自然発症高血圧ラットにおける aldosterone 代謝物について

金沢大学第二内科
新湊市民病院内科*

越田 英夫, 宮 森 勇, 池田 正 寿
斉藤 善 蔵*, 竹田 亮 祐

Aldosterone Metabolites in Spontaneously Hypertensive Rats

**Hideo KOSHIDA, Isamu MIYAMORI, Masatoshi IKEDA,
Zenzo SAITO* and Ryoyu TAKEDA**

The Second Department of Internal Medicine, School of Medicine,
Kanazawa University,
Kanazawa 920, Japan

*Department of Internal Medicine,
Shimminato Shimin Hospital,
Toyama 934, Japan

Several aldosterone metabolites are now known to possess some mineralocorticoid activities. In order to test the hypothesis that these metabolites could contribute to the pathogenesis of hypertension, we studied the aldosterone metabolism in SHR in vitro and in vivo.

In vitro experiment, male SHR and WKY rats of 4 and 15 weeks of age were used. The microsome, cytosol and heavy mitochondria fractions from liver and kidney were isolated by ultracentrifuge. 10mg protein/ml of each subcellular fraction was incubated with ^3H -aldosterone in Tris-HCl buffer at pH 7.4 containing NADPH, glucose-6-phosphate (G-6-P) and G-6-P dehydrogenase as described by Morris, D.J. et al. (Hypertension, 5 (suppl. I): I-35—I-40, 1983.). Aldosterone and its metabolites synthesized were extracted with Sep-pak C_{18} cartridges and separated by HPLC on a reverse phase column.

In vivo experiment, the urine of male SHR and WKY rats of 15 weeks old injected $10\mu\text{Ci } ^3\text{H}$ -aldosterone intraperitoneally was collected for 48 hours, extracted and analyzed by HPLC. Peaks of steroids from SHR were compared with those from WKY.

Incubation of aldosterone with liver microsomes yielded at least 10 polar and 3 less polar metabolites (A-ring reduced metabolites). SHR liver microsomes synthesized larger amounts of 3 polar metabolites than WKY liver microsomes. Liver cytosol, liver heavy mitochondria and kidney subcellular fractions mainly synthesized less polar metabolites, but failed to synthesize as much polar metabolites as liver microsomes. Kidney microsomes

and cytosol from 4 weeks old SHR synthesized larger amounts of less polar metabolites compared to those from WKY. In vivo experiment, SHR of 15 weeks of age excreted larger amounts of 2 polar metabolites than WKY.

The present study suggests that the difference of metabolism of aldosterone between SHR and WKY observed from an early stage in the liver and the target organ, kidney, may be associated with hypertension or its causative factors, and confirms that aldosterone will be metabolized to several polar and less polar forms by rat liver and kidney subcellular fractions.

緒 言

最も強力な鉱質コルチコイドである aldosterone の作用機序については, Edelman³⁾⁴⁾以来, 標的細胞内に入った aldosterone が細胞質の特異的受容体に結合し, 核内に移動後 RNA, 作用蛋白が合成されるという一連の機序が基本とされている。近年, aldosterone の代謝物が, かなりの鉱質コルチコイド活性を有することが報告⁵⁾⁶⁾され注目をあびている。すなわち, aldosterone 作用の latent period に, 血漿中, 肝及び腎内に還元型代謝物及び極性の高い代謝産物 (polar metabolites) が認められ¹⁴⁾¹⁶⁾, これらの代謝物と aldosterone に対する生理反応が相関すること¹³⁾¹⁵⁾, また, testosterone¹⁾, progesterone⁷⁾は標的組織内でより強力な生物活性を示す dihydrotestosterone, dihydroprogesterone に変換されることなどより, Morris ら¹⁵⁾¹⁷⁾¹⁸⁾²¹⁾²⁵⁾は, これらの aldosterone の代謝物が aldosterone の作用発現になんらかの役割を果たしているとする "aldosterone transformation hypothesis" を提唱している。一方, 本態性高血圧患者では, aldosterone 代謝クリアランス率が低下していることが報告²⁷⁾されており, 肝あるいは腎での aldosterone の代謝の異常があるものと推察される。そこで, 我々は, 高血圧モデルとして自然発症高血圧ラット (SHR) を用い, in vitro, in vivo で aldosterone の代謝について検討を加えた。

