図２Cry-null マウスの原発性アルドステロン症における高血圧の発症機構

（左上）血圧の 24 時間リズムを検査するため、テレメトリーシステムを用いて自由行動下の大動脈平均血圧をモニターする。WT では血圧の昼夜差が認められ *Cry*-null では昼夜リズムが消失している。通常餌（0.2%ナトリウム）を高食塩餌（3.15%ナトリウム）に変えても、WT では血圧が変わらないが、Cry-null では血圧が徐々に上昇し、1 週間ほどでプラトーに達する。（上）血漿アルドステロン濃度および血漿レニン活性、（右）*Cry*-null マウスと正常マウスの副腎を用いた DNA マイクロアレイ解析。*Cry*-null の副腎では *Hsd3b6* を認識するプローブが終日異常に高い値を示す（赤）。（下右）副腎における *Hsd3b6* の Realtime PCR 解析による定量結果。*Cry*-null は正常より 10 倍以上というきわめて高い値を示す。WT マウス（青）でもリズムが見られることに注意。（下右）副腎ミクロソーム画分を用いた HSD3b1 蛋白と CYP11a1 蛋白のウェスタンブロット、（下左）副腎球状層における ^{3}H-pregnenolone を ^{3}H-progesterone に変換する 3β-HSD 酵素活性（CPM）、（左）3β-HSD 阻害薬トリロスタンを表記の濃度で 7 日間投与した際の *Cry*-null マウスと正常マウスにおける血漿中のアルドステロン濃度。*Cry*-null ではトリロスタンは容量依存的にアルドステロンを減少させる。（中右）Hsd3b6 蛋白に対する抗体を用いた免疫組織染色。この酵素は球状層に特異的な発現（赤色）を示す（矢印）。（中左）特異的 Tacqman MGB probe によるヒト HSD3B1 の検出。2 例のヒト副腎摘出検体（2237N、1774N）を用い、球状層はレーザーマイクロダイセクションを行ってサンプルを作成した。球状層をレーザーダイセクションによって、HSD3B1 は球状層に多く発現する。CT: サーカディアン時刻（circadian time）のことで、内因性のリズムの位相を示す。 CT0 と CT12 はそれぞれ主観的明期の開始（夜明け）と主観的暗期の開始（夕暮れ）の時刻に相当する。$^{*}p < 0.05$、$^{**}p < 0.01$、$^{***}p < 0.001$（図は文献２より改変引用）

