



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                     |                                                                                                 |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | ステロイドホルモンによる生理的状态および肥満病態における代謝制御機構の解明                                                           |
| Author(s)           | 柴山, 惟                                                                                           |
| Description         | 配架番号 : 2696                                                                                     |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                           |
| Degree Name         | 博士(医学)                                                                                          |
| Dissertation Number | 甲第14954号                                                                                        |
| Issue Date          | 2022-03-24                                                                                      |
| DOI                 | <a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k14954">https://doi.org/10.14943/doctoral.k14954</a> |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/85893">https://hdl.handle.net/2115/85893</a>               |
| Type                | doctoral thesis                                                                                 |
| File Information    | SHIBAYAMA_Yui.pdf                                                                               |



# 学 位 論 文

ステロイドホルモンによる  
生理的状态および肥満病態における  
代謝制御機構の解明

**(Novel insights into steroid hormone induced  
nuclear receptor transcriptional activity  
in physiology and in obesity)**

2022 年 3 月

北 海 道 大 学

柴山 惟

Yui Shibayama







# 学 位 論 文

ステロイドホルモンによる  
生理的状态および肥満病態における  
核内受容体転写活性制御機構の解明  
(**Novel insights into steroid hormone induced  
nuclear receptor transcriptional activity  
in physiology and in obesity**)

2022 年 3 月

北 海 道 大 学

柴山 惟

Yui Shibayama

# 目 次

|       |                                                             |         |
|-------|-------------------------------------------------------------|---------|
| 1     | 発表論文目録および学会発表目録                                             | 1-2 頁   |
| 2     | 要旨                                                          | 3-5 頁   |
| 3     | 略語表                                                         | 6-7 頁   |
| 4     | 緒言                                                          | 8-9 頁   |
| 5     | 第一章                                                         |         |
|       | 肝臓における class 3 PI3K によるグルコシルチコイド受容<br>体の安定性と転写活性制御機構        | 10-50 頁 |
| 5.1   | 緒言                                                          | 11-12 頁 |
| 5.2   | 実験方法                                                        | 13-21 頁 |
| 5.2.1 | 実験に用いた抗体                                                    | 13-14 頁 |
| 5.2.2 | 実験に用いた動物                                                    | 15 頁    |
| 5.2.3 | 動物への対照実験                                                    | 15 頁    |
| 5.2.4 | 細胞成分分画                                                      | 16 頁    |
| 5.2.5 | ターゲットメタボロミクス                                                | 16-17 頁 |
| 5.2.6 | タンパク抽出とイムノブロット                                              | 17 頁    |
| 5.2.7 | 遺伝子発現解析                                                     | 17-20 頁 |
| 5.2.8 | バイオインフォマティクス解析                                              | 21 頁    |
| 5.2.9 | 統計学的解析                                                      | 21 頁    |
| 5.3   | 実験結果                                                        | 22-47 頁 |
| 5.3.1 | class 3 PI3K と GR シグナルのオーバーラップ解析                            | 22-25 頁 |
| 5.3.2 | 肝臓特異的 Vps15 ノックアウトマウスの肝臓における GR<br>標的遺伝子                    | 26-27 頁 |
| 5.3.3 | 肝臓特異的 Vps15 ノックアウトマウスの肝臓における GR<br>タンパク、GR アイソフォーム          | 28-33 頁 |
| 5.3.4 | 肝臓特異的 Vps15-LKO マウスの肝臓における絶食および<br>デキサメタゾン投与に対する GR シグナルの影響 | 34-37 頁 |
| 5.3.5 | 肝臓特異的 Vps15-LKO マウスの肝臓における核内 GR co-<br>factor 発現の検討         | 38-40 頁 |
| 5.3.6 | 肝臓特異的 Vps15-LKO5 マウスの肝臓における GC 代謝<br>の評価                    | 41-43 頁 |

|       |                                            |         |
|-------|--------------------------------------------|---------|
| 5.3.7 | 肝臓特異的 Vps15-LKO マウスの肝臓における核内 Akt シグナル発現の評価 | 44-45 頁 |
| 5.3.8 | 肝臓特異的 Vps15-LKO マウスの肝臓における GR ポリユビキチン化の評価  | 46-48 頁 |
| 5.4   | 考察                                         | 49-51 頁 |
| 6     | 第二章                                        |         |
|       | 原発性アルドステロン症患者における内臓脂肪量と血漿アルドステロン濃度の関連の検討   | 52-66 頁 |
| 6.1   | 緒言                                         | 53-54 頁 |
| 6.2   | 実験方法                                       | 55-57 頁 |
| 6.2.1 | 対象                                         | 55 頁    |
| 6.2.2 | 病型診断                                       | 55-56 頁 |
| 6.2.3 | CT での内臓脂肪量測定方法                             | 56 頁    |
| 6.2.4 | 内分泌学的測定方法                                  | 57 頁    |
| 6.2.5 | 統計学的解析                                     | 57 頁    |
| 6.3   | 実験結果                                       | 58-64 頁 |
| 6.3.1 | 背景因子                                       | 58-60 頁 |
| 6.3.2 | 試験結果                                       | 61-64 頁 |
| 6.4   | 考察                                         | 65-66 頁 |
| 7     | 総括および結論                                    | 67-68 頁 |
| 8     | 謝辞                                         | 69 頁    |
| 9     | 利益相反                                       | 70 頁    |
| 10    | 引用文献                                       | 71-78 頁 |



# 1. 発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文として発表した。

- 1) Shibayama Y, Wada N, Baba S, Miyano Y, Obara S, Iwasaki R, Nakajima H, Sakai H, Usubuchi H, Terae S, Nakamura A, Atsumi T. Relationship Between Visceral Fat and Plasma Aldosterone Concentration in Patients With Primary Aldosteronism. *Journal of the Endocrinology Society*, 2018; 2(11): 1236-1245.
- 2) Shibayama Y, Alkhoury C, Nemazanyy I, Henneman N, Cagnard N, Girard M, Atsumi T, and Panasyuk G. Class 3 Phosphatidyl Inositol-3 Kinase Promotes Glucocorticoid Receptor Stability and Transcriptional Activity in Murine Liver in Physiology. *Acta Physiologica*, 2022 Jan 29;e13793. doi: 10.1111/apha.13793.

本研究の一部は下記の学会で発表した。

- 1) Shibayama Y, Wada N, Baba S, Obara S, Iwasaki R, Nakajima H, Sakai H, Usubuchi H, Terae S, Miyano Y, Nakamura A, Atsumi T. Relationship Between Visceral Fat and Plasma Aldosterone Concentration In Patients With Primary Aldosteronism. The 44<sup>th</sup> International Aldosterone Conference, New Orleans, USA, 21-22 March 2019
- 2) Shibayama Y, Wada N, Baba S, Obara S, Iwasaki R, Nakajima H, Sakai H, Usubuchi H, Terae S, Miyano Y, Nakamura A, Atsumi T. Measurement of Visceral Fat Using Computed Tomography in Two Subtypes of Primary Aldosteronism. ENDO, New Orleans, USA, 23-26 March 2019
- 3) Shibayama Y, Wada N, Baba S, Obara S, Iwasaki R, Nakajima H, Sakai H, Usubuchi H, Terae S, Miyano Y, Nakamura A, Atsumi T. Relationship Between Visceral Fat and Plasma Aldosterone Concentration In Patients With Primary Aldosteronism. International Symposium for Aldosterone and Related Substances in Hypertension, Sendai, Japan, 11-12 May 2019
- 4) 柴山惟、和田典男、馬場周平、小原慎司、臼渕浩明、寺江聡、岩崎廉、中島悠、境英承、宮野有希恵、中村昭伸、渥美達也、原発性アルドステロン症における内臓脂肪と血漿アルドステロン濃度の関係、日本内分泌学会学術総会、仙台、2019年5月9日-11日

## 2. 要旨

### 【背景と目的】

第一章：class 3 phosphoinositide 3-kinase (PI3K)とグルココルチコイド受容体 (glucocorticoid receptor: GR)は、共に摂食、絶食状態サイクルへの代謝適応に不可欠である。GR はオートファジーを活性化することが知られているが、オートファジーが GR を制御しているかどうかについての報告はない。class 3 PI3K はオートファジーのほかエンドサイトーシス輸送、リソソーム活性などの細胞内プロセスに重要な役割を果たしている。本研究では肝臓において class 3 PI3K がどのように GR シグナルを制御しているかを明らかにすることを目的とした。

第二章：肥満と高血圧の関連は以前より知られていたが、近年内臓脂肪量とアルドステロンの関連が明らかになってきた。本研究ではアルドステロンが過剰分泌される病態である原発性アルドステロン症(primary aldosteronism: PA)の患者において内臓脂肪量と血漿アルドステロン濃度との関連について明らかにすることを目的とした。

第一章：肝臓における class 3 PI3K によるグルココルチコイド受容体の安定性と転写活性制御機構

【対象と方法】肝臓特異的 class 3 PI3K ノックアウトマウスである Vps15-LKO マウス雄性 6 週齢の肝臓における GR タンパク発現、GR $\alpha$  転写活性、GR の転写後修飾を評価した。Vps15-LKO マウス雄性 6 週齢において 24 時間絶食とデキサメタゾン投与を行い GR タンパク発現、GR リン酸化、GR 標的遺伝子発現を評価した。GR 発現の調整機構について検討するため、Vps15-LKO マウスにおける GR の活性化リガンドであるコルチコステロン値および GR のポリユビキチン化を評価した。

【結果】Vps15-LKO マウスの肝臓では、GR タンパク発現、核内 GR Ser211 リン酸化、GR $\alpha$  転写活性のすべてが抑制されていた。Vps15-LKO マウスの肝臓では、24 時間絶食とデキサメタゾン投与により、GR 標的遺伝子の一部が回復したが、これらの発現は対照マウスで観察されたレベルまでは回復しなかった。また Vps15-LKO マウスでは対照マウスと異なり、デキサメタゾン投与により GR Ser211 リン酸化は回復しなかった。Vps15-LKO マウスでは対照マウスに比

べて GR の活性型リガンドであるコルチコステロン値を制御する 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase-1 (11 $\beta$ HSD1)の転写活性および肝臓中のコルチコステロン値が低下していた。Vps15-LKO マウスの肝臓において核内 Akt シグナルの増加と E3 リガーゼ Mdm2 の活性化および、GR のポリユビキチン化を認めた。

【考察】 class 3 PI3K は、GR タンパク発現、GR $\alpha$  および GR $\alpha$  の標的遺伝子の転写、GR の転写後修飾、GR の活性化リガンドレベルの制御を介して GR シグナルを制御していた。Vps15-LKO マウスの肝臓において GR に対するプロテオソームのターンオーバーが増加することで、GR 発現を調整している可能性が示唆された。

## 第二章：原発性アルドステロン症患者における内臓脂肪量と血漿アルドステロン濃度の関連の検討

【対象と方法】本研究は、2007 年 4 月から 2017 年 4 月までに市立札幌病院で PA と診断された 131 名の患者を対象とした後方視的観察研究である。PA と診断した後に副腎静脈サンプリング (adrenal venous sampling: AVS)を行い、片側副腎摘出術が必要であると判断した患者に対しては片側副腎摘出術を施行し病理診断の後にアルドステロン産生腺腫 (aldosterone producing adenoma: APA)あるいは特発性アルドステロン症 (idiopathic hyperaldosteronism: IHA)と診断した。上記患者において血漿アルドステロン濃度 (plasma aldosterone concentration: PAC)と computed tomography (CT)画像で求めた内臓脂肪率 (visceral fat percentage: VF%)、内臓脂肪面積 (visceral fat area: VFA)、皮下脂肪面積 (subcutaneous fat area: SCFA)との相関を解析した。

【結果】IHA 患者では、PAC と VF% ( $r=0.377, p<0.001$ )および VFA ( $r=0.443, p<0.001$ )に正の相関が見られた。一方で PAC と SCFA に相関は認められなかった ( $r=0.151, p=0.170$ )。APA 患者で PAC と VF%、VFA とに相関は見られなかった。

【考察】IHA 患者のみで内臓脂肪組織とアルドステロン生成の関係が明らかになった。APA と IHA のアルドステロン過剰分泌の病態形成メカニズムが異なることが示されたとともに、IHA 患者においては内臓脂肪量を減少させることで PAC を低下させる可能性が示された。

【結論】第一章で class 3 PI3K は、空腹時の生理的応答において GR の必須の活性化因子であることが明らかになった。第二章では PA のうち IHA における過剰な内臓脂肪によるアルドステロン分泌促進機構を明らかにした。

GC とミネラルコルチコイドという二種類のステロイドホルモンによる代謝制御機構を解明した。本研究の成果がこれらのステロイドホルモンによる代謝異常への新たな治療戦略となることが期待される。

### 3. 略語表

本文中のおよび図中で使用した略語は以下の通りである。

|                     |                                            |
|---------------------|--------------------------------------------|
| 11-DHC              | 11-dehydrocorticosterone                   |
| 11 $\beta$ HSD1     | 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase-1 |
| 11 $\beta$ HSD2     | 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase-2 |
| ACTH                | adrenocorticotrophic hormone               |
| APA                 | aldosterone producing adenoma              |
| ARR                 | aldosterone renin ratio                    |
| AVS                 | adrenal venous sampling                    |
| BMI                 | body mass index                            |
| C/EBP $\alpha$      | CCAAT/enhancer binding proteins $\alpha$   |
| C/EBP $\beta$       | CCAAT/enhancer binding proteins $\beta$    |
| Cry-40              | cyclophilin-40                             |
| CT                  | computed tomography                        |
| DEX                 | dexamethasone                              |
| DST                 | dexamethasone suppression test             |
| Fabp1               | fatty acid binding protein 1               |
| FKBP51              | FK506 binding protein 51                   |
| FKBP52              | FK506 binding protein 52                   |
| FoxO1               | forkhead box o1                            |
| GAPDH               | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase   |
| GC                  | glucocorticoid                             |
| GO                  | gene ontology                              |
| GR                  | glucocorticoid receptor                    |
| GSK3 $\beta/\alpha$ | glycogen synthase kinase 3 $\beta/\alpha$  |
| Hdac3               | histone deacetylase 3                      |
| HPA                 | hypothalamic-pituitary-adrenal             |
| Hsp40               | heat shock protein 40                      |
| Hsp70               | heat shock protein 70                      |
| Hsp90               | heat shock protein 90                      |
| HU                  | hounsfield unit                            |
| IHA                 | idiopathic hyperaldosteronism              |
| IL-6                | interleukin-6                              |

|               |                                                  |
|---------------|--------------------------------------------------|
| IP            | immunoprecipitation                              |
| IR            | insulin receptor                                 |
| LBD           | ligand binding domain                            |
| LC-MS/MS      | liquid chromatography-tandem mass spectrometry   |
| LI            | lateralized index                                |
| MCP-1         | monocyte chemoattractant-1                       |
| MDM2          | murine double minute 2                           |
| MR            | mineralocorticoid receptor                       |
| NAFLD         | nonalcoholic fatty liver disease                 |
| NcoR1         | nuclear receptor corepressor 1                   |
| PA            | primary aldosteronism                            |
| PAC           | plasma aldosterone concentration                 |
| PGC1 $\alpha$ | PPAR $\gamma$ coactivator-1                      |
| PI3K          | phosphoinositide 3-kinase                        |
| PI3P          | phosphatidylinositol 3-phosphate                 |
| PP5           | phosphatase 5                                    |
| PPAR $\alpha$ | peroxisome proliferator-activated receptor alpha |
| PRA           | plasma renin ratio                               |
| SCFA          | subcutaneous fat area                            |
| SD            | standard deviation                               |
| SEM           | standard error of the mean                       |
| SI            | selectivity index                                |
| TNF- $\alpha$ | tumor necrosis factor- $\alpha$                  |
| VF%           | visceral fat percentage                          |
| VFA           | visceral fat area                                |
| Vps15         | vacuolar protein sorting 15                      |
| Vps34         | vacuolar protein sorting 34                      |

## 4. 緒 言

グルココルチコイド (glucocorticoid: GC)とミネラルコルチコイドはいずれも副腎皮質から分泌されるステロイドホルモンであり、生体内の代謝調整に深く関わっている。本研究では第一章は GC の生体内における転写制御機構について、第二章はミネラルコルチコイドの肥満病態における分泌制御機構および転写制御機構について研究した。

GC は副腎皮質束状層から分泌されるステロイドホルモンである。生体内のストレス状態で分泌が亢進され、飢餓への対応ならびに細胞増殖・分化や炎症調整にも関与している(Kadmiel and Cidlowski, 2013)。GC は薬理学的量の投与により強い抗炎症作用を有するため現在広く治療に用いられているが、一方で副作用としてステロイド糖尿病や脂質異常症、Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)といった多くの代謝関連疾患を来すことも広く知られている。GC は核内受容体であるグルココルチコイド受容体 (glucocorticoid receptor: GR)のリガンドとして働き、GR が核内で転写制御することでその作用を発現する(Hollenberg et al., 1985)。class 3 PI3K はオートファジー開始の際の隔離膜合成に用いられるほか、エンドサイトーシス輸送、リソソーム活性にも不可欠である。class 3 PI3K はインスリンシグナルとその下流の脂質と糖代謝を調整する(Nemazanyy et al., 2015)。class 3 PI3K と GR シグナルはいずれも摂食-絶食というサイクルへの適応のための代謝ホメオスタシスの調整に非常に重要な働きを有しているが、双方の調整機構については明らかとなっていない。

ミネラルコルチコイドは副腎皮質球状層から分泌されるステロイドホルモンであり、レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系の最終シグナルである。ミネラルコルチコイドは GC と同様に核内受容体であるミネラルコルチコイド受容体 (mineralocorticoid receptor: MR)のリガンドとして働き、MR が核内で転写制御することでその作用を発現する。ミネラルコルチコイドは主に腎臓遠位尿細管で MR を介した Na の再吸収を行うことで生体内の塩分量の調整および体液量の調整を行う。また MR は全身の様々な細胞に発現しており、血管周囲の炎症、線維化、内皮機能異常、酸化ストレスの増大など多彩なメカニズムで臓器障害を来すことで心血管合併症および脳血管合併症を進展させる(Monticone et al., 2018)。近年、ミネラルコルチコイドと肥満および代謝異常との関連が明らかになってきた(Akehi et al., 2019; Hanslik et al., 2015)。本邦においては食事の欧米化や運動量の減少によって、肥満者の割合が増加してきている。また食事習慣の変化により、塩分摂取量の減少傾向により塩分摂取過多による高血圧患者数は減少傾向である一方、肥満による高血圧患者数が増加傾



向である。肥満によるミネラルコルチコイド分泌機構については明らかになっておらず、肥満に関連する高血圧治療の新たなターゲットとなる可能性がある。

第一章では肝臓特異的 class 3 PI3K ノックアウトマウスを用いて GR シグナルの調整機構の分子メカニズムを検討した。第二章ではミネラルコルチコイド過剰の病態である原発性アルドステロン症 (primary aldosteronism: PA) における、過剰な内臓脂肪によるアルドステロン過剰分泌機構を検討した。

## －第 1 章－

# 肝臓における class 3 PI3K による グルココルチコイド受容体の 安定性と転写活性制御機構

## 5.1. 緒 言

代謝のホメオスタシスはすべての生物の本質的な特性であり、生存のために必須である。エネルギー消費と供給のバランスによる代謝ホメオスタシスを得るため、生体内でホルモンは遺伝子発現の調整によりエネルギー代謝を適応させる栄養感知機構として重要なシグナル伝達仲介の役割を有している。

GC はストレスに応答する視床下部-下垂体-副腎 (hypothalamic-pituitary-adrenal: HPA)系によって制御されている。GC は副腎から分泌された後に血液を介して全身に分布し、細胞内の不活性型 GR に結合する。GR は進化的に保存された核内受容体スーパーファミリーのタンパク質であり、リガンド依存性の転写因子として GC の多様な作用を媒介する(Kadmiel and Cidlowski, 2013)。肝臓は GC の代謝作用の中心となる臓器の一つである。空腹時に GC を投与すると、GR はホモ二量体として、あるいは PPAR $\alpha$  などの他の転写因子とのヘテロ二量体として、糖新生、タンパク質および脂肪の分解を活性化する。しかし GR が過剰に活性化されると、脂質合成が促進されるなど生体への悪影響となる代謝作用が生じる可能性がある。GR の代謝ホメオスタシスへの重要性と、過剰な GR の機能による生体への悪影響を防ぐため、GR シグナルは複数のレベルで厳密に制御されている。第 1 に GR の活性は、スプライシングによる活性型 GR $\alpha$  と抑制型 GR $\beta$  の共発現によりバランスがとられている(Hinds et al., 2010)。第 2 に活性化された Akt シグナルの下流でのリン酸化を含む転写後修飾により、プロテアソーム分解によって GR のターンオーバーが制御されている(Patt et al., 2020)。第 3 に GR の核内移行と核内保持は、Heat shock protein との結合によって影響を受ける(Vandevyver et al., 2012)。第 4 に肝細胞における GR リガンドのレベルは 11 $\beta$ HSD1 により調整されている。マウスにおいては代謝酵素である 11 $\beta$ HSD1 により不活性型 GC である 11-Dehydrocorticosterone (11-DHC)を活性型 GR リガンドであるコルチコステロンに変換することによって制御される(Kadmiel and Cidlowski, 2013)。