対象及び方法

ラットの肝および腎組織の各細胞分画による ³H-aldosterone の代謝を検討するための in vitro の実験, および in vivo の実験として ³H-aldosterone をラットに投与した際の尿中の代謝物の分離, 測定を行った。

1. in vitro 実験

1) 実験動物: 水と食事を自由摂取とした 4 週令および 15 週令の雄性 SHR 及び WKY ラットを用いた。実験直前の収縮期血圧は tail-cuff 法で測定した。

2) 各細胞分画の調整²⁸⁾: 各ラットは, 断頭屠殺後速やかに肝臓及び腎臓を摘出し, 0°C にて細片とした後, 10 倍容の 0.25 M sucrose 溶液を加えガラス製ホモジェナイザーでホモジェナイズした。肝, 腎とも, まず, 600g×10 分間遠心後, その上清をさらに 5000g×10 分間遠心した (沈殿: heavy mitochondria 分画)。この上清を 10000g×10 分間遠心し, 次いで上清を 105000g×60 分間遠心した (沈殿: microsome 分画, 上清: cytosol 分画)。microsome 分画は, さらに 10 倍容の 0.15 M KCl 溶液に溶解後, 105000g×60 分遠心したものを実験に用いた。各分画の蛋白含量測定は Lowry 法¹⁰⁾で行った。

3) Incubation, 抽出および高速液体クロマトグラフィー (HPLC) ²⁰⁾: NADPH500 μ M, glucose-6-phosphate50mM, glucose-6-phosphate dehydrogenase25unit, MgCl₂5mM, Tris HCl buffer (pH7.4) 50mM, [1, 2, 6, 7-³H]-aldosterone (比活性80.0Ci/mmol, New England Nuclear) 10 μ Ci および各細胞分画10mg を加えて 1 ml とし, 37°Cで180分間 incubation した。incubate を, あらかじめ methanol 2 ml 次いで蒸留水 5 ml を通した Sep-pakC₁₈カートリッジに通過させ, 蒸留水 5 ml で洗浄後 methanol 3 ml で抽出した。これを N₂ガス気流下で乾固し逆相 HPLC に供した。HPLC のポンプは島津製作所製 LC-5 A, カラムは Dupont 社製 Zorbax C₈ (4.6 $\times$ 250mm, 粒径 5 μ m) を使用し, 移動相は15% (20分間) -33% (30分間) -50% (30分間) aqueous methanol で順に stepwise に, 流速 1 ml/min で溶出した。検出器は, Aloca 社製, Radio Liquid Chromatograph Detector (model PSM-RLC601B-2) を用い, シンチレーターは Bray 溶液を2.5ml/min で使用した。

2. in vivo 実験

15週令雄性 SHR および WKY ラットに, ³H-aldosterone10 μ Ci, 3 ml 生理食塩水を腹腔内に注射し, 48時間後まで代謝ケージで畜尿した。各ラットの尿を, in vitro の実験と同じように, Sep-pakC₁₈カートリッジで抽出後 HPLC を行った。

測定値は mean $\pm$ SEM で示した。統計学的検定は Mann-Whitney の Utest で行い, 危険率 5 % 未満を有意差ありと判定した。

Table 1. Systolic blood pressures of SHR and WKY.

			Sys. Pressure(mmHg)
			(Mean $\pm$ SEM)
4 W	SHR (male) n=10		104 $\pm$ 4
	WKY (male) n=10		98 $\pm$ 3
15 W	SHR (male) n=10	] P<0.01	182 $\pm$ 3
	WKY (male) n=10		111 $\pm$ 3

Fig. 1. HPLC radiochromatogram of the metabolites of aldosterone synthesized by 15 weeks old SHR liver microsome.