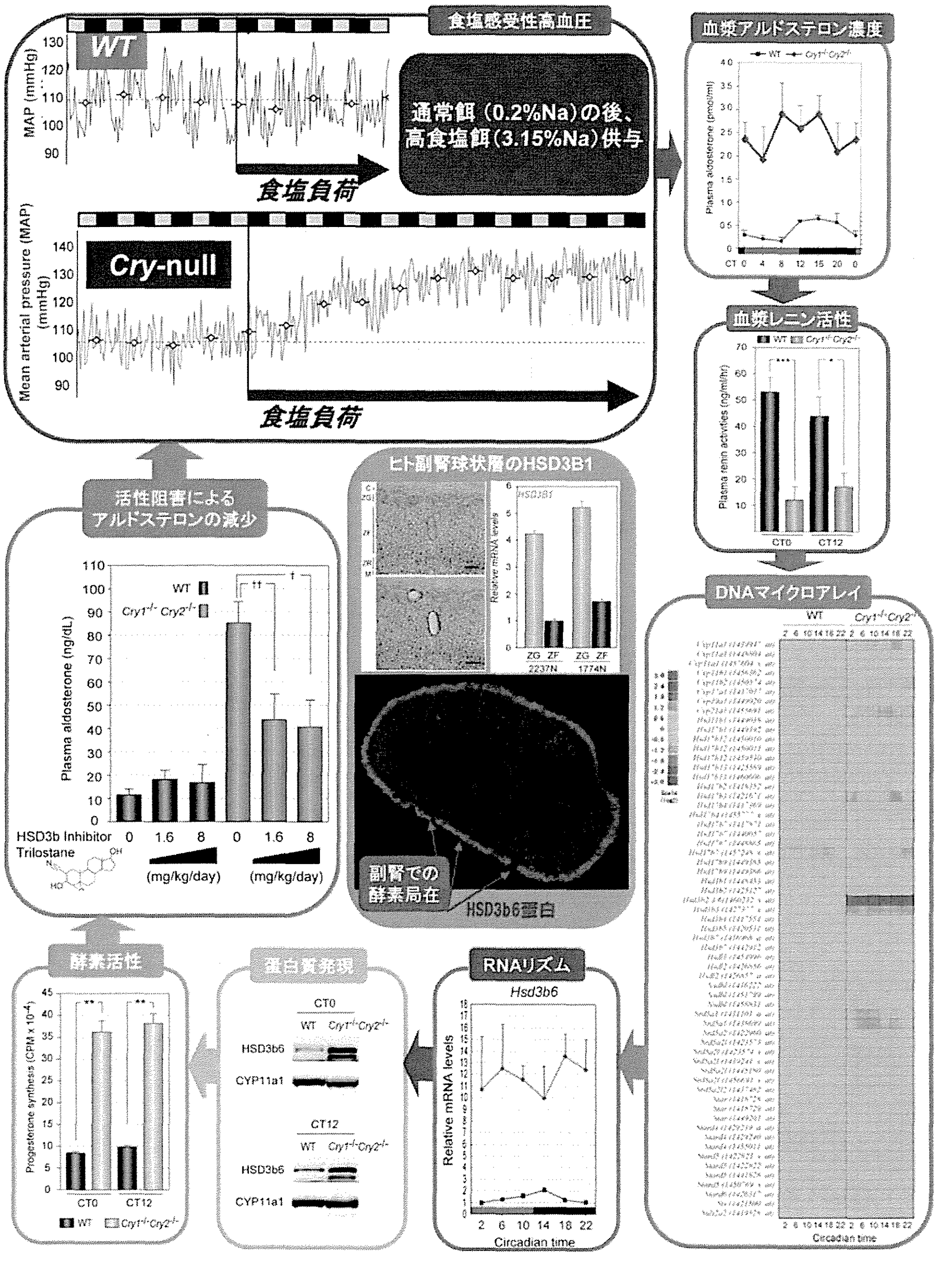


図２ *Cry*-null マウスの原発性アルドステロン症における高血圧の発症機構

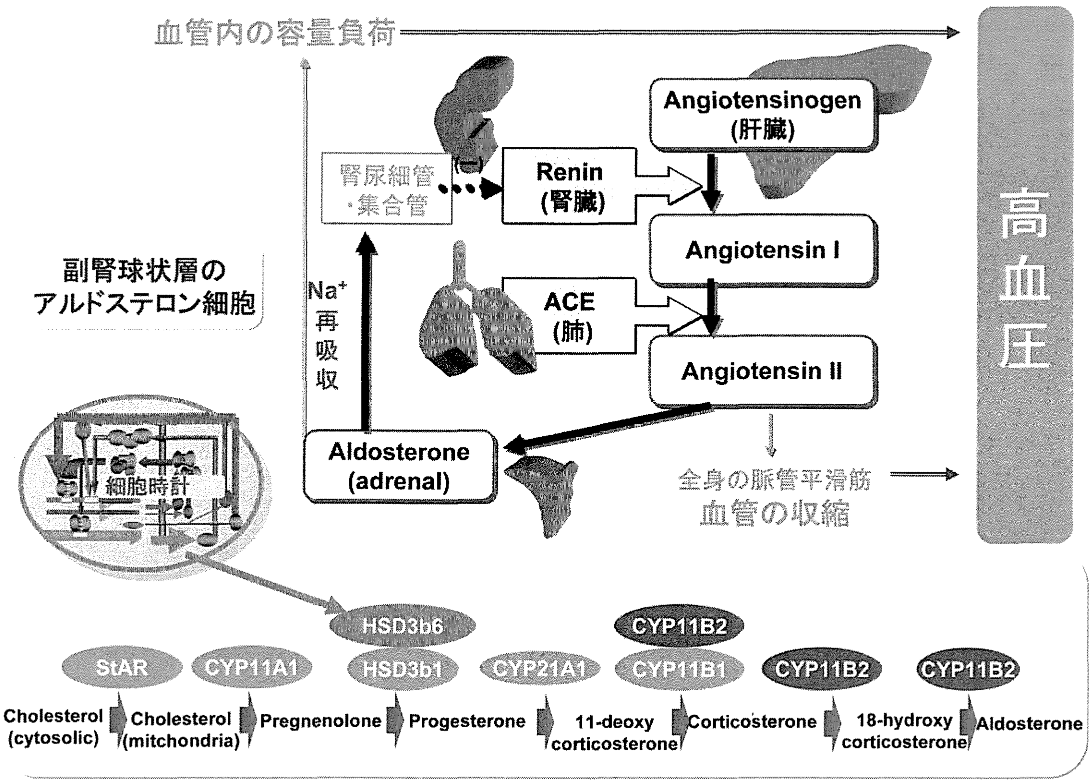


図３　副腎皮質球状層のアルドステロン細胞とレニンアンギオテンシンアルドステロン系

副腎皮質球状層における、コレステロールからアルドステロンに至る副腎ステロイド合成酵素とその代謝産物の模式図。Hsd3b6 の位置に注目。HSD3B6 と CYP11B2 はアルドステロン細胞だけに存在する酵素で、副腎の他の細胞には無い。この細胞の細胞時計はDBP、E4BP4を介してHsd3b6の転写を制御するが、*Cry*-null におけるで常時増大した DBP は通常量しか無い E4BP4 に打ち勝ち、Hsd3b6 のプロモーターにある D-box に結合し、Hsd3b6 を過剰発現させる。

