

	(1)	1	10	20	30	40	55								
hHSD3B1	(1)	MTGW	SCLVTGAGGF	LGQR	IIRLLV	KEKELKEIR	VLDKAF	GP	PELREEF	SKLQNK	TK				
hHSD3B2	(1)	-MGW	SCLVTGAGGL	LGQR	IVRLLV	EEKELKEIR	ALDKAF	R	PELREEF	SKLQNK	TK				
	(56)	56	70	80	90	100	110								
hHSD3B1	(56)	LTVLE	GDILDEPFLK	RACQDV	SI	IHTACI	IDVFGV	THRES	IMNVN	VKGTQ	LLLE				
hHSD3B2	(55)	LTVLE	GDILDEPFLK	RACQDV	SI	IHTACI	IDVFGV	THRES	IMNVN	VKGTQ	LLLE				
	(111)	111	120	130	140	150	165								
hHSD3B1	(111)	ACVQAS	VPVFIYTSS	IEVAGP	NSYKEI	IIONGHEE	EPLENT	WEA	PYP	HSKK	LAEKA				
hHSD3B2	(110)	ACVQAS	VPVFIYTSS	IEVAGP	NSYKEI	IIONGHEE	EPLENT	WEA	PYP	HSKK	LAEKA				
	(166)	166	180	190	200	210	220								
hHSD3B1	(166)	VLAANG	WNLKNGG	TLYTCA	LR	MYIY	GEGSR	FLSAS	INEAL	NNNGIL	SSVKG	FST			
hHSD3B2	(165)	VLAANG	WNLKNGD	TLYTCA	LR	TYIY	GEGGP	FLSAS	INEAL	NNNGIL	SSVKG	FST			
	(221)	221	230	240	250	260	275								
hHSD3B1	(221)	VNPVY	VGNVAWA	HILALRA	IQDP	KKAPS	IRGQ	FYYI	SDDT	PHQSY	DNLNY	TL	SKE		
hHSD3B2	(220)	VNPVY	VGNVAWA	HILALRA	IRDP	KKAPS	VRGQ	FYYI	SDDT	PHQSY	DNLNY	IL	SKE		
	(276)	276	290	300	310	320	330								
hHSD3B1	(276)	FGLRL	DSRWS	FPLS	LMYW	IGFLL	IVSFL	IR	PIY	TR	PPFNR	HI	VTLS	NSV	FTFS
hHSD3B2	(275)	FGLRL	DSRWS	LPLT	LMYW	IGFLL	IVSFL	IS	PIY	SM	QPPFNR	HT	VTLS	NSV	FTFS
	(331)	331	340	350	360	374									
hHSD3B1	(331)	YKKAQ	RDLAYK	PLYSW	E	EAKQ	KTVE	WVGS	LVDR	RHKE	TLK	SKTQ	-		
hHSD3B2	(330)	YKKAQ	RDLAYK	PLYSW	E	EAKQ	KTVE	WVGS	LVDR	RHKE	TLK	SKTQ	-		

