

学位授与番号：乙 3 1 1 9 号

氏 名：井坂 剛

学位の種類：博士（医学）

学位授与日付：平成 27 年 5 月 27 日

学位論文名：

アゼルニジピンはヒト副腎皮質由来の培養細胞 NCI-H295 におけるアルドステロン合成・分泌を阻害する

主論文名：

Azelnidipine inhibits aldosterone synthesis and secretion in human adrenocortical cell line NCI-H295R.

（アゼルニジピンはヒト副腎皮質由来の培養細胞 NCI-H295 におけるアルドステロン合成・分泌を阻害する）

学位審査委員長：教授 吉村道博

学位審査委員：教授 木村直史 教授 大野岩男

# 論文要旨

論文提出者名	井坂 剛	指導教授名	宇都宮 一典
<p>主論文題名 Azelnidipine inhibits aldosterone synthesis and secretion in human adrenocortical cell line NCI-H295R (アゼルニジピンはヒト副腎皮質由来の培養細胞 NCI-H295 におけるアルドステロン合成・分泌を阻害する)</p> <p>Tsuyoshi Isaka, Keiichi Ikeda, Yuko Takada, Yuri Inada, Katsuyoshi Tojo , Naoko Tajima European Journal of Pharmacology 2009;605,49-52.</p> <p>【目的】NCI-H295R 細胞におけるアルドステロン合成に対する L 型 <math>\text{Ca}^{2+}</math>チャネル遮断薬アゼルニジピンの作用を検討した。</p> <p>【方法】NCI-H295R 細胞を継代培養し、アゼルニジピン、T/L 型 <math>\text{Ca}^{2+}</math>チャネル遮断薬エホニジピンおよび L 型 <math>\text{Ca}^{2+}</math>チャネル遮断薬ニフェジピンを添加または非添加の条件下で、アンジオテンシン II または KCl にて細胞を刺激、37℃で 24 時間培養した。培養終了後細胞を回収し、ステロイド合成系の酵素であるステロイド 11<math>\beta</math>-ヒドロキシラーゼ (CYP11<math>\beta</math>1)、ステロイド 18-ヒドロキシラーゼ (CYP11<math>\beta</math>2) の mRNA の発現の評価を行うため、リアルタイム RT-PCR を行った。さらに、CYP11<math>\beta</math>1 および CYP11<math>\beta</math>2 の蛋白レベルの発現を、ウェスタンブロット解析により確認した。また、NCI-H295R 細胞培養液中のアルドステロンおよびコルチゾール分泌についても測定を行った。</p> <p>【結果】アンジオテンシン II 刺激下にてアゼルニジピンを添加したところ、CYP11<math>\beta</math>1 並びに CYP11<math>\beta</math>2 の発現を刺激後 3・6・24 時間の全てでエホニジピンと同等に抑制し、その効果はニフェジピン添加による抑制よりも強かった。同様に KCL 刺激下での検討では刺激 3・24 時間後の CYP11<math>\beta</math>1 ならびに刺激 24 時間後の CYP11<math>\beta</math>2 の発現をアゼルニジピンとエホニジピンは同等に抑制し、ニフェジピンよりも有意に抑制した。</p> <p>【考察】アゼルニジピンには L 型 <math>\text{Ca}^{2+}</math>チャネルだけでなく、T 型 <math>\text{Ca}^{2+}</math>チャネルに対する遮断効果があり、この作用を介することで NCI-H295R 細胞でのステロイド生合成を抑制していると考えられた。</p> <p>【結論】アゼルニジピンは NCI-H295R 細胞におけるステロイド合成酵素の mRNA 発現ならびに蛋白量、アルドステロンおよびコルチゾール産生の両者に対し、エホニジピンと同等の強力な阻害作用を有することが示され、原発性アルドステロン症を含めたアルドステロン関連高血圧において、効果的な薬剤の 1 つであると考えられた。</p>			

## 論文審査の結果の要旨

井坂 剛 氏提出の学位申請論文は、主論文 1 編 (European Journal of Pharmacology 605; 49-52, 2009) よりなり、タイトルは、「ヒト副腎皮質癌細胞株 NCI-H295R 細胞におけるアゼルニジピンのアルドステロン合成および分泌阻害作用に及ぼす研究」であり、宇都宮一典 教授のご指導で作成された。

NCI-H295R 細胞におけるアルドステロン合成に対する L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル遮断薬アゼルニジピン (Aze) の作用を検討した。NCI-H295R 細胞を継代培養し、Aze、T/L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル遮断薬エホニジピン (Efo) および L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル遮断薬ニフェジピン (Nif) を添加または非添加の条件下で、アンジオテンシン II または KCl にて細胞を刺激、37°C で 24 時間培養した。培養終了後細胞を回収し、ステロイド合成系の酵素であるステロイド 11 $\beta$ -ヒドロキシラーゼ (CYP11 $\beta$  1)、ステロイド 18-ヒドロキシラーゼ (CYP11 $\beta$  2) の mRNA の発現の評価を行うため、リアルタイム RT-PCR を行った。さらに、CYP11 $\beta$  1 および CYP11 $\beta$  2 の蛋白レベルの発現をウエスタンブロット解析により確認した。また、NCI-H295R 細胞培養液中のアルドステロンおよびコルチゾール分泌についても測定を行った。結果、アンジオテンシン II 刺激下にて Aze を添加したところ、CYP11 $\beta$  1 並びに CYP11 $\beta$  2 の発現を刺激後 3、6、24 時間の全てで Efo と同等に抑制し、その効果は Nif 添加による抑制よりも強かった。同様に KCL 刺激下での検討では刺激 3、24 時間後の CYP11 $\beta$  1 ならびに刺激 24 時間後の CYP11 $\beta$  2 の発現を Aze と Efo は同等に抑制し、Nif よりも有意に抑制した。考察として、Aze には L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルだけでなく、T 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルに対する遮断効果があり、この作用を介することで NCI-H295R 細胞でのステロイド生合成を抑制していると考えられた。結論、Aze は NCI-H295R 細胞におけるステロイド合成酵素の mRNA 発現ならびに蛋白量、アルドステロンおよびコルチゾール産生の両者に対し、Efo と同等の強力な阻害作用を有することが示された。

平成 27 年 5 月 8 日、木村直史 教授、大野岩男 教授のご臨席の下、口頭試問を実施した。席上、Aze は T 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの発現と作用のどちらを抑制しているのか、細胞株の差はあるのか、Aze は抗酸化作用を示すと言われているが、その機序は本研究と関連があるのか、ヒトにおいて CYP11 $\beta$  1 および CYP11 $\beta$  2 のアルドステロンとコルチゾールの合成にかかわる関与の違いはどうか、本研究と後になされた臨床研究の結果は合致しているのか、原発性アルドステロンに Aze は効果があると言って良いのか、腎保護作用があると考えて良いのかなど多くの質問がなされたが、井坂氏は全て適確に解答した。慎重審議の結果、本論文は学位申請論文として十分価値あるものと判断された。