厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
分担研究報告書

原発性アルドステロン症（PA）の機能確認検査と病型診断

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　部長
研究協力者　難波多挙、津曲　綾、立木美香、中尾佳奈子、臼井　健、田上哲也
国立病院機構京都医療センター内分泌代謝科

【研究要旨】
目的：機能確認検査によるPA病型診断の可能性につき検討したので報告する。
方法：対象はAVS、摘出副腎の病理所見等で確定診断したPA。機能確認検査として迅速ACTH試験を実施した60例と生食負荷試験を実施した35例の各々において、AVSあるいは手術病理所見に基づき一側性群と両側性群に分類し、ACTH負荷あるいは生食負荷に対する反応性を比較した。結果と考察：（1）迅速ACTH試験実施症例は一側性群41例、両側性群19例。一側性群では両側性群と比較し、ACTH負荷後peak PACおよびpeak PAC/Fは有意に高値であり、一側性PAの最適cut offはACTH負荷後peak PAC403 pg/ml（感度70.7%、特異度79.0%）であった。（2）生食負荷試験実施症例は一側性群14例、両側性群21例。一側性群の4時間後PACは両側性群と比較して有意に高値であり、一側性PAの最適cut offはPAC4h>110 pg/ml（感度86%、特異度100%）であった。結論：迅速ACTH試験と生食負荷試験はいずれもPAが一側性か両側性かの病型診断にも有用で、AVSの適否の参考になることが示唆された。

A. 研究目的

原発性アルドステロン症（PA）は最も代表的な二次性高血圧である。その手術適応の決定には病型（一側性 or 両側性）診断が必須で副腎静脈サンプリング（AVS）の実施が推奨される。しかし高度な技術を要し実施可能施設が限られるため、AVSの適応を判断する、より簡便な指標の確立が望まれる。

機能確認検査として実施される迅速ACTH試験は副作用が少なく外来でも施行可能である。一方、生理食塩水負荷試験は生理食塩水2Lを4時間にわたり点滴静注するため、高血圧、心不全、低カリウム血症などリスクがあり実施上の制約がある。そこで、PAの病型診断において、1)迅速ACTH試験は有用か、2)生理食塩水負荷試験は有用か、を検討した。

B. 研究方法

対象は機能確認検査、副腎CT、副腎静脈サンプリング、摘出副腎の病理組織等から確定診断されたPA症例。

①迅速ACTH試験：コートロシン®250μgを投与し、投与前、30分後、60分後のPACとコルチゾール（F）を測定。

②生理食塩水負荷試験：生理食塩水2Lを4時間で投与し、4時間後PAC（PAC4h）を測定。

それぞれの症例において、AVSあるいは手術病理所見に基づき一側性群と両側性群に分類し、ACTH負荷あるいは生食負荷に対する反応性を両群間で比較した。

（倫理面への配慮）

ヘルシンキ宣言及び厚生労働省「疫学研究に関する倫理指針」に準拠し、施設倫理委員会の

承認を得て実施した。個人情報の取り扱いには十分配慮し、個人のプライバシーの保護に留意した。

B．研究結果

1）（表1）迅速ACTH試験を実施されたのは61例。一側性群は40例、両側性群は21例であった。年齢、BMI、高血圧罹病期間については2群間で差を認めなかった。服用降圧薬数、CTで副腎腫瘍を有する割合は一側性群で有意に多かった（P<0.01、P<0.0001）。血清K値は一側性群で有意に低値であった（P<0.0005）。また、PAC・ARRは一側性群で有意に高値（P<0.0005、P<0.005）、PRAは有意に低値であった（P<0.005）。ACTH負荷後のpeak PACは、一側性群で670±435 pg/ml、両側性群で334±104 pg/ml、ACTH負荷後のpeak PAC/Fは、一側性群で28.5±19.0、両側性群で15.1±5.7であり、いずれも一側性群で有意に高値を示した（P<0.05、P<0.001）（図1）。一側性PAを診断するためのROC解析では、ACTH負荷後のpeak PACはAUC 0.872であり、Cut-offを403 pg/ml以上とした場合、感度85%、特異度81%、Cut-offを509 pg/ml以上とした場合、感度50%、特異度100%であった。ACTH負荷後のpeak PAC/FはAUC 0.813であり、Cut-offを19.3以上とした場合、感度73%、特異度86%、Cut-offを30.5以上とした場合、感度30%、特異度100%であった。