Phosphoinositide 3-kinase (PI3K)はイノシトール環の 3'位にリン酸基を負荷する酵素であり、細胞周期、生存、増殖など様々な細胞活動に関わっている。PI3K はその構造により class1、class 2 および class 3 の 3 つに分類される。このうち、最も研究が進んでいるのが class1 であり糖尿病分野においてはインスリン受容体シグナル伝達に関与する PI3K/Akt 経路が広く知られている(Huang et al., 2018)。class 3 PI3K は、酵母から哺乳類まですべての真核細胞に存在している(Backer, 2008)。class 3 PI3K は、phosphatidylinositol をリン酸化し PI3P を生成する vacuolar protein sorting 34 (Vps34)と Vps34 の安定性と活性化に必要である

vacuolar protein sorting 15 (Vps15)を含む複合体として機能している(Panaretou et al., 1997)。class 3 PI3K は、リン脂質である phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P)を合成することで、エンドサイトーシス輸送、オートファジー、リソソーム活性などの細胞内プロセスに重要な役割を果たしている(Devereaux et al., 2013)。class 3 PI3K は、insulin receptor (IR)のリソソームでの分解を促進し、IR の作用を制限することで生理的な代謝の恒常性維持に貢献している。肝臓特異的 class 3 PI3K ノックアウトでは Akt 活性の増大、転写因子 FoxO1 などの下流の標的のリン酸化の増加、糖新生が抑制される(Nemazanyy et al., 2015)。また class 3 PI3K に依存した選択的なオートファジーは、肝臓における脂質代謝のマスターレギュレーターである転写因子 PPAR $\alpha$  による空腹時の代謝適応に不可欠な役割を果たしている(Iershov et al., 2019)。これらの結果は、空腹時の転写反応に class 3 PI3K が重要な役割を果たしていることを示唆している。摂食-絶食のサイクルにおける糖代謝と脂質代謝のホメオスタシスを得るために、同化作用のある class 1 PI3K と異化作用のある GR 転写因子の間で複数の機能的相互作用が報告されている(Kuo et al., 2012; Leis et al., 2004; Piovan et al., 2013; Stechschulte et al., 2014)。一方で class 3 PI3K と GR はともに空腹時に転写が促進されが、GR の転写活性に class 3 PI3K が必要であるかは明らかでない。また異化促進因子である GR が、骨細胞、筋肉、脂肪組織においてオートファジーを転写的に活性化することを示した報告はあるが(Deng et al., 2020; Troncoso et al., 2014; Xia et al., 2010)、class 3 PI3K が摂食-絶食時の代謝適応に寄与する GR 発現を調整しているかについては研究されていなかった。本研究では、肝臓における class 3 PI3K の GR 制御機構を明らかにすることを目的にした。

## 5.2 実験方法

### 5.2.1 実験に用いた抗体

本実験では下記抗体を用いた (Table. 1)。

**Table 1.** イムノブロットのために用いた抗体

| <b>Primary antibodies</b>     |                |                     |                         |
|-------------------------------|----------------|---------------------|-------------------------|
| <b>Antigen</b>                | <b>Species</b> | <b>Manufacturer</b> | <b>Working dilution</b> |
| GR                            | Rabbit         | Cell Signaling      | 1:1000                  |
| phSer211 GR                   | Rabbit         | Cell Signaling      | 1:1000                  |
| Lamp2                         | Rat            | Abcam               | 1:1000                  |
| p62                           | Mouse          | Abnova              | 1:2000                  |
| LC3                           | Mouse          | Nano Tools          | 1:500                   |
| GAPDH                         | Rabbit         | Cell Signaling      | 1:2000                  |
| $\beta$ -catenin              | Mouse          | BD Biosciences      | 1:1000                  |
| HSP90                         | Rabbit         | Proteintech         | 1:1000                  |
| HSP70                         | Rabbit         | Proteintech         | 1:1000                  |
| Fabp1                         | Mouse          | Santa Cruz          | 1:3000                  |
| Ubiquitin                     | Mouse          | Cell Signaling      | 1:1000                  |
| phSer473 Akt1                 | Rabbit         | Cell Signaling      | 1:1000                  |
| phSer9/21 GSK3 $\beta/\alpha$ | Rabbit         | Cell Signaling      | 1:1000                  |
| phSer166 MDM2                 | Rabbit         | Cell Signaling      | 1:1000                  |

## 5.2.2 実験に用いた動物

Panasyuk lab で作成した肝臓特異的 Vps15 ノックアウトマウス(AlbCre<sup>+</sup>; Vps15<sup>ff</sup> マウス: Mouse Clinical Institute - Institute Clinique de la Souris, Illkirch, France)、対照マウス(Vps15<sup>ff</sup> マウス)の 6-8 週雄性マウスを用いた。肝臓特異的 class 3 PI3K 不活性化の遺伝学的マウスモデルは、class 3 PI3K の必須制御サブユニットである Vps15 タンパクを慢性的 (AlbCre+Vps15f/f マウス)、または Cre-リコンビナーゼを発現するアデノウイルスベクターを用いて急性的に枯渇させる方法で作成した。マウスの飼育環境は、室温 25°Cの空調のもと 8 時~20 時までを明期とした明暗サイクルで自由運動および水道水・餌の自由摂取のもとで飼育した。本研究に用いたマウスにはすべて libitum standard chow diet (Teklad global protein diet; 20% protein, 75% carbohydrate, 5% fat)を摂餌し飼育した。

本実験については、Direction Départementale des Services Vétérinaires, Préfecture de Police, Paris, France (authorization number 75-1313) and the ethical committee of Paris Descartes University (authorization number 17-052)による許可を得て行った。

## 5.2.3 動物への対照実験

上記肝臓特異的 Vps15 ノックアウトマウスおよび対照マウスに絶食、デキサメタゾン投与を行った。絶食は 24 時間とし 22 時から絶食を開始した。デキサメタゾン (Sigma)は 0.5mg/kg で投与し、投与 5 時間後に肝臓組織を採取した。

## 5.2.4 細胞成分分画

粉末状の肝臓組織 50mg から細胞内核分画を得た。粉末状の肝臓組織を 1ml の低張バッファー (10mM HEPES pH7.9, 0.5mM DTT) でホモジナイズし、氷上で 30 分間インキュベートし、5 分ごとに 10 秒間ボルテックスを行った。0.4% NP40 を加えて、氷上で 2 分間インキュベートした後、10 秒間ボルテックスした。4°C、800g で 1 分間の遠心分離を行い上澄み液とペレットに分離し、上澄み液を細胞質画分として回収した。核を抽出する前にペレットを 1ml の低張性緩衝液で 3 回、14%NP40 の 1ml 低張性緩衝液で 1 回、1ml の低張性緩衝液で 3 回洗浄した。ペレットを 300ul の高濃度緩衝液 (20mM HEPES pH7.9, 0.5mM DTT, 376 0.42M NaCl, 25% Glycerol, 0.2mM EDTA pH8) に再懸濁し、氷上で 40 分間インキュベートし、10 分ごとに 10 秒間ボルテックスを行った。4°C で 10,000g、1 分間の遠心分離を行い、細胞内核分画を回収した。

## 5.2.5 ターゲットメタボロミクス

ターゲットメタボロミクスの解析は、下記の方法で施行した。抽出液は 50% メタノール、30%ACN、20%水を使用した。抽出液の添加量は、粉末状の肝臓組織 (60 mg/ml) の重量から算出した。抽出液を加えた後、4°C で 5 分間ボルテックスし、16,000×g で 15 分間、4°C で遠心分離した。上清を回収し、液体クロマトグラフィー分離に SeQuant ZIC-pHilic カラム (Merck) を用いて液体クロマトグラフィー質量分析法で分析した。移動相 A は、20 mM 炭酸アンモニウムに 0.1%水酸化アンモニウムを加えた水溶液を用いた。移動相 B は ACN を用いた。質量分析計 (QExactive Orbitrap, Thermo Fisher Scientific) は polarity switching mode で動作させ、TraceFinder Software (Thermo Fisher Scientific) を用いて代謝物を同定した。解析のために、メタボロミクスデータは中央値正規化法を用いて正規化した。統計解析とヒートマップの作成には MetaboAnalyst 4.0 ソフトウェアを使用し、比較には対応のない Student の *t* 検定を選択した。ヒートマッ



プのクラスタリングのアルゴリズムは、類似性については Pearson 距離測度を、バイオタイプのクラスタリングについては Ward linkage 法を用いた。

## 5.2.6 タンパク質抽出とイムノブロット

イムノブロット分析用のタンパク質抽出液を調製するために、肝臓組織を液体窒素中で粉末化し、20mM Tris-HCl (pH8.0)、5%グリセロール、138mM NaCl、2.7mM KCl、1%NP-40、20mM NaF、5mM EDTA、1×Protease Inhibitors (Roche)、1×PhosphoStop Inhibitors (Roche)を含む溶解バッファーでタンパク質を抽出した。ホモジネートを 12,000×g で 10 分間、4°Cで回転させた。ビーズを 1×SDS サンプルバッファーで 10 分間加熱してタンパク質複合体を溶出させた。抽出したタンパク質を SDS-PAGE で分離した後、PVDF 膜に転写した。メンブレンは疎水性のため、使用に際しメタノールに浸し親水化処理を行った。転写したメンブレンを洗浄のうえ、5%スキムミルクを含む TBST にて 1 時間ブロッキングを行った。次に TBST で 3 回洗浄した後、一次抗体 (4°C overnight) と二次抗体 (HRP 標識抗体、室温 1 時間)とインキュベートした。さらに TBST で 3 回洗浄後、Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore)を使用して発光させ ChemiDocTM Imager (Biorad)で撮影した。解析には Image Lab software 6.0.1 (Bio-Rad)を用いた。

## 5.2.7 遺伝子発現解析

RNAeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen)を用いて、肝臓組織からトータル RNA を単離した。125 ng の random hexamer primers (Thermo Fisher Scientific)と SuperScript II (Thermo Fisher Scientific)を用いて、1 µg の total RNA から一本鎖の相補的 DNA を合成した。RT-qPCR は QuantStudio 1 (Thermo Fisher Scientific)

で、iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio Rad)を用いて行った。mRNA の相対量は、eIF2 $\alpha$  を参照遺伝子とし、対照処理または対照遺伝子型を不変の対照として 2- $\Delta\Delta$ CT 法により決定した。以下にプライマーの配列を示す (Table. 2)。

**Table 2.** RT-qPCR に用いたプライマーの配列

| Gene (sense/antisense) |           | Sequence                        |
|------------------------|-----------|---------------------------------|
| G6pc                   | sense     | 5'-ATGAACATTCTCCATGACTTTGGG-3'  |
|                        | antisense | 5'-GACAGGGAAGTCTTTATTATAGG-3'   |
| Pepck                  | sense     | 5'-CTGCATAACGGTCTGGACTTC-3'     |
|                        | antisense | 5'-CAGCAACTGCCCCGTACTCC-3'      |
| Fabp1                  | sense     | 5'-TCCGCAATGAGTTCACCCTG-3'      |
|                        | antisense | 5'-CAGCTTGACGACTGCCTTGA-3'      |
| Insig2                 | sense     | 5'-CCCTCAATGAATGTACTGAAGGATT-3' |
|                        | antisense | 5'-TGTGAAGTGAAGCAGACCAATGT-3'   |
| Lpin1                  | sense     | 5'-GGGAGACAACGGAGAAGCAT-3'      |
|                        | antisense | 5'-ATTCTCGCAGCTCCTTCTGA-3'      |
| Mttp                   | sense     | 5'-ATGGACGCCAGCTTTTGTTA-3'      |
|                        | antisense | 5'-ACGTGAGCTTGTATAGCCGC-3'      |
| Dgat2                  | sense     | 5'-AAGGATCTGCCCTGTCACG-3'       |
|                        | antisense | 5'-CTGCAGCTGTTTTTCCACCT-3'      |
| Angptl4                | sense     | 5'-AGAGGCTTCCCAAGATGACC-3'      |
|                        | antisense | 5'-GGAAGAGTTCCTGGCAGTCC-3'      |
| Abcb11                 | sense     | 5'-TGGATCAACAGCTCCTTCAAC-3'     |
|                        | antisense | 5'-TTCGCTGTTAATGTCCACCA-3'      |
| Tat                    | sense     | 5'-GGCTGGGCTGGATCCTTATC-3'      |
|                        | antisense | 5'-ATAGCAGAGGTCCGCATTGG-3'      |
| Gilz                   | sense     | 5'-GGGAGGTCCTAAAGGAGCAGATTC-3'  |
|                        | antisense | 5'-GCGTCTTCAGGAGGGTGTTTC-3'     |
| Hes1                   | sense     | 5'-GGAGAGGCTGCCAAGGTTTT-3'      |
|                        | antisense | 5'-GCAAATTGGCCGTCAGGA-3'        |
| Hey1                   | sense     | 5'-CAAGCCCGGAAGAAGCG-3'         |
|                        | antisense | 5'-TCGTCGCAATTCAGAAAGGC-3'      |
| 11 $\beta$ HSD1        | sense     | 5'-AACCACATCACTCAGACCTC-3'      |
|                        | antisense | 5'-ACCCATCCAGAGCAAACCTTG-3'     |

|             |           |                                |
|-------------|-----------|--------------------------------|
| GR $\alpha$ | sense     | 5'-AAAGAGCTAGGAAAAGCCATTGTC-3' |
|             | antisense | 5'-CTGTCTTTGGGCTTTTGAGATAGG-3' |
| GR $\beta$  | sense     | 5'-AAAGAGCTAGGAAAAGCCATTGTC-3' |
|             | antisense | 5'-TCAGCTAACATCTCTGGGAATTCA-3' |

---

### 5.2.8 バイオインフォマティクス解析

ArrayExpress データベース E-MTAB-7685 に掲載されている Panasyuk lab の肝臓特異的 Vps15 ノックアウトの肝臓におけるマイクロアレイ解析のデータ (Iershov et al., 2019)、および肝臓特異的ノックアウトマウスの GR におけるマイクロアレイ解析のデータ (He et al., 2015) を用いた。両データセットのオーバーラップを作成するために、すべての有意に変化した遺伝子 (フィルタリングされた fold change 1.2) の遺伝子リストを使用した。また、Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) V6.8 を用いて、共起する遺伝子 (upregulated or downregulated) の GO 解析を行った。GO 用語解析では、生物学的プロセスのカテゴリーを用いてプロットした。

### 5.2.9 統計学的解析

図表のデータは全て平均値  $\pm$  標準誤差 (standard error of the mean: SEM) で表記した。二群間の平均の検定には、対応のない Student の  $t$  検定を用いた。 $p$  値が 0.05 未満をもって有意差とした。統計解析にはエクセル 2019 を用いた。

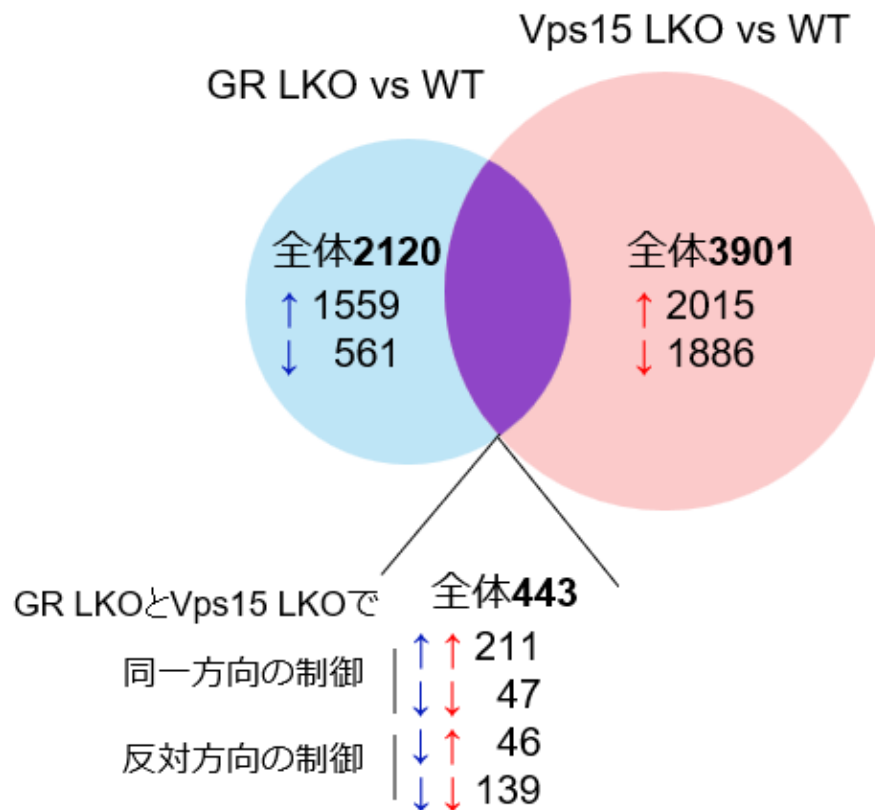
## 5.3 実験結果

### 5.3.1 class 3 PI3K と GR シグナルのオーバーラップ解析

class 3 PI3K は摂食-絶食サイクルにおける代謝適応の中心となる糖代謝と脂質代謝という 2 つの経路を介して、代謝の調整している(Iershov et al., 2019; Nemazanyy et al., 2015)。摂食-絶食サイクルにおける代謝適応にはより複雑な転写反応の調整が関与していると考えられ、肝臓において class 3 PI3K は GR シグナルの調整においてもより広範な役割を果たしている可能性が考えられた。

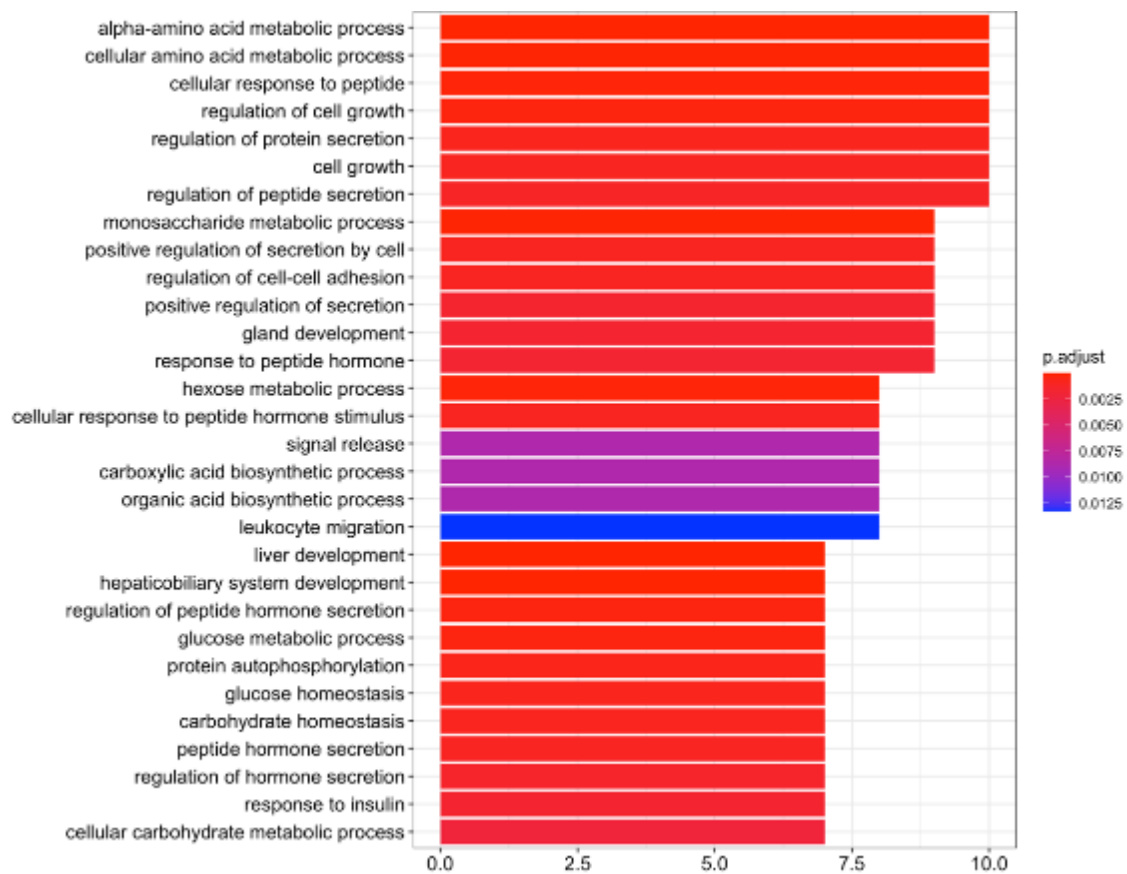
これら 2 つの経路の相互作用を調べるために、肝臓特異的 GR ノックアウトマウス (GR-LKO マウス) (He et al., 2015) と肝臓特異的 Vps15 ノックアウトマウス (Vps15-LKO マウス) (Iershov et al., 2019) の肝臓組織のマイクロアレイ結果を比較解析した。Vps15-LKO マウスでは 3901 遺伝子、GR-LKO マウスでは 2120 遺伝子の転写レベルがそれぞれ 20% 以上変化しており、443 遺伝子は 2 つのデータセットで共に発現がオーバーラップしていた (Figure 1)。2 セット間で発現がオーバーラップしていた遺伝子は、Vps15-LKO マウスでは全遺伝子の 11% (443/3901) にすぎなかったが、GR-LKO マウスでは全遺伝子の 21% (443/2120) とより重要な割合を占めていた (Figure 1)。この結果は、class 3 PI3K が GR 発現を制御する上流経路である可能性を示唆していた。これら 443 の共有遺伝子のうち、139 遺伝子 (31%) が Vps15-LKO マウス、GR-LKO マウスで共に有意に減少し、211 遺伝子 (48%) が Vps15-LKO マウス、GR-LKO マウスで共に有意に増加していた。

