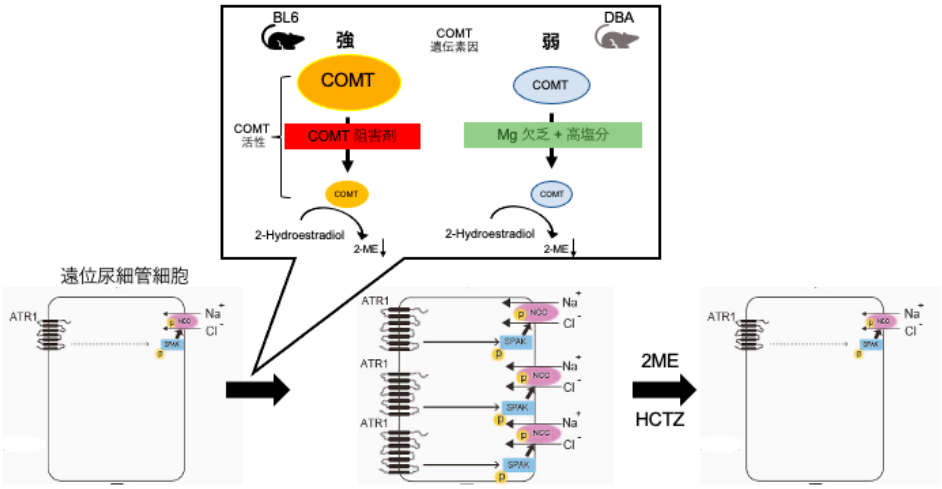
106　COMT機能不全が惹起する健康被害の分子機構解明	金﨑　啓造

【目的】人類の 20%以上がマグネシウム（Mg）欠乏であると考えられる。Mg 欠乏は代謝疾患、心血管疾患、神経疾患などの発症との相関が報告されているが、分子機序解明は未だなされていない。生態内カテコールを基質とする代謝酵素 catechol-O-methyltransferase（COMT）は活性に Mg イオンが必須である。Estradiol は肝臓でシトクロム P450 により hydroxyestradiol に代謝された後、COMT により 2-methoxyestradiol（2-ME）に変換される。2-ME は糖・脂質代謝や血圧恒常性維持など様々な生理活性を有しており、妊娠高血圧腎症（PE）発症においても 2-ME 欠乏の寄与が知られている。塩分感受性高血圧（SSH）は女性では閉経後に発症リスクが増大することが知られ、エストロゲン及びその代謝産物欠乏との関連が示唆される。ヒトでは COMT の活性低下を誘導する single nucleotide polymorphisms が高血圧や PE などの発症と関連すると報告されている。本研究では「遺伝的な COMT 活性低下と Mg 欠乏がさらなる COMT 不全と 2-ME 欠乏を惹起し、SSH を誘導する」という仮説を立て、解析を行った。

【方法】実験 1．3'UTR 構造の違いから遺伝的に高 COMT 活性を有する C57BL/6J（BL6）雄マウスと低 COMT 活性を有する DBA/2J（DBA）雄マウスを用い、7 週齢からコントロール（C）食もしくは Mg 欠乏食を与え、9 週齢より同じ Mg 濃度の高塩分負荷食に変更した。10 週齢より 2-ME、サイアザイド（HCTZ）の連日腹腔内投与を行い、12 週齢で安楽死させた。実験 2．BL6 マウスに C 食を投与後、8 週齢より COMT 阻害剤の連日腹腔内投与を開始した。9 週齢以降は実験 1 と同様に行った。実験 3．DBA 雌マウスを用いて、Mg 欠乏食開始前に卵巣摘出を行い、雄マウスと同様のスケジュールで実験した。

