining viable myocytes of human ventricles after myocardial infarction. *Circulation* 1996 ; 94 : 1513-8.
 - 8) Mizuno Y, Yoshimura M, Yasue H, Sakamoto T, Ogawa H, Kugiyama K, et al. Aldosterone production is activated in failing ventricle in humans. *Circulation* 2001 ; 103 : 72-7.
 - 9) Zhang W, Razani B, Altschuler Y, Bouzahzah B, Mostov KE, Pestell RG, et al. Caveolin-1 inhibits epidermal growth factor-stimulated lamellipod extension and cell migration in metastatic mammary adenocarcinoma cells (MTLn3). Transformation suppressor effects of adenovirus-mediated gene delivery of caveolin-1. *J Biol Chem* 2000 ; 275 : 20717-25.
 - 10) Ito H, Hirata Y, Adachi S, Tanaka M, Tsujino M, Koike A, et al. Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes. *J Clin Invest* 1993 ; 92 : 398-403.
 - 11) Malhotra R, Sadoshima J, Brosius FC 3rd, Izumo S. Mechanical stretch and angiotensin II differentially upregulate the renin-angiotensin system in cardiac myocytes *in vitro*. *Circulation Res* 1999 ; 85 : 137-46.
 - 12) Van Kesteren CA, Saris JJ, Dekkers DH, Lamers JM, Saxena PR, Schalekamp MA. Cultured neonatal rat cardiac myocytes and fibroblasts do not synthesize renin or angiotensinogen: evidence for stretch-induced cardiomyocyte hypertrophy independent of angiotensin II. *Cardiovasc Res* 1999 ; 43 : 148-56.
 - 13) Miyata S, Haneda T, Osaki J, Kikuchi K. Renin-angiotensin system in stretch-induced hypertrophy of cultured neonatal rat heart cells. *Eur J Pharmacol* 1996 ; 307 : 81-8.
 - 14) Zhu H, Garcia AV, Ross RS, Evans SM, Chien KR. A conserved 28-base-pair element (HF-1) in the rat cardiac myosin light-chain-2 gene confers cardiac-specific and alpha-adrenergic-inducible expression in cultured neonatal rat myocardial cells. *Mol Cell Biol* 1991 ; 11 : 2273-81.
 - 15) Harada E, Yoshimura M, Yasue H, Nakagawa O, Nakagawa M, Harada M, et al. Aldosterone induces angiotensin-converting-enzyme gene expression in cultured neonatal rat cardiocytes. *Circulation* 2001 ; 104 : 137-9.
 - 16) Silvestre JS, Robert V, Heymes C, Aupetit-Faisant B, Mouas C, Moalic JM, et al. Myocardial production of aldosterone and corticosterone in the rat. Physiological regulation. *J Biol Chem* 1998 ; 273 : 4883-91.
 - 17) Tsai MJ, O'Malley BW. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* 1994 ; 63 : 451-86.
 - 18) Testut P, Soubrier F, Corvol P, Hubert C. Functional analysis of the human somatic angiotensin I-converting enzyme gene promoter. *Biochem J* 1993 ; 293 : 843-8.
 - 19) David S, Kalb RG. Serum/glucocorticoid-inducible kinase can phosphorylate the cyclic AMP response element binding protein, CREB. *FEBS Lett* 2005 ; 579 : 1534-8.
 - 20) Xavier-Neto J, Pereira AC, Junqueira ML, Carmona R, Krieger JE. Rat angiotensin-converting enzyme promoter regulation by beta-adrenergics and cAMP in endothelium. *Hypertension* 1999 ; 34 : 31-8.
 - 21) Xavier-Neto J, Pereira AC, Oliveira EM, Miyakawa AA, Junqueira ML, Krieger JE. Control of the rat angiotensin I converting

- enzyme gene by CRE-like sequences. *Braz J Med Biol Res* 2004 ; 37 : 1441-53.
- 22) Sheppard KE, Autelitano DJ. 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 transforms 11-dehydrocorticosterone into transcriptionally active glucocorticoid in neonatal rat heart. *Endocrinology* 2002 ; 143 : 198-204.