続いて Vps15-LKO マウス、GR-LKO マウスで共に発現が低下あるいは増加した遺伝子の Gene Ontology (GO) パスウェイ解析を行った。生物学的プロセス解析では Vps15-LKO マウス、GR-LKO マウスで共に発現が低下していたのは、デキサメタゾンへの反応、アミノ酸とグルコースの代謝、そしてより一般的な肝臓と肝胆膵臓系の発達に関連するプロセスだった (Figure 2)。Vps15-LKO マウス、GR-LKO マウスで共に発現が増加していたのは、免疫細胞 (白血球、好中球、T 細胞、単核細胞) の活性化、移動、増殖のプロセスだった (Figure 3)。



**Figure 1.** Vps15-LKO マウス、GR-LKO マウスの肝臓での発現遺伝子のオーバーラップ

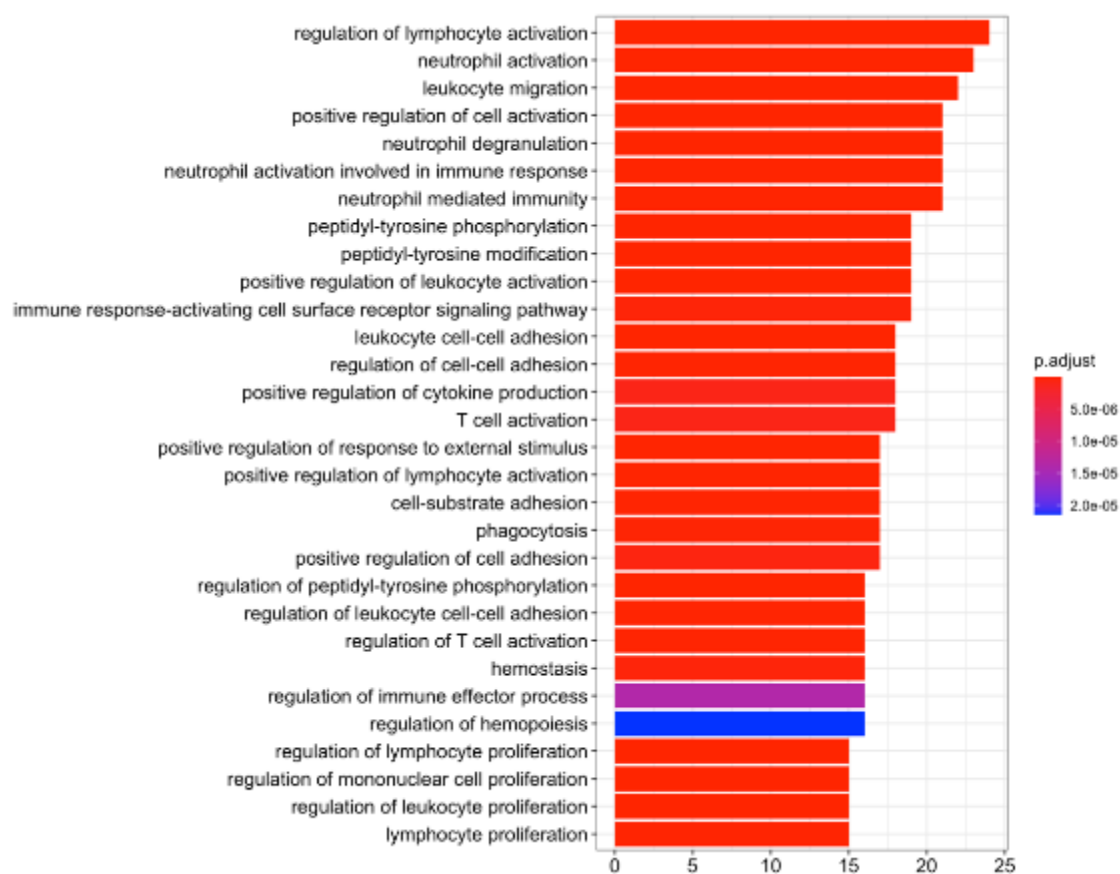
Vps15-LKO マウスの肝臓で対照マウスと比較して転写が 1.2 倍以上増加あるいは減少している遺伝子数 (ピンク色)、GR-LKO マウスの肝臓で対照マウスと比較して転写が 1.2 倍以上増加あるいは減少している遺伝子数 (水色)、Vps15-LKO マウスの肝臓と GR-LKO マウスの肝臓でともに増加あるいは減少している遺伝子数 (紫色)を示す。↑矢印は増加している遺伝子、↓矢印は低下している遺伝子を示す。



**Figure 2.** Vps15-LKO マウスの肝臓と GR-LKO マウスの肝臓でともに減少している遺伝子の生物学的プロセス解析

GO パスウェイ解析結果を示す。Vps15-LKO マウスと GR-LKO マウスの肝臓で対照マウスと比較して共に転写が 20%以上減少している遺伝子を生物学的プロセスで解析した。

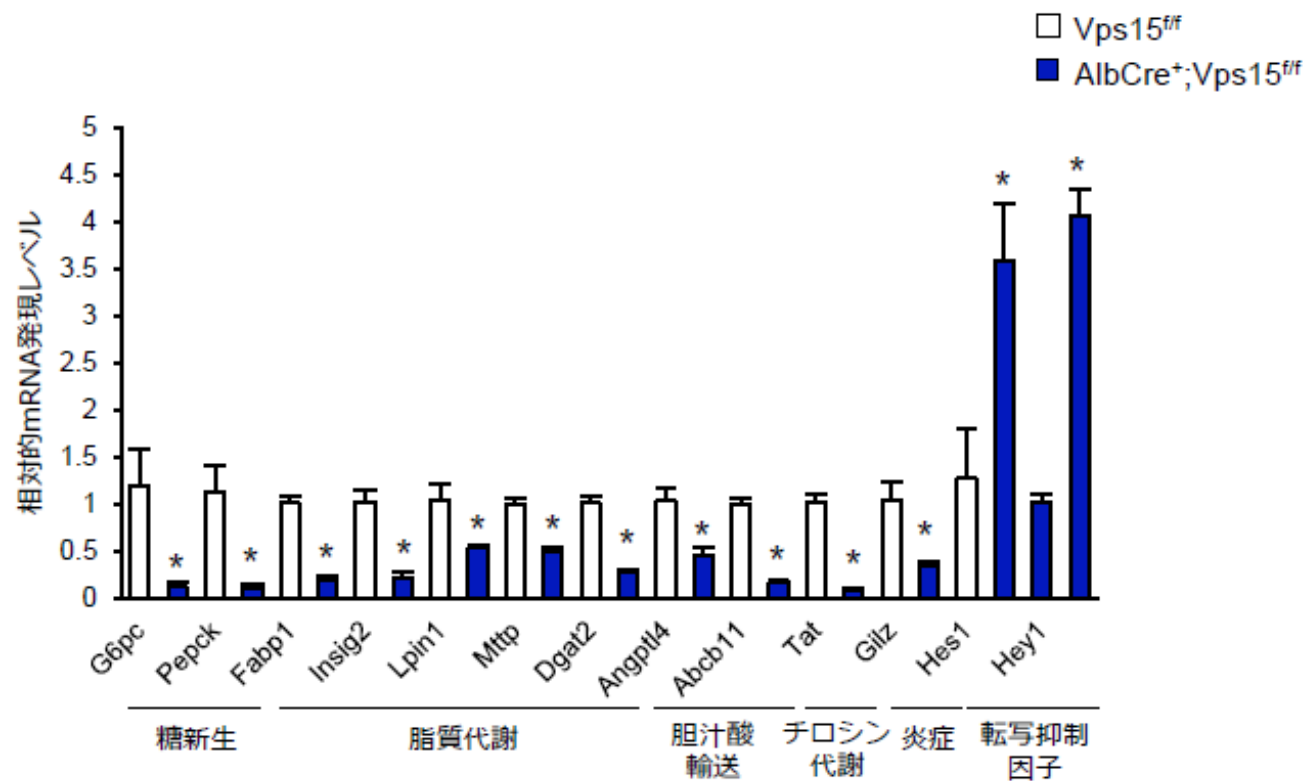




**Figure 3.** Vps15-LKO マウスの肝臓と GR-LKO マウスの肝臓でともに増加している遺伝子の生物学的プロセス解析  
GO パスウェイ解析結果を示す。Vps15-LKO マウスと GR-LKO マウスの肝臓で対照マウスと比較して共に転写が 20%以上増加している遺伝子を生物学的プロセスで解析した。

### 5.3.2 肝臓特異的 Vps15 ノックアウトマウスの肝臓における GR 標的遺伝子

Vps15-LKO マウスの肝臓における定量的リアルタイム PCR 法による解析により、肝臓における class 3 PI3K の不活性化に伴い GR 活性化シグナルが阻害されるという Figure1 の結果が裏付けられた (Figure 4)。Vps15-LKO マウスの肝臓では、GR $\alpha$  の標的遺伝子である、糖新生 (*G6pc*、*Pepck*)、脂質代謝 (*Fabp1*、*Insig2*、*Lpin1*、*Mttp*、*Dgat2*)、胆汁酸輸送 (*Angptl4*、*Abcb11*)、チロシン代謝 (*Tat*)、炎症 (*Gilz*) の転写レベルが有意に低下していた。さらに、Vps15-LKO マウスの肝臓では、Hes1 と Hey1 という転写抑制因子の転写量が有意に増加しており、GR $\alpha$  がこれらの因子の転写を抑制していることが示唆された (Figure 4)。これらの結果から、Vps15-LKO マウスの肝臓では、GR $\alpha$  の転写活性が抑制されていることが示唆された。



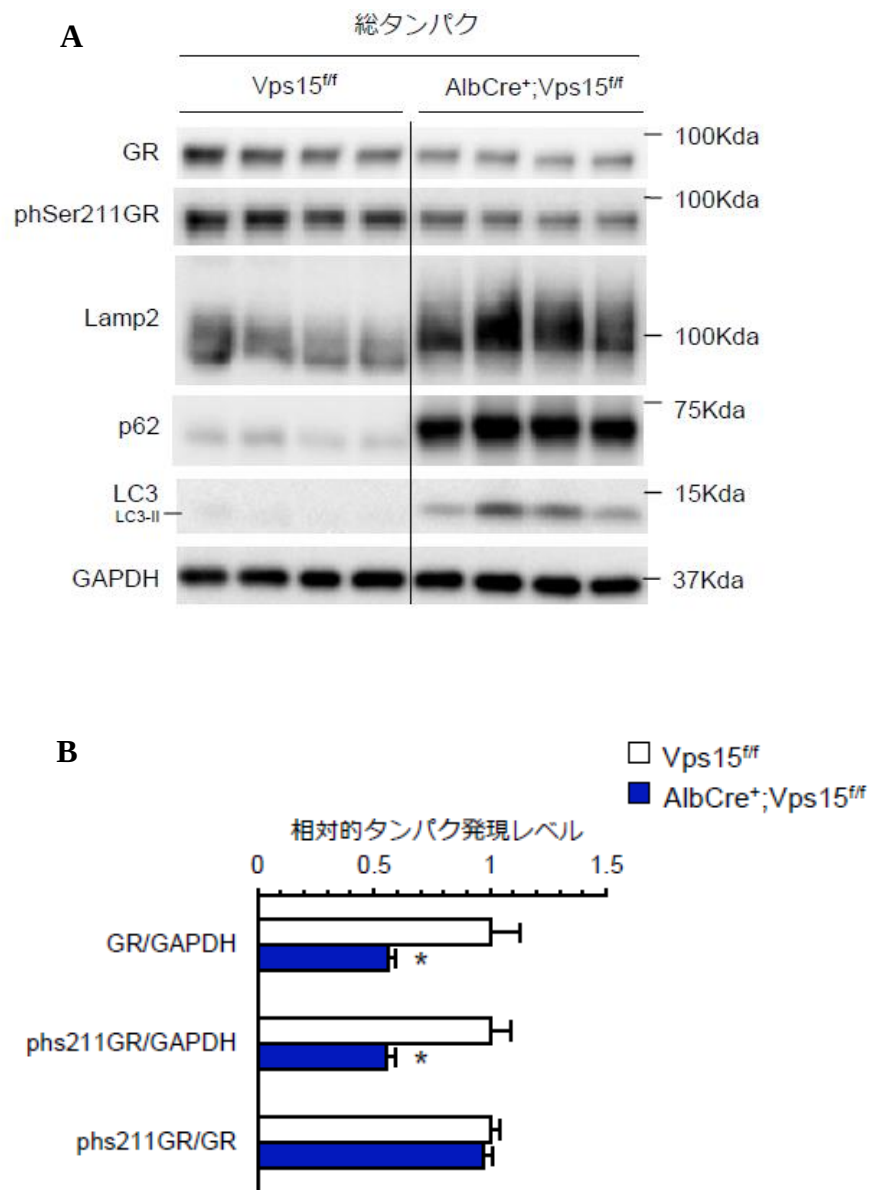
**Figure 4.** Vps15-LKO マウスの肝臓における GR 標的遺伝子

定量的リアルタイム PCR 法により 6 週齢マウスの肝臓の遺伝子発現を評価した。

対照マウス (Vps15<sup>fl/f</sup>) (白色) (n=4)、Vps15-LKO マウス (AlbCre<sup>+</sup>; Vps15<sup>fl/f</sup>) (紫色) (n=4)、(平均 ± SEM)、 $P < 0.05$  \*: vs Vps15<sup>fl/f</sup> マウス

### 5.3.3 肝臓特異的 Vps15 ノックアウトマウスの肝臓における GR タンパク、GR アイソフォーム

GR タンパクの発現が class 3 PI3K の不活性化による影響を受けるかを調べた。はじめにイムノブロットにより、リソソーム膜タンパク質 Lamp2、オートファジー受容体 p62、オートファゴソーム関連タンパク質 LC3-II の蓄積を確認し、Vps15 ノックアウトによるオートファジーを介したリソソーム分解阻害を証明した (Figure 5)。Vps15-LKO マウスの肝臓における GR タンパク発現を調べるためイムノブロットを行った。定量的リアルタイム PCR 法における GR $\alpha$  の標的遺伝子の転写活性低下と同様に、Vps15-LKO マウスの肝臓において GR タンパク発現の有意な低下を認めた (Figure 5)。



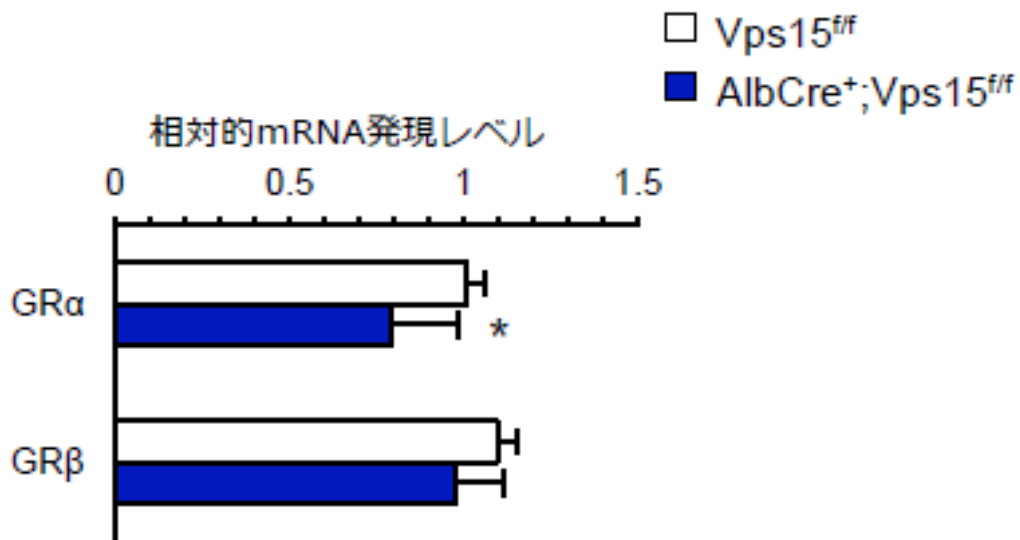
**Figure 5.** GR、リン酸化 GR、オートファジー関連タンパク

(A)イムノブロット法により 6 週齢マウスの肝臓の GR、リン酸化 GR (phSer211GR)、オートファジー関連タンパク (Lamp2、p62、LC3)を評価した。

(B)上記 GR、リン酸化 GR (phSer211GR)発現を glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)を用いて標準化し比較した。

対照マウス (Vps15<sup>f/f</sup>) (白色) (n=4)、Vps15-LKO マウス (AlbCre<sup>+</sup>; Vps15<sup>f/f</sup>) (紫色) (n=4)、(平均 ± SEM)、 $P < 0.05$  \*: vs Vps15<sup>f/f</sup> マウス

今回の解析で使用した抗 GR 抗体は、GR $\alpha$  および GR $\beta$  の両方のアイソフォームを認識する。GR の活性は、スプライシングによる活性型 GR $\alpha$  と抑制型 GR $\beta$  の共発現によりバランスがとられている。GR $\beta$  は GC と結合せず GR $\alpha$  の転写活性を阻害するほか、GR $\beta$  は GC と結合しないことが報告されている (Hinds et al., 2010)。このことから定量的リアルタイム PCR 法により、Vps15-LKO マウスにおける GR $\alpha$  および GR $\beta$  の発現を解析した。Vps15-LKO マウスにおいては、GR $\alpha$  発現が有意に低下していたが GR $\beta$  発現は対照マウスと差がなく、GR $\beta$  の過剰発現は認めなかった(Figure 6)。この結果から、Vps15-LKO マウスにおける GR 転写活性の低下は抑制型 GR $\beta$  の増加によらないことが示された。



