

原発性アルドステロン症に対する臨床的検討

辻畑正雄・吉村一宏・奥山明彦

大阪大学大学院医学系研究科臓器制御医学 器官制御外科学（泌尿器科学）

研究概要

原発性アルドステロン症に対する外科的治療について当科で施行してきた開放手術と鏡視下手術を比較検討し、鏡視下手術にて経験した合併症について詳細に検討した。さらに外科的治療施行後も持続する高血圧症例について術前・術後のホルモン動態も含め、詳細に検討を加えた。外科的治療では開腹手術に比べ、鏡視下手術の方が術後摂食・歩行開始が早く、平均出血量および鎮痛剤の使用回数・使用量が有意に少ない結果が得られた。鏡視下手術における合併症は9.4%に認められ、全例術中・術後の出血であった。しかし最近9年間は合併症を認めていない。以上より原発性アルドステロン症における鏡視下副腎摘除術は、侵襲性・安全性において有用であると考えられた。さらに原発性アルドステロン症の外科的治療後も持続する高血圧症のため降圧剤を服用している症例を25.6%認めた。それらの症例について検討したところ、術前・術後のホルモン動態に差は見られなかったが、術後高血圧持続症例は男性に多く、高齢者に多い傾向を示した。また負荷試験検査を含め、術前の未施行検査が多い傾向を示した。以上より原発性アルドステロン症に対する治療において本態性高血圧症の合併も視野に入れて術前検査を徹底する必要があると考えられた。

A. 研究目的

原発性アルドステロン症の臨床症例について画像診断法の特徴と有用性および外科的治療方法の決定と選択について詳細に検討する。また、術中、術後の呼吸、循環、ホルモン電解質動態についても検討する。

B. 研究方法

対象は1990年2月から2003年12月の間に当科で外科的治療を施行された原発性アルドステロン症（全てアルドステロン産生腺腫）63例で、1990年2月から1992年8月の間に施行された開放手術による10例（男性6例、女性4例）と1992年9月から2003年12月の間に施行された鏡視下手術による53例（男性25例、女性18例）である。まず開放手術10例と最も最近施行した鏡視下手術10例に対して手術時間、

出血量、経口摂取・歩行開始時期、鎮痛剤使用量、術後在院日数について比較検討した。また鏡視下手術53例において治療成績を検討し、特に合併症について詳細な検討を加えた。次に、鏡視下副腎摘除術を施行された53例中、術後2ヶ月以上の期間、経過をfollowできた39例（男性19例、女性20例）を対象として、術後降圧剤を必要とする高血圧症持続症例について検討を行った。術前施行検査としてCT、副腎シンチ、静脈サンプリング、生食負荷試験、カプトリル負荷試験、フロセミド立位負荷試験を行い、各症例における術前検査施行率、術前・術後のホルモン動態、などについて詳細な検討を加えた。

（倫理面での配慮）術前に患者に対して十分なインフォームド・コンセントを得て本術式を施行した。

C. 研究結果

鏡視下手術と開放手術の比較結果を表1に示す。平均手術時間は開放手術の方が短かったが、その他のパラメーター（平均出血量、経口摂取・歩行開始時期、鎮痛剤使用量、術後在院日数）において鏡視下手術が優っていた。また鏡視下手術53例の治療成績を表2に示す。平均手術時間は261.2分であるが、開始当初に長時間を要していたため、最近はほとんど全て180分以内で手術を終了している。また平均出血量においても同様で、最近ではほとんど出血なしで手術は行われている。鏡視下手術における合併症を表3に示す。我々が経験した合併症は53例中5例（9.4%）で全例術中・術後の出血であった。また5例中3例は右側の症例で肝下面癒着を原因とし、肝損傷によるものであった。しかし、最近9年間は合併症を認めていない。次に、鏡視下副腎摘除術を施行された53例中、術後2ヶ月以上の期間、経過をfollowできた39例における術前検査施行率および診断率を表4に示す。CTや副腎シンチの施行率は高いが、静脈サンプリングや各種負荷試験の施行率は低かった。また副腎シンチの診断率は低い傾向を示した。血漿アルドステロン濃度は術後全例正常値を示し、血漿レニン活性もほとんどの症例で回復していた。しかし術後降圧剤服用を必要とした症例を10例（25.6%）認めた。（表5）これらの症例においてホルモン動態には明らかな差を認めなかったが、10例中8例が男性であり、平均年齢は64.3歳で全体の50.1歳に比べ明らかに高い傾向を示した。また術後高血圧持続症例は負荷試験検査を含め、術前の未施行検査が多い傾向を示した。

D. 考察

当科では1992年9月より鏡視下副腎摘除術を開始しており、2003年12月までの間に87例施行しており、そのうち53例（60.9%）が原発性アルドステロン症で最も多い疾患である。副腎腫瘍に対する外科的治療は開放手術から鏡視下手術へとコンバートされ、現在 gold standard となっている。今回の研究結果においても開放手術と鏡視下手術の比較において安全性および侵襲性のパラメーターで明らかに鏡視下手術の方が優っていた。また合併症においても全体の9.4%に認められたが、ほとんどが鏡視下手術開始当初のものであり、最近の9年間は合併症を経験していない。ただ肝下面の癒着が認められる症例では肝損傷に注意して手術を行う必要があると考えられ、その際は後腹膜アプローチよりは経腹膜のアプローチを選択する方がベターであると考えられた。

また、原発性アルドステロン症に対して外科的治療後も引き続き降圧剤を必要とする高血圧症が持続する症例をしばしば経験する。今回の研究において25.6%の症例で術後高血圧持続を認め、比較検討において男性であることと、高齢者であることが要因になりうると推測された。またそれらの症例は負荷試験検査を含め、術前の未施行検査が多い傾向を示した。これは泌尿器科単独で診断し治療を行う症例は、術前検査が十分施行されていないことが多く、内科から外科的治療目的で紹介されてきた症例は負荷試験検査を含め、術前検査がきっちり施行されることが多い傾向にある。原発性アルドステロン症の術後も降圧剤の服用を必要とする高血圧症が持続する要因として男性および高齢が関与しているのではないかと考えられことから、本態性高血圧症

の合併も視野に入れて術前検査を徹底する必要があると考えられた。

E. 結論

原発性アルドステロン症における外科的治療において鏡視下手術は、侵襲性・安全性においてきわめて有用であると考えられた。また、外科的治療後においても本態性高血圧症の合併も視野に入れて術前検査を徹底する必要があると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

吉村一宏、奥山明彦：一副腎一疾患別術前・術後の管理 インターメルク、2003、219-229.