図1. ヒト HSD3B1 と HSD3B2 のアミノ酸配列の比較
 灰色の背景は2種のアミノ酸配列で共通のアミノ酸配列を示す。

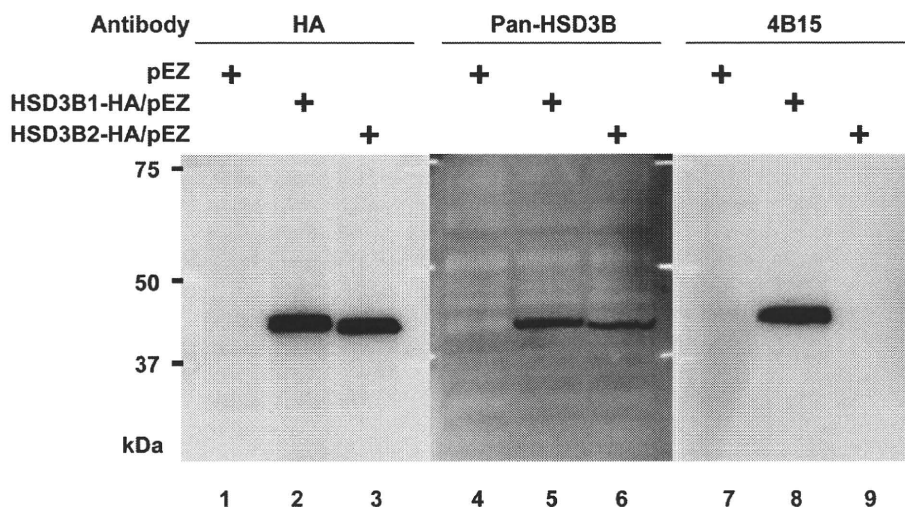


図2. ウェスタンブロット解析による抗体反応の特異性の検定
 HA抗体 (レーン1-3)、Pan-HSD3B抗体 (レーン4-6) および4B15モノクローナル抗体 (レーン7-9) のHSD3B1およびHSD3B2に対する反応の特異性を評価するため、HAタグ付きのHSD3B1蛋白質 (レーン2, 5, 8) もしくはHSD3B2 (レーン3, 6, 9) を異所的に発現させたCOS7細胞の抽出液を用いてウェスタンブロット解析を行った。レーン1, 4, および7には対照として空の発現ベクター (pEZ) をトランスフェクトした細胞の抽出液を流した。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

原発性アルドステロン症の診断法に関する研究

研究分担者 神出 計 大阪大学大学院医学系研究科 老年・腎臓内科学 講師
研究協力者 河合達男 大阪大学大学院医学系研究科 老年・腎臓内科学 医員
研究協力者 楽木宏実 大阪大学大学院医学系研究科 老年・腎臓内科学 教授

研究要旨

原発性アルドステロン症(PA)の診断において副腎静脈サンプリング(AVS)が不可欠とされる。しかし手技的に技能を要する検査であり、すべての施設で施行可能なわけではない。方法としてACTH負荷AVSを行うことが主流となって来ているが、まだ検査の意義、解釈については確立しているわけではない。今回、ACTH負荷AVSの左右比(LR)の意義を負荷前後で検討し、問題点を検討したところ、LRの逆転など診断に関して不確定な点も多いことがあらためて明らかとなった。患者の病態の正確な評価のためには、LRのみならず他のパラメータを含めた総合的な判断が必要であると考えられる。本研究は少数例での検討であるが、PA診断の難しさを示している。遺伝子多型など、より明確な診断マーカーが求められる。

A. 研究目的

原発性アルドステロン症(PA)の診断において、副腎静脈サンプリングは「ゴールドスタンダード」であるとされている。しかし、サンプリングにおけるACTH負荷の意義についてはいまだ確定的な結論が得られていない。また、PA患者はしばしばサブクリニカルクッシング症候群を合併することが知られているが、そうした患者ではサンプリングによるPAの診断は難しくなる。本研究の目的は、副腎静脈サンプリングにおいてACTH負荷前後でのlateralized ratio(LR:高値側のaldosterone/cortisol/低値側のaldosterone/cortisol)の比較を行うことにより、PAの診断におけるACTH負荷の意義を検討することである。

B. 研究方法

生食負荷試験、カプトプリル負荷試験などによって内分泌学的にPAと診断された17人(男性10人、女性7人、平均年齢52.4歳)の患者を対象に、ACTH負荷副腎静脈サンプリングを施行した。

(倫理面への配慮)

本研究は診療の中で得られた情報をもとに後ろ向きに解析されており研究対象者に不利益が生じることはない。個人情報の管理については個人を特定できるIDなどデータベースには含めることなく情報の漏えいがないよう万全を期して行っている。研究は「疫学研究に関する倫理指針(平成14

年6月17日)」を厳守して行われた。

C. 研究結果

今回の検討において、サンプリング手技の難易度の高さもあり、負荷前後ともで両側副腎静脈へのカニューレーションが成功と判断されたのは17例中4例であった。そのうち2例では負荷後LRが低下していた。また残り2例においては、負荷前後でLRの左右逆転がみられた。これらのLR逆転が見られた症例は、最終的に原発性アルドステロン症に「コルチゾールの過剰分泌」を合併していると診断され、現在内服薬にて内科的加療中である。

