

201024064A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

ゲノム解析による原発性アルドステロン症
の原因診断学の再構築

平成22年度 総括・分担研究報告書

平成23（2011）年3月

研究代表者 岡村均

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

ゲノム解析による原発性アルド ステロン症の原因診断の再構築

平成22年度総括・分担研究報告書

2010 Annual Report of
Genomic Diagnosis of Primary Aldosteronism, Research
on Measures for Intractable Diseases,
Grant for the Ministry of Health labor and Welfare of Japan

研究代表者岡村均

平成23（2011）年3月

目 次

I 班員構成	7
II 総括研究報告	
岡村 均 京都大学大学院薬学研究科医薬創成情報科学講座	11
III 分担研究報告	
河野 雄平 国立循環器病センター高血圧・腎臓科	19
岡村 均 京都大学大学院薬学研究科医薬創成情報科学講座	23
神出 計 大阪大学医学研究科老年腎臓内科学講座	29
江本 憲昭 神戸薬科大学薬学部臨床薬学講座	31
笹野 公伸 東北大学医学系研究科病理病態学講座	33
IV 2010 年度会議	37
V 研究成果	
生体リズム異常による原発性アルドステロン症の発症機構の解明と ヒトゲノム研究の重要性に関する考察	41
原発性アルドステロン症研究説明書類	59
学会発表	69

班員構成

ゲノム解析による原発性アルドステロン症の原因診断学の再構築

区 分	氏 名	所 属 等	職 名
研究代表者	岡村 均	京都大学薬学研究科医薬創成情報科学講座	教 授
研究分担者	笹野 公伸	東北大学医学系研究科病理病態学講座	教 授
	河野 雄平	国立循環器病センター高血圧・腎臓科	部 長
	神出 計	大阪大学医学研究科老年腎臓内科学	講 師
	江本 憲昭	神戸薬科大学薬学部臨床薬学	教 授

総括研究報告

ゲノム解析による原発性アルドステロン症の原因診断学の再構築

研究代表者：岡村 均 京都大学薬学研究科医薬創成情報科学講座
研究分担者：河野雄平 国立循環器病研究センター 高血圧・腎臓科
研究分担者：笹野公伸 東北大学医学系研究科病理病態学講座
研究分担者：神出 計 大阪大学大学院医学研究科老年腎臓内科学講座
研究分担者：江本憲昭 神戸薬科大学薬学部臨床薬学講座

研究要旨

原発性アルドステロン症の有力な原因遺伝子として HSD3B1 が発見された。本研究では、原発性アルドステロン症、および低レニン高アルドステロン血症を示す高血圧患者、計 36 名について、HSD3B1 遺伝子の全エクソンをシークエンスし変異を探索した。HSD3B1 活性を亢進すると思われる変異は見いだせなかった。原発性アルドステロン症の病因診断学の確立には、ゲノムレベルの解析のみでなく、タンパク質レベルでの解析も進めた。ヒトの HSD3B (3 β 水酸化ステロイド脱水素酵素) の HSD3B1 と HSD3B2 の二種のアイソザイムのヒト副腎での存在を検索したところ、副腎皮質のアルドステロン産生細胞（球状層）においては従来の HSD3B2 とともに時計遺伝子制御下にある HSD3B1 が強く発現することを明らかにした。原発性アルドステロン症発症における HSD3B1 の役割を解明するため、HSD3B1 と HSD3B2 の違いを識別することのできるサブタイプ別の特異的モノクローナル抗体を用いた病理診断システムの構築を目指した。GANP マウスを利用した高親和性抗体作製技術を用い、HSD3B1 に対して特異的な抗体クローンを得ることに成功した。これを病理組織に適応し、鑑別診断や病因診断に道筋をつけられた。

A. 研究目的

原発性アルドステロン症は高血圧患者のうちおよそ 3-10% 存在すると考えられているが、診断方法が煩雑であることから確定診断に至るのはその一部に過ぎず、原因遺伝子については未だ不明である。2010 年 Doi らにより、概日リズムを欠くマウスが食塩感受性高血圧を呈するメカニズムとして、アルドステロン合成酵素の一つである 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -

