

研究結果1

- 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。

研究結果2

- 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。

考察1

- 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。

考察2

- 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progrenolone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progrenolone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。

結論

- 原発性アルドステロン症の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。摘除術の適応できない両側性のIHAに対しては薬物治療が必須である。副腎静脈血を用いた血液診断の結果、HSD3B1の過剰発現が見込まれるIHA患者に対しては、HSD3B1に対する特異的な阻害薬が根本的な治療薬として有効であると考えられる。

平成24年度 厚生労働科学研究
難治性疾患克服研究事業

岡村班 第3回 PAゲノム班会議

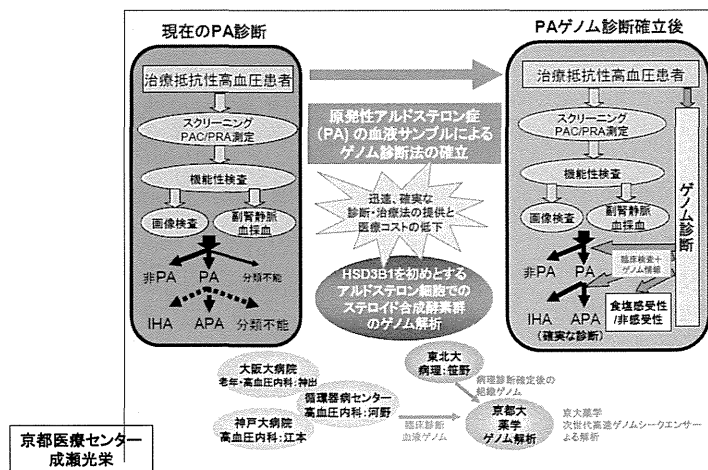
原発性アルドステロン症の 遺伝子解析

分担研究者:

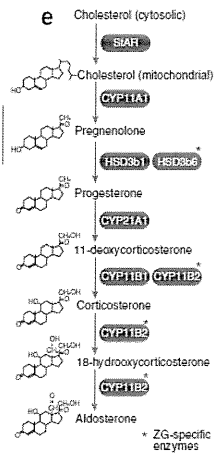
大阪大学大学院医学系研究科
老年・腎臓内科学

神出 計, 中間千香子, 大石 充, 楽木宏実

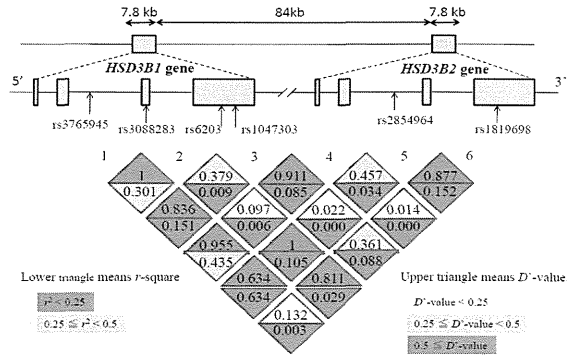
岡村班研究Grand Design



アルドステロン症関連遺伝子解析のStrategy (案)



Tag SNPs



アルドステロン症関連遺伝子解析のStrategy (案)

HSD3B1: promoterからできればcoding, non-coding全領域の sequence
→ 低頻度のmutation, 高頻度の多型の同定

GWAS

研究協力者: 国立循環器病研究センター 研究所
宮田敏行先生、花田裕典先生

同定されたmutation, polymorphismをTaqMan法にてgenotyping

PA (APA, IHA)とnon-PA EHT (with or without low renin, high aldosterone) との
関連解析, haplotype解析

Genotypeと血中aldosterone濃度やrenin活性、ARRとの相関 (intermediate phenotypes)

APA手術症例におけるGenotypeと組織所見との関連性

アルドステロン症関連遺伝子解析のStrategy

解析症例: Case- PA (APA, IHA), EHT (ARR \geq 200)
Control- EHT (ARR $<$ 200)

Case (PA):

阪大- 51例 国循- 20例 神戸大- ?例

京都医療センター- 40例 (成瀬先生)