D. 考察

明らかな内分泌学的異常所見や身体学的異常所見を認めない症例でも、ACTH負荷副腎静脈サンプリングにより「PAにコルチゾール過剰分泌の合併」と診断される症例があった。しかしこれらの症例はサブクリニカルクッシング症候群の診断基準は満たさず、こうした病態はACTH負荷副腎静脈サンプリングによってのみ診断が可能であった。サンプリングにおけるLRはPAの局在診断に有用とされているが、患者の病態の正確な評価のためには、LRのみならず他のパラメータを含めた総合的な判断が必要であると考えられる。本研究は少数例での検討であるが、PA診断の難しさを示している。遺伝子多型など、より明確な診断マーカーが求められる。

E. 結論

副腎静脈サンプリングにおけるLRはPA

の局在診断に有用とされているが、患者の病態の正確な評価のためには、LRのみならず他のパラメータを含めた総合的な判断が必要であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. 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.

学会発表

1. 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 滋賀
2. 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

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

原発性アルドステロン症の診断契機に関する研究

研究分担者 江本憲昭 神戸薬科大学臨床薬学講座 教授

研究要旨

原発性アルドステロン症（PA）は、以前に考えられていたよりも頻度が高く、また手術によって治癒可能であることから、高血圧患者の中からの的確に診断することが重要である。しかし、すべての高血圧患者にスクリーニングすることのコスト・ベネフィットは確立されておらず、PAのスクリーニング検査を行うべき対象を抽出する必要がある。今回、PA患者の診断の契機を後ろ向きに調査したところ、高血圧を伴う偶発腫瘍として発見されたものが42%と最多であった。うち2例（17%）がテレビの情報番組をきっかけとして診断されたものであり、PAに関して医療者・患者とも疾患の認知も重要な要素であると考えられた。しかし、これらは不確定な要素を含んでおり、遺伝子多型などの診断マーカーの確立が望まれる。

A. 研究目的

原発性アルドステロン症（PA）の高血圧症に置ける頻度は、約3〜20%と報告により差があるものの、従来考えられていたよりも高頻度であることが最近示されている。したがって、すべての高血圧患者においてPAの可能性を考える必要があり、レニン活性、アルドステロン濃度の同時測定によるスクリーニングが望ましい。しかし、そのコスト・ベネフィットは確立されておらず、ハイリスク群での積極的なスクリーニングが推奨される。本研究の目的は、PAと確定された患者の診断契機を調査・解析し、積極的なスクリーニングすべきPAのハイリスク群を同定することである。

B. 研究方法

神戸大学医学部附属病院で2000年から2010年に原発性アルドステロン症と診断された12名（男性5名、女性7名）の診断の契機を後ろ向きに診療記録をもとに調査・解析した。

（倫理面への配慮）

本研究は診療の中で得られた情報をもとに後ろ向きに解析されており研究対象者に不利益が生じることはない。個人情報の管理については個人を特定できるIDなどデータベースには含めることなく情報の漏えいがないよう万全を期して行っている。研究は「疫学研究に関する倫理指針（平成14年6月17日）」を厳守して行われた。

C. 研究結果

今回の検討において、診断の契機は、高血圧を伴う副腎偶発腫瘍が5名(42%)、低カリウム合併高血圧が3例(25%)、治療抵抗性高血圧が2例(17%)、若年性高血圧が2例(17%)であった。

D. 考察

今回得られた結果は、高血圧治療ガイドラインで推奨されている「PAを疑い積極的にスクリーニング検査をすべき対象」として提示される項目に一致していた。現在のわが国における画像診断検査が汎用されることから、偶発腫瘍として発見される例が42%と多いことが明らかになった。とくに、うち2例は2010年2月に原発性アルドステロン症についてのテレビ番組放映後に診断された例であり、医療者・患者とも疾患の認知が重要であることを示している。しかし、これらはPAの診断のきっかけが不確定

な要素に依存していることを示唆するものでもある。将来的には高血圧患者に対して遺伝子多型などハイスループットでスクリーニングできる方法の確立が望まれる。

E. 結論

PAを疑い積極的にスクリーニング検査をすべき対象は、今回の研究においても高血圧治療ガイドラインの推奨の範囲であり、高血圧を伴う偶発腫瘍が最多であった。

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

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 笹野公伸 東北大学大学院医学系研究科 病理診断学分野 教授
研究協力者 中村保宏 東北大学大学院医学系研究科 病理診断学分野 助教
研究協力者 小野克彦 東北大学大学院医学系研究科 病理診断学分野 技術補助員