HSD) / $\Delta 5 \rightarrow 4$ isomerase type 6 (Hsd3b6) の発現亢進により、高アルドステロン血症を伴う高血圧を発症することが Nature Medicine 誌に発表された。この酵素はヒトでは HSD3B1 に相当する。HSD3B1 が原因遺伝子であるならば、原発性アルドステロン症患者には HSD3B1 発現を亢進するような遺伝子変異が集積すると予想される。そこで、本研究では、HSD3B1 遺伝子の全エクソンをシークエンスし多型探索を実施

した。

次に、HSD3B のタンパク質に関して、興味深い事実がすでに病理診断学の面から知られていた。それは、特発性アルドステロン症患者の球状層細胞では Pan-HSD3B 抗体（東北大学笹野教授作製）に対する免疫陽性反応が亢進している。ところがこの HSD3B の正体を特定するにはヒトの 2 種のアイソザイムの極度の構造的類似性が障害となっていた。すなわち、従来の抗体では、この HSD3B1、HSD3B2 の特異的抗体は無いのである。そこで本研究では、病理組織の鑑別ができる HSD3B1 と HSD3B2 の微少なアミノ酸配列の違いを識別することのできる新規モノクローナル抗体の作成を目指した。

B. 研究方法

原発性アルドステロン症の患者 16 名に加え、本態性高血圧患者であり、かつ、血漿アルドステロン濃度／血漿レニン活性比 (ARR) >50 である 20 名の合計 36 名（男性 14 名、女性 22 名）を解析対象とし、ヒト HSD3B1 遺伝子の全エクソンのシークエンスを実施した。ゲノムシークエンスに必要なプライマーの配列等は、京都大学土井博士から提供された。変異探索には Sequencher ソフト (ver. 4.8) を用い、forward と reverse の両方向で確認できる変異を変異とした。この研究に当たり、倫理面に配慮し、全ての被験者は、研究の内容について説明を受けた後、研究に協力する旨の同意書を書面で残している。遺伝子研究は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成 16 年 12 月 28 日全部改正）」を厳守して行った。

HSD3B1 高親和性抗体作成に関しては、GANP マウスを利用した高親和性抗体作製法を用いて HSD3B1 に特異的なモノクローナル抗体の作成を行った。抗原としてヒト HSD3B1-GST 融合蛋白質を調製し、GANP マウスに免疫を行った。ELISA 法を用いて抗血清の力価上昇を確認した後、脾臓抗体産生細胞を摘出し、ミエローマ細胞と融合させてハイブリドーマを作製した。HSD3B1 特異的クローンを選出するため、ハイブリドーマの培養上清を用いて HSD3B1-GST に対し陽性かつ HSD3B2-GST に対して陰性となるクローンを ELISA によりスクリーニングし、その結果、HSD3B1 に特異的な陽性有望クローン (4B15) を得た。本クローンのサブタイプ特異性を裏付けるため、HSD3B1 と HSD3B2 を異所的に発現させた培養細胞の抽出液を用いてウェスタンブロット解析を行った。なお、この際、抗体の特異性を比較する上で、HSD3B1 と HSD3B2 を共に認識する Pan-HSD3B 抗体（東北大学笹野教授作製）を対照に用いた。

C. 研究結果

ゲノム解析対象とした患者は、年齢 63.0 ± 1.7 歳、収縮期血圧 156.7 ± 3.7 mmHg、拡張期血圧 92.7 ± 2.5 mmHg と高血圧を呈すとともに、血漿アルドステロン濃度 (PAC) 32.0 ± 7.3 ng/dl、血漿レニン活性 (PRA) 0.5 ± 0.1 ng/ml/min、ARR 104.4 ± 17.1 であり、低レニン性高アルドステロン血症を示す集団が抽出されていた（分担研究：河野参照）。HSD3B1 遺伝子の全エクソンのシークエンスにより、第 4 エクソンに位置する 3 つの変異を同定した（分担研究河野

参照)。2つは TTT(Phe286)→CTT(Leu)、AAC (Asn367) →ACC (Thr) のミスセンス変異、残りの1つは TTG (Leu338) → CTG (Leu) のサイレント変異であり、マイナーアレル頻度はそれぞれ 0.014、0.042、0.306 であった。NCBI データベースと照合した結果、それぞれ rs6205、rs1047303、rs6203 に該当することが判明した。

