

201231008A

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24年度 総括・分担研究報告書

平成25（2013）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学の再構築

平成24年度 総括・分担研究報告書

2012 Annual Report of
Genomic Diagnosis of Primary Aldosteronism, Research
on Measures for Interactable Diseases,
Grant for the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan

研究代表者 岡村均

平成25(2013)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	23
	神出 計 大阪大学医学研究科老年腎臓内科学講座	27
	江本 憲昭 神戸薬科大学薬学部臨床薬学講座	31
	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	35
	笹野 公伸 東北大学医学系研究科病理病態学講座	41
	成瀬 光栄 国立病院機構京都医療センター	47
	角谷 寛 京都大学大学院医学系研究科ゲノム医学センター	51
IV	2012 年度会議	57

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
	角谷 寛	京都大学大学院医学研究科疾患ゲノムセンター	准教授

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
研究分担者：角谷 寛	京都大学大学院医学研究科 疾患ゲノムセンター

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。我々は原発性アルドステロン症(PA)の遺伝素因を明らかにするために本厚生科研にて、関連研究施設の倫理審査承認を経て、遺伝子検体サンプル収集を行った。今回、HSD3B1 遺伝子のプロモーター領域とコーディング領域のシーケンスを行った。PA 患者の遺伝子検体サンプルは大阪大学 51 検体、国立病院機構京都医療センター40 検体、国立循環器病研究センター23 検体の合計 114 検体である。現在、13 検体についてはいまだにシーケンスが完了していないが、PA と確実に診断がつき、シーケンスが完了した 96 検体について臨床情報との関連解析を行った。その結果、HSD3B1 遺伝子の SNP の一部は PA におけるホルモン・プロファイルに影響を及ぼす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。PA には大きく分けて腫瘍性 (APA) と特発性 (IHA) という 2 つの異なる病変が存在する。今回我々は APA と IHA の病変部において、3 β -HSD 活性を担う酵素が、実は全く別のアイソザイムからなることを発見し、両者の分子基盤の違いに基づいた新たな診断法とその診断のためのツールを提供することができた。我々が作製した、HSD3B1 と HSD3B2 という IHA と APA のそれぞれに特異的な分子マーカーに対する抗体を用いれば、IHA と APA の鑑別診断が可能である。この酵素の差は、副腎静脈血にも反

映しており、分子機構を基にした疾患診断、治療への応用が期待される。最後に、原発性アルドステロン症(PA)の血圧日内変動について検索した。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、循環器病センターで PA と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、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関与する可能性が示唆された。

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るようになり、薬剤抵抗性、難治性の高血圧症の重要な原因として浮上してきた。PA の診断には、血漿アルドステロン濃度 (PAC)、レニン活性 (PRA)、その比 ARR や各種負荷試験等内分泌学検査ならびに、副腎 CT、副腎シンチグラフィといった局在・形態診断、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する。しかし、典型的な症例は必ずしも多いとは言えず、多くの場合、診断に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 の診断を迅速・確実に行うための遺伝子情報の提供を目指すものである。このゲノム診断法が確立できれば、PAC、PRA というスクリーニングや各種内分泌機能検査などに要する医療コストが大幅に軽減されるのみならず、確定診断時の大きな考案データとなり、医療上大きなメリットがある。

本研究主任研究者である岡村は、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 を発見した (Nature Medicine, 2010)。この新 3 β -HSD はリズム異常マウスで過剰に発現

し、その結果高アルドステロン血症を伴う食塩感受性高血圧となり、ヒトにおいて発症機序が不明である PA の原因となっている可能性もある。

先年度には、HSD3B1 遺伝子の 3 つの変異が見つかった。今年度は、新たに本研究のため参加各研究機関の倫理委員会の承認を得、本格的にゲノム収集に乗り出した。得た PA 患者の血液サンプルを用いて、アルドステロン細胞に発現する、3 β -HSD (HSD3B1) のゲノム解析を行い、同遺伝子の遺伝素因が PA に及ぼす影響を検討する。

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。ヒトの 3 β -HSD 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、先の研究で、我々は、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報告している (Nature Medicine., 2010)。リズム障害によって高アルドステロン血症を引き起こすのはこの球状層の HSD3B1 だと考えられ、またこれまで原因が不明であった特発性アルドステロン症 (IHA) におい