O. Miyake, A. Okuyama : Surgical management Of primary aldosteronism. Biomed & Pharmacother 2000, 54 Suppl 1, 25-31

O. Miyake, K. Yoshimura, T. Yoshioka, M. Honda, K. Matsumiya, Y. Kokado, T. Miki, A. Okuyama : Operating time and complications in laparoscopic adrenalectomy. Japanese Journal of Endourology and ESWL, 1998, 11, 31-34

2. 学会発表

辻畑正雄、鄭 則秀、辻川浩三、吉村一宏、三宅 修、奥山明彦 当科における内視鏡下副腎摘除術の検討 第15回日本内分泌外科学会総会、京都、2003

三宅 修、垣本健一、吉村一宏、辻畑正雄、高原史郎、奥山明彦：内分泌腫瘍に対する鏡視下手術—副腎— 第14回日本内分泌外科学会総会、大阪、2002

三宅 修、垣本健一、吉村一宏、辻畑正雄、松宮清美、高原史郎、奥山明彦 当科における腹腔鏡下、後腹膜腔鏡下副腎摘出術の治療成績。第15回日本 Endourology ESWL 学会、名古屋、2001

吉村一宏、三宅 修、松宮清美、高原史郎、吉岡俊昭、三木恒治、奥山明彦 褐色細胞腫に対する腹腔鏡下副腎摘除術の経験。第10回日本内分泌外科学会、宇都宮、1998.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

鏡視下手術と開放手術の比較 (表 1)

	鏡視下手術	開放手術	P value
	(最近の症例)		
	N = 10	N = 10	
平均手術時間 (分)	201	133	0.0040
平均出血量 (ml)	77	299	0.0021
経口摂取 (日)	1.5	2.3	0.0011
歩行開始 (日)	1.3	4.0	<0.0001
鎮痛剤 硬麻 (日)	1.0	2.7	<0.0001
NSAID (mg)	39.7	98.9	0.0018
術後在院日数 (日)	9.1	13.3	0.0022

鏡視下副腎摘除術53例の治療成績 (表 2)

性差 (例)	男性: 25 女性: 28
年齢 (歳)	50.1 (25 - 80)
患側 (例)	右:24 左:29
手術時間 (分)	261.7 (95 - 835)
出血量 (ml)	204.2 (10 - 3740)
経口摂取 (日)	1.5 (1 - 6)
歩行開始 (日)	1.7 (1 - 7)
術後在院日数 (日)	10.1 (5 - 20)
腫瘍径 (cm)	2.2 (0.5 - 7.0)

鏡視下手術における合併症（表3）

No	手術日	合併症の内容	患側	到達法	手術時間（分）
4	93.11.29	術中出血	左	TP	455
7	94.3.30	術中出血	右	TP	405
9	94.6.22	術中出血	左	TP	835
11	95.3.1	術後出血	右	RP	340
12	95.9.20	術中出血	右	RP	340

TP: transperitoneal approach
RP: retroperitoneal approach

術前検査項目（表4）

検査項目	症例数 (%)	診断 (%)
CT	39 (100)	33 (84.6)
副腎シンチ	33 (84.6)	21 (63.6)
静脈サンプリング	21 (53.8)	19 (90.5)
生食負荷試験	17 (43.6)	抑制 (-) : 17 (100)
カプトリル負荷試験	22 (56.7)	抑制 (-) : 22 (100)
フロセミド立位負荷試験	7 (17.9)	抑制 (-) : 7 (100)

術後高血圧持続症例（表5）

- 術後降圧剤服用を必要とした症例：10例

No	年 齢	性	CT	副腎 シンチ	静脈 サンプリング	生食 負荷	カプト リル負荷	フロセミド 立位負荷
1	56	M	○	○	—	—	—	—
2	48	M	○	—	—	○	—	—
3	62	M	○	—	—	—	○	—
4	75	F	○	○	—	○	—	—
5	56	M	○	—	—	—	○	—
6	65	M	○	○	—	—	○	—
7	80	M	○	○	○	—	—	—
8	63	F	○	○	—	—	—	—
9	70	M	○	○	—	—	—	—
10	68	M	○	○	—	—	—	—

CYP11B2の遺伝型～表現型相関： 正常副腎・原発性アルドステロン症における検討

宗 友厚、諏訪哲也、武田 純
岐阜大学医学部内分泌代謝病態学分野

研究要旨

正常副腎・アルドステロン産生副腎腺腫 (APA) のアルドステロン合成酵素 (B2) の発現レベルが同遺伝子 (CYP11B2) の K173R 多型 (第3エクソン) と関連するかどうかを検討した。さらに、Ad4BP/SF1 遺伝子 (NR5A1) の G146A 多型や SF1 発現レベルとの関連についても検討した。組織中の 11β 水酸化酵素 (B1)、B2 及び GAPDH (G) の mRNA 量は競合的 RT-PCR 法により、SF1 発現レベルはリアルタイム PCR 法により定量した。K173R 多型は PCR-RFLP (Cvn I) 法によって、G146A 多型は DNA シークエンス法によって解析した。

APA では B1/G、B2/G とともに正常副腎より高値であった。K173R 多型に関し、正常副腎では KR 型の B2/G、B2/B1 比は RR 型より高値であり、APA 組織の B2/B1 比は KK 型が RR 型よりも高値であった。さらに APA 患者の尿中アルドステロン排泄量は KK 型が RR 型よりも高値であった。また 173R アリルの転写効率は 173K アリルの 52% と推定された。SF1 発現レベルは、G146A 多型とは関連しなかったが、APA 組織中の B1/G と正相関し、B2/B1 比とは逆相関した。

CYP11B2 の K173R 遺伝型は、正常副腎・APA 組織の B2 発現レベル、APA のアルドステロン分泌能と関連し、APA 組織の B2 発現レベルは SF1 発現レベルの影響を受けると考えられた。

A. 研究目的

副腎皮質球状層で合成されるアルドステロンは、体液量を調節し血圧調節に必須の役割を担うミネラルコルチコイドの代表であり、CYP11B2 にコードされるアルドステロン合成酵素 P450_{ald} がその産生を規定する主因子である。アルドステロン産生腺腫 (APA) は、腫瘍中 CYP11B2 の発現異常により自律的なアルドステロン過剰産生をきたし、低レニン・低カリウム血症を伴った高血圧症に至る疾患であるが、最近その頻度が想像以上に高いことが示唆され、一般の高血圧症患者におけるスクリーニングの必要性が叫ばれている。

