

201128017A

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23年度 総括・分担研究報告書

平成24（2012）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23年度 総括・分担研究報告書

2011 Annual Report of
Genomic Diagnosis of Primary Aldosteronism, Research
on Measures for Interactable Diseases,
Grant for the Ministry of Health labor and Welfare of Japan

研究代表者 岡村均

平成24（2012）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 | 25 |
| | 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 | 33 |
| | 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 | 37 |
| | 笹野 公伸 東北大学医学系研究科病理病態学講座 | 43 |
| | 成瀬 光荣 国立病院機構京都医療センター | 47 |
| IV | 2011 年度会議 | 53 |

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 |
| | 成瀬 光荣 | 国立病院機構京都医療センター内分泌代謝高血圧研究部 | 部 長 |

総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

総括研究報告書

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
研究分担者：成瀬光荣 国立病院機構京都医療センター 内分泌代謝高血圧研究部

研究要旨

原発性アルドステロン症(PA)は難治性高血圧の代表的な疾患の一つであるが、その診断には難渋することが多い。本研究は、煩雑で難しい原因不明な PA のゲノム・分子診断法が確立し、内分泌学的なスクリーニング、画像診断、副腎静脈血採血等の医療コストの大幅な軽減と確定診断率の向上を目指すものである。中心となるのは、我々の発見した、ヒト及びマウスでアルドステロン産生細胞に特異的に発現する新しいタイプの 3 β -HSD (Nature Med, 2010) である。昨年度までの 16 例の PA 患者ならびに 20 例のアルドステロン・レニン比 (ARR)>50 の本態性高血圧患者を用いた先駆的な実験で認められた数個のミスセンス変異を含む異常所見を拡充するため、各研究機関での倫理委員会の承認を済ませ、多数の検体の収集に全力を挙げている。また、新しいタイプの 3 β -HSD が時計遺伝子のコントロール下にあることから、血圧の日内変動が注目されるが、PA 患者のうち入院患者を対象に 24 時間血圧(ABPM)を検討したところ、80 パーセントを超える患者が夜間非降下型(non-dipper)であった。これは、正常の患者が夜間降下型が多数を占めるという結果と全く逆であり、PA の心血管系疾患発症機序の一つとして夜間降圧の減弱がある可能性が示唆された。次に、ゲノム診断を補足するために、キーエンザイムであるヒト新型 3 β -HSD (HSD3B1) の蛋白質情報を利用した新しい診断法を模索した。HSD3B1 は、もう一つの 3 β -HSD のサブタイプで HSD3B2 は、コードする遺伝子情報も蛋白質配列も極めて似ているが、そのわずかな違いを判別することのできる特異的モノクローナル抗体を作成した。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 特異抗体のみでなく、新たに HSD3B2 に対する特異的抗体を取得することに成功した。今後、このサブタイプ特異的抗体による、PA の腫瘍性 (APA) と特発性 (IHA) という PA の二大病型への鑑別診断への応用が期待される。

A. 研究目的

近年、原発性アルドステロン症(PA)の疾病頻度が全高血圧の約 3-10%存在することが知られ、高血圧症の原因として浮上してきたが、PA 診断には、血漿アルドステロン濃度 (PAC)、レニン活性 (PRA)、副腎 CT のみならず、最終的には特殊な手技を要する副腎静脈サンプリングを行い確定診断し、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 年我々は、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) / Δ 5->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を明らかにした (Nature Medicine 2010)。トランスレーション研究により、この酵素はヒト副腎アルドステロン細胞に存在する HSD3B1 であることが明らかとなった。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。昨年度までの PA 患者血液を用いた先駆的な実験で認められた数個のミスセンス変異を含む異常所見を拡充するため、PA 患者より解析の承認を得てより血液・組織サンプル収集を行い検索に備えた。

次に、ゲノム診断を補足するために、キーエンザイムである HSD3B1 の蛋白質情報を利用した新しい診断法を模索した。HSD3B1 は、もう一つの 3 β -HSD のサブタイプで HSD3B2 は、コードする遺伝子情報

