

5. 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

ENDO2013 (米国 サンフランシスコ) および ISARSH2013 (仙台) にて発表の予定。

**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対照群に関する疫学的研究

研究分担者 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 准教授

### 研究要旨

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今年度、当大学倫理委員会に PA の遺伝子・組織解析を申請し承認を受けた(原発性アルドステロン症遺伝素因の解明 - 承認番号 G475)。これにより、京都大学内で本研究関連の遺伝子解析が可能となった。ヒトゲノムの網羅的解析を行うためには、多数の患者例とともに、それと同数以上の対照群が必要となる。そこで、先行して実施している職域のゲノム疫学サンプルに加えて、他の職域・地域におけるコホート研究を開始した。随時血圧データを複数年にわたって取得し、それと降圧剤の服用データを組み合わせることで、高血圧のない対照群のデータを蓄積することが出来る。二次性高血圧の理由として筆頭に挙げられている睡眠無呼吸症候群についても携帯型装置で解析しているので、これを除外することが可能である。既存データとしては、2004-2005年に大阪府の職域を対象としたゲノム疫学研究により、7回連続自動血圧計に夜血圧測定を行った 325名の成人男性の血圧、降圧剤服用、睡眠時無呼吸、睡眠時間、GWAS（ゲノムワイド相関解析）などのデータが有る。本年度は地域における研究では115名のエントリーが有り、職域を対象とした研究では32名のエントリーが予定されている。今後これらのデータも含めて解析を行なっていきたい。

### A. 研究目的

ヒトゲノムの網羅的解析を行うためには、多数の患者例とともに、それと同数以上の対照群が必要となる。そこで、高血圧を持たない対照群を中心にデータを蓄積することが本研究の目的である。

測定した最終二回の血圧測定の平均値

（140/90以上を閾値）、降圧剤の服用歴を元に、高血圧のある群（91例）とない群（234名）に分け、それらの年齢、BMI、ESS（エプワース眠気尺度）、睡眠時無呼吸症候群、睡眠時間について検討した。

### B. 研究方法

2004-2005年にゲノム疫学研究にエントリーした325名の男性を対象に、連続7回

（倫理面への配慮）

本研究において個人情報学内の研究者が持たず、個人情報と匿名化ID番号の対応

表は外部で管理されている。個人情報と切り離されて解析されるため、研究対象者に不利益が生じることはない。研究は「疫学研究に関する倫理指針」を厳守して行われた。

### C. 研究結果

高血圧のある群では、高血圧のない群と比較して、年齢が高く (45.5 ± 7.88 vs. 40.6 ± 8.86;  $p < 0.0001$ )、睡眠1時間あたりの無呼吸・低呼吸数 (RDI: respiratory disturbance index) が多かった (11.5 ± 11.7 vs. 7.27 ± 8.59;  $p = 0.0024$ )。BMI、ESS、睡眠時間においては差が認められなかった。高血圧の有無を従属変数、RDIおよび年齢を独立変数としてロジスティック回帰分析を行ったところ、RDIおよび年齢のオッズ比 (95%信頼区間、 $p$  値) は、1.04 (1.00-1.07,  $p = 0.031$ ) および 1.07 (1.04-1.11,  $p < 0.0001$ ) であった。

### D. 考察

高血圧のある群では年齢、RDIが高かった。高血圧の解析を行う際には、年齢及び二次性高血圧をもたらす睡眠時無呼吸症候群の程度についても考慮することが望ましいと思われる。睡眠時無呼吸症候群があると、今後血圧が上昇する可能性が高いと考えられるので、この疾患の除外には意味があると思われる。なお、海外では睡眠時間と高血圧の関係も指摘されているが、睡眠時間やBMIとの相関は認められなかった。

### E. 結論

職域を対象としたゲノム疫学研究のサンプルにおいて、高血圧の有無について解析した。年齢、睡眠時無呼吸症候群の程度が

高血圧と関係していることが示された。高血圧に関するゲノム研究の対照群をさらに集積し、一般群ではなく高血圧のない群を対象としたPAのゲノム研究に貢献していきたい。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

論文発表

- 1 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.
- 2 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
- 3 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.
- 4 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
  - 5 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.
  - 6 Tsuchiya Y, Minami I, Kadotani H, Todo T, Nishida E: Circadian clock-controlled diurnal oscillation of Ras/ERK signaling in mouse liver. *Proceedings of the Japan Academy, Ser. B, Physical and Biological Sciences.* In press.
- 学会発表
- 1 Kadotani H, Uetsu M. Ease of Use of a Web-based Sleep Survey System. *ASRS2012.* 2012/11/30-12/2. Taipei, 台湾
  - 2 Chin K, Murase K, Toyama Y, Harada Y, Akashiba T, Tastumi K, Inoue Y, Satoh M, Sakurai S, Sakakibara H, Shiomi T, Kimura H, Miyazaki S, Tsuda T, Bessho K, Yoshida K, Ueshima K, Akamizu T, Kadotani H, Hoshino Y, Oga T. The comparison of the effect of two Chinese herbal medicines (Bofu-tsusho-san and Dai-saiko-to) on metabolic disorders in obstructive sleep apnea patients with sustained obesity and hypertension. *17th Congress of the APSR.* 2012/12/14-16. Hong Kong
  - 3 Kadotani H, Yamaguchi M, Nagai Y. Association between sleep duration and hypertension in Nagahama 0-degree Cohort Study. *SLEEP2012.* 2012/6/9-13. Boston, USA.
  - 4 H. Kadotani, T. Kadotani. Sleep, quality of life and depression in a Japanese male working population. *ESRS 2012.* 2012/09/04-08. パリ、フランス
  - 5 角谷寛. アクチグラムは睡眠時無呼吸症候群の評価の際に有効か? 第19回日本時間生物学会. 2012/9/15. 北海道
  - 6 Kadotani H, Genetics of Human Sleep from genotype to phenotype. *Turkish Sleep Medicine Society 13th National Sleep Medicine Congress.* 2012/12/12-14. Antalya, Turkey
  - 7 Ahmet Ugur Demir, Hiroshi Kadotani. Evaluation of Epidemiological investigations of sleep disorders in Turkish and Japanese communities. *Turkish Sleep Medicine Society 13th National Sleep Medicine Congress.* 2012/12/12-14.
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