てもこの新型の HSD3B1 が病態に深く関与する可能性が考えられた。そこで本研究では、PA の 2 大病変である副腎腺腫 (APA) と IHA の原因究明ならびに鑑別診断を目的とし、まず仮説検証の出発点として HSD3B1 と HSD3B2 に対する特異抗体の作成に取りかかった。我々は、昨年度、HSD3B1 と HSD3B2 に対してそれぞれに特異的なモノクローナル抗体を取得することに成功した。本年度は、当該抗体を用いることによって実際にヒトの副腎標本を用いて APA と IHA の鑑別診断が可能であるかどうかを検証した。この結果、HSD3B のタイプが APA と IHA で大きく異なることを発見したので、さらに、APA と IHA 患者から採取した副腎静脈血を用いた血液を質量分析計でステロイド定量を行うことによって、両者に発現する HSD3B 酵素サブタイプの違いを判別できるかどうか検討した。

最後に、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ゲノム解析

スクリーニングの血漿アルドステロン濃度・レニン活性比(PAC/PRA 比: ARR)が 200 以上を示したため PA が疑われ、各種機能確認検査(カプトプリル負荷、生理食塩水負荷、フロセミド立位負荷)を行ない 2/3 以上の機能確認検査陽性症例を機能的 PA と診断し

た(例:大阪大学)。これらの PA を対象に倫理審査承認後(大阪大学:平成 23 年 3 月)より研究同意取得を開始し、文書による同意の得られた 51 例につき血液検体収集を行い遺伝子解析に用いた。なお国立病院機構京都医療センター内分泌代謝内科(承認:平成 24 年 4 月)より主に PA 症例 40 例、国立循環器病研究センター腎・高血圧科(承認:平成 23 年 7 月)から PA 症例 23 例の血液検体を得た。これらを当科に集積し、DNA 抽出を行い、HSD3B1 遺伝子のシーケンスのために京都大学(プロモーター領域)、国立循環器病研究センター研究所(コーディング領域)に DNA を送付した。シーケンスによって得られた一塩基多型(SNP)ならびに変異と臨床情報との関連性につき解析を行った。

2. 3 β -HSD アイソザイムに対する高親和性抗体の作成

HSD3B1 と HSD3B2 は非常に構造のよく似た酵素であるが、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、昨年度までに HSD3B1 と HSD3B2 のそれぞれのサブタイプに対して特異的なモノクローナル抗体を取得することに成功していた。そこで、今年度はこの 2 種類の抗体を用いて APA と IHA における副腎病変を免疫組織化学的解析により詳細に比較した。さらに APA ならびに IHA 患者から採取した副腎静脈血を用いて、それぞれの血液サンプル中に含まれるプロゲステロンおよびプロゲノロン濃度を液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法(LC-MS/MS)を用いて測定した。

3. 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 と診断された当院入院患者を対象に、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。

(倫理面への配慮) ゲノム研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成 17 年改正 文部科学省・厚生労働省・経済産業省)を遵守し、病理検査は東北大学医学系研究科倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

シーケンス解析の結果、プロモーター領域に rs932603 ヘテロ接合体を 3 例認め、コーディング領域 exon 4 に c.1012C>T (p.L338L, rs6203)、c.1100A>C (p.N367T, rs1047303)、c.856T>C (p.F286L, rs6205)、c.724G>A (p.D242N, rs34638609)、c.550G>A (p.A184T)、c.531C>A (p.G177G, rs190598307)、exon3 に c.298G>A (p.V100I) を認め、rs6203、rs1047303 はそれぞれ複数のヘテロ接合体を認めたがそれ以外は 1-2 例にヘテロ接合体を認めるのみであった。これらの SNP の中では APA, IHA に関連するものは認められなかった。

ホルモンデータと SNP の関連では、c.1100A>C (p.N367T, rs1047303) において A/A (n=72) の平均レニン活性 0.77ng/ml/hr に対して A/C(n=16)は 1.87 と有意な差を認め(p=0.039)、アルドステロン濃度/レニン活性(ARR)も A/A vs. A/C= 956.6 vs. 516.0 (p=0.12) と A/A で高い傾向を示した。

1012C>T もアレル間の解析では PRA 値に影響を及ぼす可能性があり、さらに promoter SNP rs932603 のヘテロを有する患者は ARR が非常に高い傾向があった。アルドステロン濃度や血清カリウム値には明らかな影響を及ぼす SNP は認められなかった。

