

アルドステロンの心筋への直接作用

吉村道博*

はじめに：アルドステロンの作用にはナトリウムが重要な共役因子である

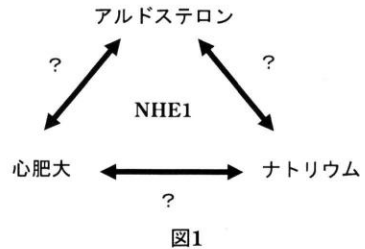
近年、アルドステロンが心血管リモデリングを惹き起こす事実が次々と報告されている。アルドステロンはその発見から既に50年が経過しているが、その奥深さには驚かされる。しかしながら、我々は、アルドステロンの作用に関する重要な共役因子を見落としてはならない。*in vivo*の実験系でナトリウム負荷をせずにアルドステロンを投与しても心筋傷害を起こさないという事実からわかるように¹⁾、アルドステロンの心筋傷害には「食塩」の存在が不可欠である。事実、一般的に、心肥大または心不全状態において減塩食は非常に重要であると以前より報告されている²⁾。食塩をほとんど摂取しない部族であるヤノマインディアンは血中アルドステロン値が高値であるにも拘らず高血圧を来たさない^{3,4)}。

我々は、食塩とアルドステロンが相乗相加的に心肥大を生じさせるという仮説を立て、それを検証するために実験を進めた。また、その研究過程において、アルドステロンの興味深い作用、つまり、高ナトリウム状態下での抗細胞脱水作用(細胞保護作用)に気付いたのでそれについても報告する⁵⁾。

心筋細胞に存在する Na^+/H^+ exchanger 1 (NHE1) が鍵になる

高食塩状態下のアルドステロンの心肥大に及ぼす直接作用を検討するにあたり、我々は、 Na^+/H^+ exchanger 1 (NHE1) の重要性にまず注目した(図1)。

最初に、NHE1について概説する。NHE1は Na^+ 流入と共役して H^+ を細胞外へ排出する2次性イオ



ンポンプであり、あらゆる動物の組織に普遍的に存在している^{6,7)}。また、NHE1は細胞内pHや細胞容積の調節にかかわり、細胞機能の維持に重要な役割を果たす交換輸送体である。心筋細胞において細胞内外へのナトリウム輸送体が数種類存在するが、アルドステロンが関与する輸送体の中で細胞内へのナトリウム輸送を行うものとしてNHE1がある。心筋におけるNHE1の詳細な機序は不明であるが、心肥大発症のメカニズムの一部に関与していると考えられている^{8~10)}。Dostal DEらは、*in vivo*研究においてNHE1特異的阻害剤が心肥大を抑制したことを報告している¹¹⁾。NHE1の機能を阻害する化合物は幾つか報告されており、本実験ではSM20220を使用した。

心臓におけるアルドステロンの作用

：ゲノム、非ゲノム作用の両面からの検討

アルドステロンをはじめとするステロイドホルモンの作用にはその詳細は不明な点が多いが、遺伝子発現を介するゲノム作用と遺伝子発現を介さずに早期に作用する非ゲノム作用があるといわれている^{12,13)}。また、心筋細胞に対してもアルドステロンのゲノム作用と非ゲノム作用があると報告されている^{14,15)}。血管平滑筋細胞において、アルドステロンはNHE1に対してゲノム作用、非ゲノム作用を有するという報告があり、心筋細胞でも