# 2012 年度会議

# 平成24年度厚生労働科学研究費 第3回PAゲノム班会議

会議の名称: 24年度厚生労働科学研究費: 第3回PAゲノム班会議

日時: 2012年12月21日 14:30-18:00

場所: 京都大学薬学研究科マルチメディア室 (教育棟 1階)

## 平成 24年度第2回 PA ゲノム班会議プログラム

- 14:30-14:35 挨拶: 岡村 均(京都大学薬学研究科)
- 14:35-15:05 神出 計(大阪大学医学研究科老年・腎臓内科)
- 15:05-15:35 土居 雅夫(京都大学薬学研究科システムバイオロジー)
- 15:35-16:05 中村 保宏(東北大学医学研究科病理診断学)
- 16:05-16:35 角谷 寛(京都大学医学研究科ゲノム医学センター)
- 16:35-17:05 江本 憲昭(神戸薬科大学臨床薬学研究室)
- 17:05-17:35 難波 多挙(京都医療センター内分泌代謝高血圧研究部)
- 17:35-18:00 まとめと総括: 岡村 均(京都大学薬学研究科)

参加者:

大阪大学 神出 計  
東北大学 中村 保宏(笹野代理)  
京都医療センター 難波 多挙(成瀬代理)  
京都大学医学研究科 角谷 寛  
京都大学薬学研究科 土居 雅夫、岡田 和樹、山村 公基、太田 拓巳、  
岡村 均

総括・事務: 岡村均・蔭山奈月

606-8501

京都市左京区吉田下阿達町 46-29 薬学部 別館 4階

京都大学大学院 薬学研究科 医薬創成情報科学講座システムバイオロジー分野  
075-753-9552 (教授室) [okamurah@pharm.kyoto-u.ac.jp](mailto:okamurah@pharm.kyoto-u.ac.jp);

[n.kageyama@pharm.kyoto-u.ac.jp](mailto:n.kageyama@pharm.kyoto-u.ac.jp)

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/system-biology>

議題：

## 1. 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の成果

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。収集した 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。引き続き、サンプル採取とシーケンスを研究機関終了まで続ける予定である。

## 2. 原発性アルドステロン症の臨床診断

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。この差は国際間では特に顕著で、副腎静脈血 (AVS) の採血を取っている多くの国内の施設に比して、欧米においても一般的とは言えず、そのため、病因や頻度などの人種差や地域差を本当に論じられるのかどうかはかなり注意せねばならない。学問的レベルを保ち、最速でするには臨床診断を一定の基準で行うことが重要である。その統一とともに、病理診断を一体化した検索が今後も必要である。さらに、AVS の LC-MS/MS によるステロイド量の測定によるアルドステロン症の新診断法を提示した。

## 3. 原発性アルドステロン症の病理診断

原発性アルドステロン症の診断には現在 CYP11B2 が病因として最も考えられているので、この CYP11B2 が診断に用いられる試みがあるが、APA での発現は一部には強いものがあるが、全体としては弱いこと、正常の副腎皮質球状層でもその発現は一樣でないことなど、他のマーカーが求められてきた。我々の今回の研究で、HSD3B1/HSD3B2 はこの CYP11B2 の弱点を克服するマーカーとして非常に有力である。我々は、各々のサブユニット HSD3B1、HSD3B2 特異的なモノクローン抗体の開発に成功した。その結果、驚くべきことに、APA では HSD3B2 のみが非常に強く発現しており、IHA では HSD3B1 が強く発現していることを明らかにした。このように、腫瘍、非腫瘍の診断マーカーとして、これらのモノクローン抗体は大いに期待される。