も蛋白質配列も極めて似ているが、そのわずかな違いを判別することのできる特異的モノクローナル抗体の作成に挑戦した。その結果、HSD3B1 特異抗体のみでなく、新たに HSD3B2 に対する特異的抗体を取得することに成功した。今後、このサブタイプ特異的抗体による病理検査を用いた、PA の詳細な鑑別診断への応用が期待される。

本年度はさらに、PA 患者のうち入院患者を対象に 24 時間血圧(ABPM)を検討し、PA では、80 パーセントを超える患者が夜間非降下型(non-dipper)であることを明らかとなり、PA の心血管系疾患発症機序の一つとして夜間降圧の減弱がある可能性が示唆された。この事実は、新しいタイプの 3 β -HSD が時計遺伝子の強い制御下にあることと考え合わせると、きわめて注目され、今後の PA における HSD3B1 遺伝子を介する血圧制御の分子機構の解明が期待される。

B. 研究方法

1. 原発性アルドステロン症のゲノム解析

ゲノム解析対象としての血液・組織サンプル収集のための研究は、大阪大学、国立循環器病センター、京都医療センター、京都大学で倫理委員会に申請し、承認を得た。

検査結果により PA と確定診断された被験者に対して、インフォームドコンセントを行い、同意を得た被験者から採血を行うとともに、診療録からデータ収集を行う。収集した静脈血は当センター内で連結可能匿名化したのち血球成分、DNA、RNA、血漿、血清に分離し、凍結保存する。一部の検体は匿名化後に共同研究機関に提供する。目標症例数は 200 例とする。

対象とする遺伝子については、これまでの既報では CYP11B2 との関連が報告されているが、SNP 既報の SNP のみならず、今後新たにゲノムワイド解析や関連の遺伝子のダイレクトシーケンスによる新規 SNP を検索する。対照の設定は、高血圧群および一般住民集団とする。

(倫理面への配慮)

ヘルシンキ宣言、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成 20 年 12 月 1 日一部改正)に基づき実施する。特に、「個人情報保護の方法及び個人情報管理者」、「試料等の保管・管理方法」、「試料等の廃棄方法およびその際の匿名化の方法」については十分に留意する。

2. 原発性アルドステロン症の血圧日内変動に関する検討

PA を診断された入院患者(国立循環器病センター)を対象に、診療録から 24 時間血圧(ABPM)を含むデータを収集した。ABPM は、30 分間隔の設定で計測し、昼間の平均血圧より夜間の平均血圧の降圧が 10%未満の場合に夜間非降下型(non-dipper)と判定した。

3. β -HSD アイソザイムに対する高親和性抗体の作成

昨年実施した HSD3B1 特異抗体につづき、GANP マウスを利用した高親和性抗体作製法を用いて HSD3B2 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 HSD3B2-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。HSD3B2 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 HSD3B2-GST に対し陽性かつ HSD3B1-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、HSD3B2 に特異的な陽性有望クローン(12E4)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(東北大学大塚教授作製)と昨年度作出した HSD3B1 特異的モノクローナル抗体(4B15)を対照に用いた。

C. 研究結果

ゲノム解析対象としての血液・組織サンプル収集のための研究計画は、各研究機関での倫理委員会の承認を済ませた。たとえば、大阪大学の神出は、すでに、36 名(平均年齢 57.3 ± 14 歳、男女比 16:20)の PA 患者から解析の承認を得てサンプル収集している。また、副腎腺腫摘出術を今年施行した 4 例については手術時副腎組織サンプルも得た。昨年以前に手術を行った症例は病理に保存してある標本から未染色標本を病理で解析用に作成した。血液サンプルは DNA, RNA を採取しておりゲノム網羅的解析ならびに遺伝子の末梢血での発現解析を予定している。

原発性アルドステロン症の血圧日内変動に関する検討は、56 名(男性 25 名、平均 62.9 ± 10.5 歳)を対象に検討した。24 時間の平均血圧は $143.9 \pm 16.2 / 85.4 \pm 11.7$ mmHg、日