**Figure 6.** GR アイソフォーム

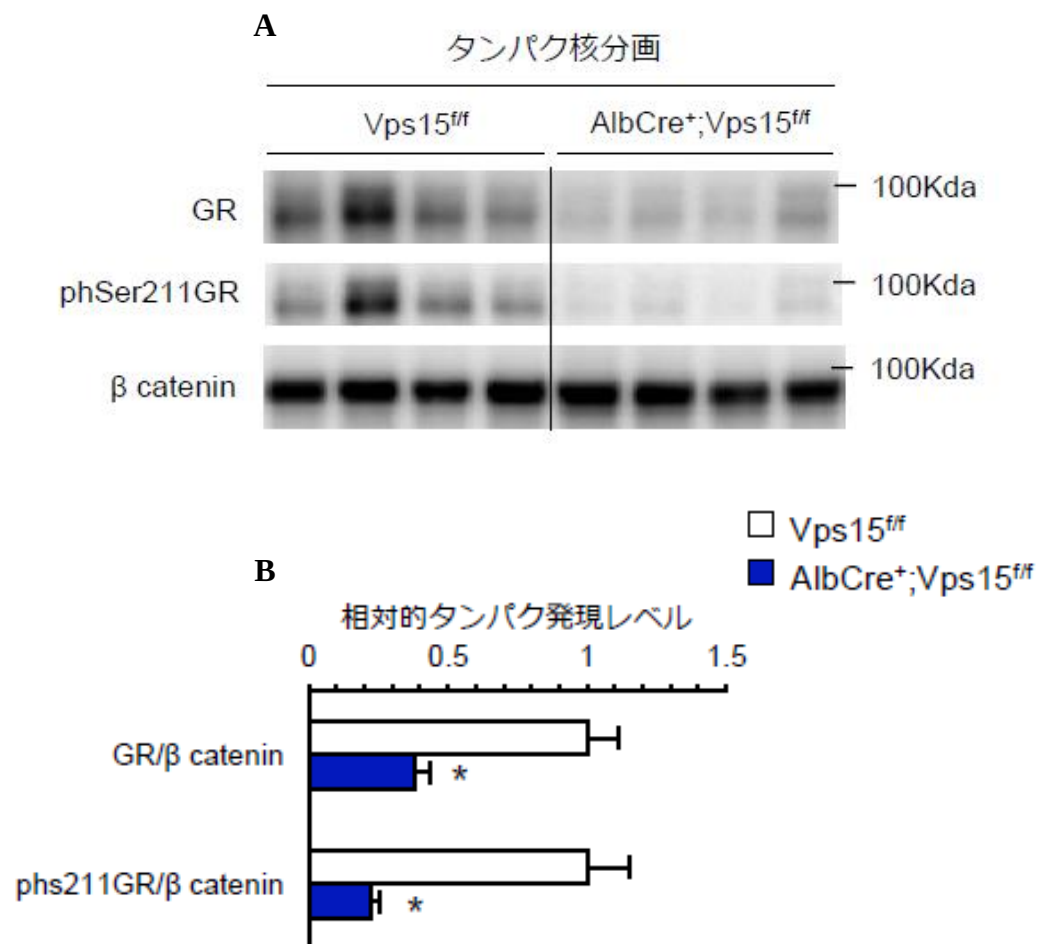
定量的リアルタイム PCR 法により 6 週齢マウスの肝臓の GR の 2 つのアイソフォーム (GRα、GRβ) の遺伝子発現を評価した。

対照マウス (Vps15<sup>f/f</sup>) (白色) (n=8)、Vps15-LKO マウス (AlbCre<sup>+</sup>; Vps15<sup>f/f</sup>) (紫色) (n=9)、(平均 ± SEM)、 $P < 0.05$  \*: vs Vps15<sup>f/f</sup> マウス

次に、転写後翻訳の一つである GR のリン酸化について解析した。Ser211 リン酸化 GR は GR 転写活性に重要な役割を有することから、本検討では Ser211 リン酸化 GR の発現量を解析した(Chen et al., 2008)。Vps15-LKO マウスの肝臓では、GR の総タンパク量の減少と同様に、Ser211 リン酸化 GR タンパク量が有意に減少していた (Figure 5)。さらに、Ser211 リン酸化 GR タンパク量を総 GR タンパク量で除して定量したところ、対照マウスと Vps15-LKO マウスとで同程度の比率を示し、Vps15-LKO マウスでは GR タンパクの代償的なリン酸化亢進が見られないことが確認された (Figure 5)。

GR は細胞内で GC と結合した後に、核内に移行して核内受容体に結合し転写活性を示すことから、Vps15-LKO マウスおよび対照マウスの肝臓組織の核分画中の GR タンパクおよび Ser211 リン酸化 GR タンパクの発現を解析した。その結果、Vps15-LKO マウスの肝組織の核内画分では、総タンパクでの結果と同様に Ser211 リン酸化 GR タンパクが著しく減少していることが確認された (Figure 7)。





**Figure 7.** タンパク核分画中の GR、リン酸化 GR

(A)イムノブロット法により 6 週齢マウスの肝臓の GR、リン酸化 GR (phSer211GR)を評価した。(B)上記 GR、リン酸化 GR (phSer211GR)発現を β catenin を用いて標準化した。

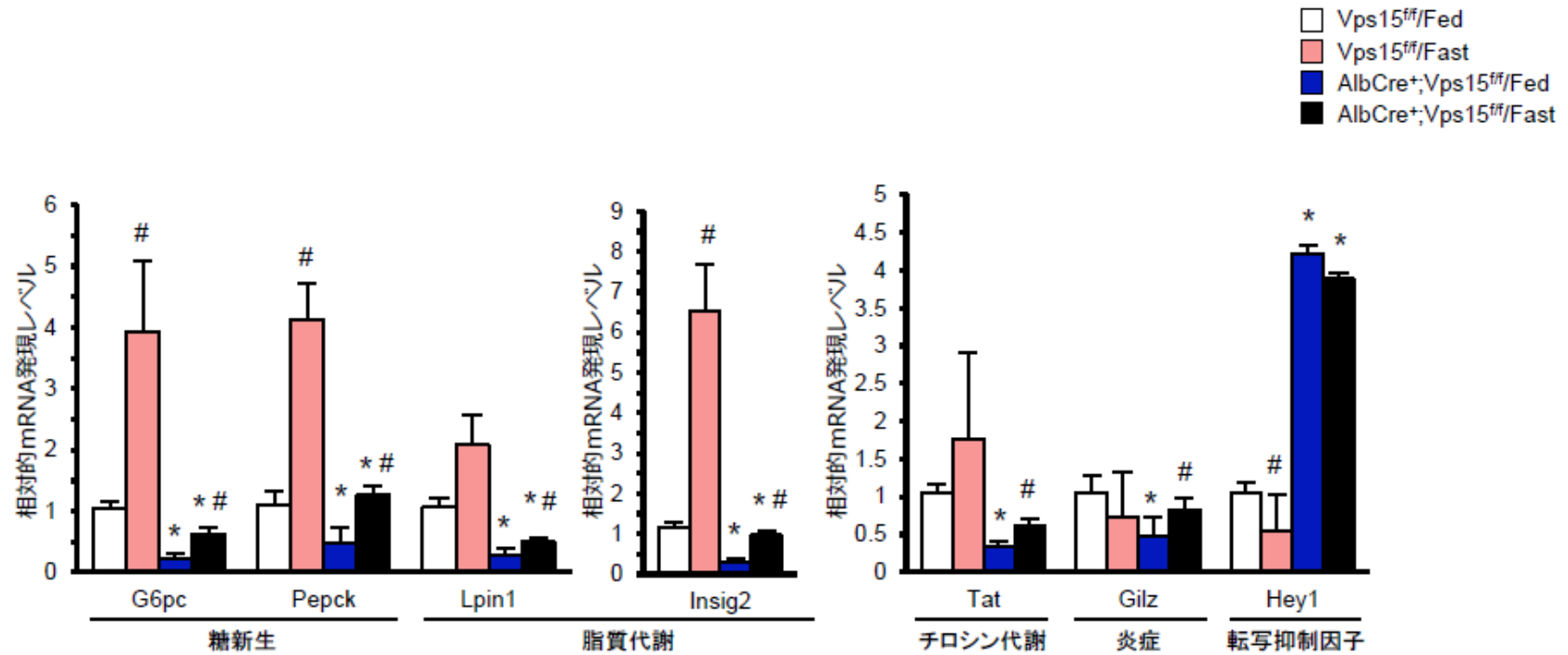
対照マウス (Vps15<sup>f/f</sup>) (白色) (n=4)、Vps15-LKO マウス (AlbCre<sup>+</sup>; Vps15<sup>f/f</sup>) (紫色) (n=4)、(平均 ± SEM)、P < 0.05 \*: vs Vps15<sup>f/f</sup> マウス

### 5.3.4 肝臓特異的 Vps15 ノックアウトマウスの肝臓における絶食およびデキサメタゾン投与に対する GR シグナルの影響

Vps15-LKO マウスにおいて急性の生理的刺激や合成 GR アゴニストによる薬理作用で GR シグナルが再活性化されるかを調べた。絶食は、内因性 GR シグナルを活性化する最も強い生理的刺激である。絶食によって Vps15-LKO マウスの肝臓で GR シグナルが再活性化されるかどうかを調べるために、24 時間の絶食後、Vps15-LKO マウスと対照マウスの肝臓における GR シグナルの発現を比較して分析した。24 時間の絶食後に対照マウスの肝臓では GR の標的遺伝子レベルが大きく変化した、Vps15-LKO マウスの肝臓ではこれらの GR 標的遺伝子の発現が有意に低下しており (Hey1 は GR 転写抑制遺伝子のため、Hey1 の上昇は GR による抑制作用の低下が示唆された)、対照マウスで観察されたレベルまでは回復しなかった (Figure 8)。

強力な GR アゴニストであるデキサメタゾン (Dexamethasone: DEX) を急性投与すると通常は GR 活性が回復し GR 標的遺伝子発現が亢進するが、Vps15-LKO マウスの肝臓で GR の活性が回復するかを調べた。定量的リアルタイム PCR 法を用いて転写産物を解析したところ、対照マウスの肝臓では、ほとんどの GR 標的遺伝子 (*Tat*、*Gilz*、*Lpin1*、*Insig2*、*Dgat2*、*Hey1*) が短期間のデキサメタゾンに反応したが、糖新生遺伝子 (*G6pc* および *Pepck*) のレベルは今回のプロトコールでは変化しなかった (Figure 9)。また一部のターゲットはデキサメタゾンに全く感受性を示さなかった (*Tat*、*Dgat2*) (Figure 9)。

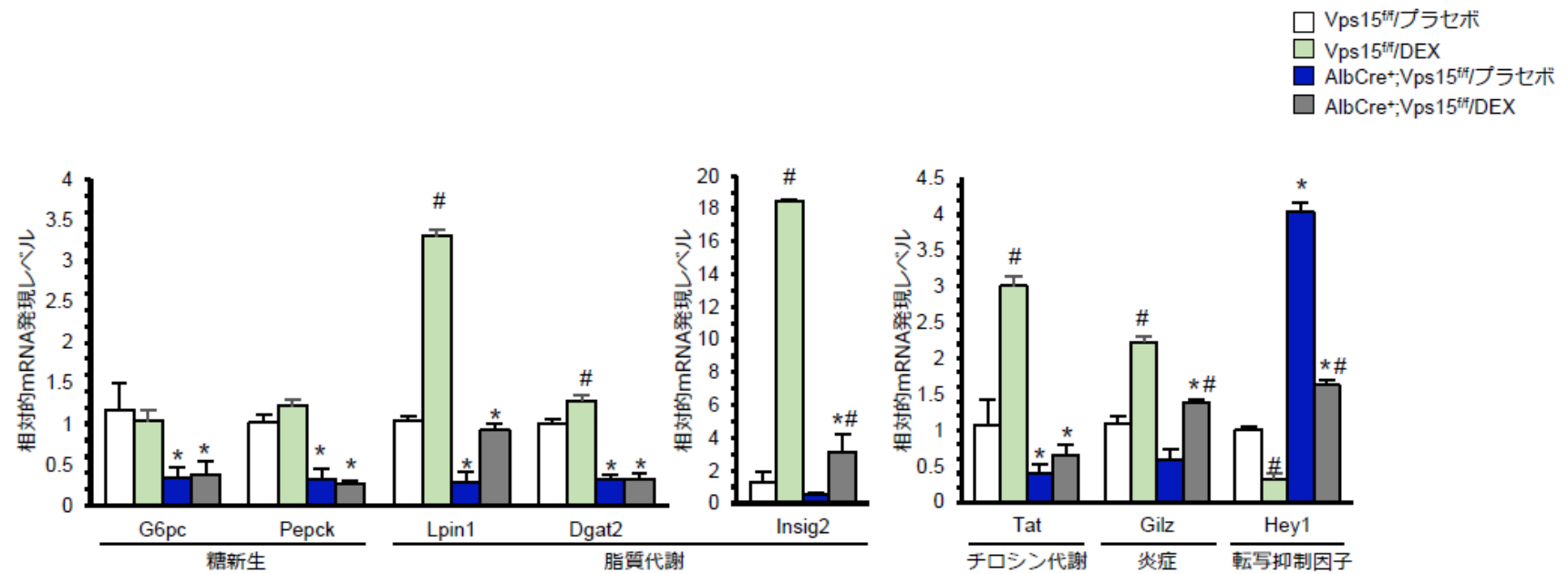
Vps15-LKO マウスに上記プロトコールでデキサメタゾンを投与した際の核内 Ser211 リン酸化 GR タンパクを評価した。Vps15-LKO マウスの肝臓では対照マウスと異なり、デキサメタゾン投与による GR の Ser211 リン酸化は抑制されていた (Figure 10)。



**Figure 8.** 24 時間絶食後の GR 標的遺伝子

定量的リアルタイム PCR 法により 6 週齢マウスの肝臓の遺伝子発現を評価した。

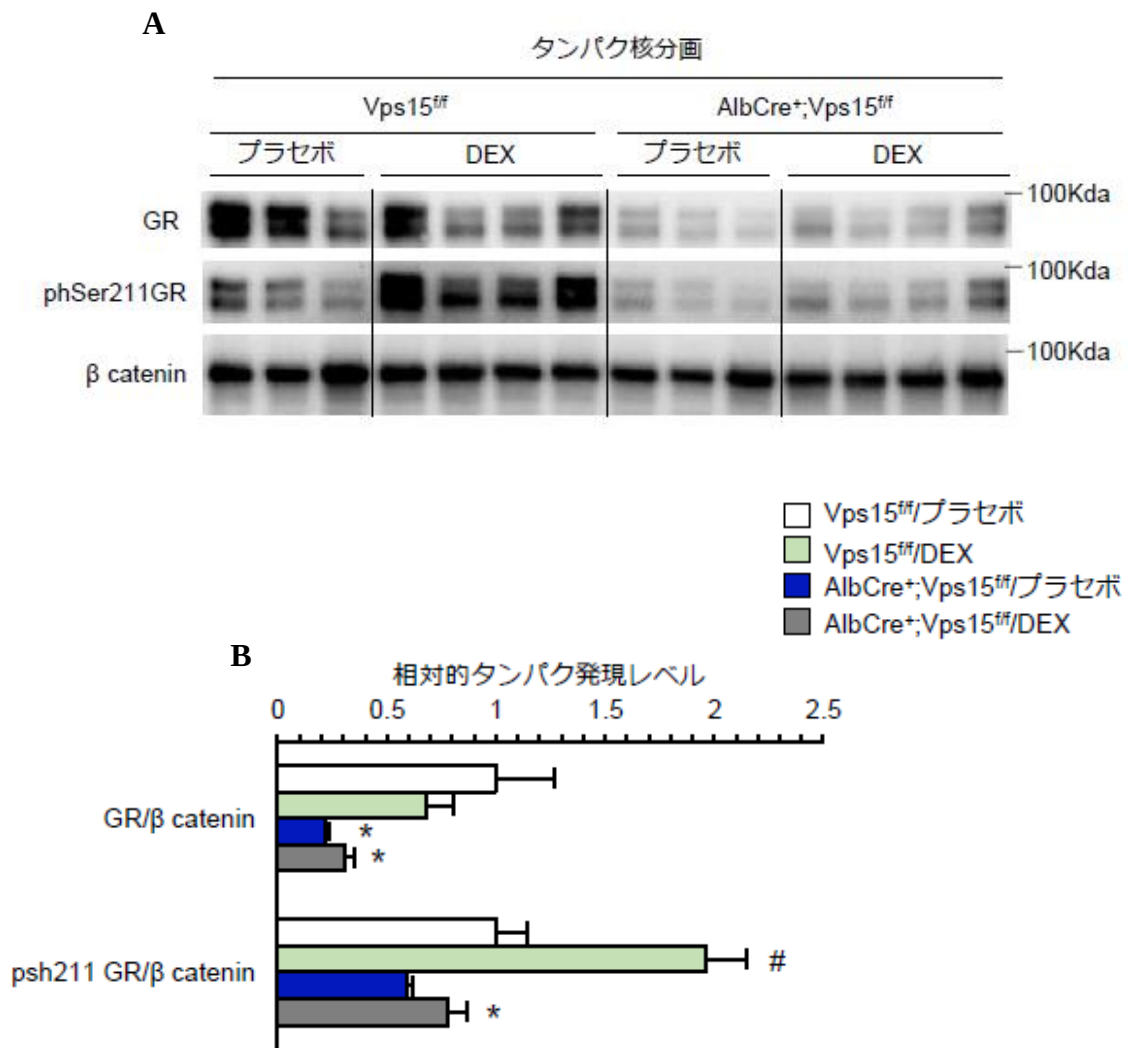
通常摂食した対照マウス (Vps15<sup>f/f</sup>/Fed) (白色) (n=6)、24 時間絶食した対照マウス (Vps15<sup>f/f</sup>/Fast) (オレンジ色) (n=6)、通常摂食した Vps15-LKO マウス (AlbCre<sup>+</sup>; Vps15<sup>f/f</sup>/Fed) (紫色) (n=4)、24 時間絶食した Vps15-LKO マウス (AlbCre<sup>+</sup>; Vps15<sup>f/f</sup>/Fed) (黒色) (n=5)、(平均 ± SEM)、 $P < 0.05$  \*: vs Vps15<sup>f/f</sup> マウス、#: vs 通常摂食したマウス



**Figure 9.** Dex 投与後の GR 標的遺伝子

定量的リアルタイム PCR 法により 6 週齢マウスの肝臓の遺伝子発現を評価した。

placebo を投与した対照マウス (Vps15<sup>f/f</sup>/placebo) (白色) (n=3)、DEX を投与した対照マウス (Vps15<sup>f/f</sup>/DEX) (緑色) (n=4)、placebo を投与した Vps15-LKO マウス (AlbCre<sup>+</sup>; Vps15<sup>f/f</sup>/placebo) (紫色) (n=3)、DEX を投与した Vps15-LKO マウス (AlbCre<sup>+</sup>; Vps15<sup>f/f</sup>/Dex) (灰色) (n=4) 、(平均 ± SEM)、 $P < 0.05$  \*: vs Vps15<sup>f/f</sup> マウス、#: vs placebo を投与したマウス



**Figure 10.** Dex 投与後、タンパク核分画中の GR、リン酸化 GR (A)イムノブロット法により 6 週齢マウスの肝臓の GR、リン酸化 GR (phSer211GR)を評価した。(B)上記 GR、リン酸化 GR (phSer211GR)発現を β catenin を用いて標準化した。

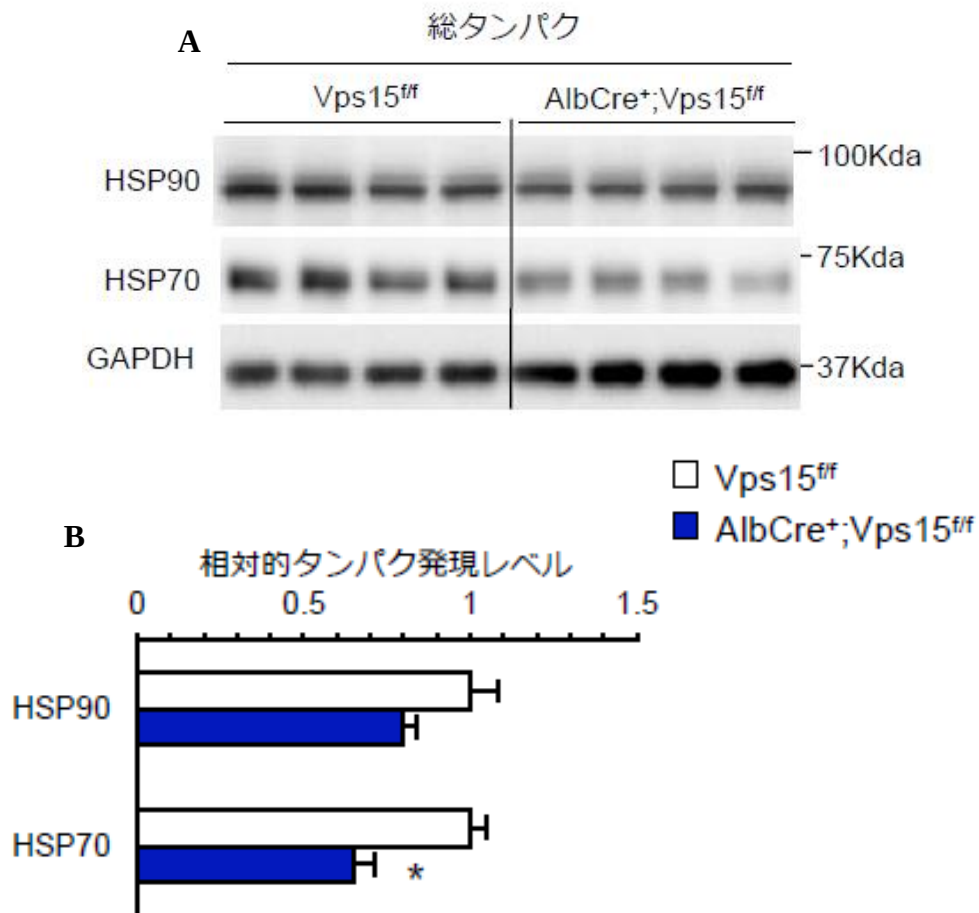
placebo を投与した対照マウス (Vps15<sup>f/f</sup>/placebo) (白色) (n=3)、DEX を投与した対照マウス (Vps15<sup>f/f</sup>/DEX) (緑色) (n=4)、placebo を投与した Vps15-LKO マウス (AlbCre<sup>+</sup>; Vps15<sup>f/f</sup>/placebo) (紫色) (n=3)、DEX を投与した Vps15-LKO マウス (AlbCre<sup>+</sup>; Vps15<sup>f/f</sup>/DEX) (灰色) (n=4)、(平均 ± SEM)、 $P < 0.05$  \*: vs Vps15<sup>f/f</sup> マウス