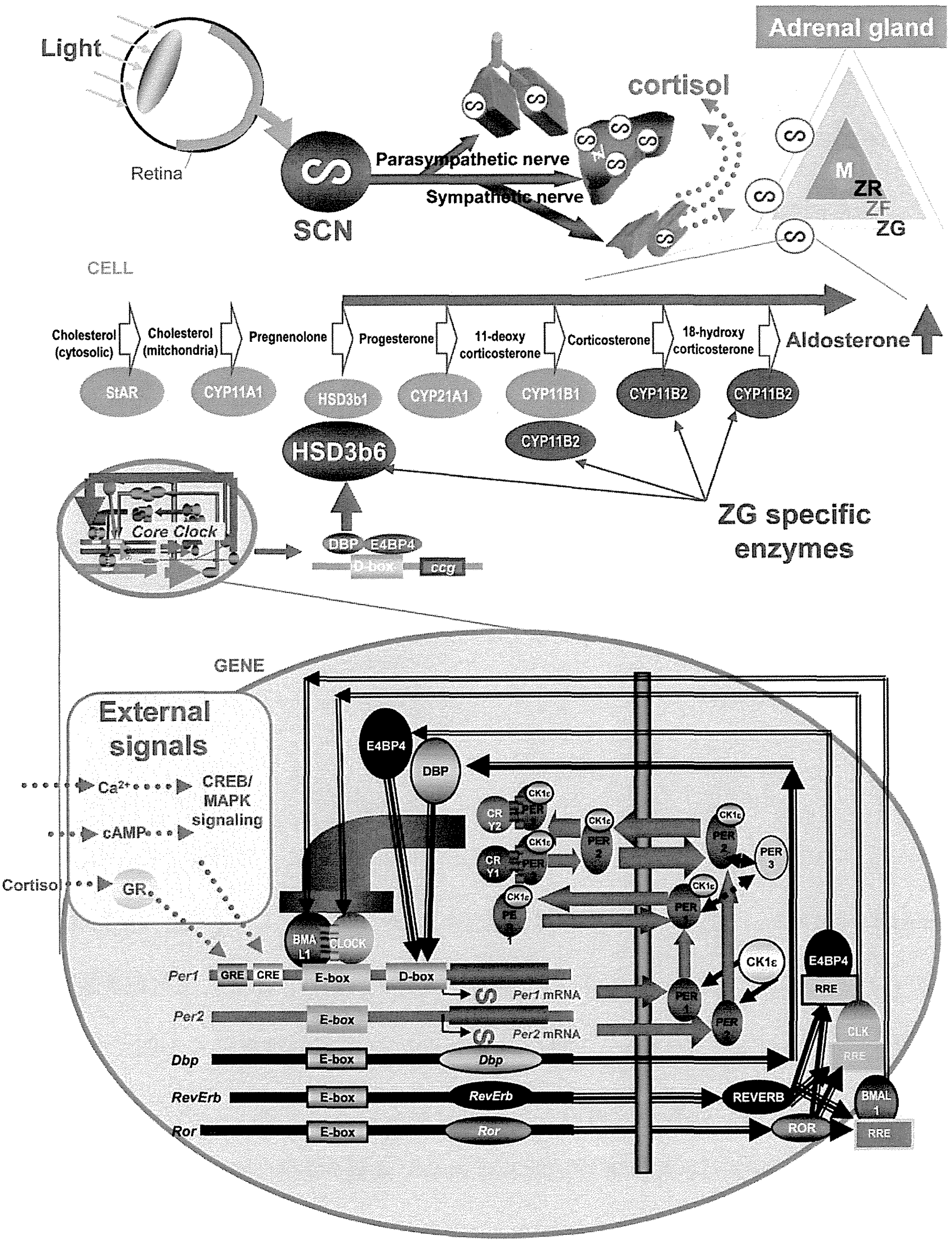


図４　生体リズムの異常から高アルドステロン血症に至る分子機構を１枚の図に示す

血圧のサーカディアンリズムと高血圧

Circadian Rhythms of Blood Pressure: Implication to Hypertension

京都大学大学院薬学研究科医薬創成情報科学専攻システムバイオロジー

Kyoto University, Grad sch Pharm Sci, Dpt Systems Biology

岡村　均

Hitoshi Okamura

はじめに

グローバリズムの席巻する現代、我々は明暗リズムが破壊された環境下で生活することになり、その結果、多くのヒトは知らず知らずのうちに、生体リズム（biological rhythms;体内リズム、生物リズムとも言われる）に変調をきたしている。血圧の昼夜差が認められるように、血圧と生体リズムは深い繋がりがある。事実、交代制勤務が血圧を上昇させることは多くの研究から明らかである[1]。この理由は長らく不明であったが、この状況は、1997 年に哺乳類の遺伝子が発見されることで一変し、現在では生体リズムの異常が多くの病気の発症、進行に関与する分子機構が解明されつつある[2]。本稿では、生体時計（Biological clock；体内時計、生物時計とも言われる）の新しい概念を説明した後、時計によるステロイド合成酵素の制御機構を述べ、生体リズムの全く消失した実験動物が食塩感受性高血圧を示す病態を説明し、血圧と生体リズムについての新しい知見を提供する。