中の平均血圧は $145.8 \pm 15.8 / 87.0 \pm 11.4$ mmHg、夜間血圧は $140.2 \pm 19.4 / 82.2 \pm 13.3$ mmHg であった。また、11名(20%)が3種類以上の降圧薬を処方されており、46名(82%)が non-dipper であった。

3 β -HSD アイソザイムに対する高親和性抗体の作成実験においては、我々が今回作出したモノクローナル抗体(12E4)はHSD3B2を特異的に認識する抗体であることが分かった。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、HSD3B2(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41kDa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、HSD3B2ではなくHSD3B1(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。また、我々が昨年度樹立に成功したHSD3B1抗体(4B15)は、HSD3B2に特異的な上述の12E4抗体とは対照的に、HSD3B2には反応せずHSD3B1のみを特異的に認識することが分かった。

D. 考察

昨年度までの、前駆実験の結果同定した3つの遺伝子変異 rs6205、rs6203、rs1047303

の頻度が、今回収集している血液サンプルでどのように変動するのかが注目される。またコーディング領域のみでなく、イントロン領域の検索も今後検討する必要がある。

PA患者血圧の日内変動に関しては、これまで、PAの夜間降圧は正常であるとする報告と、減弱しているとする報告があり、一定の解が得られていない。今回の検討の結果、減塩食下の入院中で大部分は降圧薬の投与を受けているという条件であるが、PAにはコントロール不良高血圧や non-dipper の頻度が多かった。PAには心血管系疾患や腎障害を合併することが多いことが知られているが、その発症機序の一つとして夜間降圧の減弱がある可能性が示唆された。

PAの病理検査には、これまで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、我々がGANPマウスを用いて開発したHSD3B1ならびにHSD3B2特異的モノクローナル抗体を用いれば、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

新たに収集した多数のPA患者の血清を用いた、HSD3B1遺伝子のDNAシーケンスの多型解析の進展が期待される。

PAの血圧日内変動に関する検討では、コントロール不良高血圧や夜間降圧の減弱している頻度が多いことを明らかにした。遺伝素因の解明についての検討は進行中であるが、今後、同疾患の遺伝素因の関与を明らかにし、遺伝子解析を導入することでより正確で簡便な診断方法の確立を目指した

い。

昨年度のHSD3B1に引き続き、今年度はHSD3B2に対する特異的モノクローナル抗体を樹立することに成功した。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（APA）、副腎過形成組織（IHA）、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ならびにHSD3B2の発現状態を免疫組織学的に検査することによって、本症の病態の理解が進み、HSD3Bサブタイプをもとにした新たな診断・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

論文発表

- 1 Kawano Y, Ogihara T, Saruta T, Goto Y, Ishii M: Association of blood pressure control and metabolic syndrome with cardiovascular risk in elderly Japanese: JATOS study. *Am J Hypertens.* 24, 1250-6, 2011.
- 2 Yamazaki D, Tabara Y, Kita S, Hanada H, Komazaki S, Naitou D, Mishima A, Nishi M, Yamamura H, Yamamoto S, Kakizawa S, Miyachi H, Yamamoto S, Miyata T, Kawano Y, Kamide K, Ogihara T, Hata A, Umemura S, Soma M, Takahashi N, Imaizumi Y, Miki T, Iwamoto T, Takeshima H: TRIC-A channels in vascular smooth muscle contribute to blood pressure maintenance. *Cell Metab.* 14, 231-41, 2011.
- 3 Kawano Y: Salt intake in children. *Hypertens Res.* 34, 797-8, 2011.
- 4 Kamide K, Kokubo Y, Yang J, Takiuchi S, Horio T, Matsumoto S, Banno M, Matayoshi T, Yasuda H, Miwa Y, Yoshihara F, Nakamura S, Nakahama H, Iwashima Y, Oguro R, Ohishi M, Rakugi H, Okamura T, Miyata T, Kawano Y. Association of intima-media thickening of carotid artery with genetic polymorphisms of the regulator of G-protein signaling 2 gene in patients with hypertension and in the general population. *Hypertens Res.* 34, 740-6, 2011.
- 5 Kawano Y: Diurnal blood pressure variation and related behavioral factors. *Hypertens Res.* 34, 281-5. 2011.
- 6 Iwashima Y, Horio T, Suzuki Y, Takagi T, Kamide K, Ohishi M, Ogihara T, Yoshikawa J, Kawano Y, Rakugi H: Impact of concomitant diabetes and chronic kidney disease on preload-induced changes in left ventricular diastolic filling in hypertensive patients. *J Hypertens.* 29, 144-53, 2011.
- 7 Popov S, Silveira A, Wågsäter D, Oguro R, Matsumoto S, Sugimoto K, Kamide K, Hirose T, Satoh M, Metoki H, Kikuya M, Ohkubo T, Katsuya T, Rakugi H, Imai Y,