【結果】実験 1、2（COMT 活性の異なる 2 系統のマウス・COMT 阻害剤を用いた解析）：Mg 欠乏は DBA マウスでのみ SSH を誘導し、2-ME は降圧効果を示した。腎臓 COMT 活性は Mg 欠乏・高塩分負荷食を摂取した DBA マウスで低下したが、2-ME 投与で変化を認めなかった。腎臓 COMT 活性低下に関連した SSH は、Na 出納を調節し SSH 発症に寄与するアンジオテンシン受容体 type1-SPAK-NaCl 供輸送体（NCC）経路活性化促進、及び 2-ME による抑制を認めた。COMT 阻害薬でも同様の結果が得られ、さらに NCC 阻害剤である HCTZ は両 SSH 群で降圧効果を示した。実験 3（卵巣摘出雌 DBA マウスを用いた解析）：Mg 欠乏は卵巣摘出群でのみ SSH を誘導し、2-ME 投与は降圧効果を示した。SSH を発症した雌マウスは他群に比し尿アルブミンが増加し、2-ME 投与で有意に低下した。

Mg 欠乏は COMT 活性抑制を介して 2-ME 欠乏を惹起し、SSH を惹起する



106. COMT 機能不全が惹起する健康被害の分子機構解明

金﨑　啓造

島根大学 医学部 内科学講座（内科学第一）

Key words：COMT，エストロゲン，遺伝子多型，マグネシウム，塩分感受性高血圧

緒　言

研究代表者は妊娠 *COMT* ノックアウトマウスの解析から 2-methoxyestradiol（ME）欠乏に起因した細胞外基質代謝異常-血管新生異常が妊娠高血圧腎症（PE）の本態である可能性を報告した［1］。COMT はカテコールアミンを不活化する一方、estradiol から中間代謝産物 hydroxy-estradiol を基質として 2-ME を産生する（図 1）。PE の既往は将来のメタボリックシンドロームや塩分感受性高血圧（SSH）［2］、慢性腎臓病（CKD）の危険因子と報告されている。PE とメタボリックシンドローム・CKD の間には、血管内皮細胞障害やインスリン抵抗性、蛋白尿、塩分感受性高血圧（SSH）など共通する臨床的特徴がある。ヒト *COMT* 遺伝子には mRNA・蛋白の安定性を制御する遺伝子多型・haplotype が知られている［3］。最もよく知られる機能的遺伝子多型（rs4680：G-A 変異）により COMT 蛋白の Val 158 が Met 158 に変異し、COMTMet158 蛋白は不安定かつ低い酵素活性を有する［3］。COMTMet158 は総人口の～30%に存在し、PE［4］のみならず、代謝・高血圧疾患・CKD などの生活習慣病との相関も報告されている。実際、COMT/2-ME 不全は妊娠または高脂肪食摂取マウスで耐糖能異常の［5］、PE の高血圧発症分子機序と考えられている angiotensin Ⅱ（ATⅡ）に対する昇圧感受性の［6］原因となることを見出し報告した。疫学的調査結果・臨床特徴を鑑みると、これら疾病群の説明に「COMT 不全関連疾病群」という概念の提唱と COMT 不全を直接標的とした治療戦略の拡充が望まれる。しかしながら、COMT 不全遺伝素因は周知であるにも関わらず、現時点では疾病群のスクリーニング法や治療介入手段は存在しない。

COMT 不全は遺伝素因のみならず、様々な COMT 阻害因子（内因性：ホモシステイン（Hcy）、外因性：水銀、PCB、ダイオキシン etc.）にても惹起され、遺伝素因との相互作用によりそれらがさらに増強されると考えられる。また COMT の酵素活性には Mg イオンが重要な役割を担っていることが知られている（図 1）。Mg^{2+}が COMT に結合することにより catechol 構造を有する基質の水酸基がよりイオン化しやすくなり、メチルドナーからのメチル基転移反応がスムースに起こりやすくなる［7］。興味深い事に、重症の PE・子癇では作用機序は明らかでないものの歴史的に硫酸 Mg が投与されてきた。また、メタボリックシンドロームや 2 型糖尿病症例では Mg 欠乏がインスリン抵抗性やインスリン分泌不全に寄与する可能性も報告されている。また、ATⅡの組織障害に対して Mg が拮抗することも示されている。予備的検討で得られた COMT 及び 2-ME 不全に起因する健康被害に関して、実臨床では Mg 欠乏により惹起された COMT 不全、結果として生じる 2-ME 欠乏に起因する可能性がある。世界人口の 20%以上が Mg 欠乏であると言われている。