2）（表2）生理食塩水負荷試験を実施されたのは35例。一側性群が14例、両側性群が21例であった。年齢、BMI、服用降圧薬数については2群間で差を認めなかった。低K血症を有する割合、CTで副腎腫瘍を有する割合は、一側性群で有意に多かった（P<0.005）。また、PAC・ARRは一側性で有意に高値、PRAは有意に低値であった。PAC4hは、一側性群で293.6±145.4 pg/ml、両側性群で69.8±29.2 pg/mlであり、一側性で有意に高値を示した（P<0.0001）（図2）。一側性PAを診断するためのROC解析では、PAC4hはAUC 0.956であり、Cut-offを110 pg/ml以上とした場合、感度86%、特異度100%であった。

D．考察

今回の研究結果より、ACTH負荷後PAC/F、ACTH負荷後PACともに一側性群と両側性群の間に有意差を認めたことから、いずれも病型診断に有用であることが示された。また、生理食塩水負荷試験においても、負荷4時間後のPACが一側性群と両側性群の間に有意差を認め、病型診断に有用であることが示された。

これまでにも、Dex1mg抑制下迅速ACTH試験における負荷後PACは一側性PAの診断に有用であり、Cut offを37.9 ng/dlとした場合に感度91.3%、特異度80.6%であったとの報告（Sonoyama T. JCEM. 2011;96:2771-8）がある。一方、生理食塩水負荷試験に関しては、負荷後PACはPA診断には有用だが病型診断には有用ではない、との報告（Rossi GP. J Hypertens. 2007;25:1433-42）もある。

E．結論

迅速ACTH試験、生理食塩水試験はPAの病型診断に有用である。機能確認検査で病型を推定することにより、AVSを積極的に行うべき症例を選択できる可能性が考えられる。

F．健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. Ross GP, Barisa M, Auchus R, Amar L, et, al. Naruse M, Nishikawa T.Omura M, Pessina AC.The adrenal vein sampling international study (AVIS)for identifying the major subtypes of primary aldosteronism.J.Clin.Endo97(5):1606-1614,2012.
3. 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.
4. 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.

2. 学会発表

1. 成瀬光栄、内分泌性高血圧診療の進歩と課題、第45回日本内科学会近畿支部生涯教育講演会、2011.12月
2. 成瀬光栄、大谷すみれ、宮崎康、田中剛史、波多史朗、小河淳、立木美香、田上哲也、国立病院機構PHAS-J2研究班.国立病院機構(NHO)ネットワークを活用したPAに関する研究.第21回臨床内分泌代謝Update 2012.1.27-28
3. 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
4. 立木美香、難波多挙、中尾佳奈子、玉那覇民子、臼井健、田上哲也、島津章、田辺晶代、成瀬光栄.原発性アルドステロン症における短時間生食負荷試験の診断的意義.第35回日本高血圧学会総会.2012.9.20-22
5. 難波多挙、立木美香、植田洋平、垣田真以子、中尾佳奈子、玉那覇民子、立木美香、臼井健、田上哲也、島津章、成瀬光栄 原発性アルドステロン症の病型診断における迅速ACTH試験の有用性に関する検討 第35回日本高血圧学会総会.2012.9.20-22

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

表 1：迅速 ACTH 試験を実施した患者背景

	一側性PA (n=40)	両側性PA (n=21)	*p*
年齢 (歳) *	52.0±8.7	51.5±10.2	NS
BMI (kg/m^2) *	23.5±3.4	24.3±3.2	NS
高血圧罹病期間 (年) *	11.7±8.1	7.7±7.8	NS
服用降圧薬数*	1.7±0.7	1.1±0.6	<0.01
血清カリウム (mEq/l) *	3.4±0.6	3.9±0.2	<0.0005
低カリウム血症を有する割合	73%(29/40)	14% (3/21)	<0.0001
CTで副腎腫瘍を有する割合	93%(37/41)	43%(9/21)	<0.0001
PAC (pg/ml) *	330±191	169±68	<0.0005
PRA (ng/ml/h) *	0.3±0.2	0.5±0.2	<0.005
ARR*	2110±2282	488±376	<0.005

*, mean±SD ; NS, not significant.