- Sanchez F, Leosdottir M, Syvänen A-C, Hamsten A, Melander O, Bertorello AM.: A genetic variation in salt-inducible kinase 1 influences Na⁺,K⁺-ATPase activity in vascular smooth muscle cells and associates with variations in blood pressure. *J Hypertens* 29:2395-2403, 2011.
- 8 Anggraeni VY, Emoto N, Yagi K, Mayasari DS, Nakayama K, Izumikawa T, Kitagawa H, Hirata KI. Correlation of C4ST-1 and ChGn-2 expression with chondroitin sulfate chain elongation in atherosclerosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 406, 36-41, 2011.
- 9 Vignon-Zellweger N, Heiden S, Emoto N. Renal Function and Blood Pressure: Molecular Insights into the Biology of Endothelin-1. *Contributions to Nephrology* 172, 18-34, 2011.
- 10 Fukuda Y, Tanaka H, Sugiyama D, Norisada K, Tatsumi K, Onishi T, Fukuya H, Nogami M, Ohno Y, Emoto N, Kawai H, Hirata KI. Utility of Right Ventricular Free Wall Speckle Tracking Strain for Evaluation of Right Ventricular Performance in Patients with Pulmonary Hypertension. *J Am Soc Echocardiogr.* 24, 1101-1108, 2011.
- 11 Tawaramoto K, Kotani K, Hashiramoto M, Kanda Y, Nagare T, Sakaue H, Ogawa W, Emoto N, Yanagisawa M, Noda T, Kasuga M, Kaku K. Ablation of 3-Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase 1 (PDK1) in Vascular Endothelial Cells Enhances Insulin Sensitivity by Reducing Visceral Fat and Suppressing Angiogenesis. *Mol Endocrinol.* 26, 95-109, 2011.
- 12 Vignon-Zellweger N, Heiden S, Miyauchi T, Emoto N. Molecular Biology of Endothelin-1 in the Renal and Cardiovascular Systems. *Life Sci. in press*, 2012
- 13 Adiarto S, Heiden S, Vignon-Zellweger N, Nakayama K, Yagi K, Yanagisawa M, Emoto N. ET-1 from endothelial cells is required for complete angiotensin II-induced cardiac fibrosis and hypertrophy. *Life Sci. in press*, 2012
- 14 Okamura H, Doi M, Yamaguchi Y, Fustin JM: Hypertension due to loss of clock: novel insight from the molecular analysis of Cry1/Cry2-deleted mice. *Curr Hypertens Rep.* 13, 103-108, 2011.
- 15 Imanishi M, Nakamura A, Doi M, Futaki S, Okamura H. Control of circadian phase by an artificial zinc finger transcription regulator. *Angew Chem Int.* 50, 9396-9399, 2011.
- 16 Ota T, Fustin JM, Yamada H, Doi M, Okamura H. Circadian clock signals in the adrenal cortex. *Mol Cell Endocrinol.*, 349, 30-37, 2011.