免疫組織化学的解析の結果、IHA の病巣部では HSD3B1 が強く発現するのに対し、APA では HSD3B1 は発現せず、代わりに HSD3B2 が主体的に発現することがわかった。つまり、同じアルドステロンを産生する細胞であっても、IHA と APA では使われる HSD3B のサブタイプが違うことが判明した。従って、この両者の差で、鑑別診断が可能になることがわかった。そこで我々は次に、この IHA と APA に関する分子機序の違いが、上述の副腎摘除術後の確定診断のみならず、摘除前の診断にも応用できるのではないかと考えた。実は、IHA において強く発現する HSD3B1 は、APA に発現する HSD3B2 に比べ、酵素活性が約 10 倍も高い。そこで、HSD3B によって合成されるプロゲステロンとその基質であるプログレノロンの血中濃度を質量分析法により測定し、その基質・プロダクト比から HSD3B の酵素活性を見積もったところ、やはり、酵素活性の強い HSD3B1 を大量に発現する IHA 患者から採取した副腎静脈血においては、その血中の HSD3B 活性指標が APA 患者に比べて非常に高いことがわかった。このことは、副腎静脈血を用いた血液検査によって APA と IHA の鑑別診断が可能であることを示唆している。

PA の血圧日内変動に関し、56 名(男性 25 名、平均 62.9±10.5 歳)を対象に検討したところ、24 時間の平均血圧は 143.9±16.2/ 85.4

±11.7 mmHg、日中の平均血圧は 145.8±15.8/ 87.0±11.4 mmHg、夜間血圧は 140.2±19.4/ 82.2±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。

D. 考察

HSD3B1 遺伝子の遺伝子多型、変異は PA の病態に影響を及ぼす可能性は低いが、SNP の一部は PA におけるホルモン・プロファイルに影響を及ぼす可能性が示唆された。今回得られた HSD3B1 遺伝子の SNP が PA の発症に影響を及ぼしている可能性につき本態性高血圧、正常血圧者の DNA 検体を用い今後検討していく予定である。

これまでステロイド合成の研究分野で広く用いられてきた 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 に対する特異的抗体を用いれば、IHA と APA の病巣部を免疫組織化学的に区別して染め分けることが可能であるとわかった。これらの結果は、これまで組織学的な形態の差異によって病式の確定診断がなされていた本症において、IHA と APA の違いを分子レベルで識別することのできるまったく新しい病態識別マーカーを与えるものであるといえる。またさらに、我々は質量分析を用いて副腎静脈血中のプロゲステロンとプログレノロンの濃度を測定し、それをもとに副腎全体の HSD3B 活性を見積もった。その結果、HSD3B1 を強く発現する IHA から流れ出る副腎静脈血においては、確かに HSD3B の活性が高いことがわかった。これまではプロゲステロンやプログレ

ノロンというと、単にアルドステロン生成の前駆体として考えられていたため、これらの前駆体の量的な差異がアルドステロン症の診断の指標になりうるという結果は、旧来からの盲点をつく所見となった。現在のところ、IHA と確定診断のついた副腎静脈血サンプルには数に限りがあるため、今回の血液診断法の精度や特異性については今後さらに多くの血液サンプルを検査することによって明らかにする必要がある。

最後に検討した PA の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、一定の見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。

E. 結論

HSD3B1 遺伝子の SNP の一部は PA におけるホルモン・プロファイルに影響を及ぼす可能性が示唆された。

また、HSD3B のサブタイプ特異的抗体の開発は、PA の 2 大病変である APA と IHA に対し、両者の分子基盤の違いに基づいた新たな診断法を提供することができた。我々が作製した、HSD3B1 と HSD3B2 という IHA と APA のそれぞれに特異的な分子マーカーに対する抗体を用いれば、IHA と APA の鑑別診断が可能である。

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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