SSH は女性では閉経後に発症リスクが増大することが知られ、エストロゲン及びその代謝産物の欠乏との関連が示唆される。ヒトでは COMT の活性低下を誘導する single nucleotide polymorphisms が高血圧や PE などの発症と関連すると報告されている。本研究では「遺伝的な COMT 活性低下と Mg 欠乏がさらなる COMT 不全と 2-ME 欠乏を惹起し、SSH を誘導する」という仮説を立てた。遺伝的 COMT 不全を有する実験動物モデルを用いた解析を通して、COMT 遺伝素因ー環境因子間の相互作用がもたらす意義、「COMT 不全関連疾病群」の概念を確立する為の基盤となる解析を行う。

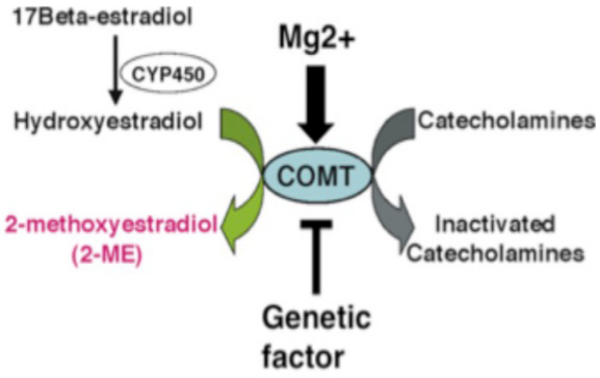


図 1. COMT によるカテコールの代謝

COMT は catecholamine の代謝・不活化をする事に責任を有するのみならず、17 beta-estradiol の代謝産物である 2-ME の様な活性を有するメトキシ化合物産生に重要である。COMT 酵素活性には Mg^{2+}が必須である。

方　法

1. C57BL6（強 COMT）および DBA（弱 COMT）マウスを用い、遺伝的な COMT 酵素活性レベルの違いが Mg 欠乏と相互作用の結果、表現型に及ぼす影響の解析

C57BL6 マウスに比し、DBA マウスでは COMT 蛋白発現レベル・活性が低下しており、その相違の原因として C57BL6 マウスの COMT 3`UTR 近位側に存在する insertion の存在が知られている。

高 COMT 活性を有する C57BL/6J（BL6）雄マウスと低 COMT 活性を有する DBA/2J（DBA）雄マウスを用い、7 週齢からコントロール（C）食もしくは Mg 欠乏食を与え、9 週齢より同じ Mg 濃度の高塩分負荷食に変更した。10 週齢より 2-ME、サイアザイド（HCTZ）の連日腹腔内投与を行い、12 週齢で安楽死させた（図 2）[8]。

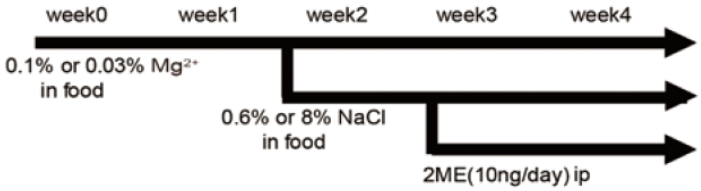


図 2. Mg 欠乏食および高塩分負荷食開始・2-ME 介入の protocol

COMT 活性の異なる 2 系統のマウス（BL6 と DBA）を用いた解析。7 週齢の各系統マウスに正常 Mg 食（0.1%）と低 Mg 食（0.03%）を 2 週間与え、その後高塩分負荷、2-ME 介入をさらに行った。