*熊本大学大学院医学薬学研究部循環器病態学

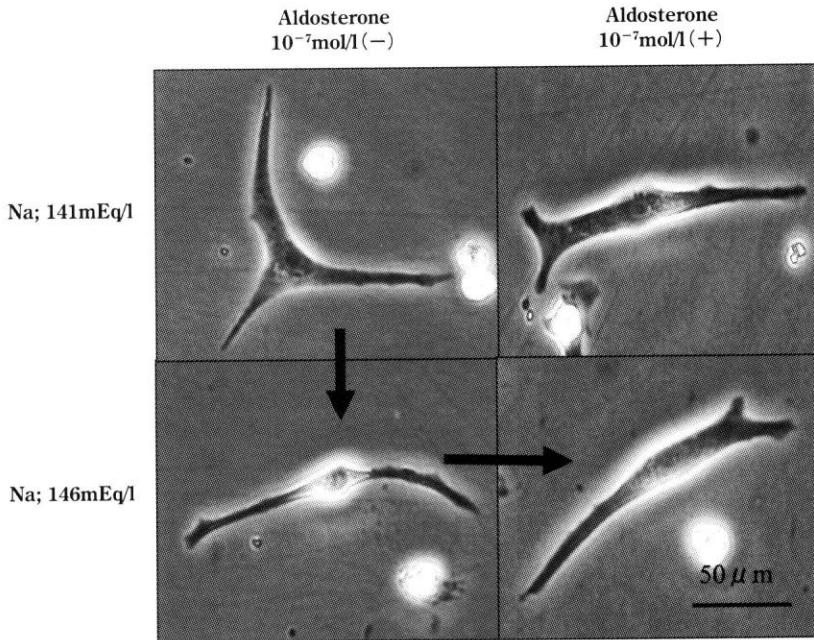


図2 アルドステロンの早期作用(細胞形態)2時間後

NHE1 に対して、同様にゲノム作用、非ゲノム作用を有している可能性が考えられる¹⁶⁾。

本研究の目的

本研究では、細胞外液ナトリウム負荷時に、①アルドステロンは、早期には NHE1 を介して細胞内へナトリウムを流入(非ゲノム作用)させることで高浸透圧による心筋細胞脱水を防ぐ生理学的作用を有し、また、②アルドステロンは、ナトリウムの長期負荷において、NHE1 を介した心筋細胞肥大作用(ゲノム作用)を有するという仮説をたて、仔ラット心筋細胞培養系を用いて検討した。

今回の研究ではアルドステロンの作用を早期作用(0~6時間)と長期作用(72時間)に分けて表現した。

早期作用の結果

A. 正および高ナトリウム濃度下でのアルドステロン投与による心筋細胞面積の早期変化

図2は細胞外液ナトリウム濃度 141(正常範囲)、146mEq/l(生理的に高いナトリウム濃度)におけるアルドステロン 10^{-7} mol/l 投与、非投与下に2時間培養した心筋細胞の写真である。細胞外液ナトリウム濃度 141mEq/l での細胞はアルドステロン投与、非投与に拘らず細胞面積の変化は認めなかった。

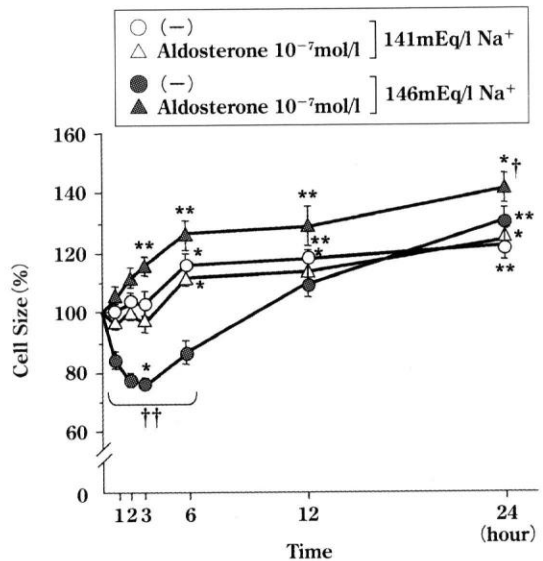


図3 アルドステロンの早期作用(細胞面積)

* p<0.01: vs. 0 hour
 ** p<0.0001: vs. 0 hour
 † p<0.01: vs. 141mEq/l Na⁺
 †† p<0.0001: vs. 141mEq/l Na⁺

細胞外液ナトリウム濃度 146mEq/l 下ではアルドステロン非投与心筋細胞は細胞面積の縮小が見られ、アルドステロン投与下でその縮小作用を抑制した(図3)。この作用はNHE1の機能を阻害するSM20220

で抑制できたが、MR 阻害薬であるエプレレノンでは抑制されなかった(図4).