- 1 Negoro H, Kanmatsu A, Doi M, Suadican SO, Matsuo M, Imanura M, Okinami T, Nishikawa N, Oura T, Matsuji S, Seo K, Tainaka M, Urabe S, Kiyokage E, Todo T, Okamura H*, Tabata H, Ogawa O* (*Corresponding authors): Involvement of urinary bladder Connexin43 and the circadian clock in coordination of diurnal micturition rhythm. *Nature Communications*, 3:809, 2012.
- 2 Fustin J-M, Doi M, Yamada H, Komatsu R, Shimba S, Okamura H: Rhythmic nucleotide synthesis in the liver: Temporal segregation of metabolites. *Cell Reports*, 1:341-349, 2012.
- 3 Ota T, Fustin JM, Yamada H, Doi M, Okamura H. Circadian clock signals in the adrenal cortex. *Mol Cell Endocrinol*. 349:30–37, 2012.
- 4 Imanishi M, Yamamoto K, Yamada H, Hirose Y, Okamura H, Futaki S. Construction of a rhythm transfer system that mimics the cellular clock. *ACS Chem Biol*. 7:1817-1821, 2012.
- 5 Negoro H, Kanematsu A, Matsuo M, Okamura H, Tabata Y, Ogawa O. Development of Diurnal Micturition Pattern in Mice After Weaning. *J Urol*. 2012 Oct 8. [Epub ahead of print]
- 6 Sakuma I, Suematsu S, Matsuzawa Y, Saito J, Omura M, Maekawa T, Nakamura Y, Sasano H, Nishikawa T: Characterization of steroidogenic enzyme expression in aldosterone-producing adenoma: a comparison with various human adrenal tumors. *Endocr J*. 2012 [Epub ahead of print]
- 7 Mise K, Ubara Y, Sumida K, Hiramatsu R, Hasegawa E, Yamanouchi M, Hayami N, Suwabe T, Hoshino J, Sawa N, Hashimoto M, Fujii T, Sasano H, Takaichi K: Cushing's Syndrome after Hemodialysis for 21 Years. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 Nov 21. [Epub ahead of print]
- 8 Felizola SJ, Nakamura Y, Hui XG, Satoh F, Morimoto R, M McNamara K, Midorikawa S, Suzuki S, Rainey WE, Sasano H: Estrogen-related receptor α in normal adrenal cortex and adrenocortical tumors: Involvement in development and oncogenesis. *Mol Cell Endocrinol*. 365(2), 207-211, 2012.
- 9 Brutsaert EF, Sasano H, Unger P, Beasley MB, Golden BK, Inabnet WB, Levine AC: Adrenal Cortical Carcinoma with Late Pulmonary Metastases Causing Clinical Cushing's Syndrome: Case Report with Immunohistochemical Analysis of Steroidogenic Enzyme Production. *Endocr Pract*. 18(6), e138-143, 2012.
- 10 Kukidome D, Miyamura N, Sakakida K, Shimoda S, Shigematu Y, Nishi K, Yamashita Y, Eto M, Sasano H, Araki E. A case of cortisol producing adrenal adenoma associated with a latent aldosteronoma: usefulness of the ACTH loading test for the detection of covert aldosteronism in overt Cushing syndrome. *Intern Med*. 51(4), 395-400, 2012.
- 11 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 adrenocorticotrophic hormone stimulation. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 76(6), 778-784, 2012.
- 12 Imai Y, Kario K, Shimada K, Kawano Y, Hasebe N, Matsuura H, Tsuchihashi T, Ohkubo T, Kuwajima I, Miyakawa M; Japanese Society of Hypertension Committee for Guidelines for Self-monitoring of Blood Pressure at Home: The Japanese Society of Hypertension Guidelines for Self-monitoring of Blood Pressure at Home. *Hypertens Res*, 35, 777-95, 2012.
 - 13 Kamide K, Kawano Y, Rakugi H: Pharmacogenomic approaches to study the effects of antihypertensive drugs. *Hypertens Res*, 35, 796-9, 2012.
 - 14 JCS Joint Working Group (Kawano Y as a member of the working group): Guidelines for the clinical use of 24-hour ambulatory blood pressure monitoring (ABPM) (JCS 2010). *Circ J* 76: 508-519, 2012.
 - 15 Doi Y, Iwashima Y, Yoshihara F, Kamide K, Hayashi S, Kubota Y, Nakamura S, Horio T, Kawano Y: Renal resistive index and cardiovascular and renal outcomes in essential hypertension. *Hypertension*, 60, 770-7, 2012.
 - 16 Kawano Y: Salt, hypertension, and cardiovascular diseases. *J Kor Soc Hypertens* 18: 53-62, 2012.
 - 17 Kawai T, Ohishi M, Takeya Y, Onishi M, Ito N, Yamamoto K, Oguro R, Kamide K, Rakugi H. Adiponectin single nucleotide polymorphism is a genetic risk factor for stroke through high pulse wave pressure: a cohort study. *J Atheroscler Thromb* 2012 (in press)
