

201231008B

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22～24年度 総合研究報告書

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22～24年度 総合研究報告書

General Research 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	総合研究報告	
	平成22～24年度総合研究報告	
	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	資料	56
	原発性アルドステロン症の診断・治療のためのトランスレーショナルリサーチ	
	血圧のサーカディアンリズムと高血圧	

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

総合研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服事業）総合研究報告書

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 Genomic Diagnosis of Primary Aldosteronism

研究期間：平成 22 年 4 月 1 日 ～ 平成 25 年 3 月 31 日

研究代表者 岡村 均 (OKAMURA HITOSHI)

京都大学・大学院薬学研究科・教授

研究要旨

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%に存在することが知られ、その診断の重要性が大きく浮上してきた。PAは難治性高血圧の原因となり、また心血管系の合併症が高頻度なため、適切な診断・治療が求められている。PAはアルドステロン腺腫 (APA) によるものと、特発性アルドステロン症 (IHA) があり、前者は手術摘除が行なわれる。PAの鑑別診断は、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するが、診断に難渋することが多い。本研究は、原因が不明で確定の難しいPAの診断を迅速・確実に行うための遺伝子・分子情報の提供を目指すものである。

アルドステロンは副腎で産生されるが、ステロイド合成において他の細胞に見られない特徴が有る。古くより、アルドステロンを直接産生する酵素であるCYP11B2のみがアルドステロン細胞に特殊な酵素であることがわかっていたが、我々は、アルドステロン合成の中間段階であるプレドニゾロンをプロゲステロンに変換する3 β -HSDに従来知られていなかった高活性の新たなサブタイプ (ヒトHSD3B1) が、アルドステロン産生細胞に発現することを報告した。マウスでもこれに該当する酵素は、やはり副腎アルドステロン細胞に存在し、リズム異常を来す食塩感受性高血圧マウスでは過剰に発現し、副腎球状層でIHA様の過形成を示す。従って、HSD3B1がどのようにヒトPAの疾患形成にかかわっているのかはきわめて注目される。

本研究班では、PA患者の血液よりステロイド合成酵素のゲノム解析を行うことでスタートした。所属する研究機関で収集したPA患者の血液サンプルでのHSD3B1のプロモーター部及びコーディング部のゲノム解析を行い、進行させた。この解析で、プロモーター領域に rs932603 ヘテロ接合体を、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。現段階ではっきり臨床データとの関連性があるのは、c.1100A>C(p.N367T)のアレル間でのPRAやARRの差である。

さらに、HSD3B1のPA病態に対する重要性を検索するため、ゲノム解析と平行して進めていた、HSD3B1とHSD3B2を別々に認識するアイソザイム特異モノクローン抗体の作成に成功した。この抗体は病理組織の免疫組織化学に適応可能で、HSD3Bの2つのアイソザイムがIHAとAPAというPAの2大病型に、各々別々に発現していた。これは、IHAとAPAで全くその病態が異なることを示唆しており、HSD3Bを利用したPAの新規のゲノム・分子診断法の今後の展開が期待される。

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学の再構築 研究構成員名簿

1. 研究組織

- 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 1 笹野公伸 (東北大学大学院医学系研究科病理病態学講座)
研究分担者 2 河野雄平 (国立循環器病センター高血圧・腎臓科)
研究分担者 3 神出 計 (大阪大学大学院医学研究科老年腎臓内科学)
研究分担者 4 江本憲昭 (神戸薬科大学薬学部臨床薬学、神戸大学医学系研究科)
研究分担者 5 成瀬光栄 (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 6 角谷 寛 (京都大学大学院医学研究科疾患ゲノムセンター)

2. 研究分担綱目

- 研究代表者 岡村 均 研究総括・ゲノム解析・分子診断 (22～24年度)
研究分担者 1 笹野公伸 病理診断・分子診断 (22～24年度)
研究分担者 2 河野雄平 臨床診断・ゲノム提供・ゲノム解析 (22～24年度)
研究分担者 3 神出 計 臨床診断・ゲノム解析・ゲノム提供 (22～24年度)
研究分担者 4 江本憲昭 臨床診断・ゲノム提供 (22～24年度)
研究分担者 5 成瀬光栄 臨床診断・ゲノム提供 (23～24年度)
研究代表者 6 角谷 寛 臨床診断・ゲノム解析 (24年度)