Fig. 2. Quantities of the metabolites of ^3H -aldosterone incubated with SHR and WKY liver subcellular fractions.

Fig. 3. HPLC radiochromatogram of the metabolites of aldosterone synthesized by 15 weeks old SHR kidney microsome.

結 果

1. in vitro 実験

ラットの収縮期血圧は Table. 1 に示した。肝 microsome 分画は、HPLC 上少なくとも10種の aldosterone より polar な metabolites, 3種の less polar metabolites を生産した (Fig. 1)。aldosterone の平均保持時間 (MRT と略す) は、67.2min, polar metabolites の MRT は順に5.6, 21.2, 28.8, 30.8, 32.4, 36.4, 40.0, 45.2, 50.8, 63.2min, less polar metabolites の MRT は、68.8, 76.4, 80.0min であった。これらの less polar metabolites の MRT は順に3 α , 5 β -tetrahydroaldosterone, 5 α -dihydroaldosterone, 3 β , 5 α -tetrahydroaldosterone (いずれも A-環還元型代謝物) の MRT と一致した。その量を各週令の SHR, WKY で比較すると、4週令 SHR は、MRT36.4, 40.0min の polar metabolites を、15週令 SHR は、MRT28.8, 36.4min の polar metabolites を対応する週令の WKY よりも有意に多く生成した。他の代謝産物の比較では、4週令, 15週令の SHR, WKY 間で有意差は認めなかった (Fig. 2)。肝 cytosol 分画は、aldosterone よりも less polar な MRT68.8min の代謝産物を生産したが、その量は4週令 SHR は WKY よりもやや少ない傾向にあったものの有意差はなかった (Fig. 2)。肝 heavy mitochondria 分画では、1種の polar metabolite (MRT63.2min) 及び2種の less polar metabolites (MRT68.8, 76.4min) を生成したが、SHR, WKY 間で差は認めなかった (Fig. 2)。一方、腎の各細胞分画は肝に比し polar metabolites の生産は極めて少なく、腎 microsome, cytosol, heavy mitochondria 分画ともに、1種の polar metabolite (MRT68.8min) を生産したに過ぎなかった (Fig. 3, 4)。4週令 SHR 腎 microsome 分画では、未代謝 aldosterone は WKY に比し有意に少なく、polar metabolite (MRT63.2min), less polar metabolite (MRT68.8min) とともに4週令 WKY に比べ有意に多かった。15週令 SHR では、代謝産物の生成量は差がなかった (Fig. 4)。4週令 SHR 腎 cytosol 分画では、less polar metabolite (MRT68.8min) は、WKY に比し有意に多かった (Fig. 4)。腎 heavy mitochondria 分画では、SHR, WKY 間で代謝産物に差は認めなかった (Fig. 4)。

Fig. 4. Quantities of the metabolites of ^3H -aldosterone incubated with SHR and WKY kidney subcellular fractions.

2. in vivo 実験

48時間畜尿の放射活性は, SHRで $9.08 \pm 0.59 \times 10^3$ cpm, WKYで $9.27 \pm 0.66 \times 10^3$ cpmであった。aldosterone 以外に, 6種の尿中 polar metabolites (MRT28.8, 30.8, 32.4, 36.4, 40.0, 45.2min), 1種の less polar metabolite (MRT68.8min) を検出し得た。MRT36.4, 45.2の polar metabolites は SHR で有意に多く, 未代謝 aldosterone 排泄量は, WKY で有意に大であった。less polar metabolite は, WKY でやや多い傾向を示したがその差は有意ではなかった (Fig. 5)。

Fig. 5. Quantities of the urinary metabolites of SHR and WKY injected with ^3H -aldosterone.