B. 正および高ナトリウム濃度下でのアルドステロン投与による心筋細胞内ナトリウム、プロトン濃度の早期変化

図5 は細胞外液ナトリウム濃度 141, 146mEq/l 下でのアルドステロン投与による心筋細胞内ナトリウム濃度の早期変化について示したものである。ナトリウム濃度は励起光 340nm 蛍光 510nm, 励起光 380nm 蛍光 510nm (F340/F380) の比で表現される。細胞外液ナトリウム濃度 141mEq/l 下でのアルドステロン投与したものであるが、アルドステ

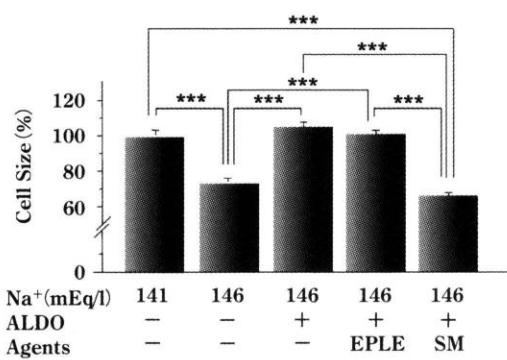


図4 アルドステロンの早期作用 (細胞面積) 2 時間後

ALDO: aldosterone 10⁻⁷mol/l
 EPLE: eplerenone 10⁻⁵mol/l
 SM: SM 20220 10⁻⁷mol/l
 *** p<0.0001

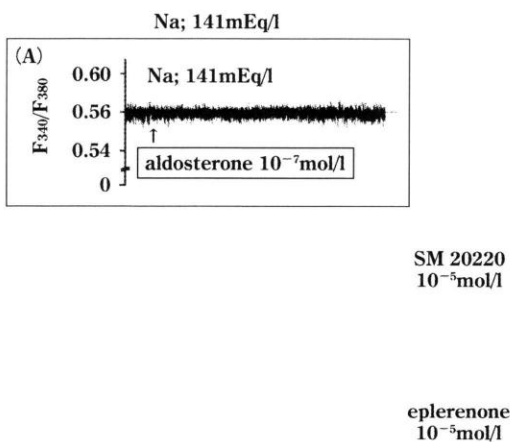


図5 アルドステロンの早期作用(細胞内ナトリウム濃度変化)2時間後

ン投与前後において細胞内ナトリウム濃度の変化は認められなかった。しかし、細胞外液ナトリウム濃度 146mEq/l にするとアルドステロン投与後細胞内ナトリウム濃度の上昇が認められた。この作用は SM20220 で抑制できたが、エプレレノンでは抑制できなかった。

図6 はアルドステロン投与による NHE1 の活性

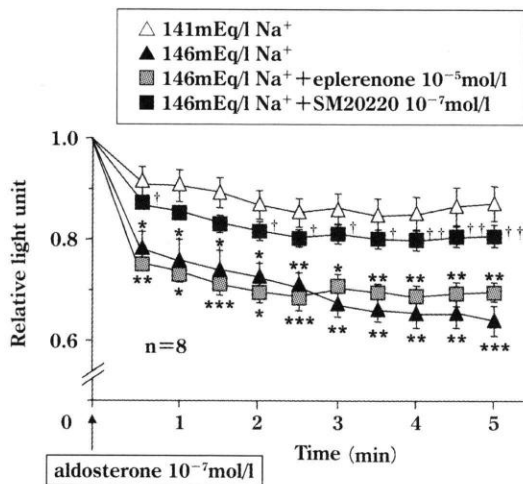
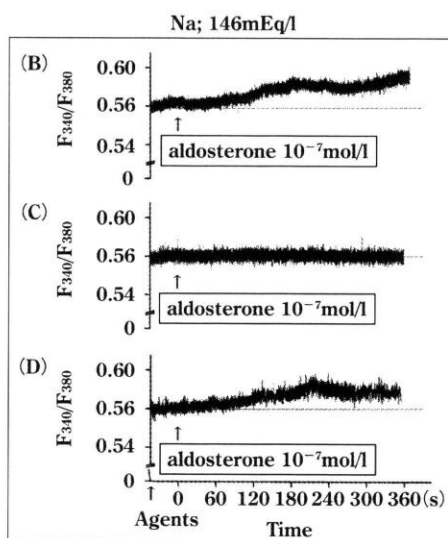


図6 アルドステロンの長期作用 (細胞内プロトン濃度変化) 2 時間後

* p<0.05, vs. 141mEq/l Na⁺
 ** p<0.005, vs. 141mEq/l Na⁺
 *** p<0.0005, vs. 141mEq/l Na⁺
 † p<0.05, vs. 146mEq/l Na⁺
 †† p<0.05, vs. 146mEq/l Na⁺