表 2：生理食塩水負荷試験を実施した患者背景

	一側性PA (n=14)	両側性PA (n=21)	*p*
年齢（歳）*	49.6±11.3	50.5±10.6	NS
BMI(kg/m^2) *	23.9±4.4	25.1±3.6	NS
服用降圧剤数*	1.7±0.7	1.1±0.6	NS
血清カリウム(mEq/l) *	3.6±0.6	3.8±0.2	NS
低カリウム血症を有する割合	64%(9/14)	14%(3/21)	<0.005
CTで副腎腫瘍を有する割合	93%(13/14)	43%(9/21)	<0.005
PAC(pg/ml) *	319.4±140.6	151.7±48.6	<0.0005
PRA(ng/ml/h) *	0.28±0.17	0.45±0.23	<0.05
ARR*	1764±1386	518±438	<0.0005

*; mean±SD, NS; not significant

図 1：迅速 ACTH 試験結果の比較

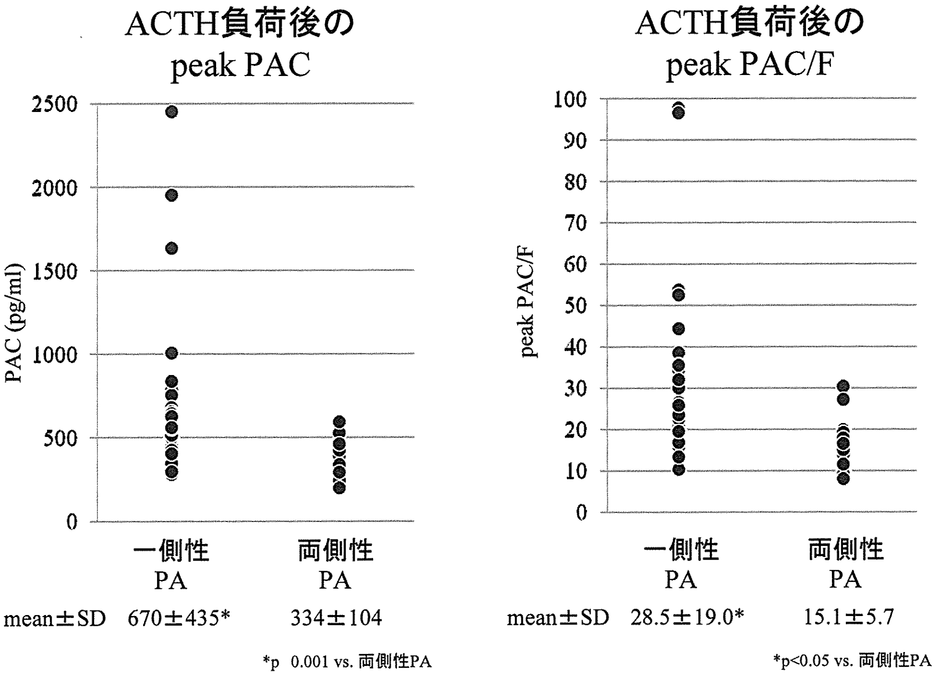
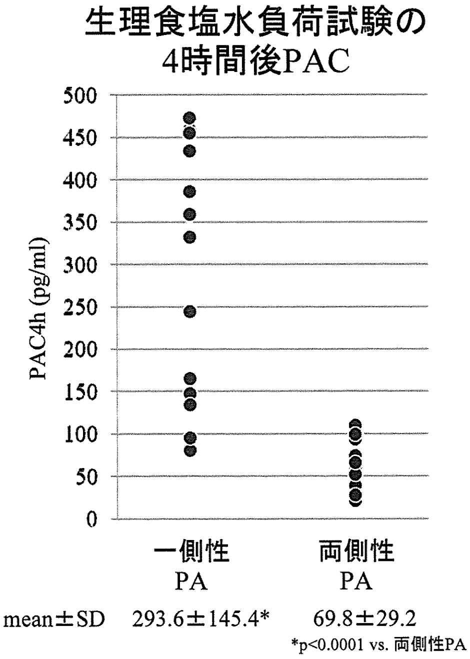