合計(PA) 111例以上

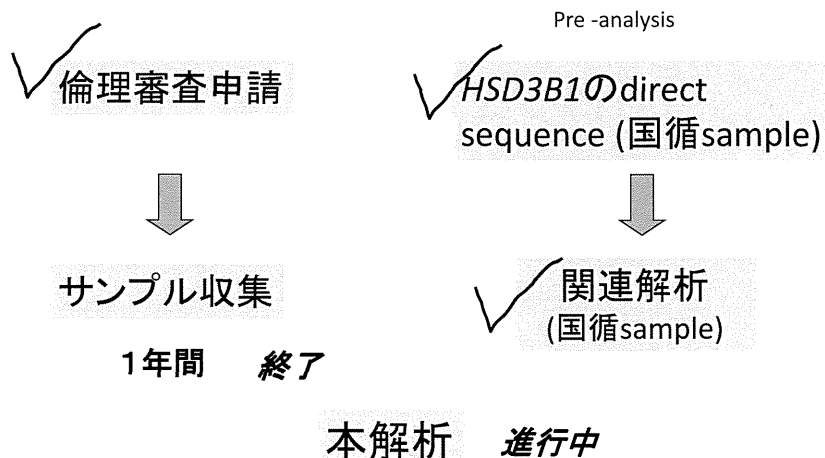
Control:

阪大

合計 200例以上

アルドステロン症関連遺伝子解析のStrategy

今後の方針



PA遺伝素因の解明 (阪大)

-12/21/12 51例-

平均年齢(歳)	56.1±13.8
男性, n (%)	24 (47.1)
BMI(kg/m ²)	23.5±4.1
APA:IHA (%)	29:22 (57:43)
Ope, n (%)	24 (47.1)
組織標本あり, n (%)	9 (17.6)
SBP/DBP(mmHg)	143.5±14.4/85.1±12.0
血清K濃度(mEq/l)	3.7±0.5
PRA(ng/ml/hr)	0.34±0.42
PAC(pg/ml)	231.5±136.3
ARR	1248±1153

※血圧は手術前の外来時、IHAの場合は現在の数値、採血項目は負荷試験時

HSD3B1
1012C>T(L338L)
TOTAL
rs6203

[Genotyping 1]		APA		
	CC	CT	TT	Total
Result	15	17	0	32
Expect	17.2	12.5	2.3	32
Frequency				
Allele 1	Allele 2			
	0.734	0.266		
Hardy-Weinberg分布の検定				
χ ² 統計量	4.1865			
P value	0.1233 (有意差なし)			

[Genotyping 2]		IHA		
	CC	CT	TT	Total
Result	11	12	0	23
Expect	12.6	8.9	1.6	23
Frequency				
Allele 1	Allele 2			
	0.739	0.261		
Hardy-Weinberg分布の検定				
χ ² 統計量	2.8651			
P value	0.2387 (有意差なし)			

HSD3B1
1012C>T(L338L)

rs6203

<Association 2>				
	CC	CT+TT	Total	
APA	15	17	32	
H/A	11	12	23	
Total	26	29	55	
Odds ratio	1.039	0.547	0.036	1.073
95% CI	0.355	-1.635	1.111	
	3.036			
X2 統計量	0.005			
P value	0.944			
(expected)				
	CC	CT+TT	Total	
APA	15.1	16.9	32	
H/A	10.9	12.1	23	
Total	26	29	55	
	C allele	T allele	Total	
APA	47	17	64	
H/A	34	12	46	
Total	81	29	110	
Odds ratio	1.025	0.439	0.025	0.881
95% CI	0.433	-0.636	0.885	
	2.424			
X2 統計量	0.003			
P value	0.955			
(expected)				
	C allele	T allele	Total	
APA	47.1	16.9	64	
H/A	33.9	12.1	46	
Total	81	29	110	

厚生労働科学研究H24年度班会議(2012. 12. 21)

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:分担研究

国立循環器病研究センター高血圧・腎臓科
河野 雄平

分担報告：河野

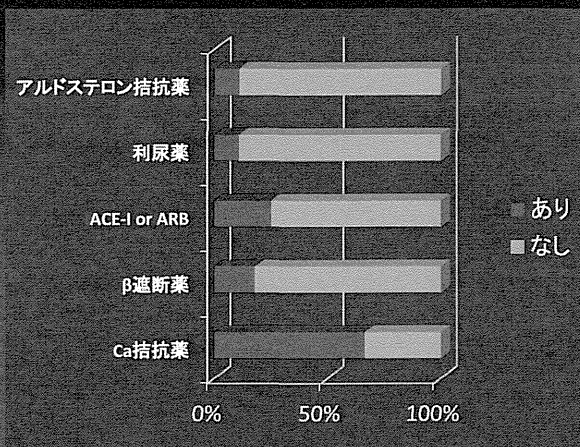
- 原発性アルドステロン症の血圧日内変動
- 原発性アルドステロン症の関連遺伝子