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 タンパクの発現増強を免疫組織学的に検索することを目的とする。

現在、対象となる症例の未染色標本の準備は終了しており、特異的抗体の完成待ちの状態である。

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の患者から摘出された副腎組織では、免疫組織学的に HSD3B1 発現の増強が予想される。本研究では、HSD3B1 特異的な

抗体および最適な免疫染色条件の検討を行うことをその目的とする。

B. 研究方法

東北大学病院において、原発性アルドステロン症の患者から切除されたアルドステロン産生性副腎腫瘍 (APA)、特発性アルドステロン症 (IHA)、さらに対照群として腎癌等で合併切除された副腎組織のパラフィンブロックから未染色標本を作製する。HSD3B1 抗体が完成後、それらの標本に染色を行いグループ間で HSD3B1 タンパク発現度の比較検討を行う。

(倫理面への配慮)

本研究は、東北大学大学院医学系研究科の倫理委員会にて承認されており、かつ得られた結果は匿名化して解析される。また本研究を行うに当たり、生命倫理・安全対

策に関する法令を全て遵守する。

C. 結果

対象となる症例を選択し、未染色標本作成を終了している。

D. 考察

HSD3B1 に特異的な抗体作成が待たれる状況である。

E. 今後の計画

APA、IHA、および対照群の免疫染色を、従来の HSD3B1 および HSD3B2 両者を認識する抗体、および、HSD3B1 に特異的な抗体で比較染色し、HSD3B1 の発現と病態との関連を追及する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

2010 年度会議

会議の名称：22 年度厚生労働科学研究費：第一回 P A ゲノム班会議

日時：2010 年 6 月 4 日 3：00 PM－19：00 PM

場所：京都大学薬学研究科教育棟一階マルチメディア室

(606-8501 京都市左京区吉田下阿達町 46-29)

出席：笹野 公伸、河野 雄平、神出 計、江本 憲昭、岡村 均、
土居雅夫、蔭山奈月（事務）

議題：

1. ヒト・マテリアルのインフォーム・ドコンセントについて
ヒト・マテリアルのインフォーム・ドコンセントの取り方を厳格に適正に進めなくてはならない。全参加施設で行うことに合意。
2. アルドステロン関連高血圧のゲノム解析のためのサンプル収集に関する議論。
ヒト血液の血液サンプルが現状では少ない。これから増やすにはどうすれば良いのか議論。参加施設の増加を図る。
3. 原発性アルドステロン症の診断に関して。
原発性アルドステロン症の定義に関しては、施設間に差がみられる。そのため、学問的レベルを保ち、最速とするには、病理診断、臨床診断を一定の基準で行うことが重要である。このため、診断に用いたスライドなどをある一定の基準で再評価し、再診断を行う。
4. ヒト HSD3B1 と HSD3B2 の遺伝子プロモーター比較解析
ヒト副腎皮質アルドステロン産生細胞 (H295R) を用いて HSD3B1 および HSD3B2 遺伝子のプロモーター解析を行い、球状層特異的 HSD3B1 遺伝子に特異的な転写制御エレメントの同定の試みの報告。

5. 日本における複数のコホート研究との共同研究での高血圧原因遺伝子の解析の試み。

6. ヒト副腎組織での HSD3B1 mRNA 及び蛋白質の発現調節機構の解析

原発性アルドステロン症および対象としてのその他の副腎疾患のために摘出された副腎における HSD 3 B1 遺伝子の mRNA 発現を検討する。

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

Searching Molecular Mechanisms of Dysregulated Clock Induced Primary Aldosteronism: Importance of Human Genomic Study

京都大学大学院薬学研究科医薬創成情報科学専攻システムバイオロジー

Kyoto University, Grad sch Pharm Sci, Dpt Systems Biology

岡村 均

Hitoshi Okamura

1. はじめに

グローバル化の席卷する現代、我々は明暗リズムが破壊された環境下で生活することになり、その結果、多くのヒトは知らず知らずのうちに、体内リズムに変調をきたしている。血圧は体内リズムに制御されている代表的な生理現象であり、我が国の約4000万人の高血圧症患者にとっては、リズム異常は大きな増悪因子である。しかるに、生体リズムがどのような機構で血圧に影響を及ぼすかは全く不明であった。