図 2：生理食塩水負荷試験結果の比較



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
分担研究報告書

「両側アルドステロン産生副腎皮質腺腫による原発性アルドステロン症の診断と治療」に関する研究

研究分担者　佐藤　文俊　東北大学病院　腎・高血圧・内分泌科　講師

【研究要旨】
腫瘍性病変に由来する原発性アルドステロン症は、片側腺腫（APA）、片側微小腺腫（mAPA）が主たる病型であるが両側腺腫も時に経験される。両側性病変である点からは、両側過形成との鑑別が臨床上重要であり、これにより治療選択が異なる。

A．研究目的

副腎静脈分枝採血を行う超選択的副腎静脈サンプリング（SS-AVS）による両側腫瘍性病変と過形成の鑑別を、自験例における診断と治療の成果から今後の課題を検討する。

B．研究方法

2007年4月から2012年6月の自験例を対象とし、Ca拮抗薬・α遮断薬内服下に、アルドステロン・レニン活性比（ARR）基礎値 20（ng/dl per ng/ml/h）以上、かつ、カプトプリル50mg 負荷ARR 20 以上の両者を満たす際に原発性アルドステロン症と診断。クッシング症候群の合併は 1mg デキサメサゾン抑制試験にて鑑別し、64Ch MDCT により副腎静脈と副腎結節の描出を行った。ACTH負荷副腎静脈サンプリングによる局在診断を行い、ACTH負荷後に、中心静脈採血におけるアルドステロン・コルチゾル比（ACR）の左右比 2.6 倍未満は両側性病変と診断。加えて、副腎静脈分枝における超選択的採血にて、ACRが末梢血におけるそれを下回る部位はアルドステロン分泌が抑制されており腫瘍性病変に付随する正常副腎と判定した。中心静脈における判定で両側性であり、CT 所見、副腎静脈サンプリングの結果を総合して臨床的に両側性 APA と診断、正常副腎温存鏡視下副腎手術を施行し、免疫組織化学法を含む病理検索にて診断を確定した。

C．研究結果

上記診断基準を満たした全299例中、134例（44.8%）が腫瘍性病変であり副腎手術による治療を行った。腫瘍性病変134例中、100例（74.6%）が片側APA、29例（21.6%）が術前CTにて病変を指摘し得なかった mAPA、5例（3.7%）が両側 APA と診断された。両側APA 5例のうち4例が女性、診断時平均年齢は53.6 歳、5例中4例は1期的両側副腎手術、1例は2期的手術を施行し、周術期の合併症は認めなかった。

D．考察

術前平均3.4剤の降圧薬内服を要したが術後平均0.8剤へ減量、5例中3例は術後に全ての降圧薬を中止、正常血圧を維持している。また、全5例において術後の糖質コルチコイド補充療法より離脱している。

E．結論

CT などによる画像評価に加えて、SS-AVS

に基づく両側腫瘍性病変と過形成の鑑別に基づいて施行する正常副腎温存両側副腎手術により、両側 APA の病態は治癒可能であることが示唆された。

F．健康危険情報　なし

G．研究発表
1．論文発表　別紙
2．学会発表
○38th Meeting of the International Aldosterone Conference
○The Endocrine Society’s 94th Annual Meeting & Expo
○第22回臨床内分泌代謝Update

H．知的財産権の出願状況
1．特許取得　なし
2．実用新案登録　なし
3．その他　なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
分担研究報告書

KCNJ5遺伝子変異の有無による原発性アルドステロン症（PA）臨床的特徴の比較

西川哲男　横浜労災病院　院長

【研究要旨】

目的　アルドステロン産生腺腫(APA)組織のKCNJ5変異の有無と臨床所見を比較検討した。

方法　APA60例の切除標本組織からcDNAを調整しKCNJ5変異の有無と臨床所見、内分泌検査所見、ACTH負荷副腎静脈採血所見を比較検討した。

結果と考察　60例中42例(70%)でKCNJ5変異を認めた。変異群は年齢が若く血漿アルドステロン濃度は高値を示し、ACTH刺激後の末梢血および患側副腎静脈血でのアルドステロン高反応を示した。一方野生型ではレニンーアンギオテンシン系依存性アルドステロン分泌を認めた。