CYP11B 2 は、副腎皮質束状層でコ

チゾール生合成を担う P450_{c11} (11β 水酸化酵素) をコードする遺伝子 CYP11B1 に隣接する形でヒト第8染色体上に存在し、互いに極めて高い相同性を有する。CYP11B2 には、プロモーター領域の -344T/C 多型と第2イントロンでの CYP11B1 への広汎な遺伝子転換多型、という2つの頻度の高い多型が存在し、さらにコード領域第3エクソン内には -344T/C 多型と連鎖する Lys173Arg 多型 (K173R) が存在する。これら多型と血圧・アルドステロン分泌・心構造との関連が注目されているが、一致した結論に至っておらず、また副腎皮質での CYP11B2 発現自体にこれらの多型が関係するののかどうかについては全く不明で

ある。

プロモーター-344T/C多型の存在する領域は、ステロイドホルモン合成酵素の発現に必須の転写因子であるAd4BP/SF1 (adrenal 4-binding protein/steroidogenic factor 1)の結合部位であると予測されていたが、最近現実には結合することが示された。SF1をコードする遺伝子NR5A1にも第4エクソン内にGly146Ala (G146A)多型の存在が知られている。

今回の研究では、APA組織中のCYP11B2発現レベルやAPA患者の臨床データとK173R多型との関係、SF1発現レベルとG146A多型との関連、さらにCYP11B2とSF1との相互関連についても検討した。

B. 研究方法

1. 対象

1992年から2002年までの間に岐阜大学医学部附属病院および関連病院にて片側副腎摘出術を受けたAPA患者26例(男性10例/女性16例、25~58歳)の腺腫組織、腎癌手術時に得た正常副腎組織14例を対象とした。各組織は摘出後速やかに-80℃で冷凍保存した。なお、対象患者からはいずれも予め書面でインフォームドコンセントを得た。血清電解質やホルモン測定は、早朝空腹時にそれぞれ30分以上の仰臥位を保った後に採血した。血漿レニン活性(PRA)、血漿アルドステロン濃度(PAC)、ACTH、血漿コルチゾール(F)、および24時間尿中アルドステロン排泄量(uAld)は市販のRIAキットを用い測定した。

2. GenotypingとmRNAレベルの定量

凍結組織からtotal RNAを抽出し、DNase処理後、逆転写反応に供しcDNAサンプルを得た。CYP11B2のK173R多

型は、5'-GCT CGG GCC CCT AGG ACG-3'(sense, nt 85-102)と5'-TGC ACA GAT GCC TGT GTA GTG-3'(antisense, nt 853-783)の各プライマーを用いPCR-RFLP (Cvn I)法により検出した。また正常副腎のうち本多型のheterozygoteすなわちKR型のサンプルにつき、 ϕ X174-Hae III断片をスタンダードとして各バンド濃度を測定し、KおよびR各アリの転写効率を推測した。NR5A1のG146A多型は、5'-GCT GTC CCT TCT GCC GCT TCC-3'(s, nt 191-211)と5'-GCC CGC ACC TGG TCC TCA TC-3'(as, nt 706-725)の各プライマーを用いPCR-direct sequence法(ABI3100を使用)により同定した。

CYP11B1、CYP11B2とglyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)のmRNAレベルは、PCR MIMIC™ KIT (Clontech)を用いた競合的PCR法により定量した。各遺伝子に特異的なプライマーとして、CYP11B1: 5'-TGC GCG TGT TCC TCT ACT CT-3'(s, nt 1208-1227) & 5'-AGA GAC GTG ATT AGT TGA TG-3'(as, nt 1503-1522)、CYP11B2: 5'-AGA GAC GTG ATT AGT TGA TG-3'(s, nt 1208-1227) & 5'-AGA TGC AAG ACT AGT TAA TC-3'(as, nt 1503-1522)、GAPDH: 5'-GCC AAG GTC ATC CAT GAC AAC-3'(s, nt 487-507) & 5'-AGT GTA GCC CAG GAT GCC CTT-3'(as, nt 817-837)、を用いた。2.5倍希釈系列のcompetitorと共に競合的PCRを行い、産物をゲル泳動後、写真をコンピューターに取り込み、NIH image 1.60 (Rasband W, N.I.H)で解析した。SF1のmRNAレベルは、5'-CAG CAG AAG AAG GCA CAG A-3'(s, nt 319-337)と5'-CAG GAA AGG CAG GGT AGA G-3'

(as, nt 550-568) を用い、リアルタイムPCR法(Roche Light Cyclerを使用)により定量、同じサンプルのGAPDHも5'-TCA TCA TCT CTG CCC CCT CTG CTG-3'(s, nt 362-385) & 5'-GAC GCC TGC TTC ACC ACC TTC TTG-3'(as, nt 780-803) を用い定量した。DNase処理や逆転写効率の違いによるサンプル間のばらつきを最小限にするため、mRNAレベルはhousekeeping geneの一つであるGAPDHのmRNAレベルに対する比として表した(B1/G、B2/G、SF1/G)。

データはmean ± SEで表示し、群間の差はMann-WhitneyあるいはBonferroni/Dunn testで検定、2変数間の関係は直線回帰にて評価した。なお正規分布性については予めBartlett testにて検定し、必要な場合にはlog変換を行った。

C. 研究結果

1. CYP11B2、CYP11B1、SF1 mRNA 定量

正常副腎におけるCYP11B2およびCYP11B1 mRNA発現量は、GAPDH mRNA発現量のそれぞれ約0.7%及び約19%であった(B2/GおよびB1/G; 図1)。APA組織では、B2/Gが正常副腎の35倍強とかなり高値($P < 0.0001$)であるのみならず、B1/Gも正常副腎の4.3倍と高値であった($P < 0.05$)。また、特に正常副腎の髓質や皮質各層の含有割合を補正する目的で算定したB2/B1比は、APA組織において正常副腎の約10倍と高値($P < 0.0001$)であった。一方、正常副腎におけるSF1 mRNA発現量はGAPDH mRNA発現量の約4分の1であり、APA組織のSF1/Gは正常副腎の60%とやや低目であったが有意差は無

かった(図1右)。

B2/GとB1/Gの関係については、APA群で有意な正相関を認めた(図2左上)が、正常副腎では有意な相関はなかった。さらにAPA組織のCYP11B2発現レベル(B2/Gあるいは $\log B2/G$)と各APA患者の臨床・生化・ホルモン所見との関係についても検討したが、腫瘍サイズ・ACTH・F・PAC・uAld値との間(図2)、また血清カリウム($r = -0.006$)・PRA($r = -0.030$)値との間にも有意な直線的相関は検出されなかった。