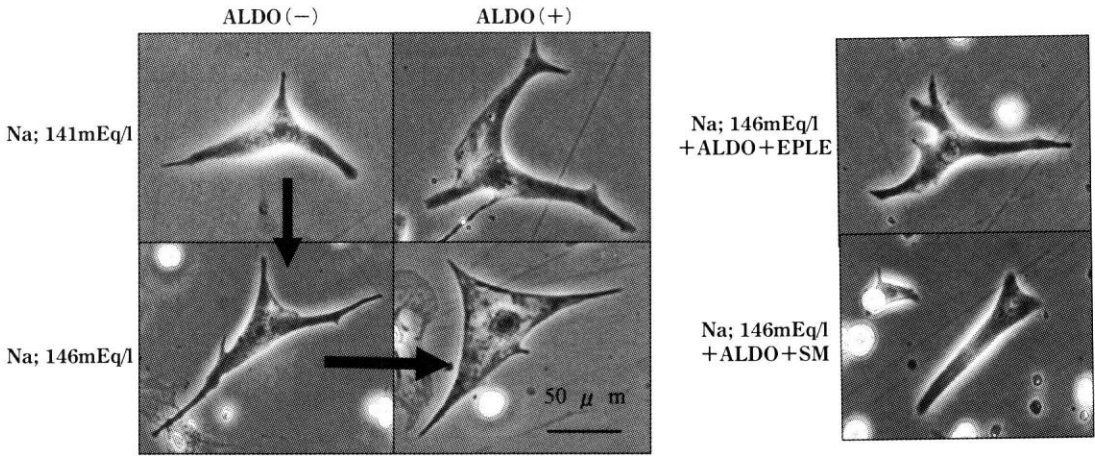


図7 アルドステロンの長期作用(細胞形態)72 時間後
 ALDO: aldosterone 10^{-7} mol/l, EPLE: eplerenone 10^{-5} mol/l, SM: SM 20220 10^{-7} mol/l

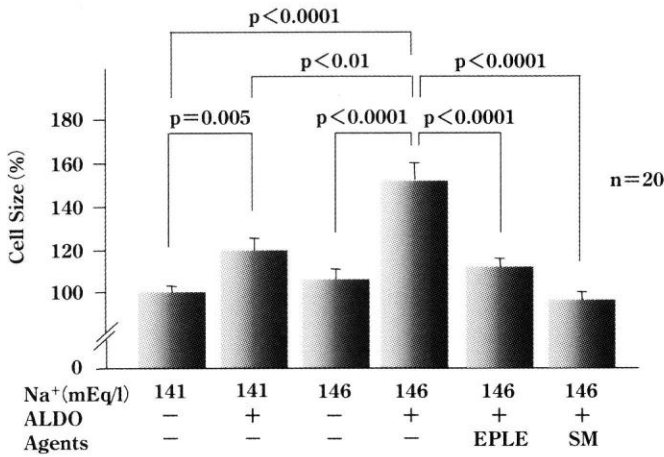


図8 アルドステロンの長期作用(細胞形態)72 時間後
 ALDO: aldosterone 10^{-7} mol/l, EPLE: eplerenone 10^{-5} mol/l, SM: SM 20220 10^{-7} mol/l

を調べるために細胞外液ナトリウム濃度 141, 146mEq/l 下でのアルドステロン投与による心筋細胞内プロトン濃度の早期変化について示したものである。各々の時間における細胞外液ナトリウム濃度 141mEq/l での細胞内 LysoSensor Green DND-153 蛍光輝度を基準にしてアルドステロン刺激後の細胞外液ナトリウム濃度 141, 146mEq/l での細胞内 LysoSensor Green DND-153 蛍光輝度の比を表に示した。細胞外液ナトリウム濃度 141mEq/l におけるアルドステロン投与後の細胞内プロトン濃度は時間とともに低下傾向にあるが、有意な低下を認めなかった。しかし、細胞外液ナトリウム濃度 146mEq/l におけるアルドステロン投与後の細胞内プロトン濃度は時間とともに有意に低下してい