APAのKCNJ5遺伝子異常の有無をACTH負荷試験で鑑別出来る可能性が示唆された。

大村昌夫、北本匠、末松佐知子、松澤陽子、齋藤淳、西川哲男
横浜労災病院 内分泌・糖尿病センター

A．研究目的

Choiらにより家族性アルドステロン症3型の原因遺伝子としてKCNJ5カリウムチャネル異常が報告され(Choi et al.Science 2011; 331: 768)、さらに家族歴のないアルドステロン産生腺腫(APA)腺腫細胞のKCNJ5遺伝子変異も欧米で36%、日本人では65.2%と報告された(Taguchi et al. J Clin Endocrinol Metab2012; 97: 131)。KCNJ5遺伝子発見以前、APAのアルドステロン分泌はACTHで刺激され、特発性アルドステロン症はレニンーアンギオテンシン系の制御を受けるとされているが、以前よりアンギオテンシンII反応性APAとアンギオテンシンII非反応性APAの存在することも報告されていた (Gordon RD. J Endocrinol Invest. 1995;18:495-)。APAのアルドステロン分泌機構の詳細は不明な点が多かった。

そこで今回我々は、日本人APA症例におけるKCNJ5遺伝子変異の有無によるAPAの臨床的特徴を検討した。

B．研究方法

ACTH負荷を用いた副腎静脈サンプリング(ACTH-AVS)により片側副腎APAと診断し、片側副腎摘出処置を行った60症例を対象とした。術前に本研究への参加を文書により説明を行い同意の得られた症例で摘出したAPA組織からcDNAを調製し、KCNJ5のシークエンスを行い、変異の有無を検討した。また各症例の診療記録から臨床所見、一般検査所見並びに内分泌機検査所見を収集し、各群の特徴について検討した。

（倫理面への配慮）

術前に本研究への参加を文書により説明を行い同意が得られた症例で手術時の標本を採取し

た。

C．研究結果

60例中42例 (70%)にKCNJ5遺伝子変異が認められた。このうち p.G151R変異は28例、p.L168Rの変異は14例であった。両群間の比較では、変異群で有意に年齢が若かったが、BMI、血圧、高血圧罹病期間、血清K値、クレアチニンクリアランス、腫瘍の大きさに差はなかった（表1）。血漿レニン活性の基礎値は両群で差がなかった。一方、末梢血中血漿アルドステロン濃度 (PAC)と1日蓄尿中アルドステロン排泄量は変異群で有意に高値を示した。ACTH刺激にたいするPAC反応性をACTH試験で検討したところ、迅速ACTH負荷後のPACの増加が有意に変異群で高かった。また、ACTH負荷副腎静脈採血では、ACTH負荷前のAPAが生じている副腎の中心静脈血中アルドステロン濃度(Aldo)は、両群で差がなかったが、ACTH負荷後は変異群で有意に高値を示した。また変異群ではACTH負荷後患側中心静脈血中コルチゾール反応はアルドステロン反応と比較し軽微であり、ACTH刺激後副腎静脈血中アルドステロン／コルチゾール比は、変異群で高値を示した。

一方レニン－アンギオテンシン系依存性アルドステロン分泌をフロセミド立位試験、カプトプリル負荷試験で検討したところ、フロセミド立位刺激に対するPAC増加反応は非変異群で有意に大きく、またカプトプリル投与によるPAC抑制反応は非変異群で大きかった。

E．結論

既報と同様に、日本人APA患者におけるKCNJ5遺伝子変異率は70%と非常に高い事が再確認された。KCNJ5遺伝子変異群で野生群に比較してアルドステロンが高いことから、APAの変異群にて自律性アルドステロン産生能がより著明であると考えられた。PAの内、若年者で典型的な高アルドステロン血症を示す症例で変異群が多いと推測された。また、KCNJ5遺伝子変異のあるAPAでは迅速ACTH負荷試験でPAC過剰反応を示し、さらに、ACTH負荷後のAVSでもPACが有意に高かったことから、APAのアルドステロン増加反応はACTH依存性の高いことが判明した。一方フロセミド立位試験、カプトプリル負荷試験の結果から、野生型APAでのアルドステロン反応はレニン－アンギオテンシン系に依存することが明らかになり、APAのKCNJ5遺伝子異常の有無をACTH負荷試験で鑑別出来る可能性が示唆された。