SF1/GとB2/G、B1/Gの相互関係については、正常副腎14例では有意な相関は認めなかったが、APA組織26例の検討では、SF1/GはB1/Gと正相関しB2/B1と逆相関(図3)した。

2. CYP11B 2 K173R 多型との関連

正常副腎におけるB2/Gは、KK 8.1 ± 2.6 ($\times 10^{-3}$, $n = 5$)、KR 10.8 ± 1.4 ($n = 5$)、RR 2.6 ± 0.8 ($n = 4$)、B2/B1は、KK 0.054 ± 0.011 、KR 0.071 ± 0.012 、RR 0.014 ± 0.005 であり、いずれもKR型がRR型より高値を示した(図4左)。一方、APA群におけるB2/Gは、KK 205 ± 41 ($\times 10^{-3}$, $n = 14$)、KR 374 ± 200 ($n = 5$)、RR 293 ± 257 ($n = 7$)であり、K173Rの各genotype間に有意差は検出されなかったが、B2/B1で評価した場合には、KK 0.675 ± 0.115 、KR 0.391 ± 0.120 、RR 0.173 ± 0.050 、でありKK型がRR型よりも高値を示した(図4右)。

APA患者臨床データとK173R多型との関連については、 $\log uAld$ が、KK 1.39 ± 0.08 、KR 1.05 ± 0.06 、RR 1.23 ± 0.08 でありKK型がRR型より高値を示したが、腫瘍サイズ・血清カリウム・PAC値(図5)やACTH・F・PRA値については各genotype間に有意差は検出されなかった。

また正常副腎サンプルのうち KR 型 (n = 5) での各バンド強度の測定により、173R アリルの転写効率は173K アリルの $52.1 \pm 3.9\%$ と推測された。

3. NR5A1 G146A 多型との関連

正常副腎における SF1/G は、GG 267 ± 109 ($\times 10^{-3}$, n = 9)、GA 144 & 345 (n = 2)、AA 170 ± 46 (n = 3)、APA 群における SF1/G は、GG 129 ± 30 (n = 17)、GA 203 ± 95 (n = 6)、AA 107 ± 51 (n = 3) であり (図 6)、G146A の各 genotype 間に有意差は検出されなかった。

D. 考察

正常副腎や APA 組織中の CYP11B2 発現レベルが K173R 多型と関連することが示唆された。これまでの検討では K173R 多型は promoter 領域の -344T/C 多型と完全に連鎖することが判明している。-344T/C 多型については、血圧・アルドステロン・心構造等の臨床データとの関連について数多く報告されてきたが、未だ一致した結論に達していないのが現状である。疫学的には、フランス人で -344T アリルと本態性高血圧が関連すること、フィンランド人では -344C アリルと心筋梗塞発症の危険度が関連する一方で、-344T アリルと尿中アルドステロン排泄量が関連すること、などが報告されている。日本人では、-344C アリルと高血圧との関連が最初に報告されたが、我々の検討¹⁾も含め、多数例の検討では有意な関連は検出されていない。また K173R 多型に関しては、チリ人では 173R アリルが低レニン性本態性高血圧と関連するが、発現実験では K173R 多型自体は酵素活性に影響しないことが報告されている²⁾。原発性アルドステロン症 (APA および IHA ; idiopathic

hyperaldosteronism) と CYP11B2 の 3 多型 (-344T/C、intron 2 conversion、K173R) との関連分析³⁾ では、IHA と特定の haplotype との関連が示唆されているが、APA や高血圧との関連は無い、と報告されている。今回の APA 26 例の 173R (-344C) アリル頻度は 0.365 であり血圧正常者 535 例¹⁾ の 0.364 とほぼ一致しており、やはり APA という疾患との関連は否定的であると考えられる。

173R アリルと完全に連鎖する promoter -344C アリルは、-344T アリルに比し、Ad4BP/SF-1 が 5 倍強く結合することが知られている。SF-1 はほとんどのステロイドホルモン合成酵素の転写促進因子とされ、「173R アリル (-344C アリル) では CYP11B2 発現が少ない」との今回の結果は一見矛盾する様に見える。しかし最近、SF-1 は確かに CYP11B1 や CYP17 などの他のステロイド合成酵素を正に調節すなわち転写を促進するが、CYP11B2 転写に関してはむしろ抑制的に働くこと⁴⁾、が明らかにされた。173R アリルと CYP11B2 発現レベルや転写効率の低下との関連を説明するのみならず、APA 組織中の SF1 発現量が B1/G と正相関し B2/B1 と逆相関する、との今回の成績にも合致する。さらに、SF1 発現量と NR5A1 G146A 多型とは関連しないが、SF1 発現量自体も CYP11B1 や CYP11B2 発現を規定する可能性が示された。転写調節因子の量的な変化については、COUP-TF、DAX-1 や NGFIB ファミリーなどのオーファンレセプターについて今後検討する予定である。

CYP11B2 発現量と、PRA、PAC、K 等の臨床所見すなわち表現型との直接的な相関は検出されなかったが、CYP11B2 発現量の少ない RR 型を有す

る APA 患者の24時間尿中アルドステロン排泄量は KK 型患者より少なく、アルドステロン分泌量という中間表現型を介して、APA による原発性アルドステロン症の表現型の多様性と関連することが示唆される。

E. 結論

CYP11B2 の K173R 遺伝型は、正常副腎・APA 組織の B2 発現レベル、APA のアルドステロン分泌能と関連し、APA 組織の B2 発現レベルは SF1 発現レベルの影響を受ける。

[参考文献]

- 1) 伊佐治真子, 宗友厚, 高田伸樹, 他. CYP11B 2 遺伝子多型と食塩感受性心肥大 岐阜医紀 50 (4): 61-69, 2002.
- 2) Fardella CE, Rodriguez H, Montero J, et al. Genetic variation in p450c11AS in Chilean patients with low renin hypertension. J Clin Endocrinol Metab. 81: 4347-4351, 1996.
- 3) Mulatero P, Schiavone D, Fallo F, et al. CYP11B2 gene polymorphisms in idiopathic hyperaldosteronism. Hypertension 35: 694-698, 2000.
- 4) Bassett MH, Zhang Y, Clyne C, White PC, Rainey WE. Differential regulation of aldosterone synthase and 11beta-hydroxylase transcription by steroidogenic factor -1. J Mol Endocrinol. 28: 125-135, 2002.

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Morita H, Isomura Y, Mune T, Daido H, Takami R, Yamakita N, Ishizuka T, Takeda N, Yasuda K, Gomez-Sanchez CE. Plasma cortisol and cortisone concentrations in normal subjects and patients with adrenocortical disorders. Metabolism 53: 89-94, 2004.
- 2) Lin J, Wang H, Narita T, Kikuno R, Ohara O, Shihara N, Nishigori N,

Horikawa Y, Takeda J. Expression profile of mRNAs from human pancreatic islet tumors. J Mol Endocrinol. 31: 519-528, 2003.