考 按

本研究では, ラット肝, 腎各細胞分画により多数の polar aldosterone metabolites, less polar metabolites が生成され, 後者の HPLC 上の保持時間は 3 α , 5 β -tetrahydroaldosterone, 5 α -dihydroaldosterone, 3 β , 5 α -tetrahydroaldosterone (いずれも A-環還元型代謝物) のそれと一致し, また, 尿中にこれらの代謝物が排泄されることが示された。

polar metabolites の鉱質コルチコイド活性は, Morris ら²⁰⁾によると, その一部のものは aldosterone の 2%~3.5%, A-環還元型代謝物のそれは 3 α , 5 β -tetrahydroaldosterone で 0.4~0.7%, 5 α -dihydroaldosterone で 5~8%, 3 β , 5 α -tetrahydroaldosterone で 0.2~0.9% に相当という⁵⁾⁸⁾。何れもその活性は, aldosterone に比し僅かであるが, aldosterone の標的器官である腎内で生成される代謝産物は, 実際には, bioassay で推定される活性よりもかなり強い活性を, 局所で発揮している可能性がある¹⁷⁾。

aldosterone 代謝物の生理的意義については不明な点が多いが, 最近になり Morris ら¹⁵⁾¹⁷⁾¹⁸⁾²¹⁾²⁵⁾は, ラットを用いた一連の実験より, aldosterone の代謝産物が, aldosterone の作用発現に一部関与するという仮説を提唱している ("aldosterone transformation hypothesis")。この仮説の根拠としては, 緒言で記した以外に, 副腎摘除ラットでは, aldosterone の反応は, 雌よりも雄が大であるが, aldosterone の代謝産物は雄により多く存在すること¹³⁾¹⁵⁾, antimineralocorticoids は, 肝, 腎内の aldosterone の代謝産物を減少させること¹¹⁾¹²⁾²⁴⁾³⁰⁾³¹⁾などを挙げている。また Gomez-Sanchez ら⁵⁾も, aldosterone の還元型代謝物の, 副腎摘除ラットを用いた bioassay による活性が, 腎

細胞質受容体との結合から推定される活性よりも大きいことより, 古典的な aldosterone 作用機序以外の機序があるものと推測している。

これらの aldosterone 代謝物と高血圧の関連を検討するため, SHR, WKY ラット間で代謝物の差異を比較検討した。その結果, 肝 microsome 分画, 腎 microsome 分画により生成される polar metabolites および尿中に排泄される polar metabolites の数種は SHR において有意に高値を示し, 一部のものは高血圧発症前期において既に有意差を認めた。この成績は SHR ではほとんどの尿中 polar metabolites 排泄量が高値を示したという報告¹⁹⁾とは若干異なるが, この解離は使用したラットの週令の差, 副腎摘除の有無に起因したものと思われる。polar metabolites の高血圧の発症維持機構に果たす意義は不明であるが, aldosterone よりやや極性の高い 19-nor-aldosterone の鉱質コルチコイド活性²²⁾, 昇圧活性²³⁾は, aldosterone と同等ないしより強力であるとする報告もあり何らかの関連が想定される。

本実験結果では, less polar metabolites は, 肝 cytosol 分画で SHR は WKY に比べ, やや低い傾向を示したが, 有意差は得られず, 尿中排泄量も同様の結果であった。肝 Δ^4 -reductase 活性の低下は, SHR²⁶⁾, 腎性高血圧ラット²⁹⁾, また本態性高血圧患者⁹⁾において報告されているが, 一部のヒト高血圧患者において dihydrocortisol の尿中排泄量が上昇³²⁾しているといった報告もあり, 必ずしも一致を見ていない。腎 microsome, 腎 cytosol 分画では, less polar metabolites は, 4 週令 SHR では WKY に比し有意に多く生成されていた。前述のように A-環還元型代謝物は, 標的臓器内で生成されるので bioassay で推定されるよりも局所において強い鉱質コルチコイド活性を発揮するものと考えられ¹⁷⁾, その昇圧活性は Gorsline ら⁶⁾により示されている。従って, 腎内で代謝産生される還元型代謝物が高血圧の発症維持に一部関与している可能性がある。