さらに今回のACTH副腎静脈採血によるAPA側副腎中心静脈血中アルドステロン／コルチゾール比が変異群で高値を示したが、in vitroの報告ではKCNJ5遺伝子変異はCYP11B1・CYP11B2の発現の増強とCYP17の発現低下が報告されているが、ACTH刺激でのPAC/Fの増大はこのin vitroの所見とも合致し、ACTH負荷副腎静脈採血による検査はAPAの診断のみならず、APAのKCNJ5変異の有無をも鑑別可能な臨床検査法と考えられた。

F．健康危険情報

なし

G．研究発表

1．論文発表

1）Nishikawa T, Omura M, Satoh F, Shibata H, Takahashi K, Tamura N and Tanabe A (2011) Guidelines for the diagnosis and treatment of primary aldosteronism -The Japan Endocrine Society

2009Endocr J 58:711-721

2）Tetsuo Nishikawa*, Masao Omura, Jun Saito and Yoko Matsuzawa, Primary aldosteronism: comparison between guidelines of the Japanese and the US Endocrine Society. Expert Rev. Endocrinol. Metab. 7(6), 637–645 (2012)

3）Minoru Iwata1, Yutaka Oki, Teruyo Okazawa, Shin Ishizawa, Chihiro Taka, Katsuya Yamazaki, Kazuyuki Tobe , Junya Fukuoka, Hironobu Sasano and Tetsuo Nishikawa, A Rare Case of Adrenocorticotropic Hormone (ACTH)-independent Macroadrenal Hyperplasia Showing Ectopic Production of ACTH. Intern Med 51: 2181-2187, 2012

4）Ikki Sakuma, Sachiko Suematsu, Yoko Matsuzaswa, Jun Saito, Masao Omura, Takashi Maekawa, Yasuhiro Nakamura, Hironobu Sasano and Tetsuo Nishikawa. Characterization of steroidogenic enzyme expression in aldosterone-producing adenoma: a comparison with various human adrenal tumors. Advance Publication doi: 10.1507/endocrj. EJ12-0270

5）Gian Paolo Rossi, Marlena Barisa, Bruno Allolio, Richard J. Auchus, Laurence Amar, Debbie Cohen, Christoph Degenhart, Jaap Deinum, Evelyn Fischer, Richard Gordon, Ralph Kickuth, Gregory Kline, Andre Lacroix, Steven Magill, Diego Miotto, Mitsuhide Naruse, Tetsuo Nishikawa, Masao Omura, et al. The Adrenal Vein Sampling International Study (AVIS) for Identifying the Major Subtypes of Primary Aldosteronism. J Clin Endocrin Metab. First published ahead of print March 7, 2012 as doi:10.1210/jc.2011-2830

6）Tetsuo Nishikawa ,Masao Omura ,Jun Saito ,Yoko Matsuzawa and Tomoshige Kino. Editorial Comment from Dr Nishikawa et al. to Preoperative masked renal damage in Japanese patients with primary aldosteronism: Identification of predictors for chronic kidney disease manifested after adrenalectomy. International Journal of Urology (2012) DOI: 10.1111/iju.12052

2．学会発表

1）Masao Omura, Kohzoh Makita, Seishi Matsui, Jun Inoue, Maki Nagata,Kunio Yamaguchi, Yukio Kakuta, Yoko Matsuzawa, Jun Saito, Tetsuo Nishikawa. Superselective ACTH-stimulated adrenal venous sampling can discriminate the main lesion from the normal tissue for doing partial adrenalectomy in unilateral aldosterone-producing adenoma. Florence, Italy, 2012 May 5-9

2）Masao Omura, Jun Inoue, Maki Nagata, Kunio Yamaguchi, Yukio Kakuta, Yoko Matsuzawa, Jun Saito, Tetsuo Nishikawa. Study on cardiovascular complications in primary aldosteronism.35th Meeting of the International Aldosterone Conference, Houston 2012 June 21-22