た。このプロトン濃度低下作用は SM20220 で抑制されが、エプレレノンでは抑制されなかった。

長期作用の結果

A. 正および高ナトリウム濃度下でのアルドステロンの心筋細胞に与える影響：72 時間培養での検討結果

図7 は、細胞外液ナトリウム濃度 141, 146mEq/l におけるアルドステロン 10^{-7} mol/l 投与、および非投与下に 72 時間培養した心筋細胞の代表的な写真である。それを統計学的に処理したものが 図8 であるが、細胞外液ナトリウム濃度 141, 146mEq/l での細胞はアルドステロン非投与にて細胞面積の変化は認めなかった。細胞外液ナトリウム濃度

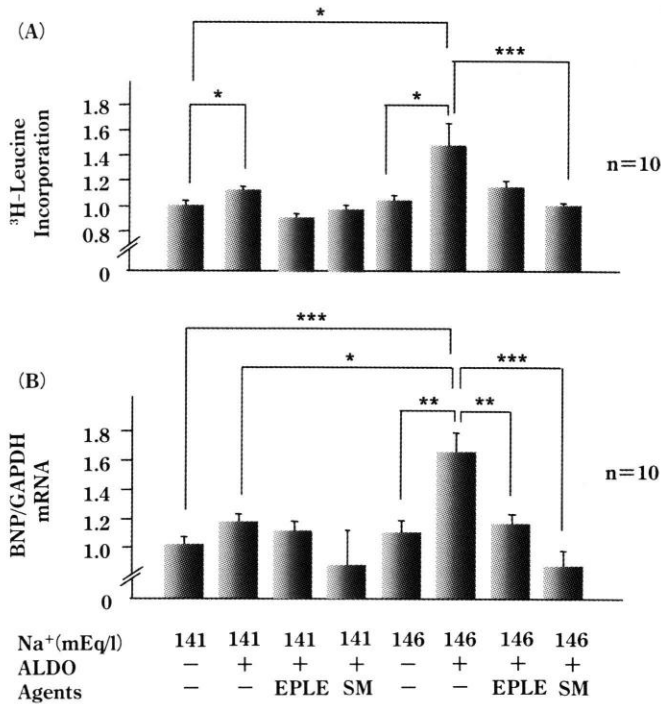


図9 アルドステロンの長期作用(細胞肥大マーカー)72時間後

* p<0.05, ** p<0.005, *** p<0.0005

ALDO: aldosterone 10⁻⁷mol/l, EPLE: eplerenone 10⁻⁵mol/l, SM: SM 20220 10⁻⁷mol/l

141mEq/l 下にアルドステロンを投与した心筋細胞は細胞面積の増大が見られた。細胞外液ナトリウム濃度 146mEq/l 下にアルドステロンを投与した心筋細胞はアルドステロン投与下で更に細胞面積は増大していた。この作用は SM20220 およびエプレレノンで有意に抑制された。

図9 は、細胞肥大を確認する為の実験である。細胞外液ナトリウム濃度 141, 146mEq/l におけるアルドステロン 10⁻⁷mol/l 投与, および非投与下に 72 時間培養した心筋細胞の細胞内 ³H-leucine 取り込みと心筋細胞 BNP 遺伝子発現量を検討した。結果は、細胞面積のものと同様で、³H-leucine 取り込みと BNP 遺伝子発現量は有意に増加した。また、この作用は SM20220 およびエプレレノンで抑制された。

図10 は細胞外液ナトリウム濃度 141, 146mEq/l におけるアルドステロン 10⁻⁷mol/l 投与, および非投与下に 72 時間培養した心筋細胞の NHE1 遺伝子発現量と NHE1 蛋白量を表わした図である。NHE1 遺伝子発現量はナトリウム濃度に拘らず、アルドステロン投与にてアルドステロン非投与の心筋細胞

と比べて有意に上昇した。この作用はエプレレノンで有意に抑制された。これはアルドステロンから肥大に至る経路に NHE1 の遺伝子発現が介在することを示している。

考察

我々は本研究において、細胞外液にナトリウム負荷した仔ラット心筋細胞培養系において、①アルドステロンは、早期には NHE1 を介して細胞内へナトリウムを流入(非ゲノム作用)させることで高浸透圧による心筋細胞脱水を防ぐ生理学的作用を有すること、また、②アルドステロンは、ナトリウムの長期負荷において、NHE1 を介した心筋細胞肥大作用(ゲノム作用)を有することを示した。