また, 一部の polar metabolites²⁰⁾, tetrahydroaldosterone²⁾には, 副腎の angiotensin 結合を抑制する作用があることが報告されており, この成績も高血圧発症との関連を示唆するものと考えられる。

結 語

1) SHR, WKY ラットの肝, 腎各細胞分画と ^3H -aldosterone の incubation 実験では, 多数の代謝産物が産生された。肝 microsome 分画では, 少なくとも 10 種の polar metabolites と 3 種の less polar metabolites (A-環還元型代謝物) が, 肝 cytosol, 肝 heavy mitochondria 分画, 腎各細胞分画では, 主として less polar metabolites が産生された。

2) 肝 microsome 分画による polar metabolites のいくつかは, 4 週令あるいは 15 週令の SHR で WKY ラットよりも多く産生された。腎 microsome, cytosol 分画による less polar metabolites の産生は, 4 週令 SHR においてより大であった。

3) ^3H -aldosterone を腹腔内投与した SHR の尿には, いくつかの polar metabolites がより多く排泄された。

4) 以上の成績より, SHR の高血圧発症維持に aldosterone の代謝産物がなんらかの関連をもって示唆された。

文 献

- 1) Bruchovsky, N., Wilson, J.D.: The conversion of testosterone to 5α -androstan- 17β -ol-3-one by rat prostate in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.*, 243: 2012–2021, 1968.
- 2) Campanile, C.P., Goodfriend, T.L.: Steroids as potential modulators of angiotensin receptors in bovine adrenal glomerulosa and kidney. *Steroids*, 37: 681–700, 1981.
- 3) Edelman, I.S.: Mechanism of action of steroid hormones. *J. Steroid Biochemistry*, 6: 147–159, 1975.
- 4) Edelman, I.S., Marver, D.: Mediating events in the action of aldosterone. *J. Steroid Biochemistry*, 12: 219–224, 1980.
- 5) Gomez-Sanchez, C.E., Smith, J.S., Ferris, M.W., Gomez-Sanchez, E.P.: Renal receptor-binding activity of reduced metabolites of aldosterone: Evidence for a mineralocorticoid effect outside of the classic aldosterone receptor system. *Endocrinology*, 115: 712–715, 1984.
- 6) Gorsline, J., Harnik, M., Tresco, P.A., Morris, D.J.: Hypertensinogenic activities of ring A-reduced metabolites of aldosterone. *Hypertension*, 8(suppl. I): I-187–I-190, 1986.
- 7) Karavolas, H.J., Hodges, D., O'Brien, D.: Uptake of [3 H] progesterone and [3 H] 5α -dihydroprogesterone by rat tissues in vivo and analysis of accumulated radioactivity: Accumulation of 5α -dihydroprogesterone by pituitary and hypothalamic tissues. *Endocrinology*, 98: 164–175, 1976.
- 8) Kenyon, C.J., Brem, A.S., McDermott, M.J., Deconti, G.A., Latif, S.A., Morris, D.J.: Antinatriuretic and kariuretic activities of the reduced derivatives of aldosterone. *Endocrinology*, 112: 1852–1856, 1983.
- 9) Kornel, L., Miyabo, S., Saito, Z., Cha, R.-W., Wu, F.-T.: Corticosteroids in human blood. VIII. Cortisol metabolites in plasma of normotensive subjects and patients with essential hypertension. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 40: 949–958, 1975.
- 10) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265–275, 1951.
- 11) McDermott, M., Latif, S., Morris, D.J.: The metabolism of aldosterone in kidney. *J. Steroid Biochemistry*, 19: 1205–1211, 1983.
- 12) McDermott, M.J., Freiburger, M., Latif, S.A., Morris, D.J.: The synthesis of reduced metabolites of aldosterone by subcellular fractions of rat kidney: Effects of antimineralocorticoids. *J. Steroid Biochemistry*, 23: 503–509, 1985.
- 13) Morris, D.J., Bereck, J.S., Davis, R.P.: Sex dependence of the metabolism of aldosterone in adrenalectomized and intact rats. *Steroids*, 21: 397–407, 1973.
- 14) Morris, D.J., Davis, R.P.: Complex formation by 3 H aldosterone in rat kidney and liver. *Steroids*, 21: 383–396, 1973.
- 15) Morris, D.J., Davis, R.P.: Aldosterone: Current concepts. *Metabolism*, 23: 473–494, 1974.
- 16) Morris, D.J., Tsai, R., DeConti, G.A.: Regulation of plasma levels of aldosterone and its metabolites during the latent period of aldosterone. *J. Steroid Biochemistry*, 7: 971–978, 1976.
- 17) Morris, D.J.: The metabolism and mechanism of action of aldosterone. *Endocrine Reviews*, 2: 234–247, 1981.
- 18) Morris, D.J., McDermott, M., Latif, S.A., Keating, A., Kenyon, C.J.: The metabolism of aldosterone in target tissues. *J. Steroid Biochemistry*, 15: 473–477, 1981.
- 19) Morris, D.J., Kenyon, C.J.: Aldosterone and its metabolism in spontaneously hypertensive rats(SHR).