以上、PA ゲノム班は、この 3 年間で、PA ゲノム解析によるアルドステロン合成の病理病態の検索から、その診断に至る成果を得ることができた。

平成24年度 厚生労働科  
学研究難治性疾患克服研  
究事業

第2回PAゲノム班会議  
日時:2012年12月21日  
場所:京都大学薬学研究科

## HSD3B11遺伝子多型と原発性アルドステロン症 の原因診断に関する研究

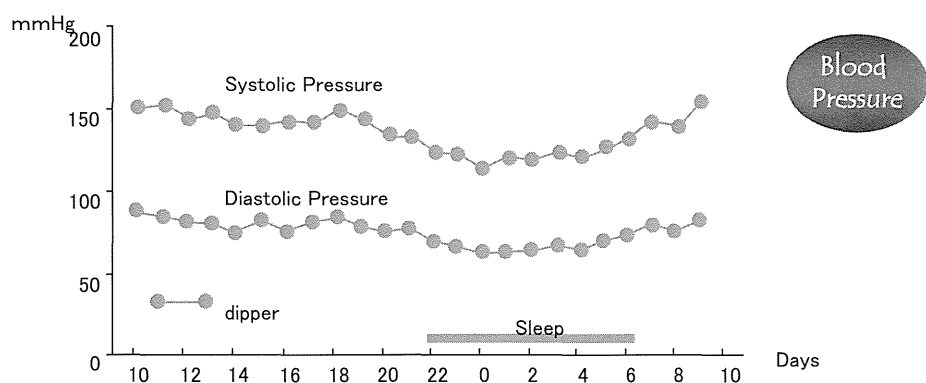
京都大学薬学研究科医薬創成情報科学講座

岡村均、土居雅夫

東北大学医学研究科病理診断学

笹野公伸、中村保宏

## 血圧の日内変動

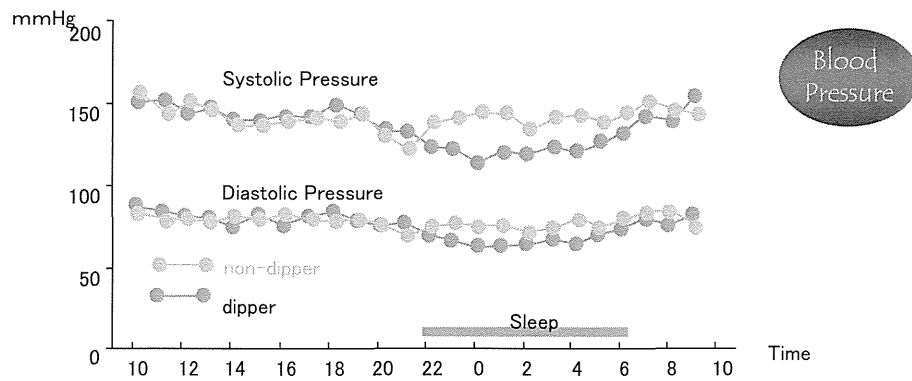


Measurement of blood pressure is  
essential in primary medical care

江本憲昭(神戸薬科大学薬学部、神戸大学医学系研究科)教授提供資料



## 高血圧の日内変動測定でのnon-dipper typeは心血管系の合併症の高リスク群



江本憲昭(神戸薬科大学薬学部、神戸大学医学系研究科)教授提供資料

## 心筋梗塞の日内変動: 血圧が上がるとき頻発

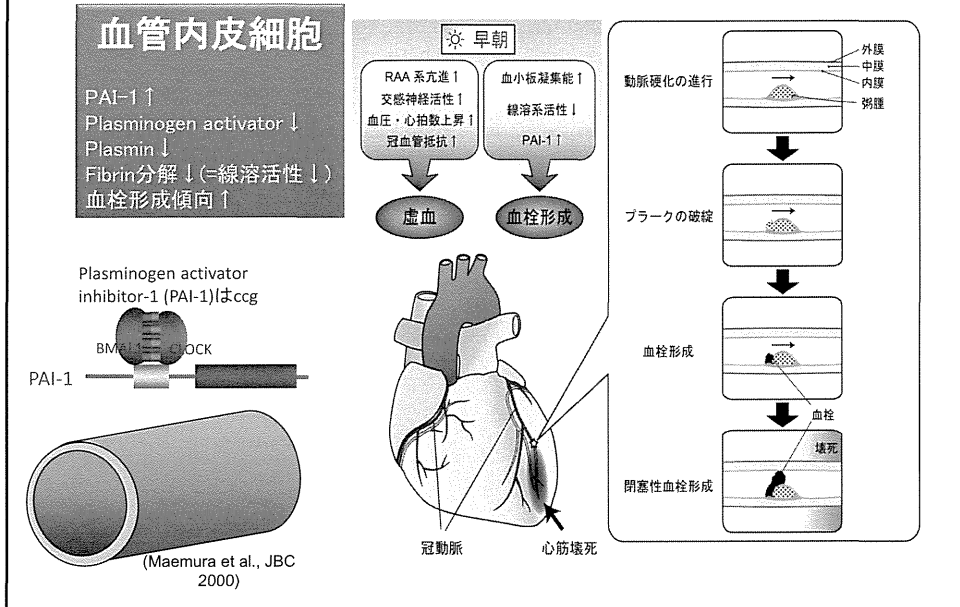
The Hourly  
Frequency of Onset  
of Myocardial  
Infarction

MILIS Study(1985)

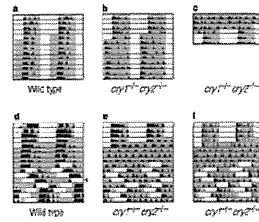
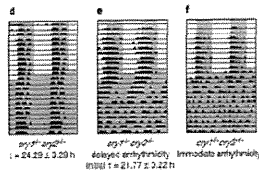
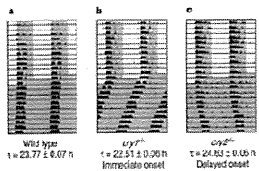
ISAM Study(1989)

Incidence of myocardial infarction correlates to  
the timing of increasing blood pressure

## なぜ朝に心筋梗塞が頻発するのか

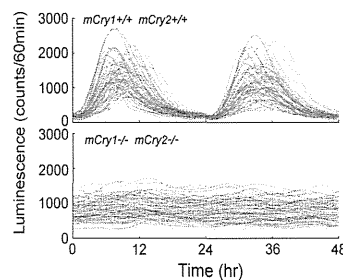


## 生体リズム完全消失マウス *Cry-null* の確

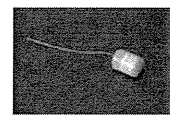


(van der Horst, Nature 1999)

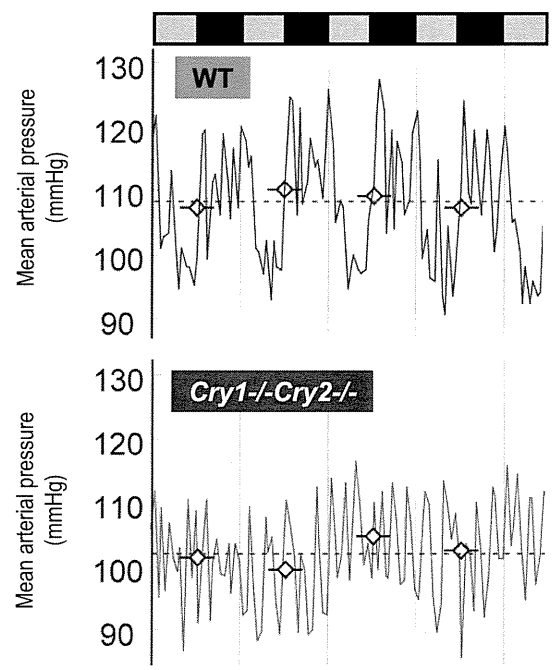
- Van der Horst G.T.H., et al. *Nature*, 389:627-630 (1999)  
Discovery of *Cry-null* mice with complete arrhythmicity
- Okamura H., et al. *Science*, 286:2531-2534 (1999)  
Central clock stops in *Cry-null* mice
- Yagita K., et al. *Science*, 292:278-292 (2001)  
Peripheral clocks stop in *Cry-null* mice