### 5.3.5 肝臓特異的 Vps15 ノックアウトマウスの肝臓における核内 GR co-factor 発現の検討

GR はリガンドが結合する前は細胞質内で Hsp 90、Hsp70 といったシャペロンと複合体を形成し不活性な状態で存在している。GR にリガンドが結合するとシャペロン構造が変化し、GR は核内に移動し転写が開始される(Vandevyver et al., 2012)。Vps15-LKO マウスの肝臓における GR 転写発現の阻害にシャペロン発現が関与している可能性を検証した。

イムノブロット解析では、対照マウスと比較して Vps15-LKO マウスの肝臓の総タンパクにおいて Hsp90 発現は低下傾向を示し、Hsp70 の発現は著しく低下していた (Figure 11)。タンパク核分画の解析では Vps15-LKO マウスの肝臓において、核内の Hsp90 の発現が対照マウスに比べて有意に増加していた (Figure 12)。

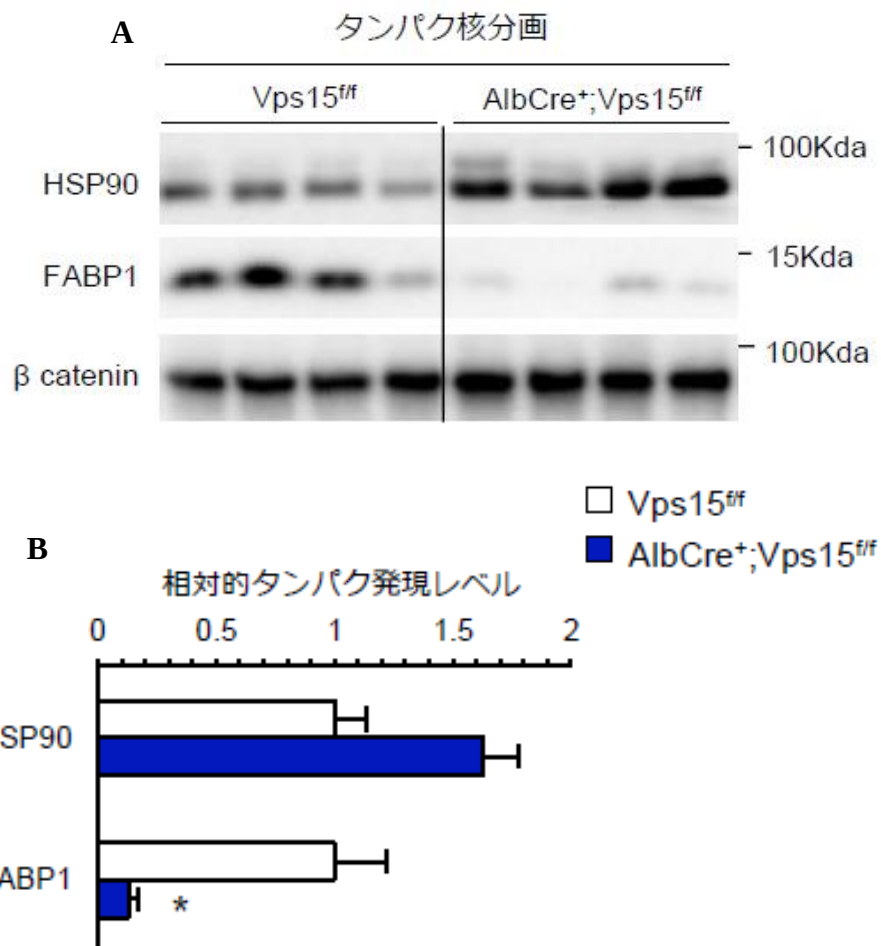
核内の Fatty Acid Binding Protein 1 (Fabp1)タンパク質が GR の co-activator として働いていることが提唱されているため、Vps15-LKO マウスの核内 Fabp1 発現を評価した。Vps15-LKO マウスの肝臓では、核内の Fabp1 レベルが顕著に低下していた (Figure 12)。これらの発現解析結果から Vps15-LKO マウスにおいて Hsp90、Hsp70、Fabp1 が GR のシャペロン、co-activator として GR 転写発現を調整している可能性を示唆していた。



**Figure 11.** 総タンパク中の HSP90、HSP70

(A)イムノブロット法により 6 週齢マウスの肝臓の総タンパク中の HSP90、HSP70 を評価した。(B)上記 HSP90、HSP70 発現を GAPDH を用いて標準化した。

対照マウス (Vps15<sup>f/f</sup>) (白色) (n=4)、Vps15-LKO マウス (AlbCre<sup>+</sup>; Vps15<sup>f/f</sup>) (紫色) (n=4)、(平均 ± SEM)、 $P < 0.05$  \*: vs Vps15<sup>f/f</sup> マウス



**Figure 12.** タンパク核分画中の HSP90、FABP1

(A)イムノブロット法により 6 週齢マウスの肝臓のタンパク核分画中の HSP90、FABP1 を評価した。(B)上記 HSP90、FABP1 発現を  $\beta$  catenin を用いて標準化した。

対照マウス ( $Vps15^{f/f}$ ) (白色) (n=4)、Vps15-LKO マウス ( $AlbCre^{+}; Vps15^{f/f}$ ) (紫色) (n=4)、(平均  $\pm$  SEM)、 $P < 0.05$  \*: vs  $Vps15^{f/f}$  マウス



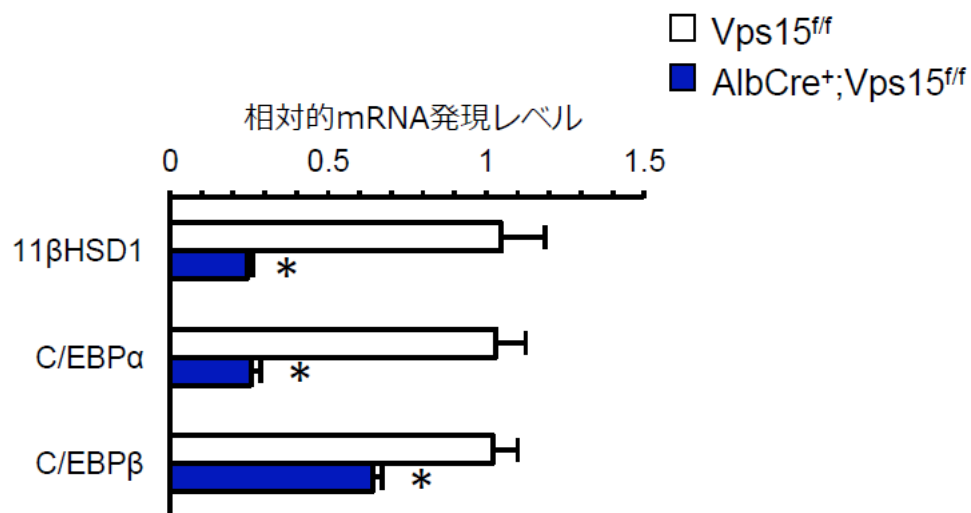
### 5.3.6 肝臓特異的 Vps15 ノックアウトマウスの肝臓における GC 代謝の評価

Vps15-LKO マウスにおける GR のリガンドレベルおよび活性型 GR リガンド量を調整する因子の解析を行なった。

Vps15-LKO マウスでは、活性型 GR リガンドであるコルチコステロン合成を担う 11 $\beta$ HSD1 の転写量が有意に減少していた (Figure 13)。次に、11 $\beta$ HSD1 の転写は CCAAT/enhancer binding proteins  $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ ) と CCAAT/enhancer binding proteins  $\beta$  (C/EBP $\beta$ ) により制御されているため (Williams et al., 2000)、C/EBP $\alpha$  と C/EBP $\beta$  発現量を評価した。11 $\beta$ HSD1 と同様に Vps15-LKO マウスの肝臓において C/EBP $\alpha$  と C/EBP $\beta$  の転写レベルが抑制されていた (Figure 13)。

LC-MS/MS 法で、Vps15-LKO マウスの肝臓におけるコルチコステロン値を評価した。Vps15-LKO マウスの肝臓では 11 $\beta$ HSD1 の転写レベルと同様に、コルチコステロン値が有意に低下していた (Figure 14)。

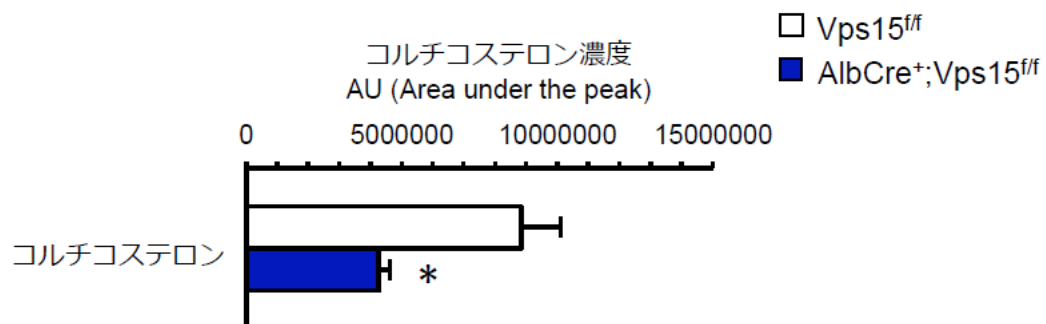
これらの結果から Vps15-LKO マウスでは GR の転写活性の阻害だけでなく、肝臓でのリガンドの代謝にも異常が生じることがわかった。



**Figure 13.** 活性型 GC レベルを調整する遺伝子

定量的リアルタイム PCR 法により 6 週齢マウスの肝臓の 11βHSD1、C/EBPα、C/EBPβ 遺伝子発現を評価した。

対照マウス (Vps15<sup>f/f</sup>) (白色) (n=6)、Vps15-LKO マウス (AlbCre<sup>+</sup>; Vps15<sup>f/f</sup>) (紫色) (n=4)、(平均 ± SEM)、*P* < 0.05 \*: vs Vps15<sup>f/f</sup> マウス



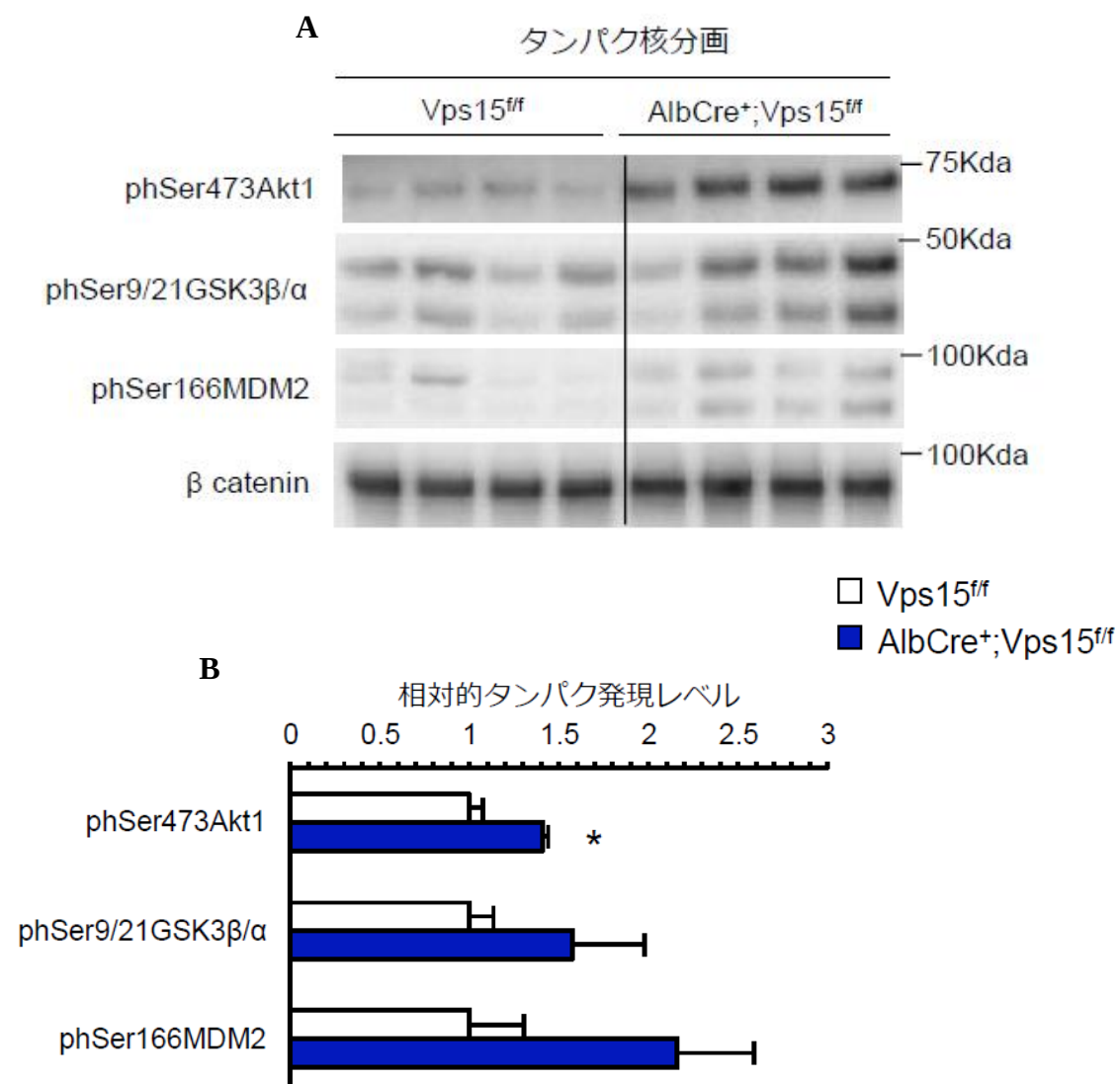
**Figure 14.** 肝臓内コルチコステロン濃度

LC-MS/MS 法により 6 週齢マウスの肝臓内コルチコステロン濃度を測定した。対照マウス (Vps15<sup>f/f</sup>) (白色) (n=5)、Vps15-LKO マウス (AlbCre<sup>+</sup>; Vps15<sup>f/f</sup>) (紫色) (n=7)、(平均 ± SEM)、 $P < 0.05$  \*: vs Vps15<sup>f/f</sup> マウス

### 5.3.7 肝臓特異的 Vps15 ノックアウトマウスの肝臓における核内 Akt シグナル発現の評価

class 3 PI3K が阻害されると、エンドソームによるインスリン受容体 (IR) の輸送およびリソソームによる IR の分解が阻害され、インスリンによる Akt シグナルが亢進する(Nemazanyy et al., 2015)。これまでに Akt シグナルの下流にある GSK3 $\beta$ / $\alpha$  および murine double minute 2 (MDM2) がそれぞれリン酸化、ポリユビキチン化を介して GR 発現を制御しているとの報告がある(Patt et al., 2020)。Vps15-LKO マウスにおいて、GR 転写活性が阻害されているメカニズムに Akt シグナルによる影響があるかを評価した。

Vps15-LKO マウスの肝臓の総タンパク中での Akt 発現は亢進することは既に報告されているが(Nemazanyy et al., 2015)、Vps15-LKO マウスの肝臓タンパクの核分画でも同様に phSer473 Akt1 発現が有意に亢進していた (Figure 15)。Vps15-LKO マウスでは phSer9/21 GSK3 $\beta$ / $\alpha$  および phSer166 MDM2 の発現の亢進傾向も認めた (Figure 15)。



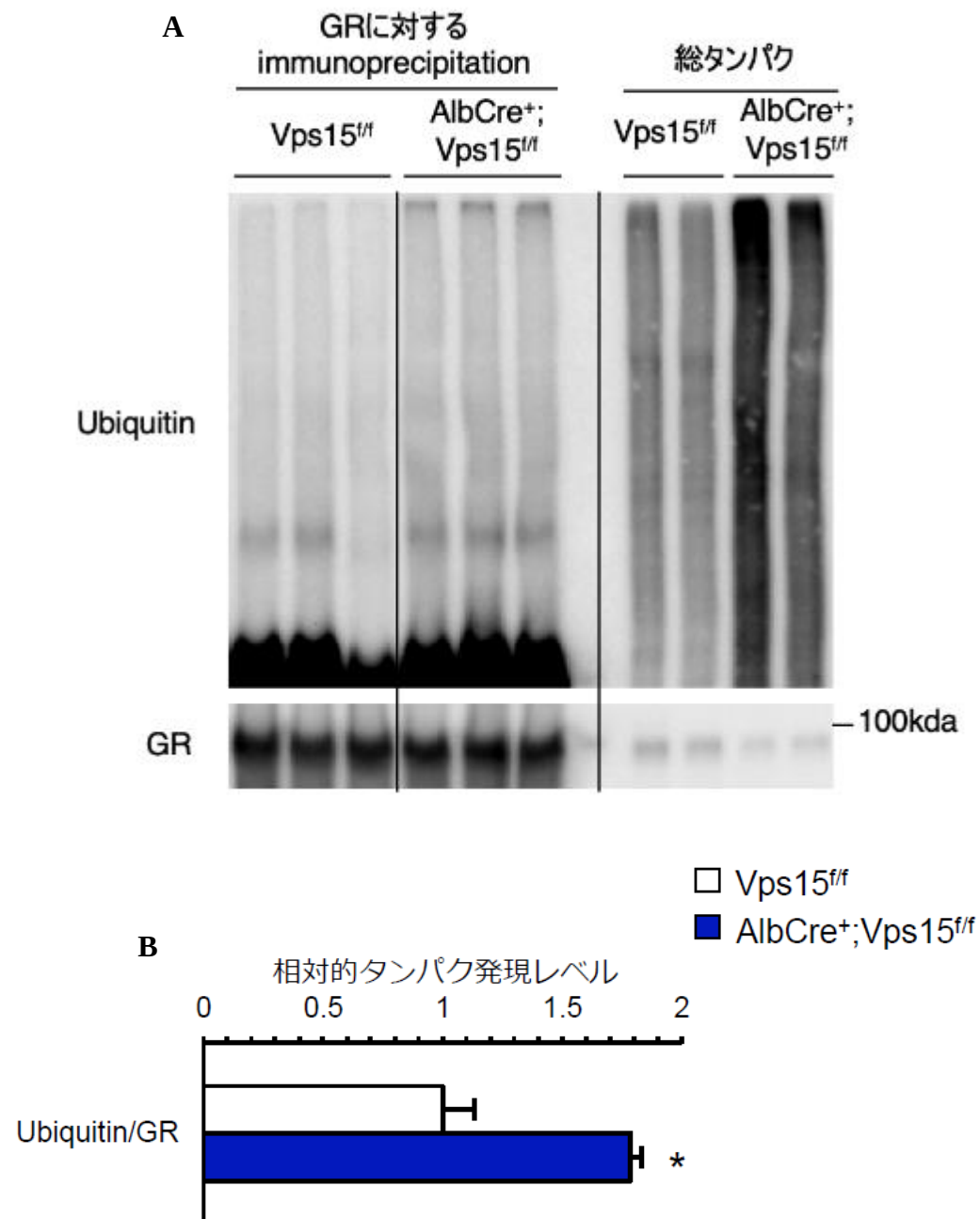
**Figure 15.** タンパク核分画中の Akt シグナル

(A)イムノブロット法により 6 週齢マウスの肝臓の phSer473Akt1、phSer9/21GSK3β/α、phSer166MDM2 を評価した。(B)上記 phSer473Akt1、phSer9/21GSK3β/α、phSer166MDM2 発現を β catenin を用いて標準化した。対照マウス (Vps15<sup>f/f</sup>) (白色) (n=4)、Vps15-LKO マウス (AlbCre<sup>+</sup>; Vps15<sup>f/f</sup>) (紫色) (n=4)、(平均 ± SEM)、 $P < 0.05$  \*: vs Vps15<sup>f/f</sup> マウス

### 5.3.8 肝臓特異的 Vps15 ノックアウトマウスの肝臓における GR ポリユビキチン化の評価

Vps15-LKO マウスの肝臓における GR タンパクレベルの低下が、そのタンパク質のターンオーバーの増加の結果である可能性を考えた。GR タンパク質のターンオーバーは、ポリユビキチン化とそれに続くプロテアソームによる分解によって制御されているため、Vps15-LKO マウスの肝臓での GR のユビキチン化を評価した。