3. 研究協力者

- 土居 雅夫 (京都大学・薬・准教授)
Fustin Jean-Michel (日本予防医学協会リサーチレジデント; 京都大学客員研究員)
岡田 和樹 (京都大学・薬)
田井中元美 (京都大学・薬)
中間千香子 (大阪大学・医・医員)
大石 充 (大阪大学・医・講師)
楽木 宏実 (大阪大学・医・教授)
宮田 敏行 (国立循環器病センター研究所・部長)
松本 幸子 (国立循環器病研究センター研究所・特任研究員)
岩嶋 義雄 (国立循環器病研究センター 高血圧・腎臓科)
花田 裕典 (国立循環器病センター・バイオバンクセンター)
難波 多挙 (京都医療センター・内分泌代謝高血圧)
立木 美香 (京都医療センター・内分泌代謝高血圧)
澤井 邦子 (京都医療センター・内分泌代謝高血圧)
山本 鉄郎 (京都医療センター・泌尿器)
西本紘嗣郎 (国家公務員共済立川病院・泌尿器)
向井 邦晃 (慶応大学・医)
中村 保宏 (東北大学・医・准教授)
前川 尚志 (東北大学・医・病理診断)
佐藤 文俊 (東北大学・医・講師)
森本 玲 (東北大学・医・助教)
伊藤 貞嘉 (東北大学・医・教授)

A. 研究目的

原発性アルドステロン症(PA)は副腎の腺腫および過形成を原因とする疾患で、その疾病頻度は全高血圧の約3-10%を占める。PAの診断には、血漿アルドステロン濃度、レニン活性、Aldosterone-Renin-Ratio(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。PAは、片側性のアルドステロン産生腺腫(aldoosterone-producing adenoma: APA)と、両側性の副腎皮質過形成を示す特発性アルドステロン症(ideopathic hyperaldosteronism: IHA)に分けられる。両者とも難治性高血圧症として知られ、治療はAPAは副腎摘除、IHAは薬物治療と大きく異なるので、その鑑別診断は、きわめて重要である。しかし、両者とも典型的な症例は必ずしも多いたとは言えず、多くの場合、それら鑑別診断に難渋することが多い。副腎静脈血採血(adrenal vein sampling: AVS)は確定診断に必要であるが、麻酔下で行うため高コストであること、また技術的にも難しいためできる施設に限られることなどが問題である。本研究では、煩雑で難しい原因不明なPAの鑑別診断を迅速・確実に行うための遺伝子および分子情報の提供を目指す。

以前より、循環器疾患と生体リズムの関係は高血圧の罹患率が昼夜交代勤務者

において高いことなどから疫学的にはよく知られていたが、実際に生体時計と高血圧を結びつける分子機序についてはこれまで全く不明であった。我々は、時計遺伝子異常マウスの副腎球状層からの過剰なアルドステロン分泌によって食塩感受性の高血圧が誘導されることを見出し、この原因酵素マウスHsd3b6をアルドステロン産生細胞に同定した(*Nature Med*, 2010)。トランスレーショナル研究にて、ヒト副腎にもこの酵素に相当するヒトHSD3B1がアルドステロン産生細胞に特異的に発現していることが判明した。従来より知られていた旧型3 β -HSD(マウスHsd3b1、ヒトHSD3B2)は、コルチゾール細胞やアルドステロン細胞と副腎皮質全体に分布するのに比して、新型3 β -HSD(マウスHsd3b6、ヒトHSD3B1)は副腎球状層のアルドステロン細胞に限局している。興味深いことに、リズム異常マウスのアルドステロン細胞で新型3 β -HSDが過剰に発現し、組織学的にヒトIHAの様に過形成の傾向を示し、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っており、ヒトにおいても、発症機序が不明であるPAの原因となっている可能性があることである。従って、今回の研究においては、ゲノム解析と平行して新型3 β -HSDの検索を行い、ゲノム診断の有効性を上げる。