新しい生体リズムの概念と血圧制御

最近１０年で、生体リズムの概念は根底から変わった。新しい見方では、生体リズムは全身の細胞内で時計遺伝子によって産生される[3]。そして、これらの数十兆個もの全身細胞にある末梢（細胞）時計を視床下部の視交叉上核（suprachiasmatic nucleu: SCN）にある中枢時計が統合するのである。SCN は数千個の細胞からなる時間発振に特化した神経核であり、極めて強力なリズムを発振することができ、ここからの時間シグナルは一旦、視床下部前部にある subparaventricular zone (SPVZ)に入り、ここから中枢の自律神経性の神経核に広く出力され、最終的には交感神経系、副交感神経系、グルココルチコイドに変換され、全身の末梢時計を統括している。血圧に関しては、SCN の出力は延髄にある循環中枢（ここには圧受容器シグナルも入る）や脊髄の交感神経節前ニューロンに出力され、血圧の日内変動をコントロールしている（**図１**）。

一方、血圧の陽性コントローラーとして、末梢のレニン・アンギオテンシン・アルドステロン RAA 系の重要性は言うまでも無い。この多臓器で構成されるシステムにも、時計がからんでいる。末梢時計が血圧制御に絡んでいるのでは無いか、というのが新しい考えである。

リズムの消失した *Cry*-null マウスは食塩感受性高血圧を示す

時計の主要遺伝子である *Cry1, Cry2* の両遺伝子を欠損する *Cry*-null マウスでは、中枢時計も末梢時計も完全にリズムの止まっているが、我々はこのマウスの血圧について検索した。*Cry*-null の平均動脈圧は日周リズムは消失しているものの、通常の餌では正常範囲であった。しかし、マウスを 3%食塩負荷給餌にすると血圧は日毎に上昇し、一週間後には 30mmHg も上昇した（**図 2 右上**）。ちなみに、この条件では、正常野生型 WT マウスの血圧は変動ない。すなわち、*Cry*-null は食塩感受性の non-dipper 型の高血圧と

なったのである[4]。血漿アルドステロン濃度は、WTマウスは弱いながら24時間リズムを示したが、驚くべきことに*Cry*-nullでは、WTにくらべ、5~10倍の非常に高いレベルを示した[4]。*Cry*-nullでは血漿レニン活性は低下していたので、低レニン高アルドステロン性高血圧と言える。

その原因物質を探るべくDNAマイクロアレイを副腎に適応したところ、ステロイド合成に関与する数十種の酵素のうち、新しいタイプの3β-HSDであるHsd3b6が、*Cry*-nullで非常に高く発現していた。Hsd3b6の副腎皮質の中の局在を見ると、副腎の球状層にのみ特異的に発現し、束状層には発現していなかった。この酵素は、時計遺伝子によってその発現が制御されるclock controlled gene（ccg）であった（**図2**）。この新型酵素は、ヒトの副腎球状層でも特異的に存在しており（ヒトはHSD3B1）、ヒトの高血圧の新しい病因としての可能性が注目される。このHSD3B1は、高血圧患者で遺伝子多型が報告されており、また時計遺伝子だけで無くRAA系にも制御され、時計を越えた新しいアルドステロン産生調節因子として、その解明が待たれる。