- 17 Doi M, Ishida A, Miyake A, Sato M, Komatsu R, Yamazaki F, Kimura I, Tsuchiya S, Kori H, Seo K, Yamaguchi Y, Matsuo M, Fustin JM, Tanaka R, Santo Y, Yamada H, Takahashi Y, Araki M, Nakao K, Aizawa S, Kobayashi M, Obrietan K, Tsujimoto G, Okamura H: Circadian regulation of intracellular G-protein signalling mediates intercellular synchrony and rhythmicity in the suprachiasmatic nucleus. *Nat Commun.* 2, 327, 2011.
- 18 Morimoto R, Kudo M, Murakami O, Takase K, Ishidoya S, Nakamura Y, Ishibashi T, Takahashi S, Arai Y, Suzuki T, Sasano H, Ito S, Satoh F. Difficult-to-control hypertension due to bilateral aldosterone-producing adrenocortical microadenomas associated with a cortisol-producing adrenal macroadenoma. *J. Hum. Hypertens.*, 25, 114-121. 2011.
- 19 Oka K, Suzuki T, Onodera Y, Miki Y, Takagi K, Nagasaki S, Akahira JI, Ishida T, Watanabe M, Hirakawa H, Ohuchi N, Sasano H. Nudix-type motif 2 (NUDT2) in human breast carcinoma: A potent prognostic factor associated with cell proliferation. *Int. J. Cancer*; 128(8): 1770-1782. 2011.
- 20 Yamada S, Tanimoto A, Wang KY, Ding Y, Guo X, Shimajiri S, Sasano H, Sasaguri Y. Non-functional adrenocortical adenoma: A unique case of combination with myelolipoma and endothelial cysts. *Pathol. Res. Pract.*, 207:192-196, 2011.
- 21 Tsujimoto T, Takaichi M, Endo H, Yasuda K, Kishimoto M, Noto H, Gomibuchi H, Yasuda H, Yamamoto-Honda R, Takahashi Y, Kajio H, Sasano H, Noda M. A patient with diabetes and breast cancer in whom virilization was caused by a testosterone-producing mature cystic teratoma containing a Brenner tumor. *Am. J. Med. Sci.*, 341, 74-77, 2011.
- 22 Suzuki T, Miki Y, Nakamura Y, Ito K, Sasano H. Steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in human carcinomas. *Mol Cell Endocrinol.* 340, 148-153, 2011.
- 23 Uruno A, Matsuda K, Noguchi N, Yoshikawa T, Kudo M, Satoh F, Rainey WE, Hui XG, Akahira JI, Nakamura Y, Sasano H, Okamoto H, Ito S, Sugawara A. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ suppresses CYP11B2 expression and aldosterone production. *J Mol Endocrinol.*, 46, 37-49, 2011.
- 24 Nakamura Y, Xing Y, Hui XG, Kurotaki Y, Ono K, Cohen T, Sasano H, Rainey WE. Human adrenal cells that express both 3β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (HSD3B2) and cytochrome b5 (CYB5A) contribute to adrenal androstenedione production. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 123, 122-126, 2011.