原発性アルドステロン症患者の血圧日内変動についての検討

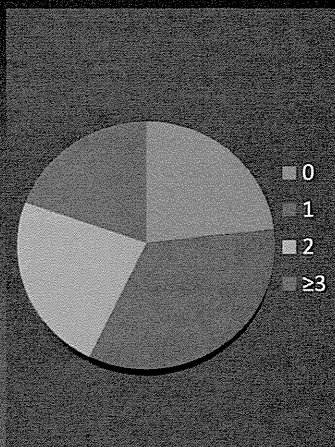
対象

原発性アルドステロン症を診断された高血圧患者 56名(男性25名、平均62.9±10.5歳)

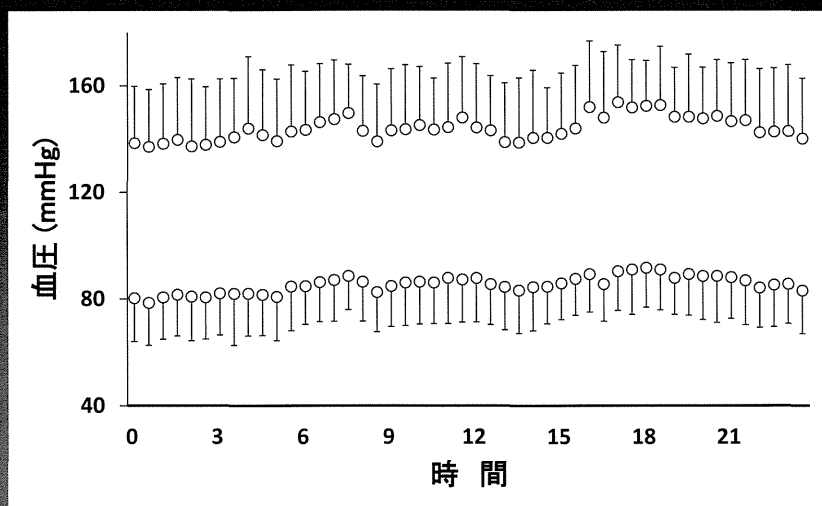
降圧薬



降圧薬の種類



原発性アルドステロン症患者の24時間血圧



夜間

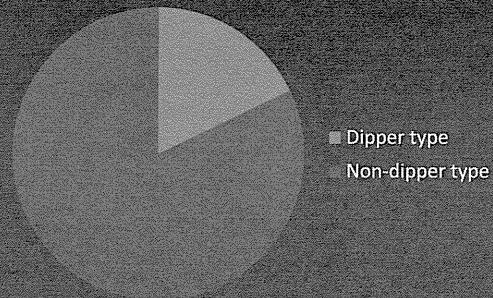
日中

夜

原発性アルドステロン症患者の24時間、日中、夜間血圧

24時間平均血圧 (mmHg)	24時間平均心拍数 (bpm)
143.9±16.2/ 85.4±11.7	64.6±9.6
日中平均血圧 (mmHg)	日中平均心拍数 (bpm)
145.8±15.8/ 87.0±11.4	67.3±10.1
夜間平均血圧 (mmHg)	夜間平均心拍数 (bpm)
140.2±19.4/ 82.2±13.3	59.2±10.1

Dipper or Non-dipper type?