- 3) Smith AN, Lovering RC, Futai M, Takeda J, Brown D, Karet FE. Revised nomenclature for mammalian vacuolar-type H⁺ - ATPase subunit genes. Mol Cell 12: 801-803, 2003.

- 4) Tanaka T, Ikari K, Furushima K, Okada A, Tanaka H, Furukawa K, Yoshida K, Ikeda T, Ikegawa S, Hunt S, Takeda J, Toh S, Harata S, Nakajima T, Inoue I. Genomewide linkage and linkage disequilibrium analyses pinpoint the ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine to COL 6 A 1 locus on chromosome 21. Am J Hum Genet 73: 812-822, 2003.

- 5) Zhu Q, Yamagata K, Miura A, Shihara N, Horikawa Y, Takeda J, Miyagawa J, Matsuzawa Y. T130I mutation in HNF-4 α gene is a loss-of-function mutation in hepatocytes and is associated with late-onset Type II diabetes mellitus in Japanese subjects. Diabetologia 46: 567-573, 2003.

- 6) Suwa T, Chen M, Hawks CL, Hornsby PJ. Zonal expression of dickkopf -3 and components of the Wnt signalling pathways in the human adrenal cortex. J Endocrinol. 178: 149-58, 2003.

- 7) Hayashi M, Yamada H, Uehara S, Morimoto R, Muroyama A, Yatsushiro S, Takeda J, Yamamoto A, Moriyama Y. Secretory granule-mediated co-secretion of L-glutamate and glucagon triggers glutamatergic signal transmission in islets of Langerhans. J Biol Chem 278: 1966-1974, 2003.

- 8) Mune T, Morita H, Suzuki T, Takahashi Y, Isomura Y, Tanahashi T, Daido H, Yamakita N, Deguchi T, Sasano H, White PC, Yasuda K. Role of local 11 α - hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in determining the phenotype of adrenal adenomas. J Clin Endocrinol Metab. 88: 864-870, 2003.

- 9) Horikawa Y, Oda N, Yu L, Fujiwara K, Makino M, Seino Y, Itoh M, Takeda J.

Genetic variations in CAPN10 are not a major factor in the occurrence of type 2 diabetes in Japanese. *J Clin Endocrinol Metab* 88 : 244–247, 2003.

10) Kajita K, Ishizuka T, Mune T, Miura A, Ishizawa M, Kanoh Y, Kawai Y, Natsume Y, Yasuda K.

Dehydroepiandrosterone downregulates

the expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ in adipocytes. *Endocrinology* 144 : 253–259, 2003.

G. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

図 1. Expression levels of CYP11B1, CYP11B2 and SF1 in normal adrenals and APA

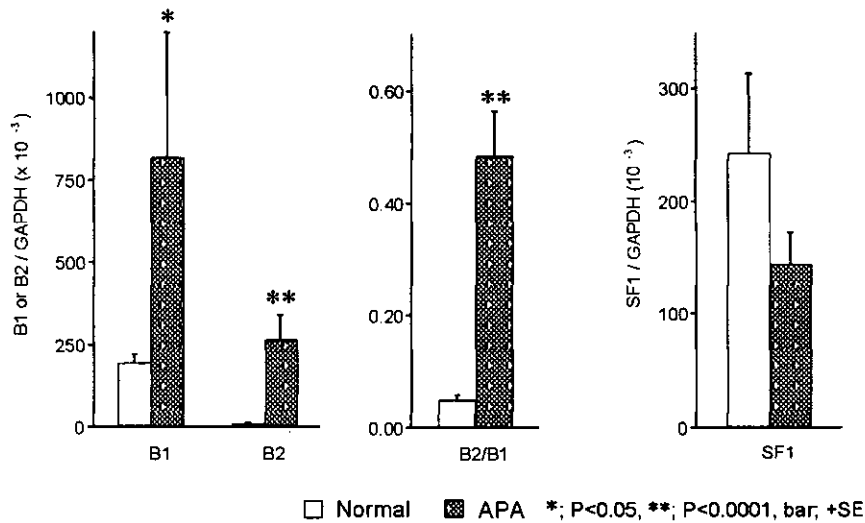
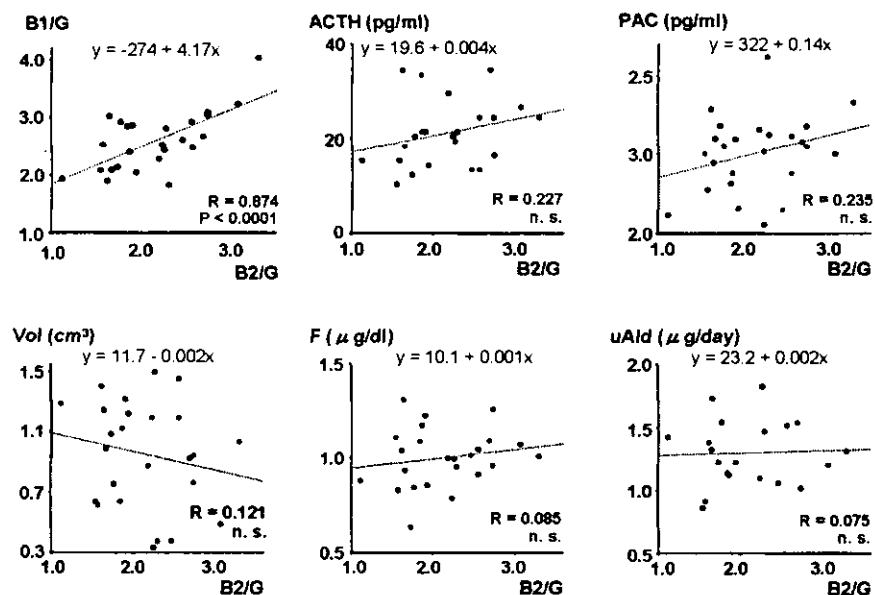
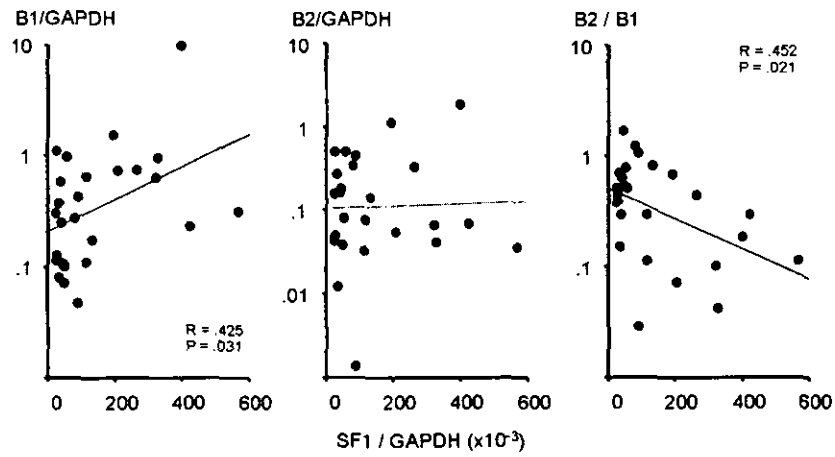