3）Masao Omura, Kohzoh Makita, Seishi Matsui, Jun Inoue, Maki Nagata, Kunio Yamaguchi, Yukio Kakuta, Yoko Matsuzawa, Jun Saito, Tetsuo Nishikawa. Usefulness of super-selective adrenal

venin sampling for detecting tiny adrenal lesions in primary aldosteronism. 94th Annual Meeting The Endocrine Society. Houston 2012 June 23-26

4) M. Omura, Y. Takashi, M. Nagata, K. Yamaguchi, Y. Kakuta, Y. Matsuzawa, J. Saito, and T. Nishikawa. Analysis of cardiovascular complications in patients with primary aldosteronism. 24th Scientific meting of The International Society of hypertension. 30 September- 4 October 2012

5) Masao Omura, Kohzoh Makita, Seishi Matsui, Jun Inoue, Maki Nagata, Kunio Yamaguchi, Yukio Kakuta, Yoko Matsuzawa, Jun Saito, Tetsuo Nishikawa. Clinical trial of minimal invasive surgery for unilateral partial adrenalectomy after precisely localizing aldosterone-producing adenoma by super-selective ACTH-stimulated adrenal vein sampling. Aldosterone & Salt: Heart and Kidney Meeting 5th - 7th October 2012 Novotel Palm Cove Resort Australia

6) Masao Omura, Nishikawa Tetsuo
Precise analyses of adrenal lesions by our new methods of adrenal vein sampling in patients with adrenal hypertension
第76回日本循環器学会学術集会. 2012年3月16日～3月18日福岡国際会議場

7) 松澤 陽子, 橋本 直子, 大村 昌夫, 西川 哲男コルチゾール産生副腎腺腫における高血圧発症機序の検討. 第109回日本内科学会講演会 2012年4月13日～4月15日 みやこめっせ 京都市

8) 松澤 陽子、佐藤淳、大村昌夫、西川哲男 SCS 合併原発性アルドステロン症のアルドステロン過剰分泌にレプチンが関与する. 第85回日本内分泌学会学術総会 2012年4月19日～ 21日 名古屋国際会議場

9) 大村昌夫 高士祐一 牧田幸三、松井青史、永田眞樹、山口邦雄、角田幸雄、松澤陽子、齋藤淳、西川哲男. 超選択的ACTH負荷副腎静脈採血と原発性アルドステロン症確認検査の比較検討. 第85回日本内分泌学会学術総会 2012年4月19日～21日 名古屋国際会議場

10) 大村昌夫 牧田幸三 松井青史 横浜労災病院 松澤陽子 斎藤淳 西川哲男. 原発性アルドステロン症診断における静脈サンプリングの実技 超選択的ACTH負荷副腎静脈採血の診断的意義 第1回臨床高血圧フォーラム 2012年５月12日から１３日 大阪千里ライフサイエンスセンター

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
分担研究報告書

副腎ホルモン産生異常に関する調査研究
本邦アルドステロン産生腺腫におけるKCNJ5遺伝子変異の特徴

山田　正信　群馬大学大学院医学系研究科病態制御内科
研究協力者　中島　康代、田口　亮、岡村　孝志

【研究要旨】

原発性アルドステロン症(PA)の原因はこれまで不明であったが、2011年にアルドステロン産生腺腫(APA)にKCNJ5の体細胞変異があることが報告された。そこで我々は、当院にて手術を施行されたアルドステロン産生腺腫(APA)32例のKCNJ5遺伝子変異の頻度と特徴を検討した。KCNJ5遺伝子変異はAPAの約66%と欧米の2倍以上の確率で認められ、新たな変異p.G151R,c.451G>Cを発見した。また、KCNJ5遺伝子に変異を有するAPAでは、KCNJ5mRNA量が有意に高く、免疫組織学的検討でも高発現を認めた。さらにコルチゾール産生腫瘍や褐色細胞腫と比較しAPA におけるKCNJ5mRNA量は有意に高値であった。KCNJ5遺伝子変異を有するAPAでは、高アルドステロン血症や低K血症、収縮期高血圧の傾向が強く、より重症な臨床像を呈することが示唆された。