 - 18 Kawai T, Ohishi M, Onishi M, Takeya Y, Ito N, Kato N, Yamamoto K, Kamide K, Rakugi H. Influence of renin angiotensin system gene polymorphisms on visit-to-visit blood pressure variability in hypertensive patients. *Am J Hypertens* 25:1249-55, 2012.
 - 19 Kawai T, Kamide K, Ito N, Onishi M, Oguro R, Takeya Y, Tatara Y, Maekawa Y, Katsuya T, Ohishi M, Rakugi H. -374 T/A polymorphism in receptor of advanced glycation end product (RAGE) gene is associated with onset of diabetes mellitus, atherosclerosis, and renal dysfunction in patients with hypertension. *Clin Exp Hypertens (in press)*
 - 20 Benigni A, Orisio S, Noris M, Iatropoulos P, Castaldi D, Kamide K, Rakugi H, Arai Y, Todeschini M, Ogliari G, Imai E, Gondo Y, Hirose N, Mari D, Remuzzi G. Variations of the Angiotensin II type 1 receptor gene are associated with extreme human longevity. *AGE* 2012 (in press)
 - 21 Congrains A, Kamide K, Oguro R, Yasuda O, Miyata K, Yamamoto E, Kawai T, Kusunoki H, Yamamoto H, Takeya Y, Yamamoto K, Onishi Y, Sugimoto K, Katsuya T, Awata N, Ikebe K, Gondo Y, Oike Y, Ohishi M, Rakugi H: Genetic Variants at the 9p21 Locus Contribute to Atherosclerosis through Modulation of ANRIL and CDKN2A/B. *Atherosclerosis* (in press)
 - 22 Banno F , Nojiri T, Matsumoto S, Kamide K, Mochizuki N, Miyata T: RGS2 deficiency in mice does not affect platelet thrombus formation at sites of vascular injury. *J Thromb Haematol* (in press)
 - 23 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
 - 24 Adiarso 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
- 25 Toyama Y, Chin K, Chihara Y, Takegami M, Takahashi KI, Sumi K, Nakamura T, Nakayama-Ashida Y, Minami I, Horita S, Oka Y, Wakamura T, Fukuhara SI, Mishima M, Kadotani H: Association between sleep apnea, sleep duration and serum lipid profile in an urban male working population in Japan. *Chest.* doi: 10.1378/chest.12-0338 2012.
 - 26 Yoshimura C, Oga T, Chin K, Takegami M, Takahashi K, Sumi K, Nakamura T, Nakayama-Ashida Y, Minami I, Horita S, Oka Y, Wakamura T, Fukuhara S, Mishima M, Kadotani H: Relationships of decreased lung function with metabolic syndrome and obstructive sleep apnea in Japanese males. *Intern Med.* 51(17):2291-7, 2012
 - 27 Harada Y, Oga T, Chin K, Takegami M, Takahashi K, Sumi K, Nakamura T, Nakayama-Ashida Y, Minami I, Horita S, Oka Y, Wakamura T, Fukuhara S, Mishima M, Kadotani H: Differences in relationships among sleep apnoea, glucose level, sleep duration and sleepiness between persons with and without type 2 diabetes. *J Sleep Res.* 21(4):410-8, 2012.
 - 28 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.* 97(5):1688-1694, 2012.
 - 29 Rossi GP, Barisa M, Allolio B, Auchus RJ, Amar L, Cohen D, Degenhart C, Deinum J, Fischer E, Gordon R, Kickuth R, Kline G, Lacroix A, Magill S, Miotto D, Naruse M, Nishikawa T, Omura M, Pimenta E, Plouin PF, Quinkler M, Reincke M, Rossi E, Rump LC, Satoh F, Schultze Kool L, Seccia TM, Stowasser M, Tanabe A, Trerotola S, Vonend O, Widimsky J Jr, Wu KD, Wu VC, Pessina AC. The Adrenal Vein Sampling International Study (AVIS) for identifying the major subtypes of primary aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab* 97(5): 1606-1614, 2012.
 - 30 Nanba K, Usui T, Minamiguchi S, Mori Y, Watanabe Y, Honda K, Asato R, Nakao K, Kawashima ST, Yuno A, Tamanaha T, Tagami T, Naruse M, Akiyama Y, Shimatsu A: Two rare TSH receptor amino acid substitutions in toxic thyroid adenomas. *Endocr J.* 59(1):13-19, 2012.
 - 31 岡村均、Fustin J.M.: 生体時計ネットワークによる動的ホメオスタシスとその破綻、*実験医学 増刊号『臓器円環による恒常性の維持・変容・破綻』*、2013年2月号
 - 32 土居雅夫, 岡村均: 時計遺伝子と高血圧の発生機序、*月刊循環器 CIRCULATION* 2013年1月号
 - 33 岡村均: 生体リズム異常と食塩感受性高血圧、*医学のあゆみ* 243 (7)、579-585、2012.
 - 34 岡村均、土居雅夫: 生体リズムと高血圧、*日本臨牀*、第70(2)、339-347、2012.
 - 35 土居雅夫, 岡村均: 生体リズム異常と高血圧、*現代医学* 60, 173-179 (2012)
 - 36 土居雅夫, 岡村均: 時計遺伝子と高血圧、*日本薬理学雑誌* 139, 227-228 (2012)
 - 37 山田裕之、岡村均: 体内時計概論、*Bio Clinica* 27(6)、532-537、2012
 - 38 岡村均、土居雅夫: 体内リズム異常と高血圧、*医学のあゆみ* 241 (13)、971-977、2012.
 - 39 土居雅夫, 岡村均: これからもっと増える生体リズム調節分子—細胞時計からシステム時計のメカニズムへ—、