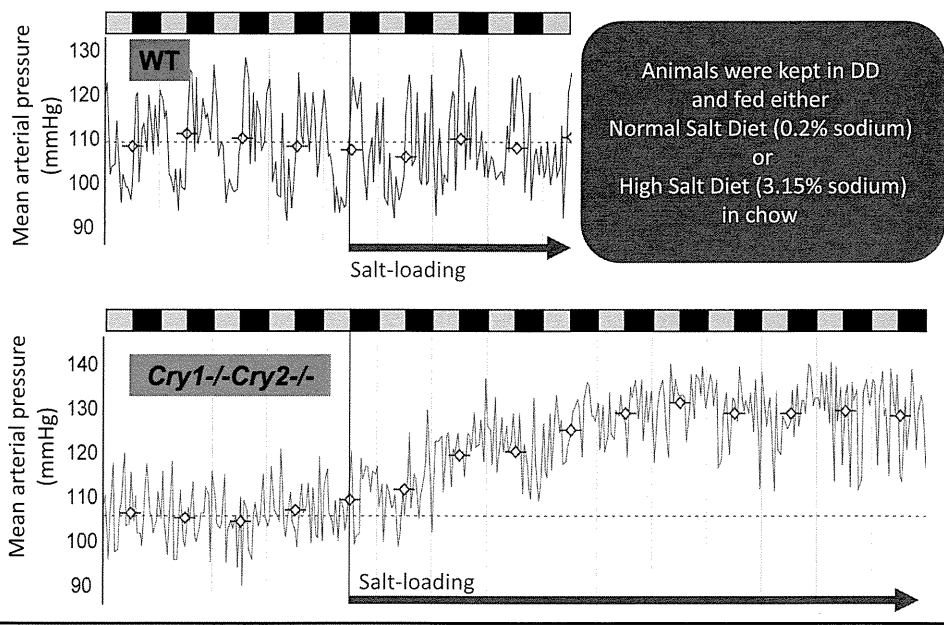
Continuous monitoring of arterial pressure in mice by inserting telemetric catheter into aortic arch through left common carotid artery

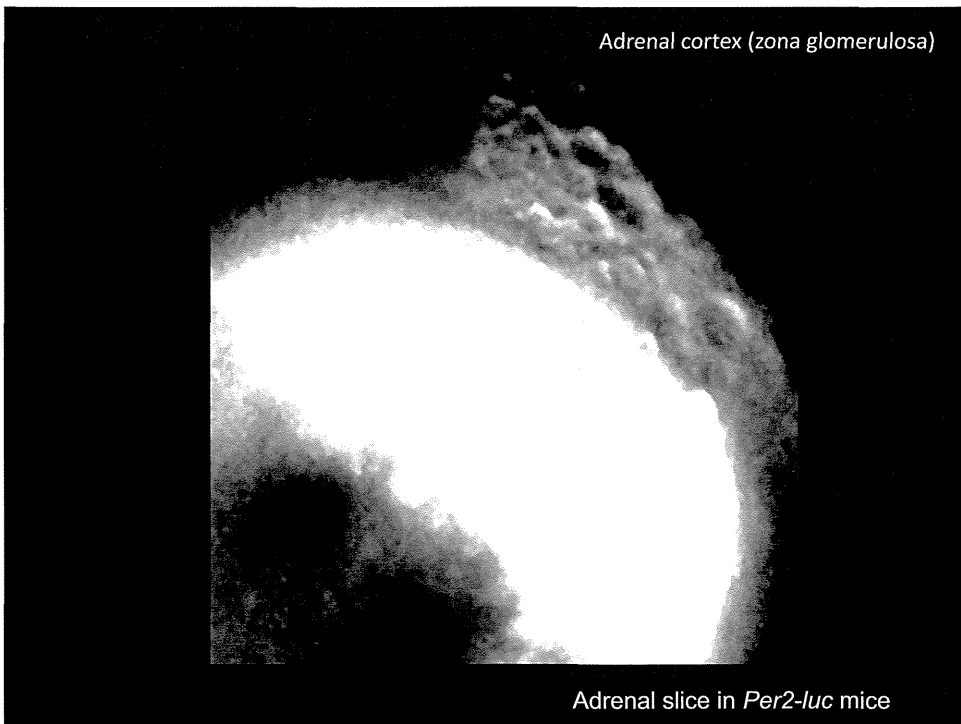
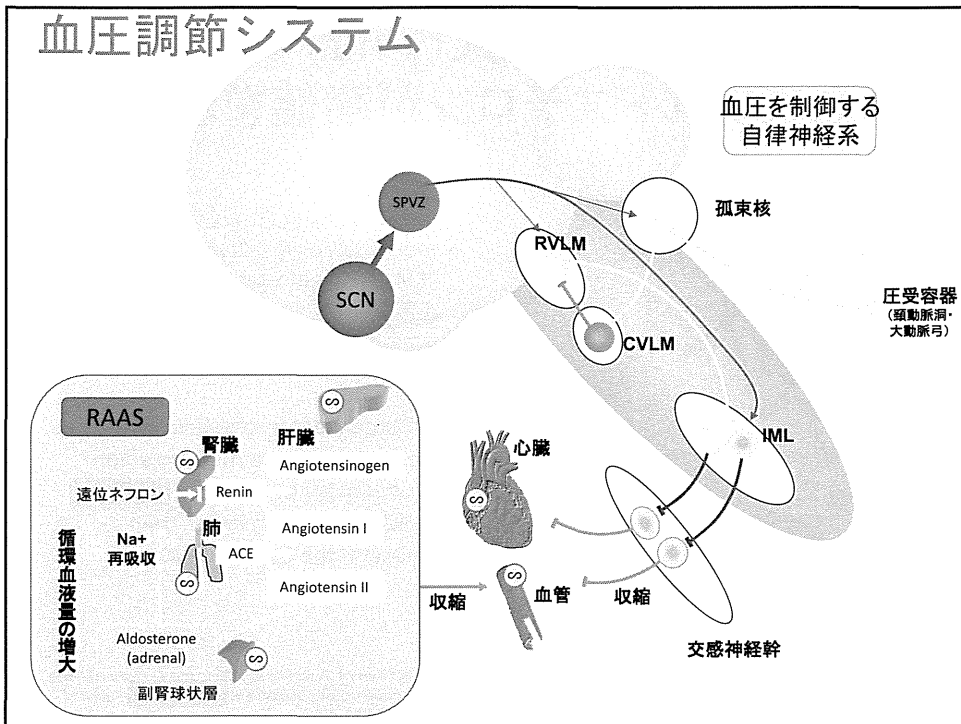