抗体作成に関しては、我々が今回作出したモノクローナル抗体 (4B15) は HSD3B1 を特異的に認識する抗体であることが分かった (分担研究岡村参照)。すなわち、本抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った結果、本抗体は、HSD3B1 (HA タグ付き) を異所的に発現させた細胞の抽出液において当該蛋白質に相当する約 42kDa のバンドと特異的に反応することが分かった。これに対し、HSD3B1 ではなく HSD3B2 (同様に HA タグ付き) を異所発現させた場合には陽性バンドは検出されなかった。HA 抗体を用いてウェスタンブロットを行うと、HSD3B2 は HSD3B1 と同程度の発現が認められたため、今回我々が作出したモノクローナル抗体は HSD3B2 ではなく HSD3B1 を特異的に認識することが分かった。これに対し、従来から病理解析に用いられていた Pan-HSD3B 抗体を用いてウェスタンブロットを行ったところ、この抗体は、当初の予想通り、HSD3B1 と HSD3B2 のどちらともを同程度認識することが分かった。

D. 考察

ゲノム解析のサンプルサイズは小さいものの、今回解析対象とした 36 名に HSD3B1 遺伝子の変異が集積しているとすれば、遺

伝子変異の頻度が高くなることが予想された。しかし、我々が同定した 3 つの遺伝子変異 rs6205、rs6203、rs1047303 の頻度は、HapMap-JPT、Cohort consortium_J で公開されている日本人の多型頻度と同程度であった。スプライスサイトの変異もまた発現への影響が懸念されるため、各エクソンの両端から上・下流 20bp も解析対象領域としシーケンス解析を実施したが、遺伝子変異の発見には至らなかった。

今回は解析していないが、プロモータ領域の変異も発現に影響すると考えられる。そこで、Hapmap データベースより今回発見した 3 つの多型を含む日本人のタイピングデータを取得し、Haploview ソフトウェア (ver.1.0) にて連鎖解析を実施した (図 1)。rs6205 は第 1 エクソンの上流 2179 bp、91 bp にそれぞれ位置する rs6661258、rs932603 と連鎖不平衡していた。rs6203 と rs1047303 は、第 1 エクソンの上流 3340 bp に位置する rs4659007 と連鎖不平衡していた。文献的には、rs6661258 は HSD3B1 の転写を阻害するエレメントを含む領域に存在するため、これに連鎖不平衡する rs6205 は、発現量に影響を与える可能性が考えられた。

抗体に関しては、これまで病理解析に広く用いられてきた Pan-HSD3B 抗体は、HSD3B1 と HSD3B2 のサブタイプの違いを区別することができない。これに対し、今回我々が GANP マウスを用いて開発した HSD3B1 特異的モノクローナル抗体を用いれば、HSD3B1 に対してこれまで不可能であったサブタイプ別の病理検査を行うことができると思われる。

E. 結論

今回のゲノム解析で同定した HSD3B1 遺伝子の 3 つの変異は、いずれもデータベースに既に登録されており、新規遺伝子変異ではなかった。HSD3B1 の活性を亢進すると思われる変異は見いだせなかった。

抗体に関しては、HSD3B1 に特異的なモノクローナル抗体の作出に成功した。これによって今後、原発性アルドステロン症の新たな病理検査の可能性が広がったといえる。すなわち、原発性アルドステロン症の患者から切除された副腎腫瘍、副腎過形成組織、および対照群として腎癌などで合併切除された副腎組織における HSD3B1 の発現状態を免疫組織学的に検査することによって、病態の理解が進み、本症に対する新たな診断法や分類法が樹立される可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Doi M, Takahashi Y, Komatsu R, Yamazaki F, Yamada H, Haraguchi S, Emoto N, Okuno Y, Tsujimoto G, Kanematsu A, Ogawa O, Todo T, Tsutsui K, van der Horst GTJ, Okamura H: Salt-sensitive hypertension in circadian clock-deficient mice involves hyperproduced adrenal Hsd3b6. *Nature Medicine*, 16, 67-74, 2010.
- 2) Okamura H, Doi M, Fustin JM,

Yamaguchi Y: Hypertension due to loss of clock. *Current hypertension Reports*. 13, 103-108, 2010.