細胞工学 Special Review 31, 344-348 (2012)

- 40 土居雅夫, 岡村均: 細胞内 G 蛋白質シグナルの仕分けが生体リズムのタイミングを決める— 目覚まし遺伝子 RGS16 の発見— 化学と生物 50, 5-7 (2012).
- 41 高橋 克敏, 広浜 大五郎, 西本 光宏, 本田 紘嗣, 樽見 さおり, 高野 幸路, 福本 誠二, 國土 典宏, 笹野 公伸, 藤田 敏郎: 副腎皮質癌は 18F-FDG PET で経過観察すべきか? 手術後の補助化学療法中に治療方針再考を迫られた一例, 日本内分泌学会雑誌 88 巻, 49-51, 2012.
- 42 岩嶋義雄, 河野雄平: 治療抵抗性高血圧への対処: 二次性高血圧の診断と治療, 循環器内科 72, 474-81, 2012.
- 43 角谷寛: 8 時間以上の長時間睡眠高血圧、動脈硬化の有意な危険因子に: Monthly ミクス. Congress eX-press 2012 年 10 月号 特別号 P6, 2012
- 44 角谷寛: 睡眠と遺伝. 「脳とこころのプライマリケア」千葉茂 編 株式会社シナジー 346-350, 2012.
- 45 William F. Young Jr., 田辺晶代, 成瀬光栄: 特別座談会 原発性アルドステロン症: 日常診療と世界の動向. 最新医学 67:129-136, 2012.
- 46 成瀬光栄, 難波多挙, 立木美香, 中尾佳奈子, 玉那覇民子, 革嶋幸子, 臼井健, 田上哲也, 広川侑奨, 黒田昌志, 伊藤剛, 奥野博, 島津章, 田辺晶代. 副腎腫瘍の臨床アップデート「原発性アルドステロン症の診療ガイドラインの現状と課題」. 内分泌・甲状腺外科学会雑誌. 29 (2) :94-100, 2012.

学会発表

- 1) Okamura H: (Invited Lecture) Clock gene, aldosterone and hypertension. Keystone Symposium: Molecular

Clockworks and the Regulation of Cardio-Metabolic Function, Apr 3 - Apr 7, 2013.