今後の方針：原発性アルドステロン症の血圧日内変動

- 2012年に原発性アルドステロン症患者10名を新たに診断し、24時間血圧を測定した。これらの症例の血圧日内変動データを加えて、2013年中の論文化を目指す。

分担報告：河野

- ・ 原発性アルドステロン症の血圧日内変動
- ・ 原発性アルドステロン症の関連遺伝子

研究方法

原発性アルドステロン症と診断

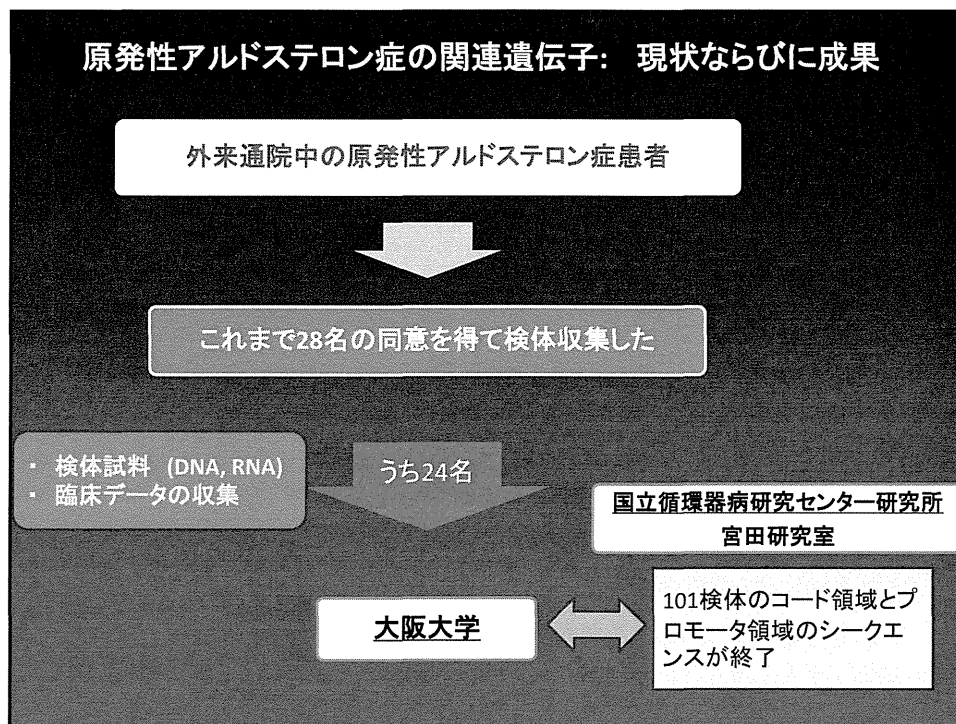
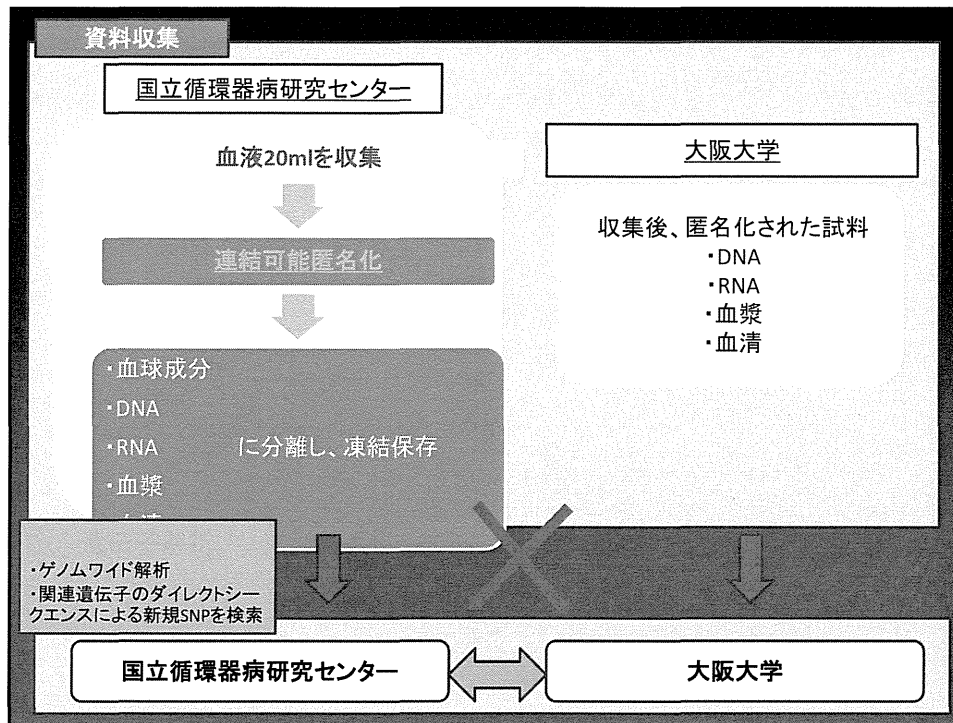


同意書を用いてインフォームドコンセントを得る

同意の場合

本研究への参加により追加の侵襲的な検査は追加されない。

血液20mlの採血ならびに診療録からの検査データを収集



今後の予定

当院での原発性アルドステロン症の現状

2000年以降では、当院において140名に対して原発性アルドステロン症を診断している（一部確定診断に至らない症例を含む）。

1. 遺伝子採血

高血圧・腎臓科を受診・入院した患者のうち、PAと診断された者を対象に、DNA、RNA、血清、血漿を収集する。目標症例は50例（進行中）。

2. 原発性アルドステロン症患者の予後調査

これまで診断された140名を対象に、心血管系疾患発症を含む予後ならびに血圧変化を検討する（進行中）。

3. 原発性アルドステロン症患者の血圧日内変動に関する検討

原発性アルドステロン症を診断された高血圧患者の24時間血圧を24時間自由行動下血圧測定(Ambulatory Blood Pressure Monitoring: ABPM)を用いて検討する（進行中）。