- 3) 岡村 均, 土居雅夫: 生体リズム異常と原発性アルドステロン症 原発性アルドステロン症マニュアル 改訂第2版 成瀬光栄、平田結喜諸 編 診断と治療社 7-9, 2010.
- 4) 笹野公伸: 原発性アルドステロン症の病理の基本 原発性アルドステロン症マニュアル 改訂第2版 成瀬光栄、平田結喜諸 編 診断と治療社 147-149, 2010.
- 5) 神出 計, 大石 充, 楽木宏実: 大阪大学老年・高血圧内科における手順 原発性アルドステロン症マニュアル 改訂第2版 成瀬光栄、平田結喜諸 編 診断と治療社 228-229, 2010.
- 6) 土居雅夫, 岡村 均: 体リズム異常に伴う高血圧発症メカニズム, *実験医学* 28, 1742-1746, 2010.
- 7) 土居雅夫, 岡村 均: 時計遺伝子と高血圧、*脳* 21, 13(4), 367-371, 2010.
- 8) 岡村 均, 土居雅夫: 血圧調節にかかわる内分泌・代謝・自律神経ネットワーク、*血圧*, 17(10), 829-834, 2010.
- 9) 岡村 均: 生体時計による血圧調節のメカニズムー新たな高血圧治療薬の開発に向けて、*ファルマシア*, 46(12),

1125-1129, 2011.

1 0) 岡村 均、土居雅夫：生体リズムと高血圧、Annual review 2011 糖尿病・代謝・内分泌、寺内康夫、石橋俊、伊藤裕編、pp159-pp170、中外医学社、2011.

1 1) 岡村 均、土居雅夫：生体リズム異常とアルドステロン産生過剰を伴う高血圧、Annual review 2011 循環器、山口徹、高本眞一、小室一成、佐地勉編、p73-p80、中外医学社、2011.

学会発表

1) Okamura H. (Plenary lecture) Novel molecular link between the circadian clock and hypertension, The Third International Aldosterone Forum in Japan, May 15-16, Tokyo, 2010.

2) Okamura H. (State-of-the-Art Presentation) Aldosterone and Clock, The 36th International Aldosterone Conference, San Diego (Convention Center), June 17-18, 2010.

3) Okamura H. (Symposium) Novel Molecular Link Between the Circadian Clock and Hypertension, Meeting of American Society of Nephrology: Renal Week 2010, Denver, CO, USA, November 16 - 21, 2010.

4) 神出 計：cons の立場から ミニシ

ンポジウム 内分泌疾患の controversy- 原発性アルドステロン症の診断と治療 ~Pros と Cons からガイドラインを見る~ 第 11 回日本内分泌学会近畿支部学術集会 平成 22 年 10 月 30 日 大津 (滋賀)

5) 河合達男、神出 計、他：原発性アルドステロン症の臨床的評価 -副腎静脈サンプリングにおける ACTH 負荷前後での lateralized ratio の比較より- 第 33 回日本高血圧学会総会 平成 22 年 10 月 16 日 福岡

6) 岡村 均：(特別講演) 生体リズムと生活習慣病、第 10 回日本抗加齢医学会総会、2010 年 6 月 11 日-13 日、京都.

7) 岡村 均：(特別講演) 生体リズム異常と高血圧、第 20 回東京高血圧研究会、2010 年 9 月 4 日、東京

8) 岡村均：(シンポジウム) 時計遺伝子異常と高血圧、第一回 Molecular Cardiovascular Conference II、2010 年 9 月 3 日-5 日、キロロ (北海道).

9) 岡村 均：(シンポジウム) 時計遺伝子と高血圧、第 31 回日本臨床薬理学会年会、2010 年 12 月 1 日-3 日、京都.

1 0) 岡村 均：(シンポジウム) 体内時計の異常による高血圧：第 2 回 Hypertension Premium Club、2010 年 12 月 18 日、大阪.