2. 高 COMT 活性を有する C57BL/6J（BL6）雄マウスに COMT 活性阻害薬を投与し、目的 1 で得られた表現系の確認

BL6 マウスに C 食を投与後、8 週齢より COMT 阻害剤の連日腹腔内投与を開始した。9 週齢以降は実験 1 と同様に行った。

3. 卵巣摘出（OVX）マウスを用いて、2-ME の材料であるエストロゲン欠乏が COMT 活性低下と相互作用して SSH を惹起するかどうか検討

低 COMT 活性を有する DBA/2J（DBA）雌マウスを用いて、一部には Mg 欠乏食開始前に卵巣摘出を行い、雄マウスと同様のスケジュールで実験した（図 3）[8]。

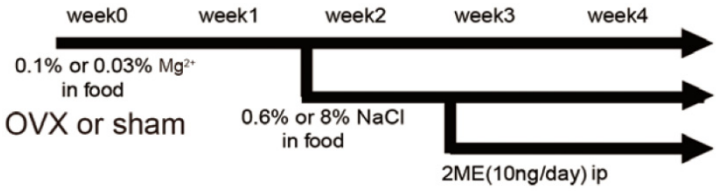


図 3. 卵巣摘出及高塩分負荷食開始・2-ME 介入の protocol

卵巣摘出 DBA マウスを用いた解析。7 週齢雌 DBA マウスに sham もしくは OVX を施行し、各マウスに正常 Mg 食（0.1%）と低 Mg 食（0.03%）を 2 週間与え、その後高塩分負荷、2-ME 介入をさらに行った。

結　果

1. COMT 遺伝素因と Mg 欠乏の相互作用が更なる COMT 活性抑制を惹起し SSH 発症を誘導した

Mg 欠乏が COMT 活性抑制を介して SSH 誘導をするという仮説のもと検討を行った。

1）DBA では、高塩分負荷により尿中 Mg 排泄量が増加した。高 COMT 活性を有する C57BL/6J（BL6）雄マウスに低 COMT 活性を有する DBA/2J（DBA）雄マウスを解析したところ、もともと DBA では BL6 より血中 Mg 濃度が低かった。Mg 欠乏食負荷により両マウスとも血中 Mg 濃度が低下した。高塩分負荷時、BL6 では尿中 Mg 排泄は著変なかったが、DBA では尿中 Mg 排泄が増加した。

2）COMT 活性は BL6＞DBA であり、低 Mg／高塩分負荷は DBA でのみ腎臓 COMT 活性を低下させた（図 4）[8]。

3）Mg 欠乏は DBA マウスでのみ SSH を惹起した。2-ME 投与は降圧効果を認めた（図 5）[8]。

4）COMT 阻害薬投与にても塩分感受性高血圧が惹起された。

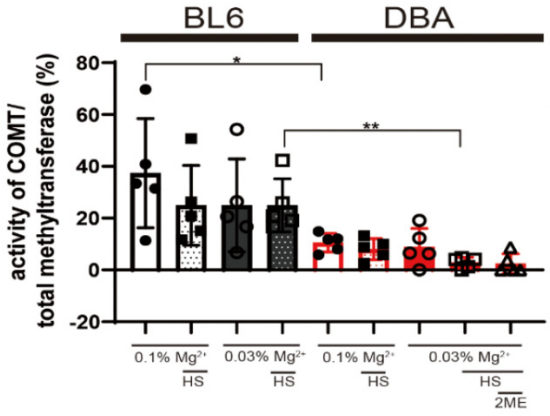


図 4. Mg 欠乏高塩分食摂取 DBA で腎臓 COMT 活性はさらに低下した

腎臓抽出タンパク 1 g 中の COMT 活性。COMT 阻害薬孵置の有無にてメチルトランスフェラーゼ活性を測定し、COMT 活性＝（総メチルトランスフェラーゼ活性 - 非 COMT メチルトランスフェラーゼ活性）にて算出した。