図 2. Correlations between CYP11B2 mRNA level and clinical parameters in APA



3. Correlation between *CYP11B1*, *CYP11B2*, and SF1 mRNA levels in APA tissues



4. *CYP11B2* expression levels in relation to K173R polymorphism

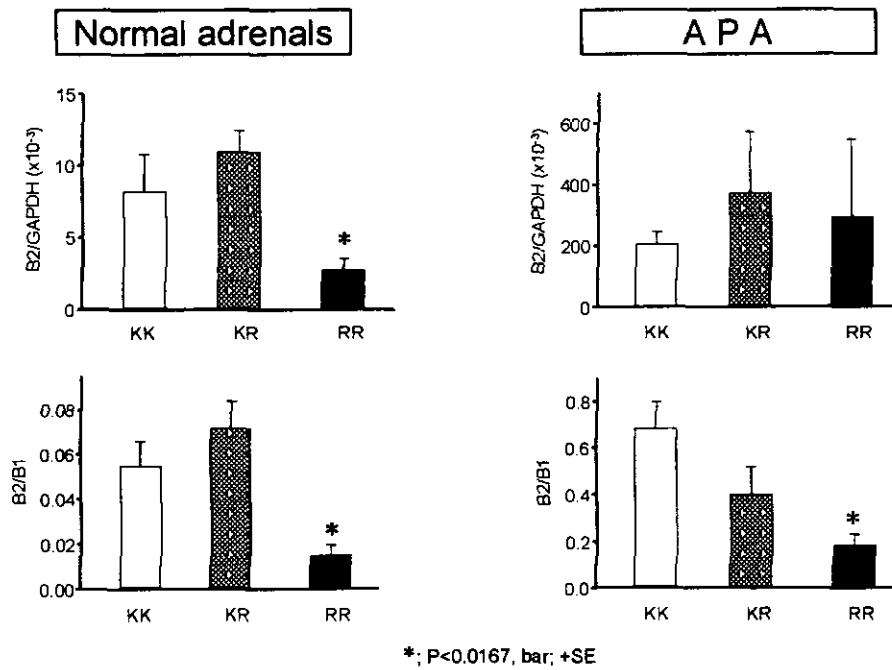


Fig 5. Clinico-hormonal characteristics in APAs in relation to K173R polymorphism

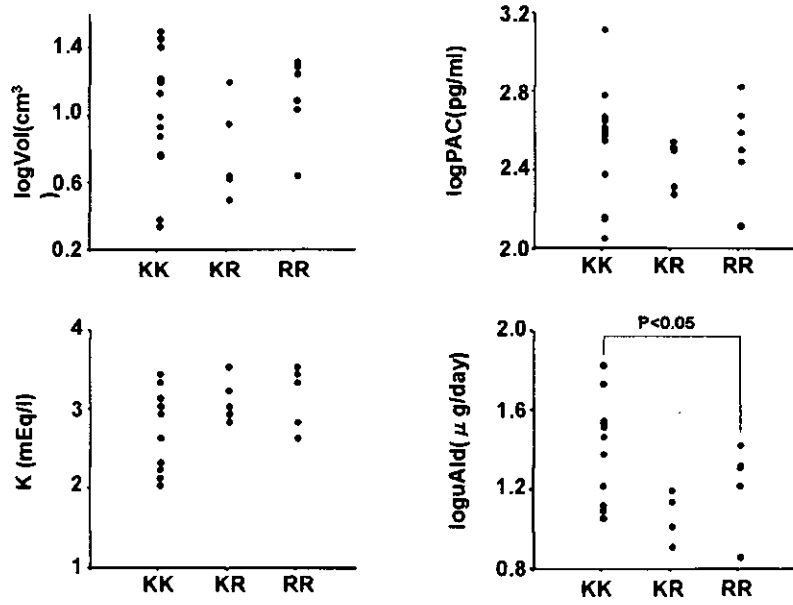
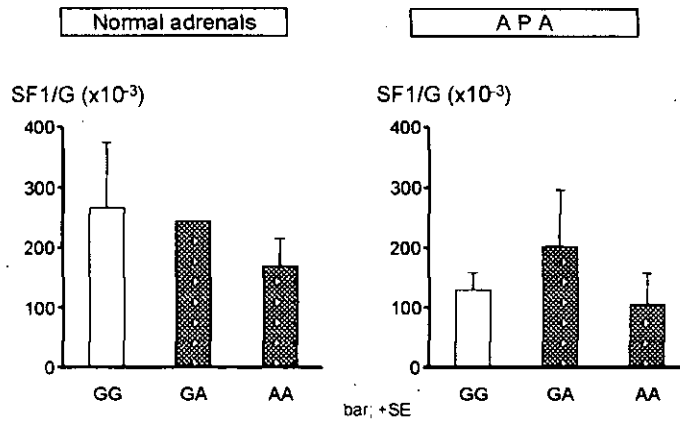


Fig 6. SF1 expression levels in relation to G146A polymorphism



(3) ミネラルコルチコイド、MR

ステロイドホルモンレセプターの 転写制御メカニズムの解明に関する研究

分担研究者 加藤茂明

東京大学分子細胞生物学研究所・教授

研究要旨

以前より我々は当研究室で確立した生化学的手法による核内受容体転写共役因子複合体同定法により、ミネラルコルチコイドレセプター (MR) の転写制御メカニズムの解明を目指してきた。その結果、RHA/CBP 複合体がリガンド選択的に MR の N 末端側 AB 領域に結合し、転写制御する事を明らかにした (H. Kitagawa et. Al, MCB 2002)。更に同様な方法でビタミン D 受容体に結合する新規転写修飾因子複合体 WINAC を同定した (H. Kitagawa et al, Cell 2003)。この複合体は ATP dependent chromatin remodeling complex というこれまで知られていた転写共役因子群とは異なるクラスの転写修飾因子であり、他の転写共役因子群のプロモーターへの結合を制御している。今回は更なる MR の N 末端領域と結合する因子群の同定を目指し、新たな精製手法を用いる事にした。