1 1) Okamura H., Plenary Lecture at
7th Anniversary International
Scientific Conference of National
Taiwan University Hospital (NTUH)
Yun-Lin Branch. “The New Era of
Translational Research on
Hypertension”, March 26, 2011,
NTUH YL Branch, Yun-Lin, Taiwan.

1 2) Okamura H., Plenary Lecture at
International symposium of
aldosterone and hypertension,
March 27, 2011, Taipei, Taiwan

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告

HSD3B1 遺伝子多型と原発性アルドステロン症に関する研究

研究分担者 河野雄平 国立循環器病研究センター 高血圧・腎臓科 部長
研究協力者 宮田敏行 国立循環器病研究センター 研究所 部長
研究協力者 松本幸子 国立循環器病研究センター 研究所 特任研究員

研究要旨

原発性アルドステロン症の有力な原因遺伝子として HSD3B1 が発見された。本研究では、原発性アルドステロン症、および低レニン高アルドステロン血症を示す高血圧患者、計 36 名について、HSD3B1 遺伝子の全エクソンをシークエンスし変異を探索した。HSD3B1 活性を亢進すると思われる変異は見いだせなかった。

A. 研究目的

原発性アルドステロン症は高血圧患者のうちおよそ 3-10% 存在すると考えられているが、診断方法が煩雑であることから確定診断に至るのはその一部に過ぎず、原因遺伝子については未だ不明である。2010 年 Doi らにより、概日リズムを欠くマウスが食塩感受性高血圧を呈するメカニズムとして、アルドステロン合成酵素の一つである 3β -hydroxysteroid dehydrogenase (3β -HSD) / $\Delta 5\rightarrow 4$ isomerase type 6 (Hsd3b6) の発現亢進により、高アルドステロン血症を伴う高血圧を発症することが Nature Medicine 誌に発表された。この酵素はヒトでは HSD3B1 に相当する。HSD3B1 が原因遺伝子であるならば、原発性アルドステロン症患者には HSD3B1 発現を亢進するような遺伝子変異が集積すると予想される。本研究では、HSD3B1 遺伝子の全エクソンをシークエンスし多型探索を実施した。

B. 研究方法

国立循環器病研究センターで収集した DNA のうち、原発性アルドステロン症の患者 16 名に加え、本態性高血圧患者であり、かつ、血漿アルドステロン濃度/血漿レニン活性比 (ARR) >50 である 20 名の合計 36 名 (男性 14 名、女性 22 名) を解析対象とし、ヒト HSD3B1 遺伝子の全エクソンのシークエンスを実施した。ゲノムシークエンスに必要なプライマーの配列等は、京都大学土井博士から提供された。変異探索には Sequencher ソフト (ver. 4.8) を用い、forward と reverse の両方向で確認できる変異を変異とした。

(倫理面への配慮)

全ての被験者は、研究の内容について説明を受けた後、研究に協力する旨の同意書を書面で残している。遺伝子研究は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成 16 年 12 月 28 日全部改正)」を厳守

して行う。

C. 研究結果

解析対象とした患者は、年齢 63.0 ± 1.7 歳、収縮期血圧 156.7 ± 3.7 mmHg、拡張期血圧 92.7 ± 2.5 mmHg と高血圧を呈すとともに、血漿アルドステロン濃度 (PAC) 32.0 ± 7.3 ng/dl、血漿レニン活性 (PRA) 0.5 ± 0.1 ng/ml/min、ARR 104.4 ± 17.1 であり、低レニン性高アルドステロン血症を示す集団が抽出されていた (表 1)。HSD3B1 遺伝子の全エクソンのシークエンスにより、第 4 エクソンに位置する 3 つの変異を同定した (表 2)。2 つは TTT (Phe286) → CTT (Leu)、AAC (Asn367) → ACC (Thr) のミスセンス変異、残りの 1 つは TTG (Leu338) → CTG (Leu) のサイレント変異であり、マイナーアレル頻度はそれぞれ 0.014、0.042、0.306 であった。NCBI データベースと照合した結果、それぞれ rs6205、rs1047303、rs6203 に該当することが判明した。