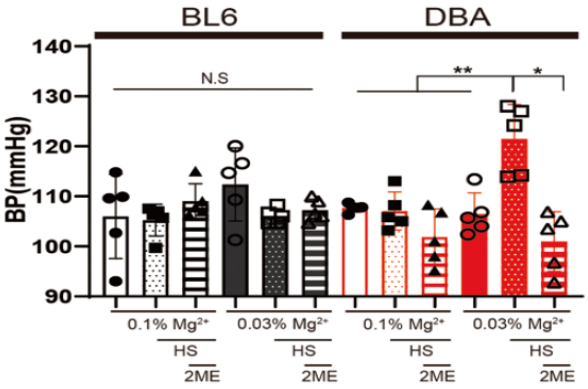


図 5. DBA マウスでは Mg 欠乏食で塩分感受性高血圧を認めた

試験最終日の収縮期血圧。BL6 マウスでは Mg 欠乏（0.03%）の元でも高塩分負荷で血圧は著変ないが、DBA では Mg 欠乏（0.03%）の基、高塩分負荷により高血圧が誘導された。

2. 腎臓 COMT 活性低下に関連した SSH は、Na 出納を調節し SSH 発症に寄与するアンジオテンシン受容体 type1-SPAK-NaCl 供輸送体（NCC）経路活性化促進と関連した

SSH 惹起に根拠がある Angiotensin receptor type 1（ATR1）、STE20/SPS1-related Pro/Ala-rich kinase（SPAK）、Na^+Cl^-供輸送体（NCC）機構の解析を行った（図 6）[8]。

1）腎臓抽出蛋白 western blot で ATR1、pSPAK、pNCC は Mg 欠乏・高塩分負荷 DBA マウスと COMTi 投与 BL6 マウスで活性化を認め、2-ME 投与で抑制された。

2）SSH 発症モデルにおいて NCC 阻害薬であるサイアザイド（HCTZ）による降圧効果を確認した。

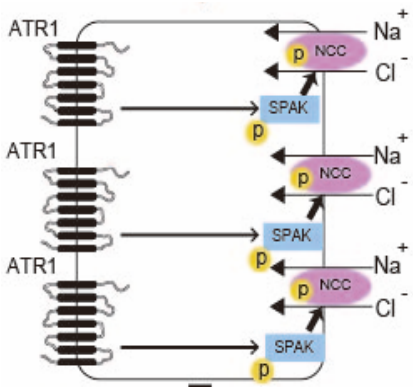


図 6. SSH 惹起における ATR1-SPAK-NCC 機構活性化

COMT 活性が低下する環境（COMT 阻害薬投与、Mg 欠乏 DBA）では尿細管細胞において SSH の病態に根拠のある ATR1、SPAK、NCC の活性が認められ、これらは 2-ME にて抑制された。

3. OVX-DBA マウスでは Mg 欠乏は SSH を惹起した

卵巣摘出により 2-ME の材料となるエストロゲンレベルは低下し、2-ME 産生が困難になると考えられるため、非 OVX 群と OVX 群において Mg 欠乏が演じる SSH 誘導の有無・機序を解析した。

1）OVX により Mg 欠乏は SSH を惹起した。2-ME 投与は降圧効果を認めた（図 7）[8]。

2）OVX は Mg 欠乏・高塩分負荷による COMT 活性低下が顕著であった（図 8）[8]。腎臓抽出蛋白 western blot では、Mg 欠乏・高塩分負荷の OVX 群で ATR1-SPAK-NCC 経路の活性化を示し、2-ME 投与はこの経路を抑制した。