今回の研究においては、まず、PAのゲノム診断研究計画を作成し、各研究機関

の倫理委員会に提出し、その承認を得る。続いて、PA 患者の血液サンプルを用いて、副腎アルドステロン細胞に発現する、新 3 β -HSD (HSD3B1) を中心としたステロイド合成酵素のゲノム解析を行う。さらには、PA における食塩感受性高血圧の、昼夜変動の有無も検索し、ゲノム解析の助力とする。研究は、国立循環器病センター（河野雄平）、大阪大学（神出計）、神戸大学（江本憲昭）、京都大学（岡村均）、東北大学（笹野公伸）の共同研究として行う。研究分担は、患者 DNA を国立循環器病センター、大阪大学、神戸大学の高血圧外来で収集し、ゲノム解析を京都大学薬学研究科、国立循環器病センターで行い、手術検体の病理診断は、東北大学で行う。後に、23 年度より京都医療センター（成瀬光栄）、24 年度より京都大学医学研究科疾患ゲノムセンター（角谷寛）がゲノム収集・解析の強化のため参加した。

我が国では約 4000 万人が高血圧症に罹患していると推定されている。しかし、既存の薬剤で治療しているにもかかわらず、高血圧患者の約 7 割は降圧目標値を達成していない。これは、高血圧症とそれに起因した心血管障害により合併症が死亡原因のトップであることを考えても、高血圧の徹底した治療は、患者 QOL、また保健医療上も重要な事項である。もし PA の素因遺伝子多型・変異が明らかになれば、初期スクリーニングと

しては、PAC、PRA とともに威力を発揮する可能性が高く、PA 診断の内分泌学的・画像のスクリーニングや難しい AVS 確定診断の大きな助力になる。さらに、新旧 3 β -HSD はその分布域が異なり、酵素活性 K_m が大きく異なるため、APA と IHA の鑑別診断のみならず、現在も不明な疾患の病因に迫る可能性も高い。また、医療経済的にも、遺伝子多型・変異検出のための診断上必要な DNA 情報は採血のみで得られ、安価であり、保健医療上メリットも大きいと言える。

以上より、(1) 高血圧疾患群のなかでの HSD3B1 遺伝子全エクソンシーケンスによる遺伝子多型と原発性アルドステロン症に関する研究、(2) 原発性アルドステロン症の遺伝素因に関する研究、(3) HSD3B 遺伝子アイソザイムによる原発性アルドステロン症の新分子診断法の開発、(4) 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、を行った。

B. 研究方法

(1) 高血圧疾患群のなかでの HSD3B1 遺伝子全エクソンシーケンスによる遺伝子多型と原発性アルドステロン症に関する研究

国立循環器病研究センターで収集した DNA のうち、PA の患者 16 名に加え、本態性高血圧患者であり、かつ、血漿アルドステロン濃度／血漿レニン活性比

(ARR) >50 である 20 名の合計 36 名 (男性 14 名、女性 22 名) を解析対象とし、ヒト HSD3B1 遺伝子の全エクソンのシーケンスを実施した。ゲノムシーケンスに必要なプライマーは独自にデザインし、変異探索には Sequencher ソフト (ver.4.8) を用い、forward, reverse の両方向で確認できる変異を変異とした。

(2) 原発性アルドステロン症の遺伝素因に関する研究

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。

(3) HSD3B遺伝子アイソザイムによる原発性アルドステロン症の新分子診断法の開発

HSD3B1 と HSD3B2 は非常に構造のよく似た酵素であるが、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し、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progesteroneおよびpregnenolone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。

(4) 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

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)