A. 高ナトリウム濃度におけるアルドステロンの早期作用について

細胞外液ナトリウム濃度 146mEq/l にて培養した仔ラット心筋細胞では、細胞外浸透圧の上昇によって細胞内液喪失が起こり、心筋細胞の縮小を生じた。また、その縮小した心筋細胞にアルドステロンが作用するとナトリウムを細胞内へ流入し、

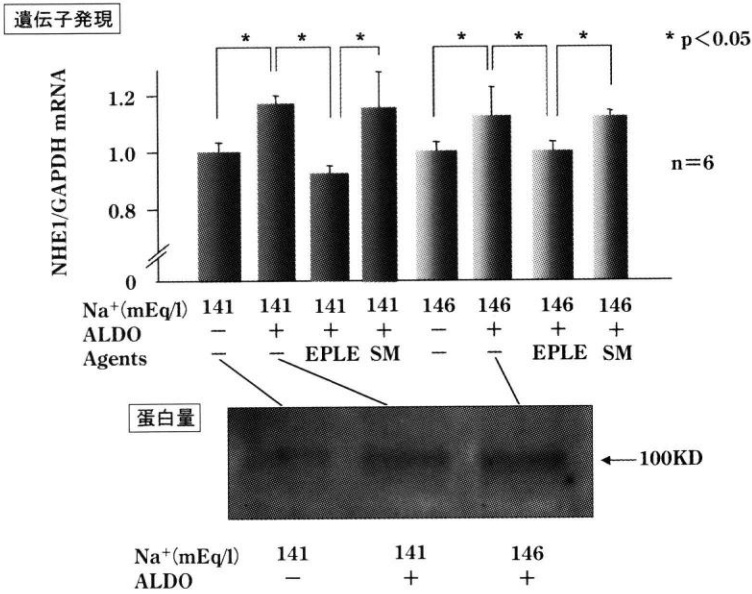


図10 NHE1 へのアルドステロンの作用(72 時間後)

ALDO: aldosterone 10^{-7} mol/l, EPLE: eplerenone 10^{-5} mol/l, SM: SM 20220 10^{-7} mol/l

プロトンを細胞外へ流出することで細胞膜間の浸透圧較差が減弱されると考えられた。これは阻害実験の結果より NHE1 を介する非ゲノム作用と思われる。つまり、細胞外液ナトリウム濃度が高く、細胞外高浸透圧状態である場合、アルドステロンは心筋細胞の脱水から即座に防御する役割を有する可能性が示唆された。今回の研究では、アルドステロンの早期作用に関して ³H-leucine の取り込み、BNP 遺伝子発現の変化が認められないことから(データ省略)、心筋肥大はまだ生じていない段階の反応であることが確認された。

アルドステロンの心血管系に対する傷害作用については様々な報告があるが、我々は今回初めてアルドステロンが心血管系に対して生理的作用(心保護作用)を有する可能性があることを示唆した。

以前、ヒト臍帯静脈内皮細胞に対し、アルドステロンが上皮型ナトリウムチャンネル(ENaC)を介して細胞内にナトリウムを流入させて細胞膨張を生じたという報告がある¹⁷⁾。ENaCは $\alpha\beta\gamma$ サブユニットによって構成されるチャンネルで腎尿管、腸管、肺胞といった上皮組織にのみ存在すると考えられていたが ENaC δ サブユニットが心臓にも存在するとの報告がある¹⁸⁾。ENaC δ の心臓に対する作用については不明であるが、今回のアルドステ

ロンの早期作用に NHE1 のみならず ENaC が関与している可能性も否定はできない。しかし、我々の実験結果からは NHE1 がその主たる作用であると考えられる。

B. 細胞外液の高ナトリウム状態下における

アルドステロンの長期作用の考察

72 時間培養を行った心筋細胞の細胞表面積、³H-leucine の取り込み率、BNP 遺伝子発現量、BNP 値の増加により、我々はアルドステロンの長期作用はナトリウム依存性に心筋細胞肥大を誘導することを示した。エプレレノン、SM20220 でこの作用が抑制できることから、アルドステロンの長期作用はミネラルコルチコイド受容体、NHE1 を介して起こるゲノム作用であることが示された。