時計遺伝子のクローニングから分子機構までを手がけたパイオニアとして、現在我々は、時計遺伝子異常による病気の分子機構の解明に全力をあげている。最近では、リズム異常マウスの病理・病態を総合的に探求し、実際のヒトの疾病を分子時計という全く新しい切り口から解明する「時計-疾患プロジェクト Chrono-disease Project」を立ち上げ、生体リズム異常による疾病機構を分子レベルで解明する試みに着手している(1)。従来からの脳機能障害(睡眠覚醒異常・夜間徘徊)のみならず、特に注目するのは臨床

疫学的にリズム異常と関係深い高血圧症、発癌、糖代謝異常などの生活習慣病の発症機構である。

我々は、時計遺伝子 *Cry1/Cry2* が欠失し生体リズムが消失したマウスが食塩感受性高血圧を示すことを明らかにした (2)。その原因は、副腎アルドステロン産生細胞に特異的に発現する時計遺伝子にコントロールされる新型 3 β -水酸化ステロイド脱水素酵素 (3 β -hydroxysteroid dehydrogenase-isomerase: 3 β -HSD) がリズム不全で活性化することによるアルドステロン産生増大であることが明らかとなった。本稿ではこの所見を中心に、時計遺伝子による新しい生体リズムシステムを解説し、ヒトにもあるこのアルドステロン産生量を制御する新しい調節酵素のゲノム研究の重要性、またこの酵素の新しい創薬ターゲットとしての可能性を述べる。

2. 血圧の日周リズム

血圧のような古くから探求されてきた生理現象も、分子レベルでそのメカニズムを述べることは一筋縄では行かない。生理学的には、血圧は心拍出量と末梢血管抵抗の積(血圧=心拍出量 x 末梢血管抵抗) によって規定される。すなわち、高血圧はこの積が上昇することである。生体には血圧を制御する体内システムとしては、自律神経系(交感神経系と副交感神経系)と体液情報(ホルモン)システムがある。交感神経系の活性化(副交感神経系の抑制)は心拍出量を増加させる。また、レニン・アンギオテンシン系の活性化はアルドステロンの増加を促し、腎尿細管からの Na の再吸収とともに水分再吸収で体液量は増加する。アンギオテンシン II や血管自身の局所因子は、血管を収縮させ末梢血管抵抗を増加させる。生体にとって血圧を維持することは、固体を構成する細胞を生かして十分機能させることは最重要項目であって、そのため上述のような多角的な制御機構を取っている。

血圧の重要な特質の一つに日周リズムがある。すなわち、血圧は明け方から上昇に

転じ、午前中上昇し続け昼にピークに達し、午後減少し、深夜最低値に至る（図1）。この血圧リズムは通常の高血圧患者にも見られるが、夜間血圧が増大し、日周リズムが消失する non-dipper という病態では、心血管障害の罹患率上がる要注意群とされ、インテンシブなケアが必要とされている（3）。しかも、交代性勤務など生体リズム（biological rhythms）と異なる勤務形態では、血圧は上昇するとされている（4）。このように、生体リズムと血圧の制御は大変関係が強い。もちろん、従来から言われている交感神経系活動の日内変動もその大きな要因で有ることは違いない。従来まで、多くの研究がなされているが、各要因がどの程度であるのかは、まだほとんど解明されていないのが実情である。現状では、多くの要因の相加的なのが実際の血圧に反映されていると考えてよいであろう。

生体リズムという現象は、有史以前から皆が知っているが、長らく近代科学が説明できない神秘のベールが覆っている生体现象の一つであった。このことが、血圧の日内変動の科学的な研究が遅れていた大きな原因であるが、生体リズムに関しては、1997年に哺乳類の遺伝子が発見されることで一変した。今や、リズム発振の分子機構が解明され、生体リズムは遺伝子から生理現象までが解明された重要な生体システムとして注目されている。では、まずこの新しい生体リズムシステムについて述べよう。

3. 生体リズムへの分子システム

生体リズムの発振は、全身のほとんど全ての細胞で起こっている。すなわち、全身にはリズムに発現する時計遺伝子が構成する数十兆の細胞時計がある（図1下）。時計の中心にいるのは *Per* 遺伝子群（*Per1*, *Per2*, *Per3*）で、強い転写リズムを起こす（1）。このリズム的な転写は、促進因子である CLOCK と BMAL1 が二量体を形成し、プロモーター上の E-box に結合し、*Per* 遺伝子群の転写を促進し、産生された mRNA から PER 蛋白質群ができ、これが核の中へ入って転写抑制因子である CRY