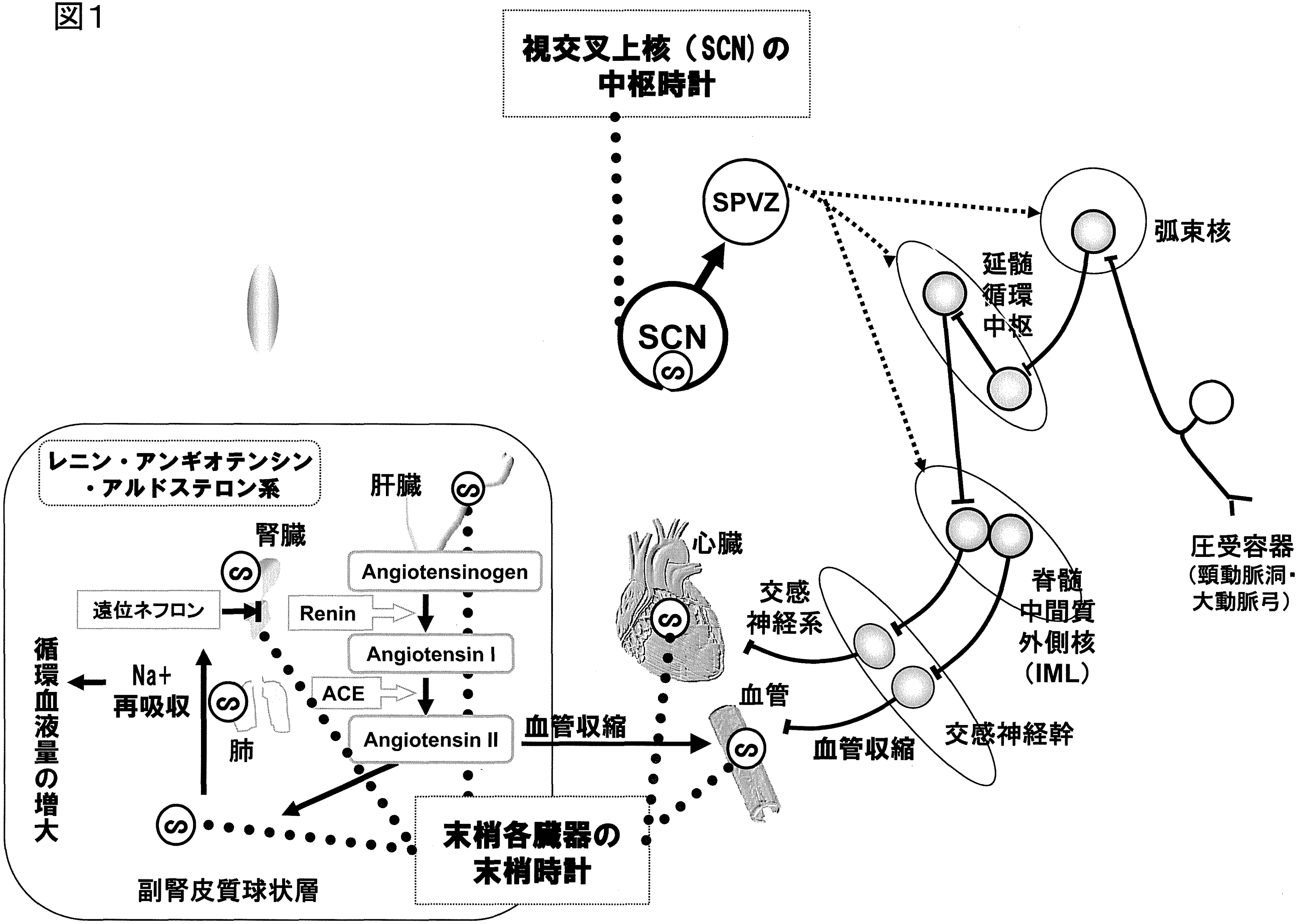
文献

1. Scheer FA, Hilton MF, Mantzoros CS, et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2009;106: 4453-4458.
2. 岡村　均：特集:体内時計と疾病（企画/岡村 均）、医学のあゆみ　Vol.239 No.9 2011年11月26日号　（医歯薬出版）
3. 岡村　均、深田吉孝編：時計遺伝子の分子生物学、シュプリンガー・フェアラーク東京、219頁、2004.
4. Doi M, Ishida A, Miyake A, et al., Nature Med. 2010; 16: 67-74.