NHE1 から心筋細胞肥大に至る過程においては、NHE1 を介する細胞内ナトリウムの増加に伴う Na/Ca 交換輸送体(NCX)を介した細胞内カルシウム異常増加が心筋細胞肥大に関与している可能性がある¹⁹⁾(図11)。

また、NHE1 を介する細胞内 pH の上昇が心筋細胞肥大に関与している可能性も否定できない。NHE1 を介しての細胞内ナトリウム上昇が心肥大を生じるメカニズムについては不明な点が多く、その解明も今後の課題である。

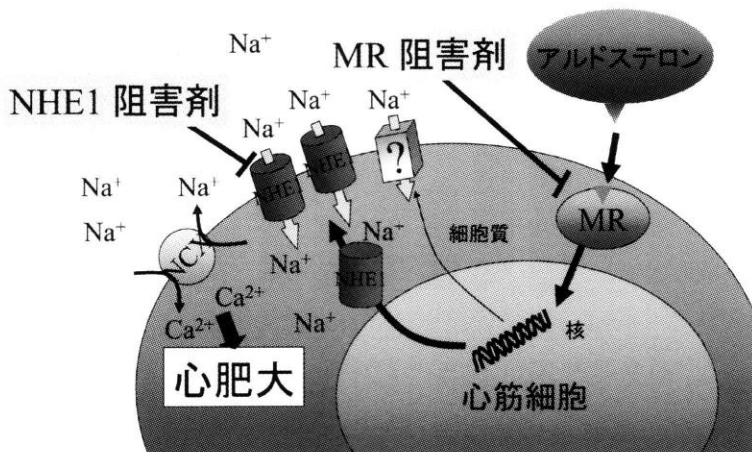


図11 アルドステロンの心筋肥大作用(長期作用)

細胞外液にナトリウム負荷した仔ラット心筋細胞培養系において、アルドステロンの長期負荷において、NHE1を介した心筋細胞肥大作用(ゲノム作用)が生じる。

C. 高ナトリウム負荷における心臓アルドステロン発現の可能性について

一般に、高ナトリウム負荷で副腎からのアルドステロン分泌は低下し、血中アルドステロン値は低下する²⁰⁾。しかしながら、ラットの心血管組織におけるアルドステロン合成酵素遺伝子発現量は高ナトリウム負荷で上昇することが報告されている²¹⁾。以上より、我々は、高塩分食を摂取し高ナトリウム負荷を続けると、血中のアルドステロン分泌は抑制されるものの、心臓局所の細胞からアルドステロンが自己分泌、傍分泌され、そのアルドステロンが短期的には細胞を保護し、そして、長期的にナトリウムとの相互作用を起こして心筋肥大を生じる可能性があると考えている。我々は、心不全や高血圧を有する患者において心臓からアルドステロンが分泌されていることを報告しているが^{22,23)}、その事実と関連があると思っている。

ヤノマモインディアンのデータは、減塩により血中アルドステロン値は上がっても、心臓局所におけるアルドステロン分泌は生じず、その結果、心肥大や高血圧を生じないのかもしれない。しかしながら、上記の理論は現時点では机上の空論に過ぎず、今後の重要な研究テーマである。

おわりに

本研究において、細胞外液にナトリウムを長期負荷した仔ラット心筋細胞培養系において、アルドステロンがNHE1を介した心筋細胞肥大作用を

有することが示された。この作用は、おそらくゲノム作用であると考えられた。しかし、早期の作用に見られるような非ゲノム作用の意義に関しては不明な点が未だ数多い。

実際の生体においては、循環中Na濃度はそれ程変化しない。それは、Na濃度は、アルドステロン、バソプレッシン、飲水量などの影響を受け、うまく制御されているからである。それならば、当該実験の細胞外液内のNa濃度を変える実験がどこまで意味のあることか疑問であるかもしれない。しかしながら、過剰食塩摂取ではNa濃度は若干ながら上昇するとも言われている。よって、当該研究は何らかの意味をなすと筆者は考えている。さらには、アルドステロンの早期のNaに関する非ゲノム作用には大変重要なメッセージが隠されていると感じており、いずれ徐々に証明していきたい。

文 献

- 1) Young MJ, Funder JW: Mineralocorticoid receptors and pathophysiological roles for aldosterone in the cardiovascular system. *J Hypertens* 2002; 20: 1465-8.
- 2) Gu JW, Anand V, Shek EW, et al: Sodium induces hypertrophy of cultured myocardial myoblasts and vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1998; 31: 1083-7.
- 3) Oliver WJ, Cohen EL, Neel JV: Blood pressure, sodium intake, and sodium related hormones in the Yanomamo Indians, a "no-salt" culture. *Circulation* 1975; 52: 146-51.
- 4) Vasan RS, Evans JC, Larson MG, et al: Serum aldosterone and the incidence of hypertension in non-hypertensive Persons. *N Engl J Med* 2004; 351: 33-41.