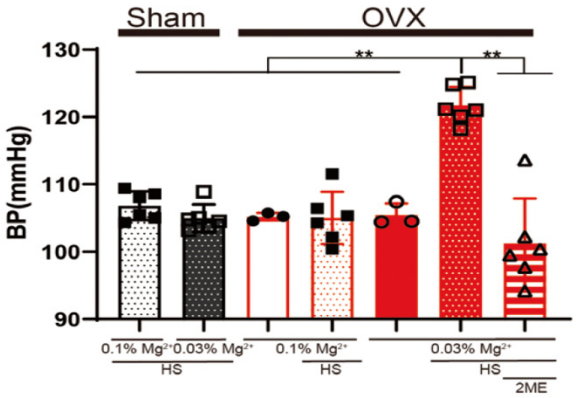


図 7. Mg 欠乏高塩分食摂取 OVX-DBA でのみ SSH が誘導、2-ME は抑制した

試験最終日の収縮期血圧。Sham DBA 雌マウスでは Mg 欠乏（0.03%）の元でも高塩分負荷で血圧は著変ないが、OVX DBA マウスでは Mg 欠乏（0.03%）の基、高塩分負荷により高血圧が誘導され、2-ME にて抑制された。

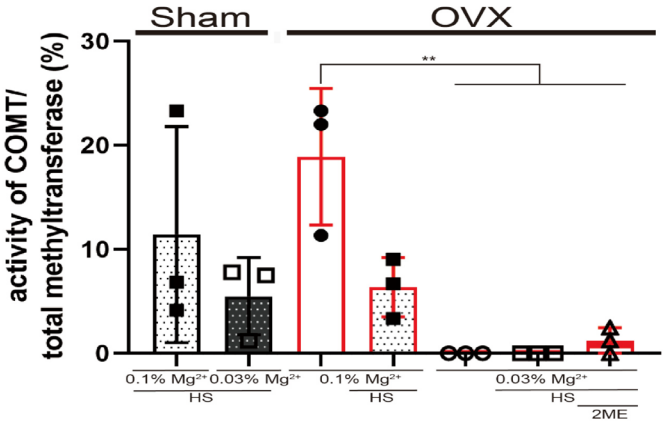


図 8. Mg 欠乏高塩分食摂取 OVX-DBA では著しい COMT 活性抑制が認められた

Sham DBA 雌マウスでは Mg 欠乏（0.03%）の元でも COMT 活性は抑制されないが、OVX DBA マウスでは Mg 欠乏（0.03%）の基、COMT 活性は著しく抑制された。2-ME は COMT 活性を上昇させなかった。

考　察

1. COMT 活性と Mg 欠乏、高塩分摂取に関して

今回我々は、遺伝的低 COMT 活性を有する DBA マウスで Mg 欠乏が COMT 活性低下を介して SSH を惹起することを明らかにした。DBA マウスで高塩分負荷により尿中 Mg 排泄量が増加したことが細胞内 Mg 濃度低下を介して COMT 活性を低下させた可能性がある。塩分感受性高血圧患者では血漿 Mg に変化は認めないが、細胞内 Mg は有意に低下していると報告されている［9］。

2. エストロゲン代謝不全、COMT 不全 と SSH

今回我々は、SSH の発症に、エストロゲンの最終代謝産物である 2-ME の欠乏が関与していることを明らかにした。PE 妊婦は血漿 2-ME 値が有意に低下していることを研究代表者が世界ではじめて報告しているが、COMT 弱遺伝素因を有する症例では Mg 欠乏の結果としての 2-ME 欠乏が男性・閉経後女性においても SSH 発症リスクとなることが示唆された。実際、PE 既往女性は閉経前でも SSH 発症リスクが高いこと［2］、Dahl 塩分感受性ラット（DR）は慢性高血圧ラットに比して加重型 PE 発症リスクが高い［10］ことも報告されている。

共同研究者・謝辞

本研究は既に文献８（2021 Apr 12;HYPERTENSIONAHA12016377.　doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.16377.）に掲載されている。本研究は金沢医科大学糖尿病内分泌内科学講座の古家大祐先生、順天堂大学医学部産婦人科学講座の熊谷麻子先生、板倉敦夫先生、竹田省先生、東京医科歯科大学腎臓内科の内田信一先生、蘇原映誠先生、日本大学薬学部生物有機化学研究室の飯島洋先生との共同研究である。