D. 考察

サンプルサイズは小さいものの、今回解析対象とした 36 名に HSD3B1 遺伝子の変異が集積しているとすれば、遺伝子変異の頻度が高くなることが予想された。しかし、我々が同定した 3 つの遺伝子変異 rs6205、rs6203、rs1047303 の頻度は、HapMap-JPT、Cohort consortium_J で公開されている日本人の多型頻度と同程度であった。スプライスサイトの変異もまた発現への影響が懸念されるため、各エクソンの両端から上・下流 20bp も解析対象領域

としシークエンス解析を実施したが、遺伝子変異の発見には至らなかった。

今回は解析していないが、プロモータ領域の変異も発現に影響すると考えられる。そこで、Hapmap データベースより今回発見した 3 つの多型を含む日本人のタイピングデータを取得し、Haploview ソフトウェア (ver.1.0) にて連鎖解析を実施した (図 1)。rs6205 は第 1 エクソンの上流 2179 bp、91 bp にそれぞれ位置する rs6661258、rs932603 と連鎖不平衡していた。rs6203 と rs1047303 は、第 1 エクソンの上流 3340 bp に位置する rs4659007 と連鎖不平衡していた。文献的には、rs6661258 は HSD3B1 の転写を阻害するエレメントを含む領域に存在するため、これに連鎖不平衡する rs6205 は、発現量に影響を与える可能性が考えられた。

E. 結論

今回の解析で同定した HSD3B1 遺伝子の 3 つの変異は、いずれもデータベースに既に登録されており、新規遺伝子変異ではなかった。HSD3B1 の活性を亢進すると思われる変異は見いだせなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表2. 全エクソンのシーケンズ解析にて発見した変異とそのアレル頻度

rs No.	exon	function	Major			hetero			Minor			MAF _{NCVC}	HWE p-value	MAF _{JPT} (n=91)	MAF _{Cohort} (HT275/NT286)	MAF _{EJE2010}
			n	%	MAF	n	%	MAF	n	%	MAF					
rs6205	4	ITT(Phe)→GTT(Leu)	35	1	0	0.014	1.97E-09	0.034	0.071	-	-	-	-	-	-	-
rs6203	4	ITG(Leu)→CTG(Leu)	18	14	4	0.306	9.13E-01	0.375	0.412	0.349	0.316	0.412	0.349	0.316	0.316	0.316
rs1047303	4	AAC(Asn)→ACC(Thr)	33	3	0	0.042	6.78E-02	0.102	0.211	0.082	0.045	0.211	0.082	0.045	0.045	0.045

MAF: minor allele frequency, HWE: Hardy-Weinberg equilibrium, EJE: European Journal of Endocrinology, HT: hypertensive population, NT: normotensive population.

表1. 患者背景

	Total (M 14 / F 22)		
	mean	±	SEM
Age (years)	63.0	±	1.7
Body mass index (kg/m ²)	23.0	±	0.9
Systolic blood pressure (mmHg)	156.7	±	3.7
Diastolic blood pressure (mmHg)	92.7	±	2.5
Creatinine (mg/dl)	0.8	±	0.1
Total cholesterol (mg/dl)	215.3	±	5.6
HDL cholesterol (mg/dl)	56.9	±	3.0
Uric acid (mg/dl)	5.6	±	0.2
PAC (ng/dl)	32.0	±	7.3
PRA (ng/ml/min)	0.5	±	0.1
ARR	104.3	±	17.1

HDL; high-density lipoprotein, PAC; plasma aldosterone concentration, PRA; plasma renin activity, ARR; PAC to PRA ratio.