The PA-C10 pressure-sensing catheter

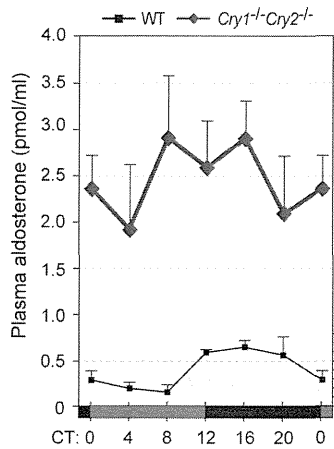


### High salt diet induces *Cry*-null mice to hypertension





## 時計が止まっているCry-nullマウスでは 血漿アルドステロンが高値を示す

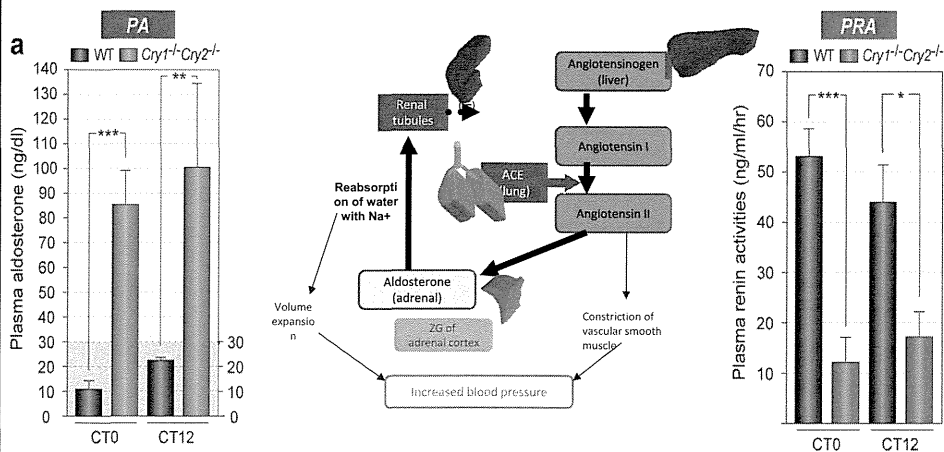


Plasma aldosterone content is remarkably high in Cry-null mice (RIA using aldosterone-specific antibody).

Plasma aldosterone levels in WT mice displayed a mild circadian fluctuation, but the overall PA values are much lower than those in the Cry-null mice.

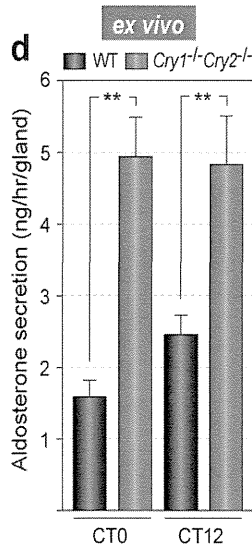
Doi M, Takahashi Y, Komatsu R, Yamazaki F, Yamada H, Haraguchi S, Emoto N, Okuno Y, Tsujimoto G, Kanematsu A, Ogawa O, Todo T, Tsutsui K, van der Horst GTJ, Okamura H: *Salt-sensitive hypertension in circadian clock-deficient mice involves dysregulated adrenal Hsd3b6* Nature Medicine, 16 (1), 67-74,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

## Cry-nullマウスの血漿レニン活性は低下



\* The plasma renin activity was determined by a conventional RIA method, which measures the production of angiotensin I from the endogenous angiotensinogen for a 60-min incubation at 37°C.

## Cry-nullマウスの副腎ではアルドステロンのHyper-production が起こっている



副腎を取り出して、培養条件下で、アルドステロンの放出量を見る。Cry-nullマウスでは、アルドステロンの分泌量が増している。

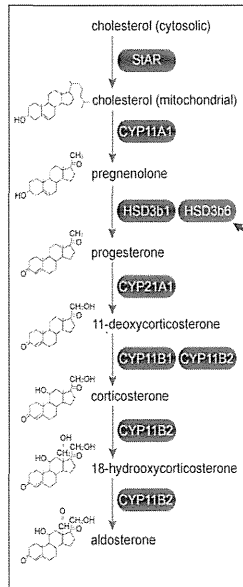
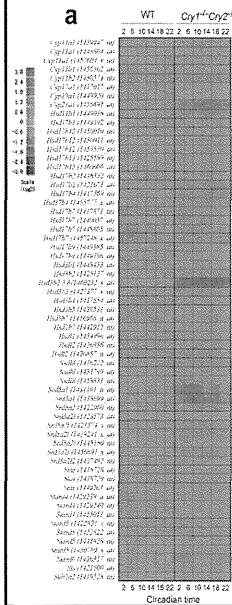
In an *ex vivo* tissue culture system of adrenal gland, aldosterone-secretion-rate in Cry-null adrenal is significantly higher than that of the WT

### Methods

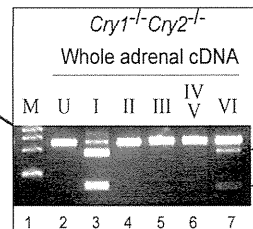
Immediately after surgical isolation, adrenal glands were surgically isolated, and cut into slices under a dissecting microscope.