ヒトへの臨床応用に関しては、ヒト由来試料などの提供者、その家族・血縁者

その他関係者の人権および利益の保護の取り扱いに十分配慮して行い、各研究機関の倫理委員会の承認を得て行った。当研究はすべて参加各施設の倫理委員会の承認を受けて行われており、参加者には研究内容をよく説明し、文書による承諾を得てから行われている。個人名と多型の解析結果は別個に保存され、参加者の個人情報が漏れない形になっている。

遺伝子研究はヒトゲノム・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）を遵守する。また本研究では薬物介入などを行う臨床試験は行わない。

倫理委員会の承認

1. 大阪大学大学院医学研究科 課題名：原発性アルドステロン症遺伝素因の解明、承認年月日：平成23年3月18日、承認番号：295（許可番号）
2. 国立循環器病研究センター 課題名：原発性アルドステロン症遺伝素因の解明、承認年月日：平成23年5月27日、承認番号：M23-15（研究課題番号）
3. 国立病院機構京都医療センター 課題名：原発性アルドステロン症遺伝素因の解明、承認年月日：平成24年4月16日、承認番号：11-24（受付番号）
4. 京都大学大学院医学研究科 課題名：原発性アルドステロン症遺伝素因の解明、承認年月日：平成24年9月12日、G475（承認番号）

5. 東北大学大学院医学系研究科 課題名：副腎腫瘍に発現する特定因子profileの検索と病態との関連（後ろ向き調査）、承認年月日：2010年11月15日；課題名：副腎腫瘍に発現する特定因子profileの検索と病態との関連、承認年月日：2010年11月15日；課題名：ヒト全身組織における副腎ステロイドホルモン合成酵素の発現解析、承認年月日：2012年2月13日

実験動物の場合は、組換えDNA実験、並びに動物実験を必要とするが、文部科学省並びに当該機関の取り扱い規定に準拠し組換えDNA実験安全委員会、動物実験委員会の承認を得、（京都大学薬学研究科承認番号：2012-42）、実験動物の人的、倫理的扱いに最大限配慮する。また本研究では薬物介入などを行う臨床試験は行わない。

C. 研究結果

表1-2、図1-6を添付した。

(1) 高血圧疾患群のなかでの HSD3B1 遺伝子全エクソンシーケンスによる遺伝子多型と原発性アルドステロン症に関する研究

解析対象とした患者は、年齢 63.0±1.7 歳、収縮期血圧 156.7±3.7 mmHg、拡張期血圧 92.7±2.5 mmHg と高血圧を呈すとともに、血漿アルドステロン濃度（PAC）32.0±7.3 ng/dl、血漿レニン活性（PRA）0.5±0.1 ng/ml/min、ARR 104.4±17.1 であり、低レニン性高アルドステロン血症を示す集団が抽出されていた（表1）。HSD3B1 遺伝子の全エクソンのシ

ークエンスにより、第4エクソンに位置する3つの変異を同定した(表2)。2つはTTT (Phe286) →CTT (Leu)、AAC (Asn367) →ACC (Thr) のミスセンス変異、残りの1つはTTG(Leu338)→CTG (Leu) のサイレント変異であり、マイナーアレル頻度はそれぞれ0.014、0.042、0.306であった。NCBIデータベースと照合した結果、それぞれrs6205、rs1047303、rs6203に該当することが判明した。

(2) 原発性アルドステロン症の遺伝素因に関する研究

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クエンスを行った。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クエンスが完了していないが、PAと確実に診断がつき、シークエンスが完了した96検体について臨床情報との関連解析を行った。

図1にHSD3B1のゲノム構造と一塩基多型をまとめた。シークエンスの結果、プロモーター領域にrs932603ヘテロ接合体を3例認めた。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。

PAの病態として副腎腺腫(APA)と特発性過形成(IHA)があるが、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)(図2)、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(図3)。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(図4)、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(図5)。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。

(3) HSD3B 遺伝子アイソザイムによる原発性アルドステロン症の新分子診断法の開発

ヒトHSD3Bの2種のアイソザイムは非常に類似した構造をしている(図6)。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る。GANP マウスを利用した高親和性抗体作製法を用いて HSD3B1 及び 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 HSD3B1-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。HSD3B1、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 HSD3B1-GST に対し陽性かつ HSD3B2-GST に対して陰性となるクローン、また、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、HSD3B1 および HSD3B2 に特異的なクローンを得た。