蛋白質群 (CRY1, CRY2) と結合して、転写促進因子を抑制し、フィードバックループが閉じて転写が減少する (図 1 上)。このループは多重のサブグループにより調整を受けている。リズム発振とともに、生体リズムにとっての重要な事項に、振動子自身の外界リズム周期とのリズム位相の同調 *entrainment* がある。このうち、最も重要なのは、環境の明暗周期との同調であり、これには、Per 遺伝子上の *cis-element* の Ca²⁺/cAMP response element (CRE) が関与し、体内の細胞同士の同期では、リズムミックスに変動するグルココルチコイドシグナルを受容する *glucose responsive element* (GRE) が重要になる。

こんなたくさんの時計はバラバラに時を打っているのでしょうか？これらの数十兆個もの末梢（細胞）時計を統合する時計が脳の視交叉上核にある中枢時計である。視交叉上核は数千個の細胞からなる時間発振に特化した神経核でありほぼ恒久的に自発的にリズムを発振することができ、ここからのシグナルは、交感神経系、副交感神経系、副腎皮質ホルモン系に変換され、全身の末梢時計を統括している (図 1 右)。この視交叉上核を破壊すると、生体リズムは消失する。すなわち、生体のリズムシステムは、全身の末梢（細胞）時計の上に、視交叉上核という強力な振動システムを持った神経核が上に乗っているという機構である。

4. 時の止まったマウス *Cry-null* ではアルドステロンの過剰産生による高血圧が起こる

生体に異常を来たすのは並大抵のことではない。というのは、生体は重要な機能に関しては、細胞、細胞間、個体システムなど、全てのレベルで補償することが常態だからである。個体にとっての基本的で、上述のように遺伝子、細胞、臓器レベルと多層レベルで展開している生体リズムシステムに関しても同様であることが想定される。従って、リズムによる異常を検出するには、多層の全てのレベルでのリズムが障害されている、

という重篤なケースでの病態解明が重要ではないかと考え、そのためには完全に時が止まっているマウスの開発を急いだ。それが、哺乳類初の中枢時計も末梢時計も完全にリズムの止まった *Cry1/Cry2* ダブルノックアウトマウス（以下 *Cry*null マウス）である（5,6）。

早速このマウスの血圧の日周変動の測定に用いたが、この測定が成功するには開始して約7年の歳月を要した。最終的には、マウス用テレメトリープローブ（PA-C10 pressure transmitter (Data Sciences International)）を用い、血圧の日周リズムの安定した測定が可能となった。野生型（WT）マウスでは平均動脈圧（mean arterial pressure: MAP）は24時間リズムを描くが、*Cry*-null マウスではリズムでは日周リズムは消失していた。しかし、圧そのものは、通常給餌では変化無かった。そこで、従来より食塩負荷により給餌に3%食塩負荷を行ったところ、MAPは食塩負荷後日ごとに上昇し、一週間後には30mmHgも上昇し140mmHg程度までになり、その後は高血圧が持続した（図2左上）。すなわち、*Cry*-null マウスは食塩感受性の、しかも non-dipper 型の高血圧となったのである。

食塩負荷は、腎尿細管からの Na の再吸収の増大とそれに伴う水の吸収増加による容量負荷が考えられる。我々は、直接これをコントロールするアルドステロンに着目した。血漿アルドステロン濃度（PAC）は、WT マウスは弱いながら24時間リズムを示したが、驚くべきことに *Cry*-null マウスでは、WT マウスにくらべ、5倍から10倍の非常に高いレベルを示した（図2上）。血漿レニン活性が *Cry*-null では低下していることでレニン・アンギオテンシン系は抑制されており（図2上）、副腎を摘出後培養液中へのアルドステロン放出は *Cry*-null で WT の数倍に達することで、PAC 高値は副腎のアルドステロン合成および放出の増大によることが判明した。このアルドステロン増大が高血圧を引き起こしていることは、アルドステロン受容体阻害剤エプレレノン投与により、血圧が正常化することでも明らかである。