- 25 Wang T, Satoh F, Morimoto R, Nakamura Y, Sasano H, Auchus R, Edwards MA, Rainey W. Gene expression profiles in aldosterone-producing adenomas and adjacent adrenal glands. *Eur. J. Endocrinol.*, 164, 613-619, 2011.
- 26 Hayakawa E, Yoshimoto T, Hiraishi K, Kato M, Izumiyama H, Sasano H, Hirata Y. A rare case of ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia associated with aldosterone-producing adenoma. *Intern. Med.* 50, 227-232, 2011.
- 27 Ishidoya S, Kaiho Y, Ito A, Morimoto R, Satoh F, Ito S, Ishibashi T, Nakamura Y, Sasano H, Arai Y. Single-center outcome of laparoscopic unilateral adrenalectomy for patients with primary aldosteronism: lateralizing disease using results of adrenal venous sampling. *Urology*, 78, 68-73, 2011.
- 28 Miki Y, Abe K, Suzuki S, Suzuki T, Sasano H. Suppression of estrogen actions in human lung cancer. *Mol. Cell Endocrinol.*, 340, 168-174. 2011.
- 29 Geisler J, Sasano H, Chen S, Purohit A. Steroid sulfatase inhibitors: promising new tools for breast cancer therapy? *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 125, 39-45. 2011.
- 30 Akishima-Fukasawa Y, Yoshihara A, Ishikawa Y, Watanabe N, Hiroi N, Akasaka Y, Sasano H, Ishii T, Yoshino G. Malignant adrenal rest tumor of the retroperitoneum producing adrenocortical steroids. *Endocr. Pathol.*, 22, 112-117, 2011.
- 31 Verma MK, Miki Y, Sasano H. Aromatase in human lung carcinoma. *Steroids*. 76, 759-764. 2011.
- 32 Yoshida M, Hiroi M, Imai T, Kikumori T, Himeno T, Nakamura Y, Sasano H, Yamada M, Murakami Y, Nakamura S, Oiso Y. A case of ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia associated with multiple endocrine neoplasia type 1. *Endocr. J.* 58, 269-277, 2011.
- 33 Hashimoto N, Kawamura Y, Nakamura T, Murawaki A, Nishiumi T, Hirota Y, Sakagushi K, Kurahashi T, Miyake H, Fujisawa M, Sasano H, Takahashi Y. A case of primary aldosteronism caused by multiple adrenocortical macronodules. *Intern. Med.*, 50, 585-590, 2011.
- 34 Yoshida M, Sasano H, Kikumori T, Imai T, Murakami Y, Nakamura S, Ogawa K, Miyata M, Murakami M, Oiso Y. A case of subclinical Cushing syndrome due to primary pigmented nodular adrenocortical disease associated with adrenocortical adenoma. *Endocrine*, 40, 144-145, 2011.
- 35 Hiraishi K, Yoshimoto T, Tsuchiya K, Minami I, Doi M, Izumiyama H, Sasano H, Hirata Y. Clinicopathological features of

- primary aldosteronism associated with subclinical Cushing's syndrome. *Endocr. J.*, 58, 543-551, 2011.
- 36 Demura M, Wang F, Yoneda T, Karashima S, Mori S, Oe M, Kometani M, Sawamura T, Cheng Y, Maeda Y, Namiki M, Ino H, Fujino N, Uchiyama K, Tsubokawa T, Yamagishi M, Nakamura Y, Ono K, Sasano H, Demura Y, Takeda Y. Multiple noncoding exons 1 of nuclear receptors NR4A family (nerve growth factor-induced clone B, Nur-related factor 1 and neuron-derived orphan receptor 1) and NR5A1 (steroidogenic factor 1) in human cardiovascular and adrenal tissues. *J. Hypertens.*, 29, 1185-1189, 2011.
- 37 Nakamura Y, Satoh F, Morimoto R, Kudo M, Takase K, Gomez-Sanchez CE, Honma S, Okuyama M, Yamashita K, Rainey WE, Sasano H, Ito S. 18-Oxocortisol measurement in adrenal vein sampling as a biomarker for subclassifying primary aldosteronism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 96, E1272-1278, 2011.
- 38 Brown KA, McInnes KJ, Takagi K, Ono K, Hunger NI, Wang L, Sasano H, Simpson ER. LKB1 expression is inhibited by estradiol-17 β in MCF-7 cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2011 Jun 12. [Epub ahead of print]
- 39 Nakamura Y, Rege J, Satoh F, Morimoto R, Kennedy MR, Ahlem CN, Honma S, Sasano H, Rainey WE. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of human adrenal vein corticosteroids before and after ACTH stimulation. *Clin. Endocrinol.*, 2011 [Epub ahead of print]
- 40 Nanba K, Tamanaha T, Nakao K, Tsukamoto Kawashima S, Usui T, Tagami T, Okuno H, Shimatsu A, Suzuki T, Naruse M. Confirmatory testing in primary aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012(in press)
- 41 Ross GP, Barisa M, Auchus R, Amar L, Naruse M, Nishikawa T, Omura M, Pessina AC, Adrenal vein sampling for identification of the subtypes of primary aldosteronism: results on 2635 cases of the avis study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012. (in press)
- 42 岡村 均:生体時計による血圧調節のメカニズム—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.
- 43 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.
- 44 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、高本真一、小室一成、佐地勉編、p73-p80、中外医学社、2011.