These slices were preincubated in serum-free DMEM/F12 medium, aerated with 5%CO<sub>2</sub> - 95% O<sub>2</sub> gas mixture at 37°C to wash out the serum carryover. Then, slices were placed to the fresh serum-free medium, and incubated for 1 hr, and the amounts of aldosterone secreted into the medium were determined by RIA.

## 副腎において時間特異的マイクロアレイをすると、Hsd3bファミリーの新しいものがCry-nullマウスの副腎で極めて高値を示した

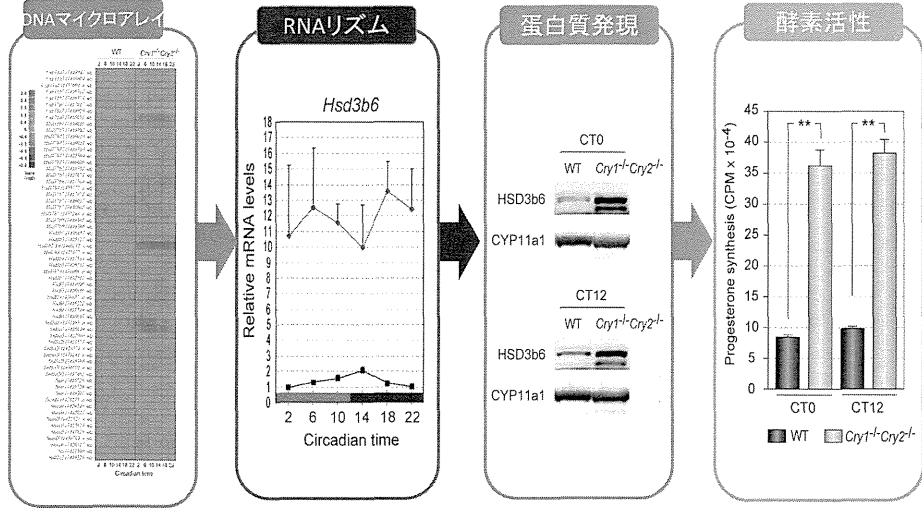


Affimatrix Microarray was performed to investigate all steroidogenic enzymes in adrenal at various time points in WT and Cry-null mice. Only a gene probe (146022\_s\_at) showed a strong labeling. This probe hybridizes with Hsd3b2, Hsd3b3 and Hsd3b6 among 6 members of Hsd3b family..

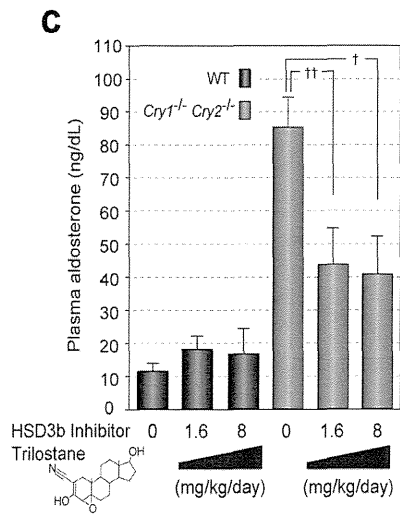


By RT-PCR combined with subtype-specific restriction endonucleases, we observed that the mouse adrenal glands express only type I and VI Hsd3b isoforms, while the other isoforms (i.e. types II to V) were undetectable

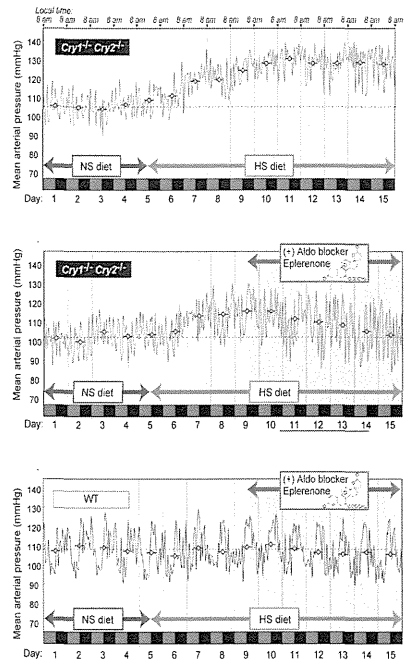
Hsd3b6 は mRNA, たんぱく質、酵素活性レベルにまで反映される



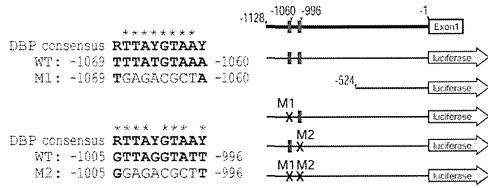
3β-HSD 酵素阻害剤である trilostane (gavage, 1.6-8mg/day, 7days) は、血漿アルドステロン値を下降させる