HSD3B1 遺伝子多型と原発性アルドステロン症に関する研究

研究分担者岡村 均京都大学大学院薬学系研究科システムイオロジー分野教授

研究協力者土居雅夫京都大学大学院薬学系研究科システムイオロジー分野准教授

研究要旨

原発性アルドステロン症の有力な原因遺伝子として HSD3B1 が発見された。ヒトの HSD3B (3 β 水酸化ステロイド脱水素酵素) には HSD3B1 と HSD3B2 の二種のアイソザイムがあり、これまで副腎では HSD3B2 のみが存在するとされてきたが、私共は最近、副腎皮質のアルドステロン産生細胞（球状層）においては従来の HSD3B2 とともに「分子時計によって制御される HSD3B1」が強く発現することを明らかにした (Nature Med., 2010)。リズム障害によって高アルドステロン血漿を引き起こすのはこの球状層の HSD3B1 だと考えられ、またこれまで原因不明の原発性アルドステロン症においては、まさにこの球状層に特異的に発現する HSD3B1 の異常が本症の成因に深く関与している可能性が考えられる。そこで本研究では、上述の仮説を病理学的に検証することを目的とし、HSD3B1 と HSD3B2 の違いを識別することのできるサブタイプ別の特異的モノクローナル抗体の作成に取りかかった。GANP マウスを利用した高親和性抗体作製技術を用いた結果、HSD3B1 に対して特異的な抗体クローンを得ることに成功した。

I. 研究目的

興味深いことに、特発性アルドステロン症患者の球状層細胞では Pan-HSD3B 抗体（東北大学笹野教授作製）に対する免疫陽性反応が亢進している。ところがこの HSD3B の正体を特定するにはヒトの 2 種のアイソザイムの極度の構造的類似性が障害となっていた (図 1)。そこで本研究では、HSD3B1 と HSD3B2 の微少なアミノ酸配列の違いを識別することのできる新規モノクローナル抗体の作成を目指した。

J. 研究方法

GANP マウスを利用した高親和性抗体作製法を用いて HSD3B1 に特異的なモノクローナル抗体の作成を行った。抗原としてヒト HSD3B1-GST 融合蛋白質を調製し、GANP マウスに免疫を行った。ELISA 法を用いて抗血清の力価上昇を確認した後、脾臓抗体産生細胞を摘出し、ミエローマ細胞と融合させてハイブリドーマを作製した。HSD3B1 特異的クローンを選出するため、ハイブリドーマの培養上清を用いて HSD3B1-GST に対し陽性かつ

HSD3B2-GST に対して陰性となるクローンを ELISA によりスクリーニングし、その結果、HSD3B1 に特異的な陽性有望クローン (4B15) を得た。本クローンのサブタイプ特異性を裏付けるため、HSD3B1 と HSD3B2 を異所的に発現させた培養細胞の抽出液を用いてウェスタンブロット解析を行った。なお、この際、抗体の特異性を比較する上で、HSD3B1 と HSD3B2 を共に認識する Pan-HSD3B 抗体 (東北大学野教授作製) を対照に用いた。

(倫理面への配慮)

現時点ではマウスを用いた抗体作製の段階にあるため、ヒトの臨床研究には該当しない。

K. 研究結果

我々が今回作出したモノクローナル抗体 (4B15) は HSD3B1 を特異的に認識する抗体であることが分かった (図 2)。すなわち、本抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った結果、本抗体は、HSD3B1 (HA タグ付き) を異所的に発現させた細胞の抽出液において当該蛋白質に相当する約 42kDa のバンドと特異的に反応することが分かった。これに対し、HSD3B1 ではなく HSD3B2 (同様に HA タグ付き) を異所発現させた場合には陽性バンドは検出されなかった。HA 抗体を用いてウェスタンブロットを行うと、HSD3B2 は HSD3B1 と同程度の発現が認められたため、今回我々が作出したモノクローナル抗体は HSD3B2 ではなく HSD3B1 を特異的に認識することが分かった。これに対し、従来から病理解析に用いられていた Pan-HSD3B 抗体を

用いてウェスタンブロットを行ったところ、この抗体は、当初の予想通り、HSD3B1 と HSD3B2 のどちらともを同程度認識することが分かった。

L. 考察

これまで病理解析に広く用いられてきた Pan-HSD3B 抗体は、HSD3B1 と HSD3B2 のサブタイプの違いを区別することができない。これに対し、今回我々が GANP マウスを用いて開発した HSD3B1 特異的モノクローナル抗体を用いれば、HSD3B1 に対してこれまで不可能であったサブタイプ別の病理検査を行うことができると思われる。

M. 結論

HSD3B1 に特異的なモノクローナル抗体の作出に成功した。これによって今後、原発性アルドステロン症の新たな病理検査の可能性が広がったといえる。すなわち、原発性アルドステロン症の患者から切除された副腎腫瘍、副腎過形成組織、および対照群として腎癌などで合併切除された副腎組織における HSD3B1 の発現状態を免疫組織学的に検査することによって、病態の理解が進み、本症に対する新たな診断法や分類法が樹立される可能性がある。