A. 研究目的

近年、核内受容体の転写制御には様々な転写共役因子複合体が関与する事が知られているが、その機能や因子群について未だ不明な点が多い。従って蛋白精製の手法を用いて核内受容体と相互作用する因子群の取得が必要と考えられる。また MR やグルココルチコイドレセプター (GR) 等の核内受容体はリガンド依存的な転写活性化能に加え、恒常的な転写活性を有する領域 AF 1 が存在する。しかしながら AF 1 に結合する転写共役因子群については不明な点が多い。このような核内受容体の特徴を考え、核内受容体の独特の転写制御機構に迫りたいと考えている。

B. 研究内容

1 : タンパク質複合体精製系の確立

大量の培養細胞より核抽出液を取得し、核内受容体に結合する因子群を取得した。更に得られた巨大な複合体についてその

複合体の機能を明らかにするとともに構成因子を同定した。

2 : タンパク質同定系の発展

MALDI-TOF MS を用いたタンパク質同定法を駆使し、取得した複合体の同定を行った。同定した結果は Western blotting にて確認した。

3 : AF1 転写共役因子複合体の同定

昨年 MR AF1 に結合する因子として RHA/CBP 複合体を同定したが、この時利用した領域は MR AF1 の 1 / 3 程の大きさで、全長において他に結合する因子群については未知である。そこで MR AF1 領域全長を恒常的に発現させた細胞株を用いて未知の AF1 転写共役因子群をタンパク精製法にて同定する。方法はこれまでと同様に細胞核抽出液から結合因子群をタグ抗体カラムで精製・抽出し SDS-PAGE にて展開し、In gel digestion を行い、MALDI-TOF MS を用いてそれらを同定する。

4 : AF1 転写メカニズムの解明

取得した転写共役因子群が前述の転写のどの段階で作用する因子であるかを検索する予定である。In vitro クロマチン再構築系を立ち上げ、取得した複合体がクロマチン再構築能があるか、また構造変換機能があるかを明らかにした。

(倫理面への配慮)

使用している生物材料は培養細胞であり、倫理面への配慮は必要ないと考えられる。

C. 研究結果

1：MR AF1 転写活性化複合体の同定

MR AF1 領域に結合する転写共役因子複合体を同定するために、MR AF1 を強制発現させた浮遊 HeLa 細胞株を樹立した。この細胞株を大量培養し、核抽出液からタンパク精製を行った。この精製産物をグリセロールグラジエントでサイズ分画を行った結果、MR AF1 複合体の分離に成功した。

2：新規転写共役因子複合体 WINAC の同定

VDR に結合する新規クロマチン修飾因子複合体 WINAC を同定した。この複合体はウィリアムズ症候群という遺伝病に関連した複合体であり、一部は転写の他に DNA 複製にも関与する事が知られている。様々な解析によりこの複合体の生体内における VDR に関連した機能を明らかにした (H. Kitagawa et al, Cell 2003)。

3：BRCT に結合する TRRAP/GCN5 複合体の同定

癌抑制遺伝子である BRCA1 は1863アミノ酸からなる核蛋白であり DNA 修復や転写活性化因子として機能する。乳癌患者において BRCT 領域と呼ばれる C 末の転写活性化領域での変異が頻発している事から BRCT に相互作用する蛋白質

群の精製を試みた。その結果、ER の転写活性化因子として作用する TRRAP/GCN5 複合体と DNA 修復に関連する MSH2 等の同定に成功した。

4：クロマチンを介した転写メカニズムの解明

In vitro のクロマチン再構築系を作成する事により、WINAC がクロマチンを再構築し、VDR 依存的なクロマチン構造変換の機能を有する事が明らかになった。

D. 考察

転写共役因子群は近年種々の複合体を形成する事が明らかになってきた。それら複合体が転写制御のどの面に必要であるかが、現在転写制御の研究の上で重要な課題である。そこで今回我々が確立した生化学的な蛋白精製法により、新たな機能を持つ新規転写修飾因子複合体の取得が期待出来る。今回得られた複合体は転写の他 DNA 複製・修復に関連した因子も含まれており、新たな転写制御機構の解明が期待できる。今後は組織特異的、標的遺伝子特異的な複合体形成の解明に取り組む事が重要であり、目下我々が取り組んでいる In vitro のクロマチン再構築系や生体内でのクロマチン構成因子の修飾変化等の実験が必要になる。

E. 結論

MR の AF1 を強制発現させた細胞株を樹立し、MR AF1 複合体の存在を明らかにした。一方 ER に結合する TRRAP/GCN5 複合体の構成因子が乳癌関連遺伝子 BRCA1 と相互作用する事を見出した。また VDR に結合する新規クロマチン構造修飾因子複合体 WINAC を同定し、核内受容体を介する新しい転写制御機構を明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ohtake, F., Takeyama, K., Matsumoto, T., Kitagawa, H., Yamamoto, Y., Nohara, K., Tohyama, C., Krust, A., Mimura, J., Chambon, P., Yanagisawa, J., Fujii-Kuriyama, Y., Kato, S. :

Modulation of estrogen receptor signalin by an association with the activated dioxin receptor. *Nature*, 423, 545-550, 2003.

Kitagawa, H., Fujiki, R., Yoshimura, K., Mezaki, Y., Uematsu, Y., Matsui, D., Ogawa, S., Unno, K., Okubo, M., Tokita, A., Nakagawa, T., Ito, T., Ishimi, Y., Nagasawa, H., Matsumoto, T., Yanagisawa, J., Kato, S. : Promoter targeting of a nuclear receptor with an ATP-dependent chromatin remodeling complex related to Williams syndrome. *Cell*, 113, 905-917, 2003.

Suzawa, M., Takada, I., Yanagisawa, J., Ohtake, F., Ogawa, S., Yamauchi, T., Kadowaki, T., Takeuchi, Y., Shibuya, H., Gotoh, Y., Matsumoto, K., Kato, S. : Inhibition of adipogenesis by cytokines with suppression PPAR γ function through the TAK1/TAB 1-NIK mediated cascade. *Nature Cell Biol.*, 5, 224-230, 2003.

Ishitani, K., Yoshida, T., Kitagawa, H., Ohta H., Nozawa, S., Kato, S. : p54^{nrb} acts as a transcriptional coactivator for activation function 1 of the human androgen receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 306, 660-665, 2003.