種々の HSD3B に対する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い、HSD3B1 および HSD3B2 を各々特異的に認識する抗体であることを証明した。さらに HA-HSD3B1、HA-HSD3B2 を COS-1 細胞に発現させたもので細胞組織化学を行い、細胞レベルで抗体の特異性を証明した。さらに、アミノ酸の特異的な部位に変異を入れる Site-directed mutagenesis にて、各々の抗体の特異的な認識部位を決定した。

このように、数々の手法にて、特異性を確認した抗体を、実際の病理染色に用いた。IHA および APA の病理標本に、HSD3B1 と HSD3B2 特異抗体を用いた免疫組織化学を適応した結果、IHA の副腎球状層では 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。この結果、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解明された。

興味深いことに、酵素活性レベルでは、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。我々は、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、摘除前の副腎静脈血のステロイド組成に反映しているのではないかと考え、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。その結果、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

ても、APA と IHA の鑑別診断が可能であることを示唆している。

(4) 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

原発性アルドステロン症(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、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(図 7)。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。

D. 考察

はじめの、「高血圧疾患群のなかでの HSD3B1 遺伝子全エクソンシーケンスによる遺伝子多型と原発性アルドステロン症に関する研究」は、サンプルサイズは小さいものの、今回解析対象とした 36 名に HSD3B1 遺伝子の変異が集積しているとすれば、遺伝子変異の頻度が高くなることが予想された。しかし、我々が同定した 3 つの遺伝子変異 rs6205、rs6203、rs1047303 の頻度は、HapMap-JPT、Cohort consortium_J で

公開されている日本人の多型頻度と同程度であった。スプライスサイトの変異もまた発現への影響が懸念されるため、各エクソンの両端から上・下流 20bp も解析対象領域としシーケンス解析を実施したが、遺伝子変異の発見には至らなかった。今回は解析していないが、プロモーター領域の変異も発現に影響すると考えられる。そこで、Hapmap データベースより今回発見した 3 つの多型を含む日本人のタイピングデータを取得し、Haploview ソフトウェア(ver.1.0)にて連鎖解析を実施した。その結果、rs6205 は第 1 エクソンの上流 2179 bp、91 bp にそれぞれ位置する rs6661258、rs932603 と連鎖不平衡していた。rs6203 と rs1047303 は、第 1 エクソンの上流 3340bp に位置する rs4659007 と連鎖不平衡していた。文献的には、rs6661258 は HSD3B1 の転写を阻害するエレメントを含む領域に存在するため、これに連鎖不平衡する rs6205 は、発現量に影響を与える可能性が考えられた。

続いて、新たに収集した遺伝子検体サンプル 114 検体(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)を用いて、原発性アルドステロン症の遺伝素因に関する研究を行った。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。このうち、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。この解析で、プロモーター領域に rs932603 ヘテロ接合体を、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。臨床データとの関連では、c.1100A>C(p.N367T) のアレル間での PRA や ARR の差である。残念ながら、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ですが、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。

上記のHSD3B1に対するゲノム変異検索の医学的妥当性を検索するには、HSD3B1自身がPAの病態とどのように関わっているのかをさらに追求する必要がある。ヒトのHSD3B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、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HSD3B1が強く発現することを明らかにした (Nature Med., 2010)。そこで、ヒト副腎の病態時におけるHSD3B1およびHSD3B2の発現を検索することにした。ところが、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。そこで、HSD3B1とHSD3B2の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取りかかり、HSD3B1ならびにHSD3B2に対する特異的抗体を得ることが出来た。この抗体を用いて、IHAとAPAの副腎を免疫組織化学的に検索すると、APAの腫瘍部はHSD3B2に特異的に、IHAの過形成部ではHSD3B1が特異的に強く発現していた。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、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。