免疫沈降法 (Immunoprecipitation: IP) で Vps15-LKO マウスの肝臓サンプルに GR 抗体を結合させ、抗ユビキチン抗体を用いてイムノブロッティングを行った。Vps15-LKO マウスの肝臓では GR のポリユビキチン化が対照マウスに比べて有意に増加していた (Figure 16)。この結果は、Vps15-LKO マウスの肝臓で GR のポリユビキチン化促進により GR タンパクの分解促進と GR 発現低下をきたしている可能性を示唆していた。



**Figure 16.** Immunoprecipitation によるユビキチン化 GR の評価

(A)Immunoprecipitation により 6 週齢マウスの肝臓で GR 抗体に結合したユビキチン発現をイムノブロット法により評価した。(B)上記ユビキチンタンパク発現を GR 発現量から標準化した。

対照マウス (Vps15<sup>f/f</sup>) (白色) (n=3)、Vps15-LKO マウス (AlbCre<sup>+</sup>; Vps15<sup>f/f</sup>) (紫色) (n=3)、(平均 ± SEM)、 $P < 0.05$  \*: vs Vps15<sup>f/f</sup> マウス





## 5.4 考察

本研究では、class 3 PI3K が、GR の上流で作用することにより、絶食に対する生理的反応の調整に幅広い役割を果たしていることが明らかになった。class 3 PI3K の必須制御サブユニットである Vps15 タンパクを肝細胞特異的に欠失させて class 3 PI3K を不活性化すると、生理的な安静時 (非摂食時) に GR の一般的な転写反応が低下していた。Vps15-LKO マウスの肝臓では、GR の活性化リン酸化 (Ser211) と GR タンパク発現の両方が有意に低下していた。さらに Vps15-LKO マウスに DEX を急性投与しても、空腹時の糖代謝および脂質代謝に関わる遺伝子の発現に対する GR による転写反応は回復しなかった。Vps15-LKO マウスにおいて肝臓でのコルチコステロン値および、不活性な GC 前駆体を活性型のコルチコステロンに変換する酵素である 11 $\beta$ HSD1 の発現が低下した。さらに、Vps15-LKO マウスの肝臓では、GR の転写活性を抑制しプロテオソームによる分解を促進することが知られている核内 Akt シグナルが増大していた。このように、Vps15-LKO マウスの肝臓では、リガンドの利用率の低下と Akt シグナルの増加が、GR タンパクのポリユビキチン化の促進と並行して起こっていた。Vps15-LKO マウスの肝臓における GR シグナル発現低下のメカニズムとして、GR のリガンドの低下とプロテオソームによる GR の分解亢進が示された。class 3 PI3K による GR 転写活性の制御が明らかになり、class 3 PI3K は GR 発現制御および GR 転写制御を介して生理的な摂食-絶食サイクルにおける代謝適応に寄与している可能性が考えられた。

11 $\beta$ HSD1 と 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase-2 (11 $\beta$ HSD2) という 2 つの代謝酵素が GC の活性を制御している。ヒトでは 11 $\beta$ HSD1 は、非活性型 GC であるコルチゾンを変換して活性型のコルチゾールに変換する。逆に、コルチゾールの不活性型への変換は 11 $\beta$ HSD2 によって行われる。一方でマウスでは 11 $\beta$ HSD1 は、非活性型 GC である 11-DHC を活性型のコルチコステロンに変換する。逆に、コルチコステロンの不活性型への変換は 11 $\beta$ HSD2 によって行われる。11 $\beta$ HSD2 の発現は、腎臓、大腸、汗腺に限られており、肝臓ではほとんど検出されないことから、11 $\beta$ HSD1 の発現が肝細胞の活性型 GC のレベルをコントロールしている (Seckl and Walker, 2001)。C/EBP $\alpha$  と C/EBP $\beta$  が 11 $\beta$ HSD1 の転写を制御している (Esteves et al., 2012)。C/EBP $\beta$  は、肝臓でゲノムの GR 結合部位に直接結合してクロマチンへの結合性を調節することで GR 転写の活性化と抑制の両方を制御している (Grøntved et al., 2013)。本研究では肝臓特異的 class 3 PI3K ノックアウトマウスの肝臓において 11 $\beta$ HSD-1、および 11 $\beta$ HSD-1 を制御する C/EBP $\alpha$  と C/EBP $\beta$  発現が低下し、肝臓内のコルチコステロン濃度も低下していた。肝

臓特異的 class 3 PI3K ノックアウトマウスにおける GR の活性リガンドの低下は class 3 PI3K による GR シグナル制御のメカニズムの一因であると考えられた。

GR は細胞質ではじめに heat shock protein 70 (Hsp70)、heat shock protein 40 (Hsp40) と結合した後に、Hsp70/ heat shock protein 70 (Hsp90) organizing protein (Hop) と Hsp90 を結合する。ATP 存在下に Hop が GR 複合体から離されると Hsp70、Hsp40 も複合体から離される。その後にイムノフィリンである FK506 binding protein 52 (FKBP52)、FK506 binding protein 51 (FKBP51)、cyclophilin-40 (Cyp-40) と phosphatase 5 (PP5) と結合することで GR が成熟し GC と高いアフィニティで結合することが出来るようになる (Vandevyver et al., 2012)。Hsp90 は、細胞周期に関与する転写因子およびプロテインキナーゼを含む多数の真核生物のシグナル伝達タンパク質を調節する分子シャペロンタンパク質である (Taipale et al., 2010)。肝臓特異的 class 3 PI3K ノックアウトマウスの肝臓において全タンパク内で Hsp90 発現は変化がなく Hsp70 発現は対照マウスと比較して低下していた。一方、肝臓特異的 class 3 PI3K ノックアウトマウスの肝臓の核分画内で Hsp90 発現は増加していた。Hsp90 は GR の C 末端に存在する ligand binding domain (LBD) に直接結合し GR 複合体の形状を ATP 依存性に変化させることで GR を活性化させると考えられている (Kirschke et al., 2014)。一方で、別の報告では核内の Hsp90 がクロマチン上のグルココルチコイド認識配列との結合を減少させることにより、GR の転写を阻害することが示されている (Kang et al., 1999)。このように、class 3 PI3K が核内 Hsp90 の代謝の上流でどのような役割を果たしているのか、それが肝臓における GR の転写活性にどのような影響を与えているのかは、未だ明らかになっていない。

Fabp1 は脂質結合タンパク質であり、脂肪酸の核への供給を増加させる。その他にも Fabp1 は PPAR $\alpha$  や GR の転写活性を高め、Fabp4 は GR の核外への排出を減少させる機能を持つことが明らかになっている (Hughes et al., 2015)。class 3 PI3K は、Histone Deacetylase 3 (Hdac3) や Nuclear Receptor Corepressor 1 (NcoR1) によって抑制されている PPAR $\alpha$  を抑制することで、Fabp1 を制御する (Iershov et al., 2019)。Vps15-LKO マウスでは、核内の Fabp1 が有意に減少していることから、GR の転写を抑制するメカニズムの一因となっている可能性が示唆された。

GR は、N-末端ドメイン上のセリン残基 (S113、S134、S141、S143、S203、S211、S226、S404) でリン酸化される (Kadmiel and Cidlowski, 2013)。phospho-Ser211 GR は GR の転写活性化に寄与するため、本研究では phospho-Ser211 GR を評価した。GR はリガンドと結合しなくてもリン酸化されるが、活性型リガンドと結合するとリン酸化は促進される (Chen et al., 2008)。Vps15-LKO マウス

では総タンパク質および核分画において、GR のリン酸化が減少していたがリガンドが少ないことが影響している可能性も考えられた。そこで、GR の強力なリガンドであるデキサメタゾンを Vps15-LKO マウスに投与しリン酸化が促進されるかを確認した。その結果 Vps15-LKO マウスでは、Ser211 での GR リン酸化の回復は認められず、Vps15-LKO マウスでは GR のリン酸化を抑制する別のメカニズムが存在することが示唆された。

GR のリン酸化酵素として MAPK、サイクリン依存性キナーゼ、GSK-3 $\beta$  が報告されている(Kadmiel and Cidlowski, 2013)。class3 PI3K をノックアウトした肝細胞では、インスリン受容体のシグナル伝達が持続し Akt シグナルが増加していた(Nemazanyy et al., 2015)。Akt は、細胞の生存、増殖、成長、およびインスリン誘発性のグルコース輸送において重要な役割を果たしている。Akt は、小胞体、ミトコンドリア、ゴルジ体、核など様々な細胞内構成要素に分布している(Martelli et al., 2012)。核内の Akt が核内の mTORC1 活性を制御することで、PPAR $\gamma$  coactivator-1 (PGC1 $\alpha$ )などの代謝遺伝子の転写を促進することが示唆されている(Cunningham et al., 2007; Laplante and Sabatini, 2013; Zhou et al., 2020)。GSK3 は細胞質に分布すると考えられていたが、GSK3 は核内にも存在し、核内の GSK3 は多くの転写因子を制御している(Beurel et al., 2015)。GSK3 は Akt によるリン酸化でその活性を制御される(Hermida et al., 2017)。Vps15-LKO マウスでは、核内の phospho-Ser473 Akt1 が増加することで phospho-Ser9/21 GSK3 $\beta/\alpha$  が増加し、GR の phospho-Ser211 が抑制されていた可能性が考えられた(Figure 17)。

GR はリガンドと結合した後、GR 転写の過剰活性化を防ぐために直ちに転写抑制とタンパク質分解の両方によって制御される(Bellingham et al., 1992)。Mdm2 はユビキチンリガーゼとして働き、GR を含むいくつかのステロイドホルモン受容体をプロテオソーム分解によって制御している(Kinyamu and Archer, 2003; Sengupta and Wasylyk, 2001)。Akt は Mdm2 のリン酸化(Ser166)を介してユビキチン化を促進することが報告されており(Patt et al., 2020)、本研究における Vps15-LKO マウスでの phospho-Ser166 Mdm2 発現亢進および GR のポリユビキチン化亢進という結果と一致していた(Figure 17)。

このように、Vps15-LKO マウスの肝臓では、GR のリガンド利用低下と Akt シグナルの増加が、GR タンパクのポリユビキチン化の促進と並行して起こっていた。これらの結果は、class 3 PI3K が GC による GR 転写活性の制御を行っていることを示しており、class 3 PI3K が GR を介しても生理的な摂食-絶食サイクルにおける代謝適応に貢献している可能性が示された。

## －第 2 章－

# 原発性アルドステロン症患者における 内臓脂肪量と血漿アルドステロン濃度の 関連の検討

## 6.1 緒 言

第一章では class 3 PI3K による GC を介した代謝制御機構を解明した。第二章では GC と同様に副腎皮質から分泌されるミネラルコルチコイドと肥満病態の関連について解明することを目的とした。これまで、副腎皮質から分泌されるステロイドホルモンでは GC が代謝制御を担い、また過剰な GC が中心性肥満と関連があることが広く知られていた。一方で、近年ミネラルコルチコイドも GC と同様に代謝制御に関与している可能性が示されてきた。今回は未だ明らかになっていないミネラルコルチコイドと肥満の関連について、原発性アルドステロン症患者の臨床データを用いて解明することを目的とした。

高血圧は生活習慣や遺伝要因により発症する本態性高血圧と、他の疾患が原因である二次性高血圧に大別される。二次性高血圧は内分泌疾患に起因する原発性アルドステロン症 (primary aldosteronism: PA)、Cushing 症候群、褐色細胞腫や腎臓に起因する腎血管性高血圧、その他にも睡眠時無呼吸症候群などが原因となる。このうち PA は二次性高血圧のうち最も高頻度であり、高血圧のうち 5-10% は PA である (Hannemann and Wallaschofski, 2012; Young, 2007)。

アルドステロンは副腎皮質球状層から分泌されるステロイドホルモンであり、主に腎の遠位尿細管が標的組織である。通常は体液量の低下を感知すると腎臓からレニンが分泌され、レニンの刺激によりアルドステロンが分泌されると遠位尿細管において  $\text{Na}^+$  と  $\text{OH}^-$  の再吸収と  $\text{K}^+$  と  $\text{H}^+$  の排泄により、塩分を体内に保持し体液量を調整する。副腎からアルドステロンが自律的に過剰分泌される疾患である PA ではレニン刺激によらずアルドステロンが過剰に分泌されることにより高血圧、低 K 血症を来す。

ミネラルコルチコイド受容体 (mineralocorticoid receptor: MR) は全身の様々な細胞に発現しており、PA では高血圧による血管障害機序に加えて、過剰なアルドステロンが血管の MR に作用し直接的な血管障害をもたらす。このため PA 患者では本態性高血圧患者に比較して脳血管疾患、心血管疾患の発症数が多い (Matrozo et al., 2009)。PA は副腎腫瘍によりアルドステロンが過剰分泌されるアルドステロン産生腺腫 (aldosterone producing adenoma: APA) と、両側の副腎過形成によりアルドステロンが過剰分泌される特発性アルドステロン症 (idiopathic hyperaldosteronism: IHA) に大別される。APA は腫瘍側の副腎切除により血圧正常化と合併症予防の効果を見込めるため早期の手術が望ましいが、IHA では MR 拮抗薬を用いた薬物療法がその治療法となるため、PA の病型の正確な診断が重要である。

PA では高血圧だけでなく、代謝性疾患を合併しやすいことが明らかになってきた(Garg et al., 2010)。脂肪細胞や筋細胞において MR が活性化されるとインスリンシグナルが阻害されるためにインスリン抵抗性をきたす(Luther, 2014)。PA では本態性高血圧と比較して 2 型糖尿病を併存する割合が高く、さらに PA を APA と IHA の 2 病型に分けると IHA の方が肥満の割合が有意に高く糖尿病の併存率も高い傾向であった(Akehi et al., 2019)。肥満により本態性高血圧を来すことが広く知られるようになり(Chiang et al., 1969)、特に過剰な内臓脂肪が高血圧を来すことがわかってきた(Nicklas et al., 2003)。また非 PA 患者において PAC と内臓脂肪面積の関連が示された(Engeli et al., 2005; Licata et al., 1994)。一方で PA において PAC と内臓脂肪量の関連については報告はなく、PA の各病型において内臓脂肪が病態形成にどの様に寄与しているかもわかっていない。我々は PA の病態が APA と IHA の 2 病型で異なることから、アルドステロン過剰分泌の病態形成への内臓脂肪の関与が異なる可能性を考えた。そこで臨床データを用いて PA の各病型において PAC と内臓脂肪量との関連を明らかにすることを目的として本検討を行った。内臓脂肪と副腎でのアルドステロン過剰分泌機構を明らかにすることは、PA の新たな治療戦略の創出並びに肥満高血圧治療にも寄与する可能性が考えられた。

## 6.2 実験方法

### 6.2.1 対象

後ろ向き観察研究。2007年4月から2017年4月までに市立札幌病院でPAと診断された131人の患者を対象とした。PAの診断は以下の通り日本内分泌学会(Nishikawa et al., 2011)と日本高血圧学会(Shimamoto et al., 2014)の示すガイドラインに従って行った。スクリーニング検査として、降圧薬をカルシウム拮抗薬または $\alpha$ 拮抗薬に変更後に血漿アルドステロン濃度 (plasma aldosterone concentration: PAC) (pg/mL)、血漿レニン活性 (plasma renin ratio: PRA) (ng/mL/h)を測定しアルドステロン/レニン比 (aldosterone renin ratio: ARR) $>200$ をスクリーニング陽性とした。PAの診断は機能確認検査のうちカプトプリル負荷試験、立位フロセミド負荷試験、生理食塩水負荷試験のうちいずれか一つ陽性で行った。1mgDex抑制試験で血清コルチゾール $\geq 3\mu\text{g/dL}$ の患者は自律コルチゾール産生が疑われるため除外した。本研究についてはopt-out methodologyで施行し、opt-out methodologyの詳細については市立札幌病院のウェブサイトに表示した。

### 6.2.2 病型診断

PAと診断した後に、病型診断のために副腎静脈サンプリング (adrenal venous sampling: AVS)を行った。AVSでは、adrenocorticotrophic hormone (ACTH)刺激前とACTH刺激30分後にそれぞれ両側副腎静脈と下大静脈から採血を行った。ACTH刺激としてcosyntropin 250 $\mu\text{g}$ を静脈投与した。

カテーテル挿入成功はACTH刺激後のselectivity index (SI) (コルチゾールの副腎静脈/下大静脈比)  $\geq 5$  または下大静脈内コルチゾール濃度 $\geq 200\mu\text{g/dL}$ で判

定した(Omura et al., 2006)。上記でカテーテル挿入不成功と判定された患者は除外した。

片側アルドステロン分泌は ACTH 刺激後の lateralized index (LI) (優位側副腎の副腎静脈内アルドステロン/コルチゾール比と非優位側副腎の副腎静脈内アルドステロン/コルチゾール比の比) $\geq 4$  で判定した(Monticone et al., 2015; Webb et al., 2012; Young et al., 2004)。両側アルドステロン分泌は  $LI < 2$  で判定した(Rossi et al., 2001)。本検討では LI が 2-4 の間の患者は除外した。

AVS で片側アルドステロン過剰分泌と判定し、病理学的に副腎皮質腺腫と診断された患者を APA と診断した。AVS で両側アルドステロン過剰分泌と判定した患者は IHA と診断した。

## 6.2.3 CT での内臓脂肪量測定方法

Computed tomography (CT)画像は Toshiba Aquillio ONE CT scanner (Tokyo, Japan)を用いて撮像した。64 スライスマルチディテクターCT スキャンで tube voltage 120kV、tube current は自動制御、ピッチファクター 0.828 とした。肝臓の上端から骨盤までの範囲で撮影した。540mgI/kg の造影剤 (体重 $\geq 55$ kg の患者にはイオパミドール、体重 $< 55$ kg の患者にはイオヘキソール)を投与した後に 30 秒、90 秒、180 秒後に大動脈の CT 値が 230 hounsfield unit (HU)以上であることを確認した後、2mm 厚でスキャンを行った。CT で検出された副腎腫瘍は、直径 10 mm 以上の腫瘍と定義した。

Synapse Vincent version 4.4 (Tokyo, Japan)を用いて内臓脂肪量を解析した。内臓脂肪は window level -50~-270 HU で検出した。内臓脂肪率 (visceral fat percentage: VF%)は内臓脂肪体積を腹腔内体積で除して求めた。内臓脂肪面積 (visceral fat area: VFA)、皮下脂肪面積 (subcutaneous fat area: SCFA) およびウエスト径は臍高で測定した。



## 6.2.4 内分泌学的測定方法

PAC はラジオイムノアッセイ法で測定した (SPAC-S Aldosterone Kits ; Fuji Rebio, Co., LTD, Tokyo, Japan)。仰臥位での PAC の基準値は 30-159 pg/mL。PRA も同様にラジオイムノアッセイ法で測定した (PRA Radioimmunoassay Kits ; Fuji Rebio, Co., LTD, Tokyo, Japan)。仰臥位での PRA の基準値は 0.3-2.9 ng/mL/h。

## 6.2.5 統計学的解析

本検討において内臓脂肪量の評価のために CT から算出した VF%と VFA の二つの指標を用いた。PA の各病型の患者において。入院中に早朝に仰臥位で測定した PAC と CT で評価した VF%、VFA、SCFA、ウエスト径の相関の解析を行った。更に、PAC とその他一般的なパラメータである年齢、身長、体重、body mass index (BMI)、PRA、ARR、1mgDex 抑制試験後の血清コルチゾール値の相関についても解析を行った。