- 5) Yamamuro M, Yoshimura M, Nakayama M, et al: Direct effects of aldosterone on cardiomyocytes in the presence of normal and elevated extracellular sodium. *Endocrinology* 2006; 147: 1314-21.
- 6) Orłowski J, Kandasamy RA, Shull GE: Molecular cloning of putative members of the Na^+/H^+ exchanger gene family. *J Biol Chem* 1992; 267: 9331-9.
- 7) Wakabayashi S, Shigekawa M, Pouyssegur J: Molecular physiology of vertebrate Na^+/H^+ exchangers. *Physiol Rev* 1997; 77: 51-74.
- 8) Karmazyn M, Gan XT, Humphreys RA, et al: The myocardial Na^+/H^+ exchange: structure, regulation, and its role in heart disease. *Circ Res* 1999; 85: 777-86.
- 9) Ebata S, Muto S, Okada K, et al: Aldosterone activates Na^+/H^+ exchange in vascular smooth muscle cells by nongenomic and genomic mechanisms. *Kidney Int* 1999; 56: 1400-12.
- 10) Karmazyn M, Liu Q, Gan XT, et al: Aldosterone increases NHE-1 expression and induces NHE-1-dependent hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes. *Hypertension* 2003; 42: 1171-6.
- 11) Dostal DE, Baker KM: Angiotensin and endothelin: messengers that couple ventricular stretch to the Na^+/H^+ exchanger and cardiac hypertrophy. *Circ Res* 1998; 83: 870-3.
- 12) Losel RM, Falkenstein E, Feuring M, et al: Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers. *Physiol Rev* 2003; 83: 965-1016.
- 13) Funder JW: The nongenomic actions of aldosterone. *Endocr Rev* 2005; 26: 313-21.
- 14) Harada E, Yoshimura M, Yasue H, et al: Aldosterone induces angiotensin-converting-enzyme gene expression in cultured neonatal rat cardiocytes. *Circulation* 2001; 104: 137-9.
- 15) Mano A, Tatsumi T, Shiraishi J, et al: Aldosterone directly induces myocyte apoptosis through calcineurin-dependent pathways. *Circulation* 2004; 110: 317-23.
- 16) Ebata S, Muto S, Okada K, et al: Aldosterone activates Na^+/H^+ exchange in vascular smooth muscle cells by nongenomic and genomic mechanisms. *Kidney Int* 1999; 56: 1400-12.
- 17) Oberleithner H, Ludwig T, Riethmüller C, et al: Human endothelium. Target for aldosterone. *Hypertension* 2004; 43: 952-6.
- 18) Yamamura H, Ugawa S, Ueda T, et al: Protons activate the δ -subunit of the epithelial Na^+ channel in humans. *J Biol Chem* 2004; 279: 12529-34.
- 19) Bers DM, Barry WH, Despa S: Intracellular Na^+ regulation in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 2003; 57: 897-912.
- 20) Ye P, Kenyon CJ, Mackenzie SM, et al: Regulation of aldosterone synthase gene expression in the rat adrenal gland and central nervous system by sodium and angiotensin II. *Endocrinology* 2003; 144: 3321-8.
- 21) Takeda Y, Yoneda T, Demura M, et al: Effects of high sodium intake on cardiovascular aldosterone synthesis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2001; 19: 635-9.
- 22) Mizuno Y, Yoshimura M, Yasue H, et al: Aldosterone production is activated in failing ventricle in humans. *Circulation* 2001; 103: 72-7.
- 23) Yamamoto N, Yasue H, Mizuno Y, et al: Aldosterone is produced from the ventricles of patients with essential hypertension. *Hypertension* 2002; 39: 958-62.