Kawano, H., Sato, T., Yamada, T., Matsumoto, T., Sekine, K., Watanabe, T., Nakamura, T., Fukuda, T., Yoshimura, K., Yoshizawa, T., Aihara, K., Yamamoto, Y., Nakamichi, Y., Metzger, D., Chambon, P., Nakamura, K., Kawaguchi, H., Kato, S. :

Suppressive function of androgen receptor in bone resorption. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 9416-9421, 2003.

Nakamichi, Y., Shukunami, C., Yamada, T., Aihara, K., Kawano, H., Sato, T., Nishizaki, Y., Yamamoto, Y., Shindo, M., Yoshimura, K., Kawaguchi, H., Hiraki, Y., Kato, S. : Chondromodulin-I (ChM-I) is a bone remodeling factor. *Mol. Cell. Biol.*, 23, 636-644, 2003.

Sato, T., Matsumoto, T., Yamada, T., Watanabe, T., Kawano, H., Kato, S. : Late onset of obesity in male androgen receptor-deficient (ARKO) mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 300, 167-171, 2003.

Matsumoto, T., Takeyama, K., Sato, T., Kato, S. : Androgen receptor functions from reverse genetic models. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 85, 95-99, 2003.

Taketani, Y., Nomoto, M., Yamamoto, H., Isshiki M., Morita, K. Arai, H., Miyamoto, K., Kato, S., Takeda E. : Increase in IP 3 and intracellular Ca²⁺ induced by phosphate depletion in LLC-PK 1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 305, 287-291, 2003.

Fujishima, T., Kittaka, A., Yamaoka, K., Takeyama, K., Kato, S., Takayama, H. : Synthesis of 2, 2-dimethyl-1, 25-dihydroxyvitamin D 3 : A-ring structural motif that modulates interactions of vitamin D receptor with transcriptional coactivators. *Org. Biomol. Chem.*, 1, 1863-1869, 2003.

Masuyama, R., Nakaya, Y., Katsumata, S., Kajita, Y., Uehara, M., Tanaka, S., Sakai, A., Kato, S., Nakamura, T., Suzuki, K. : Dietary calcium and phosphorus ratio regulates bone mineralization and turnover in vitamin D receptor knockout mice by affecting intestinal calcium and phosphorus absorption. *J. Bone Miner. Res.*, 18, 1217-1226, 2003.

Sato, T., Matsumoto, T., Kawano, H., Watanabe, T., Uematsu, Y., Sekine, K., Fukuda, T., Aihara, K., Krust, A.,

Yamada, T., Nakamichi, Y., Yamamoto, Y., Nakamura, T., Yoshimura, K., Yoshizawa, T., Metzger, D., Chambon, P., Kato, S. : Brain masculinization requires androgen receptor function. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003 (in press).

Endo, I., Inoue, D., Mitsui, T., Umaki, Y., Akaike, M., Yoshizawa, T., Kato, S., Matsumoto, T. : Deletion of vitamin D receptor gene in mice results in abnormal skeletal muscle development with deregulated expression of myoregulatory transcription factors. Endocrinology, 2003 (in press).

WuQiang, F., Yanase, T., Yin, W., Kawate, H., Saitoh, M., Oba, K., Nomura, M., Okabe, T., Goto, K., Yanagisawa, J., Kato, S., Takayanagi, R., Nawata, H. : Protein kinase A potentiates Ad4BP/SF-1 transactivation by re-integrating the subcellular dynamic interactions of the nuclear receptor with its cofactors, GCN5/TRRAP, and suppressor, DAX-1: a laser confocal imaging study in living KGN cells. Mol. Endocrinol., 2003 (in press).

Murayama, A., Kim, M., Yanagisawa, J., Takeyama, K., Kato, S. : Ligand-induced transrepression by a nuclear receptor mediated by a bHLH-type activator through co-regulator switching. EMBO J., 2003 (in press).

選択的アルドステロン受容体拮抗薬（エプレレノン）の 心血管作用に関する研究

主任研究者 宮森 勇
福井大学医学部第三内科教授

分担研究者 河合康幸、吉田正博、森川玄洋
福井大学医学部第三内科

研究要旨

高塩分含有飼料を与えた食塩感受性ダールラット（心不全実験モデル）に選択的アルドステロン受容体拮抗薬（エプレレノン）を投与することでうっ血性心不全による死亡率を低下させる事ができた。心不全群では心筋内鉱質コルチコイド受容体(MR)の遺伝子発現が増強していたが、エプレレノン投与により有意に抑制された。心臓MR発現は心不全発症・進展を促進することが示された。

A. 研究目的

アルドステロンは、腎尿細管以外にも作用しミネラルコルチコイド受容体を介して心筋の線維化や心肥大を促進することが報告されている。アルドステロンの心血管組織に対する直接作用は抗アルドステロン剤によって抑制され、近年の大規模臨床研究においても抗アルドステロン剤は心不全患者で死亡率を低下させることが示されている。選択的抗アルドステロン剤（エプレレノン）は従来の降圧薬と同等の効果を有し、また大規模臨床試験から急性心筋梗塞に伴う重症心不全に対する有用性が確立され、さらに高血圧症に伴う心肥大や腎機能障害の予防に有効であることが示されている。以上の事を踏まえ、高塩分含有飼料を与えた食塩感受性ダールラット（心不全実験モデル）を用いて心血管作用に関する検討を行った。

B. 研究方法

100匹の食塩感受性ダールラットを6週齢まで1%塩分含有飼料にて飼育して、

6週齢より8%塩分含有飼料を開始しエプレレノン(2mg/day)を投与した群(DS-Ep群、n=50)と非投与群(DS群、n=50)に無作為に分け、死亡を観察した。0、2、5、8、11週目に、3匹ずつ選び、体重・血圧・心拍数を3回計測しその平均値を各々の計測値とした。次にペントバルビタール(50mg/kg)の腹腔内投与にて麻酔を行い、胸骨正中中部でPhillips SONOS 5500を用いて心臓超音波検査を行い、左室拡張末期径・左室収縮末期径・心室中隔壁厚・左室後壁厚・左室径短縮率(%FS)を各々3回計測しその平均値を測定値とした。その後、胸骨正中切開し心臓を露出し、右房より血液を5ml採取した後、心臓と大動脈を一塊にして摘出し、大動脈・心房等をデブリードし左室のみとし、左室重量を測定した。RNA分離用に左室心尖部より心筋組織5×5mmを取り出し、TRIzol reagent(Gibco-BRL, Grand Island, NY)1ml加えPower homogenizerでホモジナイズし、クロロホルムを加え遠心した後エタノール沈澱しtRNAを分離