- Clin. Exp. Hypertens., A4: 1613–1626, 1982. 20) Morris, D.J., Kenyon, C.J., Latif, S.A., McDermott, M., Goodfriend, T.L.: The possible biological role of aldosterone metabolites. Hypertension, 5 (suppl. 1): I-35–I-40, 1983. 21) Morris, D.J.: Further studies on aldosterone metabolism. Ann. Clin. Lab. Sci., 16: 94–102, 1986.
- 22) Morris, D.J., Brem, A.S., Saccoccio, N.A., Pacholski, M., Harnik, M.: Mineralocorticoid activity of 19-hydroxyaldosterone, 19-nor-aldosterone, and 3β -hydroxy- Δ^5 -aldosterone: Relative potencies measured in two bioassay systems. Endocrinology, 118: 2505–2509, 1986. 23) Morris, D.J., Gorsline, J., Tresco, P.A., Harnik, M.: The effects of 19-nor-aldosterone on blood pressure of adrenalectomized spontaneously hypertensive rats. Steroids, 46: 1003–1010, 1985. 24) Morris, D.J., McDermott, M.J., Freiburger, M., Latif, S.A., Pacholski, M., Brem, A.S.: The effects of antimineralocorticoids on synthesis of aldosterone metabolites in target tissues. J. Steroid Biochemistry, 24: 341–344, 1986.
- 25) Morris, D.J., Brem, A.S.: Metabolic derivatives of aldosterone. Am. J. Physiol., 252: F365–F373, 1987. 26) Nishikawa, T., Tamura, Y., Mikami, K., Yamamoto, M., Kumagai, A.: Adrenal steroidogenesis and hepatic corticosteroid metabolism in hypertensive rats. Endocrinol. Jap., 25: 149–155, 1978. 27) Nowaczynski, W., Kuchel, O., Genest, J.: A decreased metabolic clearance rate of aldosterone in benign essential hypertension. J. Clin. Invest., 50: 2184–2190, 1971. 28) Schneider, W.C.: Intracellular distribution of enzymes. J. Biol. Chem., 176: 259–266, 1948.
- 29) Silah, J.G.: Reduction of the Δ^4 -3-ketosteroids by normal and hypertensive rat liver. Endocrinology, 87: 90–98, 1970. 30) Tsai, R., Morris, D.J.: The effect of spironolactone on the hepatic metabolism of aldosterone in male rats. Endocrinology, 103: 1239–1244, 1978. 31) Tsai, R., Davis, R.P., Morris, D.J.: The effect of the antimineralocorticoid, spironolactone on the hepatic synthesis of polar metabolites of aldosterone in male rats. J. Steroid Biochemistry, 13: 481–487, 1980.
- 32) Ulick, S., Ramirez, L.C., New, M.I.: An abnormality in steroid reductive metabolism in a hypertensive syndrome. J. Clin. Endocrinol. Metab., 44: 799–802, 1977.

(受付日: '88. 3. 1)