本研究は主に、上原記念生命科学財団研究推進特別奨励金、及び、科学研究費補助金基盤研究（C）（19K08738）を用いて行った。

文　献

1） Kanasaki K, Palmsten K, Sugimoto H, Ahmad S, Hamano Y, Xie L, et al. Deficiency in catechol-O-methyltransferase and 2-methoxyoestradiol is associated with pre-eclampsia. Nature. 2008;453(7198):1117-21. doi: 10.1038/nature06951. PubMed PMID: 18469803.

2） Martillotti G, Ditisheim A, Burnier M, Wagner G, Boulvain M, Irion O, et al. Increased salt sensitivity of ambulatory blood pressure in women with a history of severe preeclampsia. Hypertension. 2013;62(4):802-8. Epub 2013/08/28. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01916. PubMed PMID: 23980074.

3） Tunbridge EM, Harrison PJ, Weinberger DR. Catechol-o-methyltransferase, cognition, and psychosis: Val158Met and beyond. Biol Psychiatry. 2006;60(2):141-51. Epub 2006 Feb 14. PubMed PMID: 16476412.

4） Roten LT, Fenstad MH, Forsmo S, Johnson MP, Moses EK, Austgulen R, et al. A low COMT activity haplotype is associated with recurrent preeclampsia in a Norwegian population cohort (HUNT2). Molecular human reproduction. 2011;17(7):439-46. Epub 2011/03/01. doi: 10.1093/molehr/gar014. PubMed PMID: 21355050; PubMed Central PMCID: PMC3116680.

5） Kanasaki M, Srivastava S, Xu L, Kudoh S, Kitada M, Ueki N, et al. Deficiency in catechol-o-methyltransferase is linked to a disruption of glucose homeostasis in mice. Sci Rep. 2017;in Press.

6） Ueki N, Kanasaki K, Kanasaki M, Takeda S, Koya D. Catechol-O-Methyltransferase Deficiency Leads to Hypersensitivity of the Pressor Response Against Angiotensin II. Hypertension. 2017;69(6):1156-64. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.09247. PubMed PMID: 28461606.

7） Tsao D, Diatchenko L, Dokholyan NV. Structural mechanism of S-adenosyl methionine binding to catechol O-methyltransferase. PLoS One. 2011;6(8):e24287. Epub 2011/09/10. doi: 10.1371/journal.pone.0024287. PubMed PMID: 21904625; PubMed Central PMCID: PMCPMC3164188.

8） Kumagai A, Takeda S, Sohara E, Uchida S, Iijima H, Itakura A, et al. Dietary Magnesium Insufficiency Induces Salt-Sensitive Hypertension in Mice Associated With Reduced Kidney Catechol-O-Methyl Transferase Activity. Hypertension. 2021:HYPERTENSIONAHA12016377. Epub 2021/04/13. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.16377. PubMed PMID: 33840199.

9） Resnick LM, Gupta RK, DiFabio B, Barbagallo M, Mann S, Marion R, et al. Intracellular ionic consequences of dietary salt loading in essential hypertension. Relation to blood pressure and effects of calcium channel blockade. J Clin Invest. 1994;94(3):1269-76. Epub 1994/09/01. doi: 10.1172/JCI117445. PubMed PMID: 8083368; PubMed Central PMCID: PMCPMC295212.

10） Gillis EE, Williams JM, Garrett MR, Mooney JN, Sasser JM. The Dahl salt-sensitive rat is a spontaneous model of superimposed preeclampsia. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2015;309(1):R62-70. Epub 2015/04/24. doi: 10.1152/ajpregu.00377.2014. PubMed PMID: 25904684; PubMed Central PMCID: PMCPMC4491533.