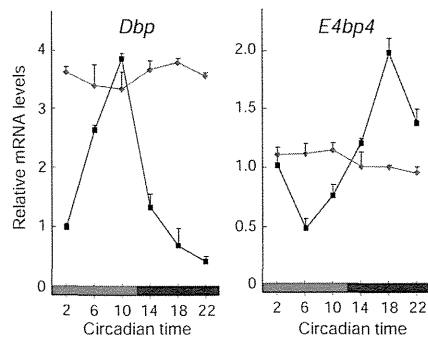
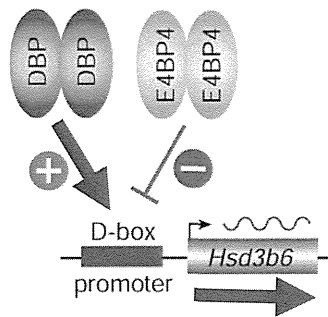
アルドステロン受容体阻害剤である Eplerenone は、Cry-nullマウスの血圧を正常化させる



### Hsd3b6のプロモーターにはD-boxがあり、ここで時計遺伝子の制御を受ける

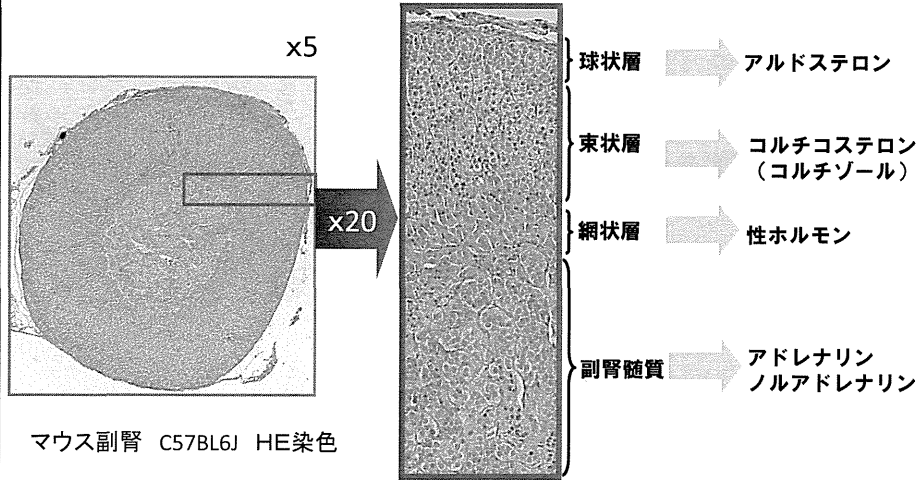


Clock-controlled DBP is always up-regulated in Cry-null mice





## 副腎は部位によってホルモン分泌が異なる

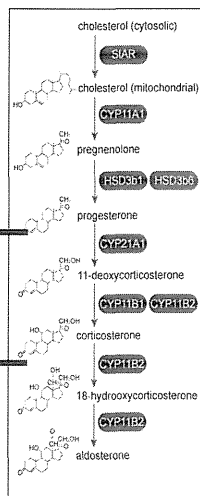


## 産生するステロイドの種類は細胞が どんな合成酵素を持つかで決まる

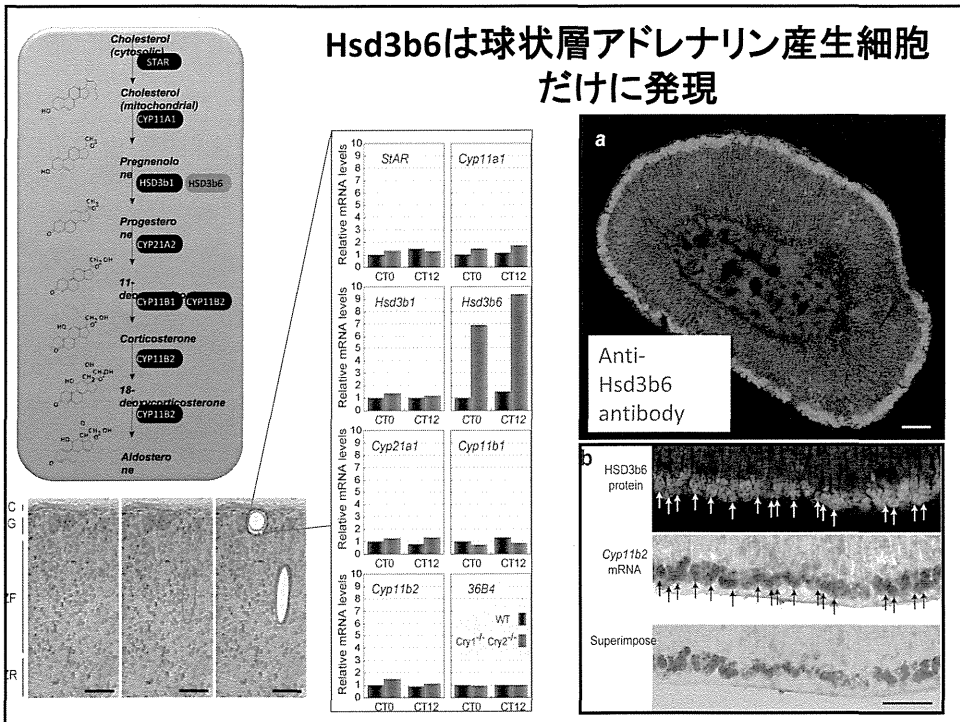
球状層細胞  
アルドステロン

束状層細胞  
コルチコステロン  
コルチゾール

性ステロイド  
プロゲステロン



## Hsd3b6は球状層アドレナリン産生細胞だけに発現

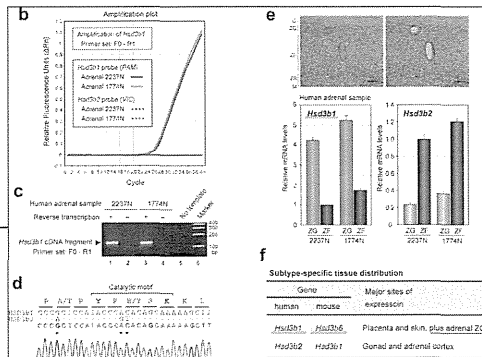


## ヒトにもマウスHsd3b6にあたる副腎球状層特異的酵素ヒトHSD3B1が存在

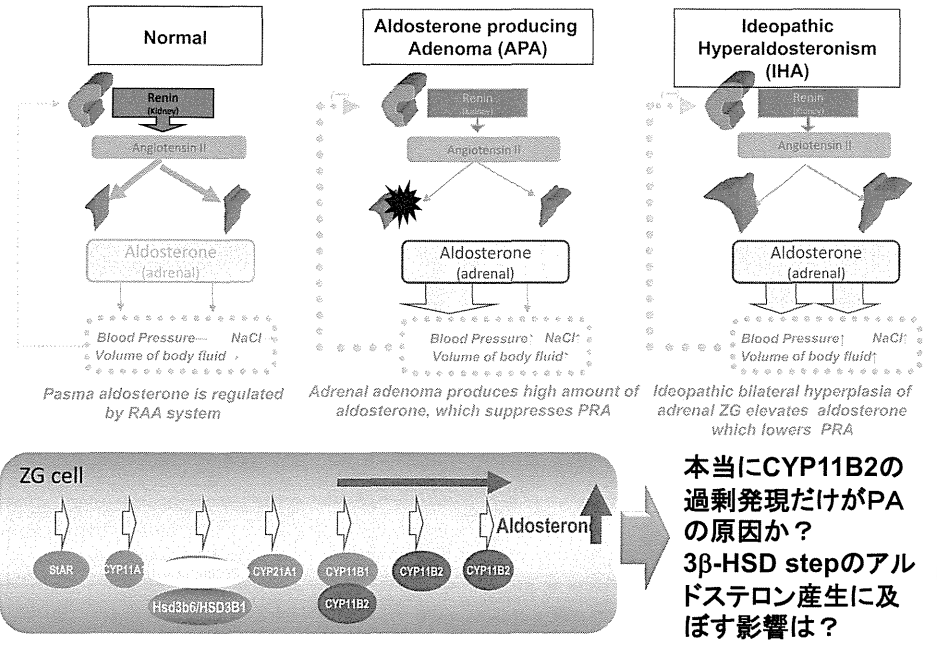
Human HSD3B1 is a counterpart of mice Hsd3b6

Overview of human and mouse Hsd3b genes

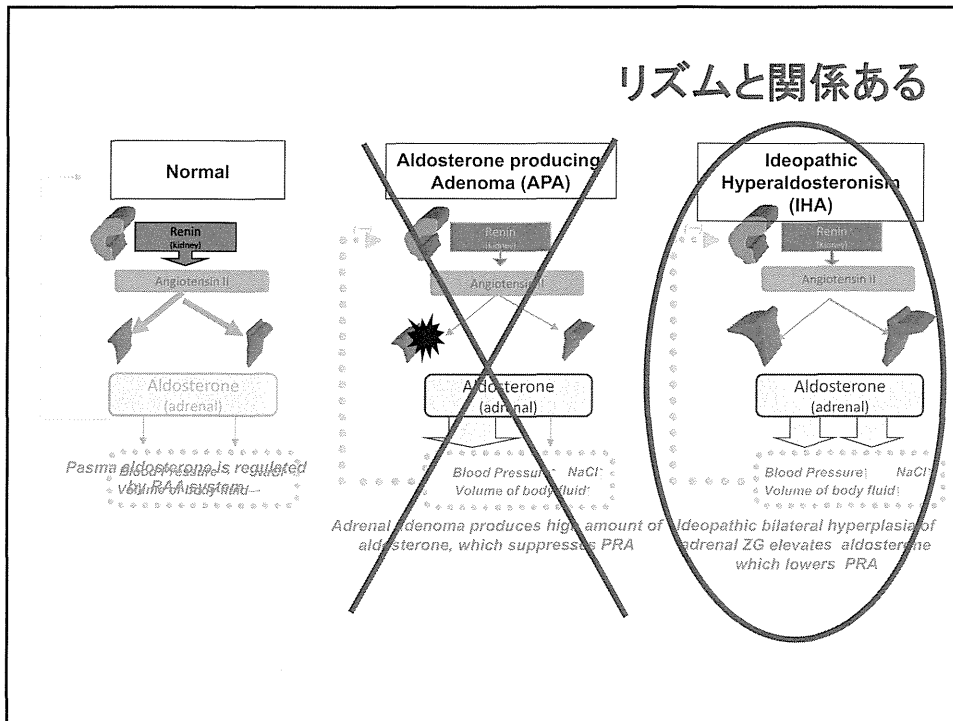
Species	Type	Major sites of expression	Chromosomal localization
human	I	Placenta and skin, plus adrenal ZG	
	II	Gonad and adrenal cortex	
	III-5	(pseudogenes)	
mouse	I	Gonad and adrenal cortex	
	II	Kidney and liver	
	III	Kidney and liver	
	IV	Kidney	
	V	Liver	
	VI	Placenta and skin, plus adrenal ZG	



# HSD3B1より原発性アルドステロン症の病因を再考



## リズムと関係ある



## 研究目的

- ヒトのHSD3B(3 $\beta$ 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、またこれまで原因の不明であった特発性アルドステロン症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。興味深いことに、ヒトの特発性アルドステロン症(IHA)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1A)。この課題を克服するためには、HSD3B1とHSD3B2のそれぞれに対して、両者の微少なアミノ酸配列の違いを識別することのできるサブタイプ特異的抗体を樹立する必要があった。そこで本研究では、原発性アルドステロン症の2大病変である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。

## 研究方法

- HSD3B1とHSD3B2は非常に構造のよく似た酵素であるが、G ANP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グレノ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。
- (倫理面への配慮)東北大学医学系研究科倫理委員会の承認を得て行った。