一般にステロイド産生はその合成酵素の活性により決定される。そこで、我々は、DNA マイクロアレイ (図 2 右) を 4 時間毎にサンプルした WT と *Cry*-null の副腎に適用することにした。ステロイド合成に関与する数十種の酵素のうち、新しいタイプの 3 β -HSD が、*Cry*-null で非常に高く発現していることが明らかとなった。この新タイプ 3 β -HSD は *Hsd3b6* であって、従来副腎にあると言われていた *Hsd3b1* とは異なるものであった (図 3)。*Hsd3b6* mRNA の定量を Real time PCR でおこなうと、WT に比して、常に 10 倍以上の増加を検出した (図 2 下)。

この酵素の副腎皮質の中の局在を調べたところ、この *Hsd3b6* は副腎の球状層にのみ特異的に発現し、束状層には発現していなかった (図 2 中)。3 β -HSD 活性を持つ酵素は pregnenolone を progesterone に変換するので、性ステロイド、グルココルチコイド、ミネラルコルチコイドの全てに必須の酵素であるが、新タイプである HSD3b6 の局在は、このサブタイプがアルドステロンの合成のみに関与することを示している。

アルドステロン細胞にも末梢 (細胞) 時計があり、様々な遺伝子の 24 時間リズムを制御していると考えられる (図 3)。今回の *Hsd3b6* の転写は時計遺伝子により、DBP を介して正の制御を受け、E4BP4 を介して負の制御を受ける。*Cry*-null マウスの副腎では E4BP4 に比して DBP は常に高いので、*Hsd3b6* は一日を通して転写の増大が見られ、高いレベルで発現が維持され、その結果として惹起された 3 β -HSD の活性の上昇が球状層におけるアルドステロンの合成を常に増大させていると考えられる。

5. *Cry*-null マウスはヒト特発性アルドステロン症 IHA 様の病態を示す

さらに我々は、蛋白質レベルでも、酵素活性のレベルでも *Cry*-null で HSD3b6 の発現上昇が起こっていることを証明した (図 2 下)。さらに実際に *Cry*-null マウスの過剰なアルドステロン分泌を 3 β -HSD 阻害薬であるトリロスタンを用いてブロックできることから (図 2 左)、増大した HSD3b6 が *Cry*-null マウスのアルドステロン過剰産

生を誘導する主要原因分子であると結論づけた。

この *Cry-null* マウスでの食塩感受性高血圧は、ヒトの病態に何に当たるのであろうか。ヒトでは、副腎のアルドステロンの過剰分泌による高血圧は原発性アルドステロン症(Primary Aldosteronism)と呼ばれ、低レニン・高アルドステロン血症が特徴である。副腎の病理は、良性腫瘍である腺腫 (aldosterone producing tumor (APA)) と過形成 hyperplasia である特発性アルドステロン症 (ideopathic hyperaldosteronism:IHA)にわかれる。片側性はAPAが多く、患側副腎摘出術の適応となるが、IHAは両側性であるため、原則としてアルドステロン受容体拮抗薬などによる薬物療法を行う。我々の今回の *Cry-null* は、両側性にアルドステロン産生が亢進していることから、IHA様の病態を示すといえる(8)。ところが、このIHAについては特発性という名の通り、いまでもって病因が特定されておらず、有効な薬物治療法を確立するためには最適な実験動物モデルの樹立と詳細な病態解析が必要とされていた。それゆえ、IHA様の病態を示す *Cry-null* マウスの存在は、IHA病態解明を含む原発性アルドステロン症自身のための有力なモデルとなると考えられる。

6. ヒトにもあるアルドステロン産生を調節する新型 3 β -HSD と高血圧

アルドステロン産生量を決めている球状層特異的な 3 β -HSD の存在は、これまでの副腎の常識を覆すものであるが、このような酵素はヒトにあるのであろうか？これまで、ヒトには 3 β -HSD は副腎では HSD3B2 という酵素一種類しかないとされてきたが、本当にそうであろうか？ヒト染色体 1p12 にある *HSD3B* 遺伝子部位では、*HSD3B1* と *HSD3B2* という2種の発現する遺伝子がある(ここで用いられるネーミングは、発見された年代順に遺伝子名が付けられているのであって、同じ名前であっても機能の類似性を指すものでないことに留意)。我々は、ヒト副腎球状層をレーザーマイクロダイセクション法で採取し、従来無いと思われていた *HSD3B1* がヒトの副腎皮質において球