HSD3B1は時計遺伝子に制御され、このマウスホモログが時計の異常である *Cry*-nullマウスで過剰発現するということは、アルドステロン産生と、生体リズムの関係を示唆する。そこでPA患者の血圧の昼夜リズムを検索した。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

高血圧症の中で、重要な位置を占める原発性アルドステロン症(PA)の診断を迅速・確実に行うための遺伝子・分子情報の提供を目指した。この中で今回注目したのは、その過剰発現が、マウスで食塩感受性高血圧を起こすヒト HSD3B1 のゲノム配列である。本研究班を構成する研究機関で収集したPA患者の血液サンプルでの HSD3B1 のプロモーター部及びコーディング部のゲノム解析を行い、進行させた結果、プロモーター領域に rs932603ヘテロ接合体を、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。現段階ではっきり臨床データとの関連性があるのは、c.1100A>C(p.N367T)のアレル間での PRA や ARR の差である。このように、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。

さらに、この HSD3B1 ゲノム解析の PA の病態への重要性を検索するため、ゲノム解析と平行して進めていた HSD3B1 の PA での発現を解析した。そのため、HSD3B アイソザイムである HSD3B1 と HSD3B2

を別々に認識するアイソザイム特異モノクローン抗体を作成した。この抗体は病理組織の免疫組織化学に適応可能で、HSD3B の 2 つのアイソザイムが IHA と APA という PA の 2 大病型に、各々別々に発現していた。これは、IHA と APA が全くその病態を異なることを示唆しており、HSD3B を利用した PA の新規のゲノム・分子診断法の今後の展開が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ota T, Fustin JM, Yamada H, Doi M, Okamura H. Circadian clock signals in the adrenal cortex. *Mol Cell Endocrinol.* 349:30-37, 2012.
2. Negoro H, Kanmatsu A, Doi M, Suadicanani 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 Com.*, 3:809, 2012.
3. 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.
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. 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* 31 (5) , 765-772, 2013. (増刊号『臓器円環による恒常性のダイナミクス』)
6. 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
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 山田裕之, 岡村均: 体内時計概論、*Bio Clinica* 27(6), 532-537, 2012.
12. 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.
13. 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.
14. 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 (in press).

15. 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.* 98:13-19, 1013.
16. 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.* 365:207-211, 2012.
17. 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 Steriodogenic Enzyme Production. *Endocr Pract.* 18:e138-143, 2012.
18. 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.* 51:395-400, 2012.
19. 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).* 76:778-784, 2012.
20. Suzuki S, Takagi K, Miki Y, Onodera Y, Akahira JI, Ebata A, Ishida T, Watanabe M, Sasano H, Suzuki T.: Nucleobindin 2 in human breast carcinoma as a potent prognostic factor. *Cancer Sci.* 103:136-143, 2012.
21. Sakurai M, Miki Y, Masuda M, Hata S, Shibahara Y, Hirakawa H, Suzuki T, Sasano H: LIN28: A regulator of tumor-suppressing activity of let-7 microRNA in human breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 131:101-106, 2012.
22. 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.
23. 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.*, 35:777-395, 2012.
24. Kamide K, Kawano Y, Rakugi H: Pharmacogenomic approaches to study the effects of antihypertensive drugs. *Hypertens Res*, 35:796-799, 2012.
25. 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.
26. 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*, 60:770-777, 2012.
 27. Kawano Y: Salt, hypertension, and cardiovascular diseases. *J Kor Soc Hypertens.*, 18:53-62, 2012.
 28. 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.
 29. 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.*, 20:152-160, 2013.
 30. 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* .., 25:1249-1255, 2012.
 31. 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)
 32. 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)
 33. 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* 220:449-455, 2012.
 34. 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* 10:309-311, 2012.
 35. Vignon-Zellweger N, Heiden S, Miyauchi T, Emoto N. Endothelin and endothelin receptors in the renal and cardiovascular systems. *Life Sci.*, 91:490-500, 2012.
 36. 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.*, 91:651-657, 2012.
 37. Toyama Y, Chin K, Chihara Y, Takegami M, Takahashi KI, Sumi K,