- 2) Okamura H: (Invited Speaker) Clock genes and aldosterone production, Symposium of Adrenal gland, 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer, Kanazawa (Ishikawa Ongakudo), Nov 15-17, 2012.
- 3) Okamura H: (Invited Lecture) Dysregulated clock controlled genes and hypertension, Aldosterone&Salt: Heart & Kidney 2012, Palm Cove (Queensland), Australia, Oct 5-7, 2012.
- 4) Okamura H: (Plenary Lecture) Clock gene, aldosterone and hypertension, Hypertension Sydney 2012: 24th Scientific Meetings of the International Society of Hypertension, Hypertension Sydney 2012, Sydney (Australia), Sept 30 - Oct 4, 2012.
- 5) Okamura H: (Invited Speaker) Clock Genes and Hypertension; Symposium Primary Aldosteronism - Advances in Genetics and Management, in The 94th Annual Meeting of American Endocrine Society. (ENDO 2012)-Houston, Texas, USA June 23-26, 2012.
- 6) Okamura H: (Plenary Lecture) Circadian Clock genes and hypertension, 15th International Congress of Endocrinology & 14th TH European Congress of Endocrinology, ICE/ECE, Florence (Fortezza da Basso), Italy, May 05-09, 2012.
- 7) 岡村 均, 教育講演、生体リズム異常と高血圧、第 85 回日本内分泌学会学術総会、名古屋市(名古屋国際会議場)、2012 年 4 月 19 日
- 8) 岡村 均, 招待講演、時計遺伝子の研究最前線、シンポジウム「長寿の秘訣を時間栄養学から探る」、国際素材会議 (International Food Ingredients & Additives Exhibition and Conference, ifa: アイフィア) および健康食品エキスポ

- (Health Food Exposition; HFE)健康食品エキスポ、東京(東京ビックサイト)、2012年5月25日
- 9) 岡村 均、基調講演、生体リズム異常と疾病:臓器の時計とその異常、第21回日本小児泌尿器科学術総会、岡山市(岡山コンベンションセンター)、2012年7月5日
 - 10) 河野雄平: Application of home blood pressure measurement and ambulatory blood pressure monitoring in the management of hypertension: 第76回日本循環器病学会総会、2012(3)福岡。
 - 11) Kawano Y: Hypertension in Japan and the role of salt reduction. World Heart federation / World Congress of Cardiology Scientific Sessions, 2012(4) Dubai, United Arab Emirates.
 - 12) Kawano Y, et al. Self-measurement of daily salt intake from overnight urine using an electronic device in the management of hypertension. 24th Meeting of the International Society of Hypertension, 2012(10) Sydney, Australia
 - 13) 神出 計; 第84回日本内分泌学会学術総会 クリニカルアワー 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 2012, 4, 21 神戸
 - 14) 中間千香子、神出 計、他: 原発性アルドステロン症局在診断のための選択的副腎静脈サンプリングに対する年齢の影響 平成24年度日本老年医学会総会 2012, 6, 29 東京
 - 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スクリーニングにおける年齢の影響 第35回日本高血圧学会総会 2012, 9, 20. 名古屋
 - 16) 角谷寛(教育講演) 低酸素と脳、日本睡眠学会第37回定期学術集会、横浜、2012 2012/6/29 パシフィコ横浜
 - 17) 成瀬光栄 特別講演Ⅲ「原発性アルドステロン症～臨床家・若手研究者が知るべき知見～」 第16回日本内分泌病理学会学術総会 2012.10.12
 - 18) 成瀬光栄、難波多挙、中尾佳奈子、玉那覇民子、革嶋幸子、立木美香、臼井健、田上哲也、奥野博、田辺晶代(シンポジウム) 原発性アルドステロン症の診療ガイドラインの現状と課題 第24回日本内分泌外科学会総会 2012.6.08-09
 - 19) 成瀬光栄、難波多挙、立木美香、田辺晶代、PHAS-J2 研究班 シンポジウム: 原発性アルドステロン症診療ガイドラインの現状と課題 第85回日本内分泌学会 2012.4..21
- H. 知的財産権の出願・登録状況**
- 1) 登録番号: 特願2012-222030、発明の名称: 原発性アルドステロン症の検出方法及びモノクローナル抗体、発明者氏名: 岡村均、土居雅夫、佐藤文俊、笹野公伸、森本玲、伊藤貞嘉、中村保宏、出願(登録)年月日: 2012年(平成24年)10月4日

分担研究報告

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、継続している。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、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関与す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

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 を診断された当院入院患者を対象に、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。