状層特異的に発現することを明らかにした (図 2 中)。すなわち、マウス *Hsd3b6* に機能的に対応するヒト遺伝子は *HSD3B1* と思われる。

7. ヒト新型 *HSD3B1* の遺伝子多型と高血圧

この *HSD3B1* の多型に関しては興味深いデータが報告されている。スウェーデンの 1944 年生まれの健常者の *HSD3B1* のエクソン 4 の rs6203 の T→C 変異 (Leu338 は変わらない) に関する検討では、収縮期血圧と拡張期血圧がこの多型を有する対象者で上昇した (7)。また、下平らは日本人の本態性高血圧患者を検査し、*HSD3B1* の同部位の T→C 多型の男性患者や、また他の部位ミスセンス多型 (rs1047303 の A→C 変異) に、血圧や血漿アルドステロンの高値を示す傾向を認めた (8)。これらの報告と、マウスの *HSD3b6* 酵素活性によるアルドステロン産生調節という今回の所見を考え合わせると、ヒト *HSD3B1* 遺伝子がアルドステロン産生を介して血圧をコントロールしている可能性を示している。その意味で、*Crynull* マウスの病態に近い原発性アルドステロン症患者でのゲノム検索を行う、今回の「厚生省科学研究費補助金難治性疾患克服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」の研究進行は重要である。

高血圧症は全成人の 30–40%にも達し、心血管障害を引き起こす要因として極めて重要である。興味深いことに、本態性高血圧に分類される疾患のなかで、高アルドステロン値、低レニン値を示すが、原発性アルドステロン症とまでは言えない症例が極めて多いことが注目される。これらの患者は本態性高血圧の 10–20%を占める。これらの患者での *HSD3B1* の発現動態が注目される。

マウスに戻るが、*Crynull* マウスの *HSD3b6* の過剰発現は、トリロスタンによる酵素阻害により、アルドステロン減少と血圧の改善をもたらしている。この結果は、球状層にある対応する酵素であるヒト *HSD3B1* の過剰発現が高血圧を引き起こす可能性が

あり、この酵素サブタイプに対する特異的阻害剤はアルドステロンを直接下げる原因治療薬として注目される。トリロスタンは HSD3B1 及び HSD3B2 両方とも活性を阻害するので、臨床には用いられない。しかし、HSD3B1 特異的阻害剤の開発はアルドステロン特異的に産生を落とし、アルドステロン受容体阻害剤とともに、アルドステロンによる病態改善に寄与する可能性が高く、開発が待たれる。

8. おわりに

最後になったが、このアルドステロンの異常に高い *Cry-null* マウスの血圧調節はどうなっているのでしょうか。我々はこのマウスを7年前のプロジェクト創始時に、圧トランスジューサー法にて検索している。その結果、MAP は $\alpha 1$ 受容体アゴニスト Phenylephrin に対する反応性が極端に減少し、圧反射性心拍応答が亢進していた(9)。すなわち、収縮する機能が落ちており、圧反射による心機能の亢進で血圧を保っている状況であった。当時はこの現象は理解できなかったが、現在では、*Cry-null* マウスのアルドステロンにより血管内の伸展度は相当高く、その血管伸展による局所効果によって、 $\alpha 1$ 受容体の低発現が補償として起こったのではないかと推測している。

今回、全身の時間が止まった *Cry-null* マウスの検索から、食塩感受性高血圧を引き起こす新しいアルドステロン産生調節酵素である球状層特異的 3β -HSD サブタイプを同定した。この結果は、直接的には、リズム失調に伴う高血圧の発症の分子機構を示すのみならず、間接的には、この新タイプの酵素異常によるアルドステロン産生亢進を通じた新しい高血圧発症機構を示すものである。

アルドステロンは臓器障害を来たすと言われ、実際、原発性アルドステロン症は薬物抵抗性を示すだけでなく、心血管系の合併症が多い。今回登場した HSD3B1 は、従来全くアルドステロンの産生と関係あるとは知られていなかった。現在、その生理的発現動態、その細胞内シグナル伝達、その病態時における発現、また特異的阻害剤の開発を