図１.血圧制御における中枢時計と末梢時計

図は、血圧に関する神経性調節機構と体液性調節機構を模式的に示し、その中で生体時計がどのように存在しているかを示している。血圧調節には、圧受容体、延髄循環中枢、自律神経系で構成される神経性調節機構とともに、多臓器が関与する体液性の血圧調節機構であるレニン・アンギオテンシンアルドステロン（RAA）系がある。生体時計生体リズム中枢である視交叉上核（SCN）からの時間出力は subparaventricular zone (SPVZ) を介して中枢の自律神経中枢、延髄循環中枢に入る。これとは別に、心臓、血管のみならず腎臓、肝臓、肺、副腎にもローカルな時計が存在し、各部位でリズミックに細胞活動を行っている。

図1

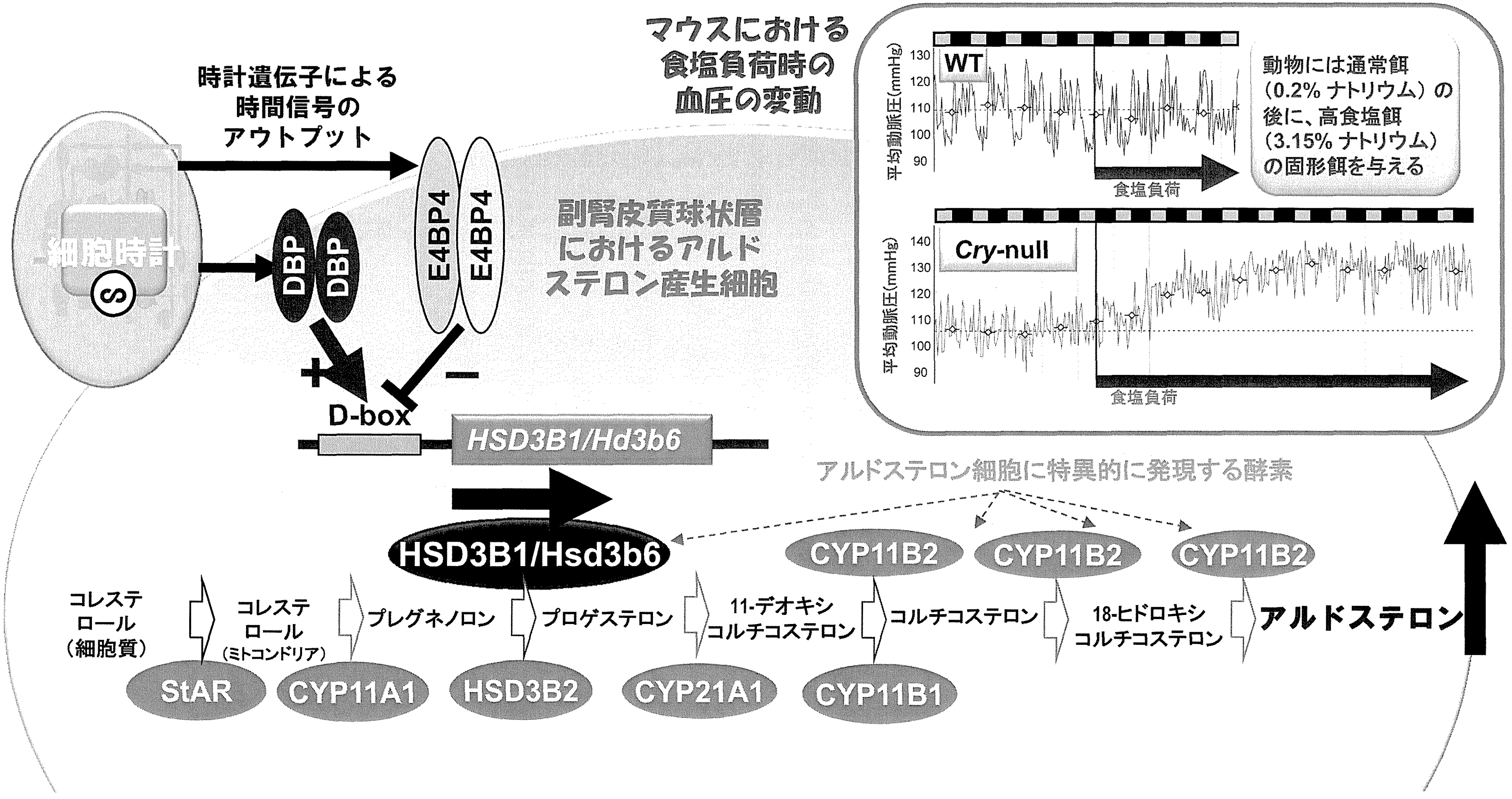


視交叉上核（SCN）の
中枢時計
SPVZ
SCN
S
弧束核
延髄
循環
中枢
圧受容器
(頸動脈洞・
大動脈弓)
脊髄
中間質
外側核
(IML)
交感
神経系
交感神経幹
心臓
S
血管
S
血管収縮
血管収縮
レニン・アンギオテンシン
・アルドステロン系
肝臓
S
腎臓
S
遠位ネフロン
Angiotensinogen
Renin
Angiotensin I
ACE
Angiotensin II
循環血液量の増大
Na+
再吸収
S
肺
S
副腎皮質球状層
末梢各臓器の
末梢時計

図 2. 食塩感受性高血圧と副腎アルドステロンの産生細胞の時計

右上図は、テレメトリーシステムを用いた自由行動下の大動脈平均血圧のモニターを示す。右上では、WT では血圧の昼夜差が認められ *Cry*-null では昼夜リズムが消失している。通常餌（0.2%ナトリウム）を高食塩餌（3.15%ナトリウム）に変えても、WT では血圧が変わらないが、*Cry*-null では血圧が徐々に上昇し、1 週間ほどでプラトーに達する。他の図は、副腎皮質球状層のアルドステロン細胞における時計の役割を模式的に示す。細胞時計が正の制御因子である DBP と負の制御因子である E4BP4 が *HSD3B1/Hsd3b6* プロモーター上の D-box に競合的に作用し、その発現にリズムをもたらす。