- 45 岡村 均：はじめに、特集:体内時計と疾病（企画/岡村均）、医学のあゆみ、239(9)、873-875、2011.
- 46 岡村 均、土居雅夫：生体リズムと高血圧、日本臨牀、70(2):339-347、2012.
- 47 江本憲昭：生体時計と血圧調節、血圧18 (11), 1073-1077, 2011.
- 48 江本憲昭：時計機構の異常と心血管疾患、心臓 43, 150-153, 2011
- 49 岩嶋義雄、河野雄平：原発性アルドステロン症の診断と治療はJSH2009で良いか？循環器内科。70, 389-94, 2011.
- 50 難波多挙、中尾佳奈子、島津章、成瀬光栄。高齢者の原発性アルドステロン症の臨床像：自験 109 例での検討.第 20 回臨床内分泌代謝 Update Proceeding、日本内分泌学会雑誌、87Suppl.59-60:2011.
- 51 成瀬光栄、田辺晶代。もっとわかりやすい原発性アルドステロン症診療マニュアル.2011.診断と治療社
- 学会発表
- 1) Kawano Y: Salt, hypertension, and cardiovascular disease. Autumn Scientific Meeting of the Korean Society of Hypertension 2011, 2011 (11) Busan, Korea (Plenary lecture).
- 2) Okamura H. Coordinated regulation of circadian rhythms and homeostasis by the hormonal suprachiasmatic nucleus outputs. Third World Congress of Chronobiology, Puebla (Mexico), May 5-9, 2011. (Symposium)
- 3) Okamura H. Dysregulated, cell-specific cccg's lead to disease. Gordon Research Conference on Chronobiology, Il Ciocco in Lucca (Barga), Italy, June 12 -17, 2011. (Symposium)
- 4) Okamura H. Clock and renin angiotensin aldosterone system in adrenal gland and kidney. 2011 APS Conference: 7th International Symposium on Aldosterone and the ENaC/Degenerin Family of Ion Channels: Molecular Mechanisms and Pathophysiology, Pacific Grove, CA, USA, September 18—22, 2011. (Symposium)
- 5) Nanba K, Tamanaha T, Nakao K, Kawashima S, Yuno A, Usui T, Tagami T, Shimatsu A, Naruse M, Comparison of clinical characteristics between elderly and younger patients with primary aldosteronism, 37th Meeting of the International Aldosterone Conference, Boston, USA 2011.6.
- 6) Naruse M, Diagnosis and treatment of primary aldosteronism in Japan, PUMCH Clinical Endocrinology and Metabolism Forum, PCEM F 2011、Beijing, China, 2011. 6.