C. 研究結果

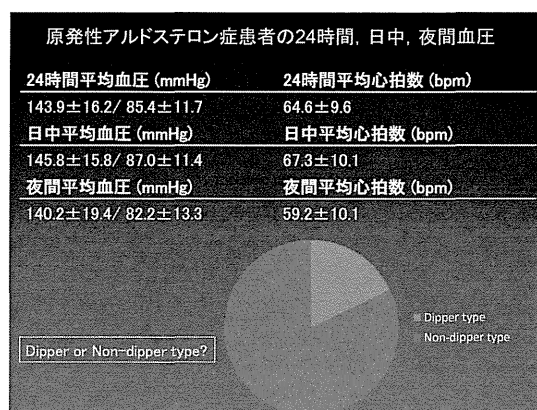
1. 原発性アルドステロン症の遺伝素因の解明

当センター倫理委員会に倫理申請書類を提出し、2011 年 5 月に承認を得た(研究課題番号 M23-15)。収集作業を効率的に進めるために、当センターでのバイオバンクと共同で行うこととし、研究計画に変更を行い、2011 年 12 月に承認を得て(研究課題番号 M23-15-2)、収集作業を開始・進行しており、これまで 28 名から同意を得て検体収集をした。

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

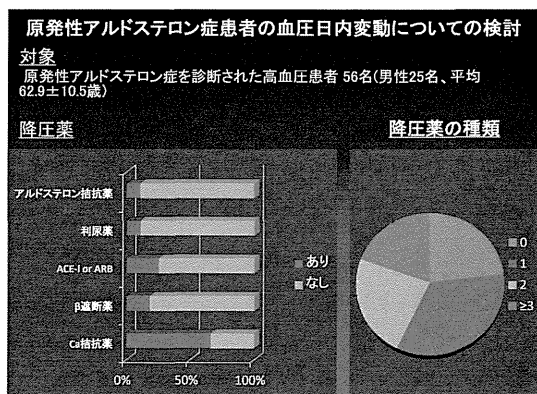
56 名(男性 25 名、平均 62.9±10.5 歳)を対象に検討したところ、24 時間の平均血圧は 143.9±16.2/ 85.4±11.7 mmHg、日中の平均血圧は 145.8±15.8/ 87.0±11.4 mmHg、夜間血圧は 140.2±19.4/ 82.2±13.3 mmHg であった【図 1】。

【図 1】



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【図 2】。

【図 2】



D. 考察

これまで、PA の夜間降圧は、正常であるとする報告 1-3 と減弱しているとする報告 4-6 があり、一定の見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。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

- 1 Imai Y, Kario K, Shimada K, Kawano Y, Hasebe N, Matsuura H, Tsuchihashi T, Ohkubo T, Kuwajima I, Miyakawa M; Japanese Society of Hypertension Committee for Guidelines for Self-monitoring of Blood Pressure at Home: The Japanese Society of Hypertension Guidelines for Self-monitoring of Blood Pressure at Home. Hypertens Res, 35, 777-95, 2012.
- 2 Kamide K, Kawano Y, Rakugi H: Pharmacogenomic approaches to study the effects of antihypertensive drugs. Hypertens

Res, 35, 796-9, 2012.

- 3 JCS Joint Working Group (Kawano Y as a member of the working group): Guidelines for the clinical use of 24-hour ambulatory blood pressure monitoring (ABPM) (JCS 2010). Circ J 76: 508-519, 2012.
- 4 Doi Y, Iwashima Y, Yoshihara F, Kamide K, Hayashi S, Kubota Y, Nakamura S, Horio T, Kawano Y: Renal resistive index and cardiovascular and renal outcomes in essential hypertension. Hypertension, 60, 770-7, 2012.
- 5 Kawano Y: Salt, hypertension, and cardiovascular diseases. J Kor Soc Hypertens 18: 53-62, 2012.
- 6 岩嶋義雄、河野雄平: 治療抵抗性高血圧への対処：二次性高血圧の診断と治療, 循環器内科 72, 474-81, 2012.

学会発表

- 1 河野雄平：Application of home blood pressure measurement and ambulatory blood pressure monitoring in the management of hypertension: 第76回日本循環器病学会総会，2012(3) 福岡.
- 2 Kawano Y: Hypertension in Japan and the role of salt reduction. World Heart federation / World Congress of Cardiology Scientific Sessions, 2012 (4) Dubai, United Arab Emirates.
- 3 Kawano Y, et al. Self-measurement of daily salt intake from overnight urine using an electronic device in the management of hypertension. 24th Meeting of the International Society of Hypertension, 2012 (10) Sydney, Australia