N. 健康危険情報

なし

O. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Doi M, Takahashi Y, Komatsu R, Yamazaki F, Yamada H, Haraguchi S, Emoto N, Okuno Y, Tsujimoto G,

- Kanematsu A, Ogawa O, Todo T, Tsutsui K, van der Horst GTJ, Okamura H: Salt-sensitive hypertension in circadian clock-deficient mice involves hyperproduced adrenal Hsd3b6. *Nature Medicine*, 16, 67-74, 2010.
- 2) Okamura H, Doi M, Fustin JM, Yamaguchi Y: Hypertension due to loss of clock. *Current hypertension Reports*. 13, 103-108, 2010.
- 3) 岡村 均, 土居雅夫: 生体リズム異常と原発性アルドステロン症 原発性アルドステロン症マニュアル 改訂第2版 成瀬光栄、平田結喜諸 編 診断と治療社 7-9, 2010.
- 4) 土居雅夫, 岡村 均: 体リズム異常に伴う高血圧発症メカニズム, *実験医学* 28, 1742-1746, 2010.
- 5) 土居雅夫, 岡村 均: 時計遺伝子と高血圧, *脳* 21, 13(4), 367-371, 2010.
- 6) 岡村 均, 土居雅夫: 血圧調節にかかわる内分泌・代謝・自律神経ネットワーク、*血圧*, 17 (10), 829-834, 2010.
- 7) 岡村 均: 生体時計による血圧調節のメカニズムー新たな高血圧治療薬の開発に向けて、*ファルマシア*, 46(12), 1125-1129, 2011.
- 8) 岡村 均, 土居雅夫: 生体リズムと高血圧、*Annual review 2011 糖尿病・代謝・内分泌*、寺内康夫, 石橋俊, 伊藤裕編、pp159-pp170、中外医学社、2011.
- 9) 岡村 均, 土居雅夫: 生体リズム異常とアルドステロン産生過剰を伴う高血圧、*Annual review 2011 循環器*、山口徹、高本眞一、小室一成、佐地勉編、p73-p80、中外医学社、2011.
- 学会発表
- 1) Okamura H. (Plenary lecture) Novel molecular link between the circadian clock and hypertension, *The Third International Aldosterone Forum in Japan*, May 15-16, Tokyo, 2010.
- 2) Okamura H. (State-of-the-Art Presentation) Aldosterone and Clock, *The 36th International Aldosterone Conference*, San Diego (Convention Center), June 17-18, 2010.
- 3) Okamura H. (Symposium) Novel Molecular Link Between the Circadian Clock and Hypertension, *Meeting of American Society of Nephrology: Renal Week 2010*, Denver, CO, USA, November 16 – 21, 2010.
- 4) 岡村 均: (特別講演) 生体リズムと生活習慣病、第10回日本抗加齢医学会総会、2010年6月11日-13日、京都。
- 5) 岡村 均: (特別講演) 生体リズム異

常と高血圧、第 20 回東京高血圧研究会、
2010 年 9 月 4 日、東京

P. 知的財産権の出願・登録状況
なし

6) 岡村均: (シンポジウム) 時計遺伝子
異常と高血圧、第一回 Molecular
Cardiovascular Conference II、2010
年 9 月 3 日—5 日、キロロ (北海道) .

7) 岡村 均: (シンポジウム) 時計遺
伝子と高血圧、第 31 回日本臨床薬理学
会年会、2010 年 12 月 1 日—3 日、京
都.

8) 岡村 均: (シンポジウム) 体内時計
の異常による高血圧：第 2 回
Hypertension Preminum Club、2010
年 12 月 18 日、大阪.

9) Okamura H., Plenary Lecture at 7th
Anniversary International Scientific
Conference of National Taiwan
University Hospital (NTUH)
Yun-Lin Branch. “The New Era of
Translational Research on
Hypertension”, March 26, 2011,
NTUH YL Branch, Yun-Lin, Taiwan.

10) Okamura H., Plenary Lecture at
International symposium of
aldosterone and hypertension,
March 27, 2011, Taipei, Taiwan