*Cry*-null では、常に DBP が最高値を示すに比して、E4BP4 は比較的低い値のままで、転写のバランスはプラスに働き *Hsd3b6* mRNA は増大する。最下部には、コレステロールからアルドステロンに至る副腎ステロイド合成酵素とその代謝産物を示す。HSD3B1、CYP11B2 は副腎皮質球状層特異的酵素である。HSD3B1/Hsd3b6 と CYP11B2 はアルドステロン細胞だけに存在する酵素で、副腎の他の細胞には無い。右上図は文献 4 より改変引用。

図2



時計遺伝子による
時間信号の
アウトプット
細胞時計
S
DBP
DBP
E4BP4
E4BP4
+
−
D-box
HSD3B1/Hd3b6
副腎皮質球状層
におけるアルド
ステロン産生細胞
マウスにおける
食塩負荷時の
血圧の変動
WT
平均動脈圧(mmHg)
130
120
110
100
90
食塩負荷
動物には通常餌
(0.2% ナトリウム）の
後に、高食塩餌
(3.15% ナトリウム）
の固形餌を与える
Cry-null
平均動脈圧(mmHg)
140
130
120
110
100
90
食塩負荷
アルドステロン細胞に特異的に発現する酵素
HSD3B1/Hsd3b6
CYP11B2
CYP11B2
CYP11B2
コレステロール
(細胞質)
コレステロール
(ミトコンドリア)
プレグネノロン
プロゲステロン
11-デオキシコルチコステロン
コルチコステロン
18-ヒドロキシコルチコステロン
アルドステロン
StAR
CYP11A1
HSD3B2
CYP21A1
CYP11B1

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, Labor and Welfare of Japan

発行　平成 25 年 3 月 31 日

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

研究代表者 岡村均

京都大学大学院薬学研究科・京都大学薬学部
〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町 46-29

印刷　あさひ高速印刷
〒600-8815 京都市下京区中堂寺粟田町 93