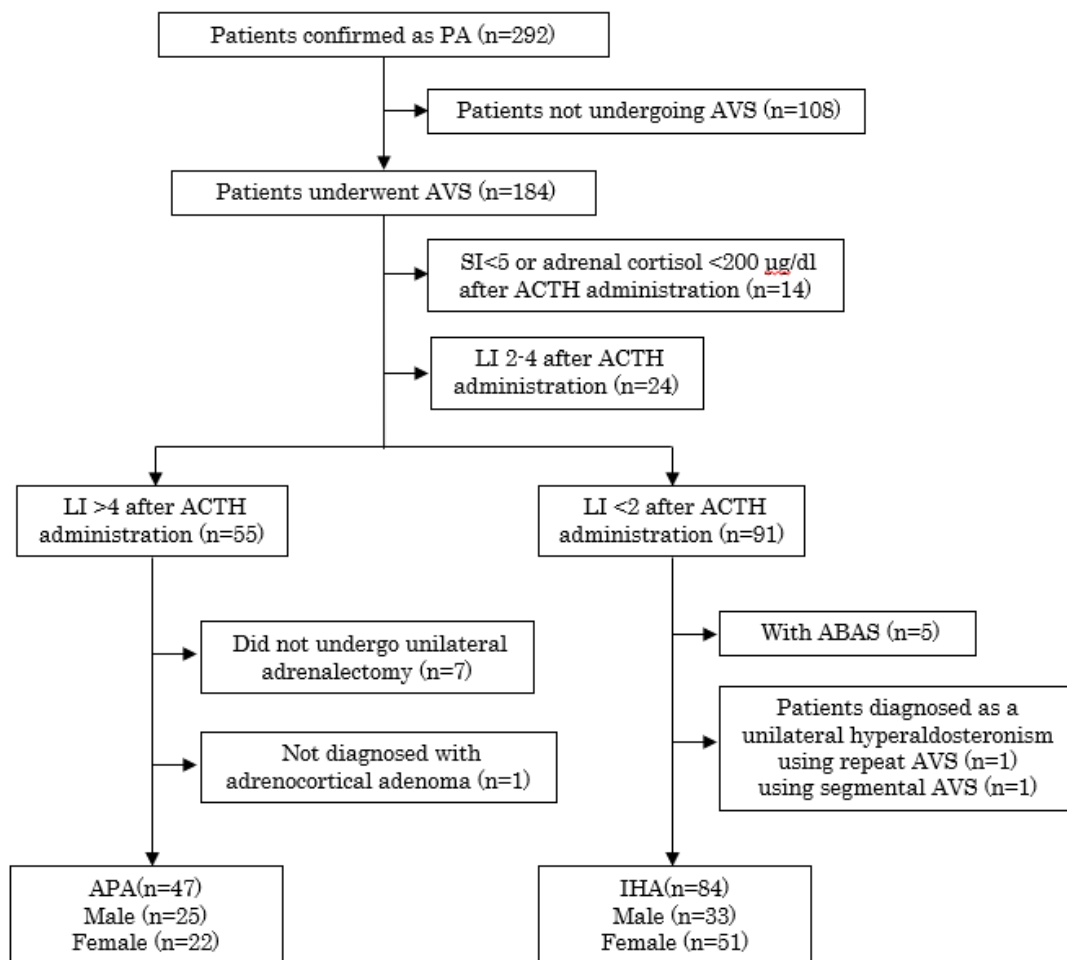
結果は平均  $\pm$  standard deviation (SD)、中央値 [四分位数]または数値 (%) として示した。両群間の背景因子の差は、連続変数には Welch の t 検定または Mann-Whitney U 検定を、離散変数にはカイ二乗検定またはフィッシャー検定を用いて評価した。相関の解析は Spearman の順位相関分析で評価した。P 値  $<0.05$  を統計的に有意であるとした。データ分析には Bell Curve for Excel (Social Survey Research Information Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いた。

## 6.3 実験結果

### 6.3.1 背景因子

本研究のフローチャートを Figure 17 に示す。PA と診断した 292 人のうち、184 人に対して AVS を施行した。AVS 施行した患者のうち 55 人を片側アルドステロン過剰分泌と診断し、そのうち 48 人に片側副腎摘出術を施行した。このうち 47 人を病理学的に副腎皮質腺腫と診断し、APA と診断した。AVS で両側アルドステロン過剰分泌と診断した 91 人のうち両側副腎静脈のアルドステロン/コルチゾール比が下大静脈のアルドステロン/コルチゾール比よりも低い ABAS (apparent bilateral aldosterone suppression) (Shibayama et al., 2018; Shibayama et al., 2016) と判定した患者 (n=5)、再度施行した AVS で片側アルドステロン過剰分泌と診断した患者 (n=1)、超選択的 AVS (Sato et al., 2015) で片側アルドステロン過剰分泌と診断した患者 (n=1) を除外し、84 人を IHA と診断した (Figure 17)。

患者背景を Table 3 に示す。APA と IHA を比較して年齢、性別、身長、体重、BMI、収縮期・拡張期血圧に差はなかった。APA では IHA と比較して高血圧罹病期間は有意に長かった (APA vs. IHA: 7.0 [3.0-10.0] vs. 3.0 [0.7-6.0] years,  $p=0.01$ )。内分泌学的検査では APA では IHA と比較して PRA 低値 (APA vs. IHA: 0.2 [0.1-0.3] vs. 0.3 [0.2-0.5] ng/mL/h,  $p<0.01$ )、PAC 高値 (APA vs. IHA: 333 [228-459] vs. 140 [115-170] pg/mL,  $p<0.001$ )、ARR 高値 (APA vs. IHA: 1720 [1072-2640] vs. 409 [285-858] pg/mL,  $p<0.001$ )、1mg デキサメタゾン抑制試験の血清コルチゾール値高値だった (APA vs. IHA: 1.2 [0.9-1.5] vs. 0.8 [0.6-1.2] ug/dL,  $p<0.01$ )。生化学検査では APA では IHA と比較して血清 K 値低値 (APA vs. IHA: APA vs. IHA: 3.2 [2.8-3.6] vs. 3.5 [3.2-3.8] mmol/L,  $p<0.001$ )、K 補充率高値だった。CT 所見では APA では IHA と比較して副腎腫瘍を有する割合は高値であった (Table 3)。



**Figure 17.** 患者フローチャート

PA と診断した患者 (n=292)のうち AVS または AVS と病理診断から、PA の 2 病型 (APA(n=47)、IHA(n=84))と診断した。

**Table 3.** 患者背景

|                                       | APA (n = 47)        | IHA (n = 84)        | <i>p</i> value |
|---------------------------------------|---------------------|---------------------|----------------|
| Age (years)                           | 51.5 ± 12.6         | 51.1 ± 11.3         | 0.85           |
| Sex (male: female) (%)                | 25 (53%): 22 (47%)  | 33 (39%): 51 (61%)  | 0.18           |
| Body height (cm)                      | 162.6 ± 9.2         | 162.1 ± 9.2         | 0.79           |
| Body weight (kg)                      | 66.9 [55.6-75.1]    | 64.2 [57.0-72.8]    | 0.75           |
| BMI                                   | 25.1 ± 4.0          | 25.0 ± 4.0          | 0.87           |
| Systolic blood pressure (mmHg)        | 138.0 [130.0-149.5] | 139.0 [126.0-144.0] | 0.40           |
| Diastolic blood pressure (mmHg)       | 79.5 [70.0-84.8]    | 82.0 [73.5-90.0]    | 0.11           |
| Duration of hypertension (years)      | 7.0 [3.0-10.0]      | 3.0 [0.7-6.0]       | 0.01           |
| Number of antihypertensive drugs      | 2.0 [1.0-2.0]       | 1.0 [0-2.0]         | <0.001         |
| PRA (ng/mL/h)                         | 0.2 [0.1-0.3]       | 0.3 [0.2-0.5]       | <0.01          |
| PAC (pg/mL)                           | 333 [228-459]       | 140 [115-170]       | <0.001         |
| ARR                                   | 1720 [1072-2640]    | 409 [285-858]       | <0.001         |
| Serum cortisol after 1-mg DST (μg/dL) | 1.2 [0.9-1.5]       | 0.8 [0.6-1.2]       | <0.01          |
| Serum potassium level (mEq/L)         | 3.2 [2.8-3.6]       | 4.0 [3.8-4.1]       | <0.001         |
| Potassium supplement (%)              | 26 (55.3%)          | 4 (4.8%)            | <0.001         |
| Adrenal tumor (%)                     | 44 (93.6%)          | 15 (17.9%)          | <0.001         |

データは平均 ± SD または中央値 [四分位数]、または数値 (%)で表す。

### 6.3.2 試験結果

脂肪量のパラメータの比較を Table 4 に示す。IHA では APA と比較して VF% が有意に高値だった (APA vs. IHA:  $22.9\% \pm 10.8\%$  vs.  $27.6\% \pm 10.2\%$ ;  $p=0.02$ )。同様に IHA では APA と比較して VFA が高値の傾向であったが有意差は認めなかった。APA と IHA を比較して SCFA とウエスト径に有意差は認めなかった (Table 4)。

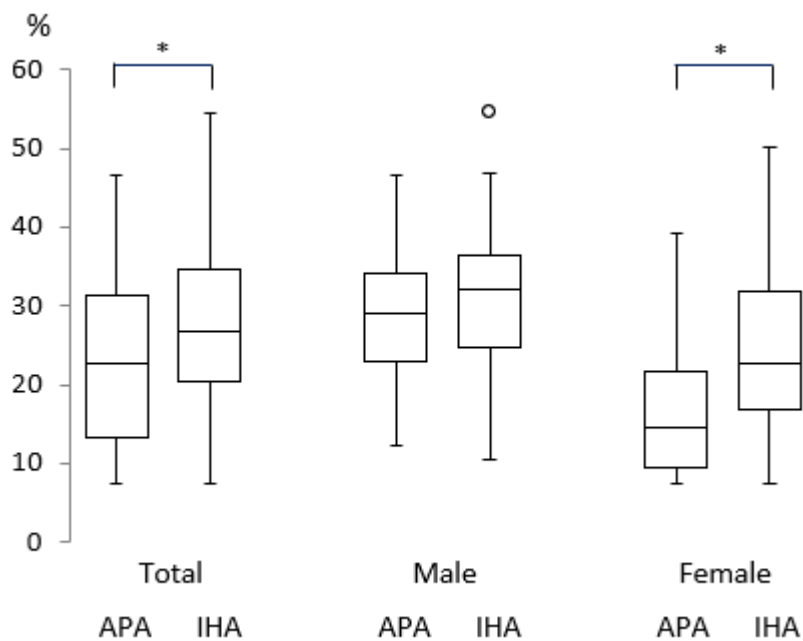
APA と IHA 患者をそれぞれ性別で分けた際の脂肪量のパラメータの比較を Figure 18 に示す。IHA では男性も女性も APA と比較して VF% および VFA は高値の傾向であったが、IHA 女性においては APA 女性と比較して VF% が有意に高値だった (APA vs. IHA:  $16.9\% \pm 1.9\%$  vs.  $25.1\% \pm 1.4\%$ ;  $p=0.001$ ) (Figure 18)。

各病型における PAC と脂肪量パラメータの相関を Figure 19 に示す。IHA において PAC と VF% ( $r=0.377$ ,  $p<0.001$ ) (Figure 19A)、PAC と VFA ( $r=0.443$ ,  $p<0.001$ ) (Figure 19B)、PAC と BMI ( $r=0.386$ ,  $p<0.001$ ) (Figure 19D)、PAC とウエスト径 ( $r=0.354$ ,  $p<0.001$ ) (Figure 19E) に有意な正の相関を認めた。これらの相関は IHA 患者を男性と女性に分けて検討しても認められた。一方で、IHA では PAC と SCFA に相関は認められなかった ( $r=0.151$ ,  $p=0.170$ ) (Figure 19C)。APA においては PAC と VF% ( $r=-0.073$ ,  $p=0.629$ )、PAC と VFA ( $r=0.018$ ,  $p=0.904$ )、PAC と BMI ( $r=0.068$ ,  $p=0.648$ )、PAC とウエスト径 ( $r=0.032$ ,  $p=0.831$ )、PAC と SCFA ( $r=-0.046$ ,  $p=0.759$ ) のいずれも相関を認めなかった。

**Table 4.** 脂肪量のパラメータおよびウエスト径の比較

|                                          | APA (n = 47) | IHA (n = 84) | <i>p</i> value |
|------------------------------------------|--------------|--------------|----------------|
| Visceral fat percentage (%)              | 22.9 ± 10.8  | 27.6 ± 10.2  | 0.02           |
| Visceral fat area (cm <sup>2</sup> )     | 90.6 ± 54.1  | 97.0 ± 7.9   | 0.52           |
| Subcutaneous fat area (cm <sup>2</sup> ) | 141.1 ± 69.7 | 153.4 ± 7.3  | 0.32           |
| Waist circumference (cm)                 | 84.7 ± 10.9  | 85.2 ± 1.0   | 0.81           |

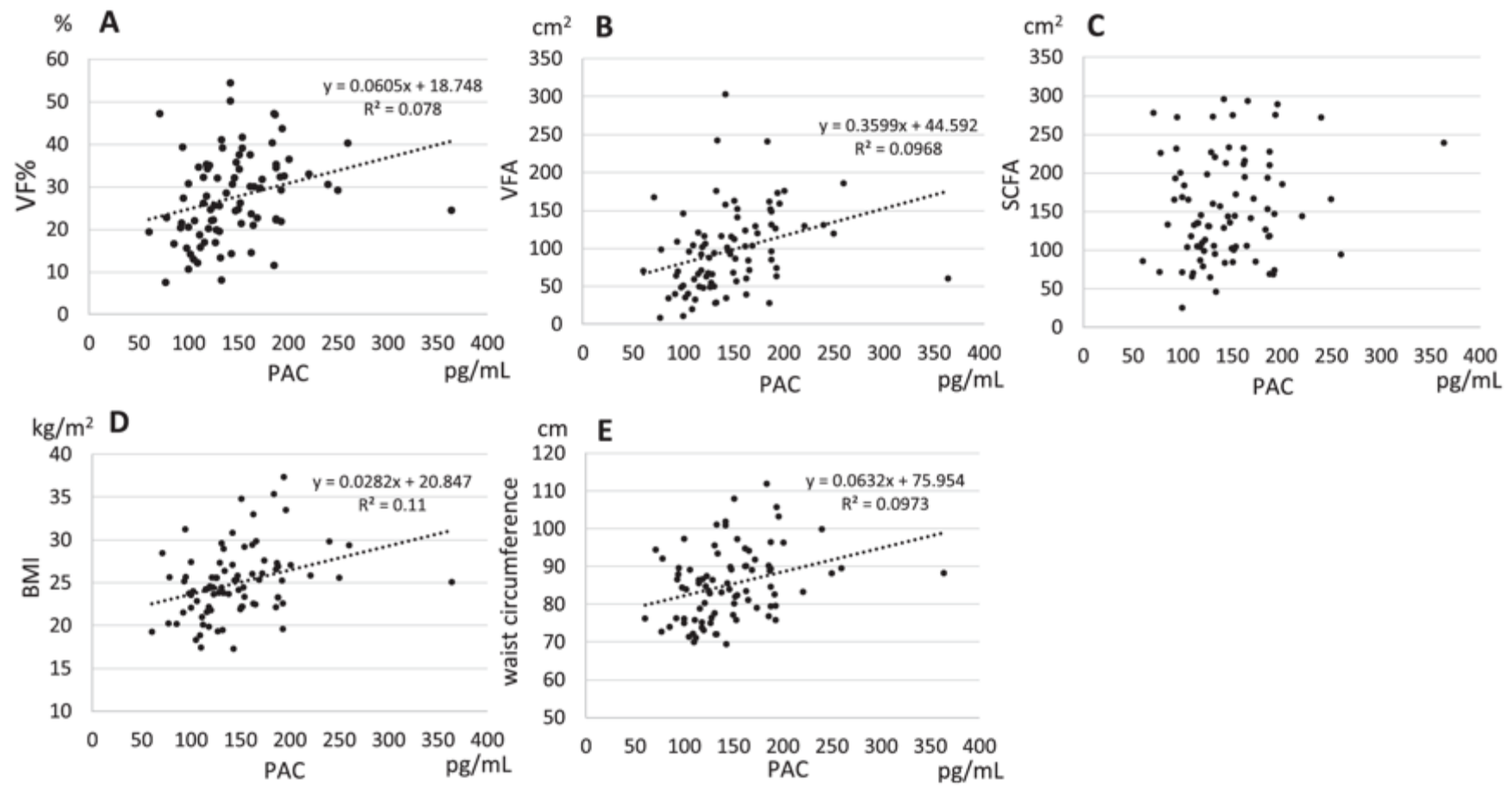
データは平均 ± SD で表す。



**Figure 18.** PA 各病型における性別による VF%の比較

全体、あるいは男性、女性それぞれでの PA 病型による VF%に比較を示す。

データは中央値 [四分位数]で表す。  $P < 0.05$  \*: APA vs IHA



**Figure 19.** IHA における PAC と各因子の相関

IHA 患者における PAC と(A) VF% (B) VFA (C) SCFA (D) BMI (E) ウエスト径との相関をそれぞれ示す。



## 6.4 考 察

これまでの非 PA 患者研究では、肥満高血圧患者および肥満患者では非肥満者と比較して PAC が高値であることが示されていた(Licata et al., 1994)。また非 PA の肥満患者において、減量後に PAC が低下したとも報告されている(Engeli et al., 2005)。非 PA の肥満女性において PAC と VFA の相関についての報告はあるが、PA 患者において PAC と内臓脂肪量についての関連は明らかではなかった。本研究で PA 患者において PAC と CT で評価した内臓脂肪率および内臓脂肪面積との正の相関を示すことができた。上記相関は、PA のうち IHA 患者においてのみ認められた。

PAC と内臓脂肪量が関連するメカニズムとしては、副腎と脂肪組織との双方向のクロストークが考えられている(Marzolla et al., 2012)。副腎から脂肪細胞への方では、MR の活性化は preadipocytes から mature adipocytes への分化を促進し(Kargi and Iacobellis, 2014)、tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、interleukin-6 (IL-6)、monocyte chemoattractant-1 (MCP-1)といった炎症誘発遺伝子の発現を促進する(Caprio et al., 2007)。脂肪細胞から副腎の方では、内臓脂肪組織が鉱質コルチコイド分泌促進因子として作用する(Ehrhart-Bornstein et al., 2003)。マウスにおいてレプチンがアルドステロン合成の最終ステップで用いられる酵素である CYP11B2 の発現を調整していると報告されている(Huby et al., 2015)。副腎皮質細胞においてアディポネクチン受容体の mRNAs 発現が報告されており、アディポネクチンがアルドステロン分泌を調整している可能性が示唆されている(Rossi et al., 2006)。Complement-C1q tumor necrosis factor-related 1 が副腎皮質球状層に発現しており、CYP11B2 遺伝子発現の調整によるアルドステロンの調整についても報告されている(Jeon et al., 2008)。副腎と脂肪組織の双方向的な刺激により、内臓脂肪過剰によるアルドステロン過剰分泌の病態が形成されていると考えられた。

本研究においては BMI とウエスト径は APA と IHA で差がなく、PAC は IHA と比較して APA で有意に高値だった。また VF%は APA と比較して IHA で有意に高値だった。これらの結果から、PA 患者において内臓脂肪とアルドステロン合成との関連は PA のサブタイプにより大きくことが示唆された。APA では副腎腫瘍からの自律分泌によりアルドステロンが合成されるため、内臓脂肪量と PAC との関連は認めなかったと考えられた。一方で、IHA は両側副腎過形成からのアルドステロン自律分泌がアルドステロン高値の病態と考えられているが、両側副腎からのアルドステロン合成を特徴とするために

手術による治療が適応とならないためその病態は現在まで明らかになっていない。本研究の結果からは、IHA においては内臓脂肪がアルドステロン過剰分泌の病態形成に重要な役割を持っていることが示された。この結果からは、IHA 患者においては食事療法により内臓脂肪量を減少させることで PAC を低下させ生命予後を改善できる可能性が示された。この結果は PA 診療において重要なインパクトがあると考えられる。

また本邦において増加している肥満者の高血圧にアルドステロン過剰あるいは MR シグナル過剰亢進機構が存在することが考えられる。更なる分子メカニズム解析を進めれば肥満高血圧治療の一助となる可能性が考えられる。

## 7. 総括および結論

第一章では肝臓における class 3 PI3K による GR シグナルの制御機構を検討した。本研究で明らかとなった知見は以下の通りである。

1. 肝臓特異的 class 3 PI3K ノックアウトマウスの肝臓では GR 標的遺伝子発現が低下していた。
2. 肝臓特異的 class 3 PI3K ノックアウトマウスの肝臓では GR 発現および GR Ser211 リン酸化が抑制されていた。
3. 肝臓特異的 class 3 PI3K ノックアウトマウスの肝臓では 24 時間絶食、あるいはデキサメタゾン投与によっても GR 標的遺伝子発現は回復しなかった。
4. 肝臓特異的 class 3 PI3K ノックアウトマウスの肝臓では活性型 GR リガンドであるコルチコステロンの転写因子並びにコルチコステロン濃度が低下していた。
5. 肝臓特異的 class 3 PI3K ノックアウトマウスの肝臓では Akt シグナル発現が亢進し、GSK3 $\beta$ / $\alpha$  のリン酸化 (Ser9/21) および MDM2 のリン酸化 (Ser166) が亢進していた。
6. 肝臓特異的 class 3 PI3K ノックアウトマウスの肝臓では GR のポリユビキチン化が促進されていた。

これらの結果から class 3 PI3K ノックアウトマウスにおいては GR 転写、GR リガンドレベル、GR 発現がいずれも抑制されていることが示され、class 3 PI3K の肝臓での発現が生理的安静時および長時間の空腹時の GR シグナルの活性化に必須であることを明らかになった。