- 7) Naruse M, Clinical guidelines and reality in primary aldosteronism, 27th Meeting of the International Society of Hypertension, Beijing, China, 2011. 11.
- 8) Dwi AN, Emoto N, et al. Cryptochrome Null Mice as Mice Model for Primary Hyperaldosteronism. 第 34 回日本高血圧学会総会、2011 年 10 月 20 日-22 日、宇都宮
- 9) Dwi AN, Emoto N, et al. Lymphatic Capillary Density Increase on Salt Treated Hyperaldosteronism Mice Restrain Hypertension Development. The 76th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, March 16-18, Fukuoka, 2012
- 10) Emoto N. トピックス 体内時計と循環器疾患 The 76th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, March 16-18, Fukuoka, 2012.
- 11) 岡村 均: 時計遺伝子と疾病、日本炎症・再生学会、京都(京都国際会議場)、2011 年 6 月 3 日(教育講演)
- 12) 岡村 均: 分子より見た生体リズム異常による病気、日本交通医学会総会、京都、2011 年 6 月 4 日(特別講演)
- 13) 岡村 均: 生体リズム異常と高血圧、第 34 回日本高血圧学会総会、宇都宮(栃木県総合文化センター)、2011 年 10 月 20 日—22 日(招待講演)
- 14) 神出 計、大石 充、楽木宏実: 原発性アルドステロン症の診療ガイドラインの意義と課題: 各種負荷試験での診断率の比較 第 84 回日本内分泌学会学術総会、神戸、クリニカルアワー 平成 23 年 4 月 21 日
- 15) 中間千香子、神出 計、他: 原発性アルドステロン症診断のための各種機能確認検査に対する年齢の影響 第 34 回日本高血圧学会総会、宇都宮、平成 23 年 10 月 20 日
- 16) 河野雄平: 高血圧治療: 治療抵抗性高血圧への対処. 平成 23 年度日本内科学会生涯教育講演会, 2011 (10) 福岡(教育講演) .
- 17) 河野雄平: 高血圧の食事療法: 効果と限界. 第 34 回日本高血圧学会総会, 2011 (10) 宇都宮(シンポジウム) .
- 18) 成瀬光栄、田中剛史、大谷すみれ、小河淳、田邊真紀人、山崎力、PHAS-J 研究班、EBM-1: わが国の高血圧症における原発性アルドステロン症(PA)の実態調査研究(PHAS-J)、第 65 回国立病院総合医学会、2011.10 月
- 19) 成瀬光栄、PHAS-J 研究班、PHAS-J2 研究班、わが国の高血圧における原発性アルドステロン症(PA)の実態調査研究(PHAS-J)および学会ガイドラインに基づく診断と効果的な薬物療法の確

立に関する研究(PHAS-J2)、第65回国立
病院総合医学会、2011.10月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告

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遺伝素因の解明ならびに血圧日内変動に関する検討

分担研究者 河野雄平 国立循環器病研究センター 高血圧・腎臓科

研究要旨

原発性アルドステロン症(PA)は難治性高血圧の代表的な疾患の一つであるが、その診断には難渋することが多い。PA 発症に関与する遺伝素因を明らかにすることを目指し、該当症例からの遺伝情報を含む検体試料の収集を開始した。また、PA の血圧日内変動については、これまで、夜間降圧は正常であるとする報告と、減弱しているとする報告があり、一定の見解が得られていないことから、当センターで PA を診断された入院患者を対象に 24 時間血圧(ABPM)を検討した。PA 患者 56 名では、11 名(20%)が 3 種類以上の降圧薬を処方されており、46 名(82%)が夜間非降下型(non-dipper)であった。減塩食下の入院中で大部分は降圧薬の投与を受けているという条件であるが、PA にはコントロール不良高血圧や non-dipper の頻度が多く、PA の心血管系疾患発症機序の一つとして夜間降圧の減弱がある可能性が示唆された。

A. 研究目的

原発性アルドステロン症(PA)は難治性の高血圧症の代表的な疾患の一つであり、その診断には、難渋することが多い。

PA は、食塩感受性・難治性の高血圧を呈することが多いものの、血圧値の日内変動についてはよく分かっていない。そこで本研究では、PA 発症に関与する遺伝素因を明らかにすることを目指し、該当症例からの遺伝情報を含む検体試料の収集を行うとともに、その血圧日内変動を明らかにする。

B. 研究方法

1. 原発性アルドステロン症の遺伝素因の解明

当院または他院で行われた検査結果により PA と確定診断された被験者に対して、インフォームドコンセントを行い、同意を得た被験者から採血を行うとともに、診療録からデータ収集を行う。収集した静脈血は当センター内で連結可能匿名化したのち血球成分、DNA、RNA、血漿、血清に分離し、凍結保存する。一部の検体は匿名化後に共同研究機関（大阪大学）に提供する。目標症例数は 50 例とする。

対象とする遺伝子については、これまで