第二章では PA 患者の 2 病型において血漿アルドステロン濃度と内臓脂肪量の関連を検討した。本研究で明らかとなった知見は以下の通りである。

1. IHA では APA と比較して VF% が有意に高値だった (APA vs. IHA:  $22.9\% \pm 10.8\%$  vs.  $27.6\% \pm 10.2\%$ ;  $p=0.02$ )。
2. PA 患者のうち IHA でのみ血漿アルドステロン濃度と内臓脂肪量に正の相関を認めた (PAC と VF% ( $r=0.377$ ,  $p<0.001$ )、PAC と VFA ( $r=0.443$ ,  $p<0.001$ ))。

これらの結果から、内臓脂肪過多により PA の一病型が形成される可能性が示唆され、内臓脂肪量減量により高血圧のコントロールならびに PA による合併症進行を抑制できる可能性が考えられた。

class 3 PI3K による GC の細胞内シグナル制御機構、PA 患者における副腎と脂肪細胞という臓器間シグナル伝達機構をそれぞれ解明した。グルココルチコイドによる副作用としての代謝疾患治療ならびに、PA のみならず肥満者によるアルドステロン過剰による高血圧治療のターゲットとして更なる詳細なメカニズム解析が必要であると考ええる。

## 8. 謝辞

原稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて頂いた、北海道大学大学院免疫代謝内科学教室 渥美達也教授に謝意を表します。第一章の研究に対してご指導ご鞭撻を賜りました **Institute Necker Enfants Malades Prof. Ganna Panasyuk**、第二章の研究に対してご指導ご鞭撻を賜りました市立札幌病院 糖尿病・内分泌内科 和田典男先生に深く感謝いたします。研究全般にわたり直接のご指導ご鞭撻を賜りました糖尿病・肥満病態治療分野 三好秀明特任教授、免疫代謝内科学教室 中村昭伸講師、曹圭龍特任助教、亀田啓助教、野本博司助教に深く感謝いたします。本研究を支えていただきました、免疫・代謝内科学教室の全ての皆様、ならびにフランスでの研究を支えていただいた **Institute Necker Enfants Malades, Laboratory of Nutrient Sensing Mechanism** の皆様に心より御礼を申し上げます。

本研究の一部は **JSPS 特別研究員奨励費 JP1119133** の助成を受けたものです。本研究遂行に当たり、日本学術振興会特別研究員 **DC2** に採用しサポートをいただいた日本学術振興会に感謝いたします。

## 9. 利益相反

第一章、第二章で行われた研究において、開示すべき利益相反状態はない。

## 10. 参考文献

- Akehi, Y., Yanase, T., Motonaga, R., Umakoshi, H., Tsuiki, M., Takeda, Y., Yoneda, T., Kurihara, I., Itoh, H., Katabami, T., *et al.* (2019). High Prevalence of Diabetes in Patients With Primary Aldosteronism (PA) Associated With Subclinical Hypercortisolism and Prediabetes More Prevalent in Bilateral Than Unilateral PA: A Large, Multicenter Cohort Study in Japan. *Diabetes Care* *42*, 938-945.
- Backer, J.M. (2008). The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochem. J.* *410*, 1-17.
- Bellingham, D.L., Sar, M., and Cidlowski, J.A. (1992). Ligand-dependent down-regulation of stably transfected human glucocorticoid receptors is associated with the loss of functional glucocorticoid responsiveness. *Mol. Endocrinol.* *6*, 2090-2102.
- Beurel, E., Grieco, S.F., and Jope, R.S. (2015). Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases. *Pharmacol. Ther.* *148*, 114-131.
- Caprio, M., Fève, B., Claës, A., Viengchareun, S., Lombès, M., and Zennaro, M.C. (2007). Pivotal role of the mineralocorticoid receptor in corticosteroid-induced adipogenesis. *Faseb. j.* *21*, 2185-2194.
- Chen, W., Dang, T., Blind, R.D., Wang, Z., Cavasotto, C.N., Hittelman, A.B., Rogatsky, I., Logan, S.K., and Garabedian, M.J. (2008). Glucocorticoid receptor phosphorylation differentially affects target gene expression. *Mol. Endocrinol.* *22*, 1754-1766.
- Chiang, B.N., Perlman, L.V., and Epstein, F.H. (1969). Overweight and hypertension. A review. *Circulation* *39*, 403-421.
- Cunningham, J.T., Rodgers, J.T., Arlow, D.H., Vazquez, F., Mootha, V.K., and Puigserver, P. (2007). mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex. *Nature* *450*, 736-740.
- Deng, J., Guo, Y., Yuan, F., Chen, S., Yin, H., Jiang, X., Jiao, F., Wang, F., Ji, H., Hu, G., *et al.* (2020). Autophagy inhibition prevents glucocorticoid-increased adiposity via suppressing

BAT whitening. *Autophagy* 16, 451-465.

Devereaux, K., Dall'Armi, C., Alcazar-Roman, A., Ogasawara, Y., Zhou, X., Wang, F., Yamamoto, A., De Camilli, P., and Di Paolo, G. (2013). Regulation of mammalian autophagy by class II and III PI 3-kinases through PI3P synthesis. *PLoS. One* 8, e76405.

Ehrhart-Bornstein, M., Lamounier-Zepter, V., Schraven, A., Langenbach, J., Willenberg, H.S., Barthel, A., Hauner, H., McCann, S.M., Scherbaum, W.A., and Bornstein, S.R. (2003). Human adipocytes secrete mineralocorticoid-releasing factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100, 14211-14216.

Engeli, S., Böhnke, J., Gorzelniak, K., Janke, J., Schling, P., Bader, M., Luft, F.C., and Sharma, A.M. (2005). Weight loss and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Hypertension* 45, 356-362.

Esteves, C.L., Kelly, V., Bégay, V., Man, T.Y., Morton, N.M., Leutz, A., Seckl, J.R., and Chapman, K.E. (2012). Regulation of adipocyte 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 $\beta$ -HSD1) by CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)  $\beta$  isoforms, LIP and LAP. *PLoS. One* 7, e37953.

Garg, R., Hurwitz, S., Williams, G.H., Hopkins, P.N., and Adler, G.K. (2010). Aldosterone production and insulin resistance in healthy adults. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95, 1986-1990.

Grøntved, L., John, S., Baek, S., Liu, Y., Buckley, J.R., Vinson, C., Aguilera, G., and Hager, G.L. (2013). C/EBP maintains chromatin accessibility in liver and facilitates glucocorticoid receptor recruitment to steroid response elements. *Embo. j.* 32, 1568-1583.

Hannemann, A., and Wallaschofski, H. (2012). Prevalence of primary aldosteronism in patient's cohorts and in population-based studies--a review of the current literature. *Horm. Metab. Res.* 44, 157-162.

Hanslik, G., Wallaschofski, H., Dietz, A., Riester, A., Reincke, M., Allolio, B., Lang, K., Quack, I., Rump, L.C., Willenberg, H.S., *et al.* (2015). Increased prevalence of diabetes mellitus and the metabolic syndrome in patients with primary aldosteronism of the German Conn's Registry. *Eur. J. Endocrinol.* 173, 665-675.



- He, B., Cruz-Topete, D., Oakley, R.H., Xiao, X., and Cidlowski, J.A. (2015). Human Glucocorticoid Receptor  $\beta$  Regulates Gluconeogenesis and Inflammation in Mouse Liver. *Mol. Cell. Biol.* *36*, 714-730.
- Hermida, M.A., Dinesh Kumar, J., and Leslie, N.R. (2017). GSK3 and its interactions with the PI3K/AKT/mTOR signalling network. *Adv. Biol. Regul.* *65*, 5-15.
- Hinds, T.D., Jr., Ramakrishnan, S., Cash, H.A., Stechschulte, L.A., Heinrich, G., Najjar, S.M., and Sanchez, E.R. (2010). Discovery of glucocorticoid receptor-beta in mice with a role in metabolism. *Mol. Endocrinol.* *24*, 1715-1727.
- Hollenberg, S.M., Weinberger, C., Ong, E.S., Cerelli, G., Oro, A., Lebo, R., Thompson, E.B., Rosenfeld, M.G., and Evans, R.M. (1985). Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* *318*, 635-641.
- Huang, X., Liu, G., Guo, J., and Su, Z. (2018). The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes. *Int. J. Biol. Sci.* *14*, 1483-1496.
- Huby, A.C., Antonova, G., Groenendyk, J., Gomez-Sanchez, C.E., Bollag, W.B., Filosa, J.A., and Belin de Chantemèle, E.J. (2015). Adipocyte-Derived Hormone Leptin Is a Direct Regulator of Aldosterone Secretion, Which Promotes Endothelial Dysfunction and Cardiac Fibrosis. *Circulation* *132*, 2134-2145.
- Hughes, M.L., Liu, B., Halls, M.L., Wagstaff, K.M., Patil, R., Velkov, T., Jans, D.A., Bunnett, N.W., Scanlon, M.J., and Porter, C.J. (2015). Fatty Acid-binding Proteins 1 and 2 Differentially Modulate the Activation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\alpha$  in a Ligand-selective Manner. *J. Biol. Chem.* *290*, 13895-13906.
- Iershov, A., Nemazanyy, I., Alkhoury, C., Girard, M., Barth, E., Cagnard, N., Montagner, A., Chretien, D., Rugarli, E.I., Guillou, H., *et al.* (2019). The class 3 PI3K coordinates autophagy and mitochondrial lipid catabolism by controlling nuclear receptor PPAR $\alpha$ . *Nat. Commun.* *10*, 1566.
- Jeon, J.H., Kim, K.Y., Kim, J.H., Baek, A., Cho, H., Lee, Y.H., Kim, J.W., Kim, D., Han, S.H., Lim, J.S., *et al.* (2008). A novel adipokine CTRP1 stimulates aldosterone production.

Faseb. j. *22*, 1502-1511.

Kadmiel, M., and Cidlowski, J.A. (2013). Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends Pharmacol. Sci.* *34*, 518-530.

Kang, K.I., Meng, X., Devin-Leclerc, J., Bouhouche, I., Chadli, A., Cadepond, F., Baulieu, E.E., and Catelli, M.G. (1999). The molecular chaperone Hsp90 can negatively regulate the activity of a glucocorticosteroid-dependent promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* *96*, 1439-1444.

Kargi, A.Y., and Iacobellis, G. (2014). Adipose tissue and adrenal glands: novel pathophysiological mechanisms and clinical applications. *Int. J. Endocrinol.* *2014*, 614074.

Kinyamu, H.K., and Archer, T.K. (2003). Estrogen receptor-dependent proteasomal degradation of the glucocorticoid receptor is coupled to an increase in mdm2 protein expression. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 5867-5881.

Kirschke, E., Goswami, D., Southworth, D., Griffin, P.R., and Agard, D.A. (2014). Glucocorticoid receptor function regulated by coordinated action of the Hsp90 and Hsp70 chaperone cycles. *Cell* *157*, 1685-1697.

Kuo, T., Lew, M.J., Mayba, O., Harris, C.A., Speed, T.P., and Wang, J.C. (2012). Genome-wide analysis of glucocorticoid receptor-binding sites in myotubes identifies gene networks modulating insulin signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* *109*, 11160-11165.

Laplane, M., and Sabatini, D.M. (2013). Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance. *J. Cell. Sci.* *126*, 1713-1719.

Leis, H., Page, A., Ramírez, A., Bravo, A., Segrelles, C., Paramio, J., Barettino, D., Jorcano, J.L., and Pérez, P. (2004). Glucocorticoid Receptor Counteracts Tumorigenic Activity of Akt in Skin through Interference with the Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling Pathway. *Mol. Endocrinol.* *18*, 303-311.

Licata, G., Scaglione, R., Ganguzza, A., Corrao, S., Donatelli, M., Parrinello, G., Dichiaro, M.A., Merlino, G., and Cecala, M.G. (1994). Central obesity and hypertension. Relationship between fasting serum insulin, plasma renin activity, and diastolic blood pressure in young

obese subjects. *Am. J. Hypertens.* **7**, 314-320.

Luther, J.M. (2014). Effects of aldosterone on insulin sensitivity and secretion. *Steroids* **91**, 54-60.

Martelli, A.M., Tabellini, G., Bressanin, D., Ognibene, A., Goto, K., Cocco, L., and Evangelisti, C. (2012). The emerging multiple roles of nuclear Akt. *Biochim. Biophys. Acta.* **1823**, 2168-2178.

Marzolla, V., Armani, A., Zennaro, M.C., Cinti, F., Mammi, C., Fabbri, A., Rosano, G.M., and Caprio, M. (2012). The role of the mineralocorticoid receptor in adipocyte biology and fat metabolism. *Mol. Cell. Endocrinol.* **350**, 281-288.

Matrozkova, J., Steichen, O., Amar, L., Zacharieva, S., Jeunemaitre, X., and Plouin, P.F. (2009). Fasting plasma glucose and serum lipids in patients with primary aldosteronism: a controlled cross-sectional study. *Hypertension* **53**, 605-610.

Monticone, S., D'Ascenzo, F., Moretti, C., Williams, T.A., Veglio, F., Gaita, F., and Mulatero, P. (2018). Cardiovascular events and target organ damage in primary aldosteronism compared with essential hypertension: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **6**, 41-50.

Monticone, S., Viola, A., Rossato, D., Veglio, F., Reincke, M., Gomez-Sanchez, C., and Mulatero, P. (2015). Adrenal vein sampling in primary aldosteronism: towards a standardised protocol. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **3**, 296-303.

Nemazanyy, I., Montagnac, G., Russell, R.C., Morzyglod, L., Burnol, A.F., Guan, K.L., Pende, M., and Panasyuk, G. (2015). Class III PI3K regulates organismal glucose homeostasis by providing negative feedback on hepatic insulin signalling. *Nat. Commun.* **6**, 8283.

Nicklas, B.J., Penninx, B.W., Ryan, A.S., Berman, D.M., Lynch, N.A., and Dennis, K.E. (2003). Visceral adipose tissue cutoffs associated with metabolic risk factors for coronary heart disease in women. *Diabetes Care* **26**, 1413-1420.

Nishikawa, T., Omura, M., Satoh, F., Shibata, H., Takahashi, K., Tamura, N., and Tanabe,

A. (2011). Guidelines for the diagnosis and treatment of primary aldosteronism--the Japan Endocrine Society 2009. *Endocr. J.* *58*, 711-721.

Omura, M., Sasano, H., Saito, J., Yamaguchi, K., Kakuta, Y., and Nishikawa, T. (2006). Clinical characteristics of aldosterone-producing microadenoma, macroadenoma, and idiopathic hyperaldosteronism in 93 patients with primary aldosteronism. *Hypertens. Res.* *29*, 883-889.

Panaretou, C., Domin, J., Cockcroft, S., and Waterfield, M.D. (1997). Characterization of p150, an adaptor protein for the human phosphatidylinositol (PtdIns) 3-kinase. Substrate presentation by phosphatidylinositol transfer protein to the p150.Ptdins 3-kinase complex. *J. Biol. Chem.* *272*, 2477-2485.

Patt, M., Gysi, J., Faresse, N., Cidlowski, J.A., and Odermatt, A. (2020). Protein phosphatase 1 alpha enhances glucocorticoid receptor activity by a mechanism involving phosphorylation of serine-211. *Mol. Cell. Endocrinol.* *518*, 110873.

Piovan, E., Yu, J., Tosello, V., Herranz, D., Ambesi-Impiombato, A., Da Silva, A.C., Sanchez-Martin, M., Perez-Garcia, A., Rigo, I., Castillo, M., *et al.* (2013). Direct reversal of glucocorticoid resistance by AKT inhibition in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* *24*, 766-776.

Rossi, G.P., Sacchetto, A., Chiesura-Corona, M., De Toni, R., Gallina, M., Feltrin, G.P., and Pessina, A.C. (2001). Identification of the etiology of primary aldosteronism with adrenal vein sampling in patients with equivocal computed tomography and magnetic resonance findings: results in 104 consecutive cases. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *86*, 1083-1090.

Rossi, G.P., Sticchi, D., Giuliani, L., Bernante, P., Zavattiero, S., Pessina, A.C., and Nussdorfer, G.G. (2006). Adiponectin receptor expression in the human adrenal cortex and aldosterone-producing adenomas. *Int. J. Mol. Med.* *17*, 975-980.

Satoh, F., Morimoto, R., Seiji, K., Satani, N., Ota, H., Iwakura, Y., Ono, Y., Kudo, M., Nezu, M., Omata, K., *et al.* (2015). Is there a role for segmental adrenal venous sampling and adrenal sparing surgery in patients with primary aldosteronism? *Eur. J. Endocrinol.* *173*, 465-477.

Seckl, J.R., and Walker, B.R. (2001). Minireview: 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1- a tissue-specific amplifier of glucocorticoid action. *Endocrinology* *142*, 1371-1376.

Sengupta, S., and Wasylyk, B. (2001). Ligand-dependent interaction of the glucocorticoid receptor with p53 enhances their degradation by Hdm2. *Genes Dev.* *15*, 2367-2380.

Shibayama, Y., Wada, N., Naruse, M., Kurihara, I., Ito, H., Yoneda, T., Takeda, Y., Umakoshi, H., Tsuiki, M., Ichijo, T., *et al.* (2018). The Occurrence of Apparent Bilateral Aldosterone Suppression in Adrenal Vein Sampling for Primary Aldosteronism. *J. Endocr. Soc.* *2*, 398-407.

Shibayama, Y., Wada, N., Umakoshi, H., Ichijo, T., Fujii, Y., Kamemura, K., Kai, T., Sakamoto, R., Ogo, A., Matsuda, Y., *et al.* (2016). Bilateral aldosterone suppression and its resolution in adrenal vein sampling of patients with primary aldosteronism: analysis of data from the WAVES-J study. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* *85*, 696-702.

Shimamoto, K., Ando, K., Fujita, T., Hasebe, N., Higaki, J., Horiuchi, M., Imai, Y., Imaizumi, T., Ishimitsu, T., Ito, M., *et al.* (2014). The Japanese Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension (JSH 2014). *Hypertens. Res.* *37*, 253-390.

Stechschulte, L.A., Wuescher, L., Marino, J.S., Hill, J.W., Eng, C., and Hinds, T.D., Jr. (2014). Glucocorticoid receptor  $\beta$  stimulates Akt1 growth pathway by attenuation of PTEN. *J. Biol. Chem.* *289*, 17885-17894.

Taipale, M., Jarosz, D.F., and Lindquist, S. (2010). HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* *11*, 515-528.

Troncoso, R., Paredes, F., Parra, V., Gatica, D., Vásquez-Trincado, C., Quiroga, C., Bravo-Sagua, R., López-Crisosto, C., Rodriguez, A.E., Oyarzún, A.P., *et al.* (2014). Dexamethasone-induced autophagy mediates muscle atrophy through mitochondrial clearance. *Cell Cycle* *13*, 2281-2295.

Vandevyver, S., Dejager, L., and Libert, C. (2012). On the trail of the glucocorticoid receptor: into the nucleus and back. *Traffic* *13*, 364-374.

Webb, R., Mathur, A., Chang, R., Baid, S., Nilubol, N., Libutti, S.K., Stratakis, C.A., and

Kebebew, E. (2012). What is the best criterion for the interpretation of adrenal vein sample results in patients with primary hyperaldosteronism? *Ann. Surg. Oncol.* *19*, 1881-1886.

Williams, L.J., Lyons, V., MacLeod, I., Rajan, V., Darlington, G.J., Poli, V., Seckl, J.R., and Chapman, K.E. (2000). C/EBP regulates hepatic transcription of 11beta -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. A novel mechanism for cross-talk between the C/EBP and glucocorticoid signaling pathways. *J. Biol. Chem.* *275*, 30232-30239.

Xia, X., Kar, R., Gluhak-Heinrich, J., Yao, W., Lane, N.E., Bonewald, L.F., Biswas, S.K., Lo, W.K., and Jiang, J.X. (2010). Glucocorticoid-induced autophagy in osteocytes. *J. Bone Miner. Res.* *25*, 2479-2488.

Young, W.F. (2007). Primary aldosteronism: renaissance of a syndrome. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* *66*, 607-618.

Young, W.F., Stanson, A.W., Thompson, G.B., Grant, C.S., Farley, D.R., and van Heerden, J.A. (2004). Role for adrenal venous sampling in primary aldosteronism. *Surgery* *136*, 1227-1235.

Zhou, X., Zhong, Y., Molinar-Inglis, O., Kunkel, M.T., Chen, M., Sun, T., Zhang, J., Shyy, J.Y., Trejo, J., Newton, A.C., *et al.* (2020). Location-specific inhibition of Akt reveals regulation of mTORC1 activity in the nucleus. *Nat. Commun.* *11*, 6088.