A．研究目的

これまで原発性アルドステロン症の原因はまったく不明であったが、2011年2月にChoiらのグループから、アルドステロン産生腺腫(APA)の22名中8名（約30%）にKチャネルのKCNJ5(Kir 3.4, GIRK4)の体細胞変異があることが報告された。その後世界中でAPAにおけるKCNJ5遺伝子変異の頻度などが検討されているが、本邦では検討されていない。そこで今回我々は、本邦におけるAPAのKCNJ5遺伝子変異の頻度と変異例における特徴を検討した。

B．研究方法

①2007年から2012年までに群馬大学医学部附属病院に入院し、手術を行ったAPA 32例（男性16例、女性16例、平均年齢52歳）を対象とした。さらにコルチゾール産生腫瘍(5例)、褐色細胞腫(10例)の検討も行った。②腫瘍検体よりcDNAを作成し、ダイレクトシークエンスにてKCNJ5遺伝子変異の有無を検討した。③各腫瘍におけるKCNJ5mRNA発現量をリアルタイムPCRにて測定し、さらに免疫組織学的検討によりKCNJ5発現を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究については群馬大学医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理審査委員会の承認(受付番号121)を得て行っている。

C．研究結果

32例のAPA症例で、21例(65.6%)にKCNJ5遺伝子変異を認めた（c.451G>A, p.G151R 11例、c.451G>C, p.G151R 5例、c.503T>G, p.L168R 5例）。この中で新たな変異p.G151R,c.451G>Cを発見した。一方、コルチゾール産生腫瘍や褐色細胞腫にはKCNJ5遺伝子変異は認めらなかった。また、KCNJ5遺伝子に変異を有するAPAでは、KCNJ5 mRNA

発現量が有意に高く(図1)免疫組織学的検討でもKCNJ5の高発現を認めた(図2)。さらにコルチゾール産生腫瘍や褐色細胞腫と比較しAPAのKCNJ5m RNA量は有意に高値であった(図3)。APAのKCNJ5変異症例は、野生型と比較して有意に若年で(47vs.58歳, p＜0.05)、血漿アルドステロンが高値であり(42.4 vs.27.3ng/dl, p＜0.05)、血中K低値(2.4 vs. 3.8mEq/l, p＜0.01)、拡張期血圧高値(84 vs. 76mmHg, p＜0.05)であった。

D．考察

原発性アルドステロン症は、欧米においては、約70% が副腎の両側性の過形成による特発性アルドステロン症(Idiopathic adrenal hyperplasia, IHA)であり、約30%がアルドステロン産生腺腫(Aldosterone-producing adenoma, APA)によるものである。ところが我が国においてはこの頻度が逆転しており、APAが約70%でIHAが約30%という特徴がある。今回の検討でも驚いたことに21例(65.6%)と欧米における2倍以上の確率でKCNJ5遺伝子変異を認め、さらに新たな変異p.G151R,c.451G＞Cを発見した。またKCNJ5変異症例は欧米の報告と同様に、若年で、アルドステロン高値などの傾向を認めたが、欧米で認められるような女性に多い傾向は認められなかった。また、KCNJ5変異症例ではKCNJ5mRNAや蛋白発現の増加を認めており、KCNJ5高発現が高アルドステロン血症を引き起こしている可能性も考えられた。

E. 結論

本邦におけるAPAは欧米と比較しKCNJ5遺伝子変異を高率に認め、明らかな性差は認めなかった。またKCNJ5遺伝子変異はAPAに特異的であり、変異を認めるAPAではアルドステロン産生能が高くより重症の臨床像を呈する可能性が示唆された。

F．健康危険情報

該当なし。

G．研究発表

1．論文発表

1．Yamada M, Nakajima Y, Taguchi R, Okamura T, Ishii S, Tomaru T, Ozawa A, Shibusawa N, Yoshino S, Toki A, Ishida E, Hashimoto K, Satoh T, Mori M. KCNJ5 mutations in aldosterone- and cortisol-co-secreting adrenal adenomas. Endocr. J. 59:735-741, 2012.

2．Taguchi R, Yamada M, Nakajima Y, Satoh T, Hashimoto K, Ozawa A, Shibusawa N, Okada S, Rokutanda N, Takata D, Koibuchi Y, Horiguchi J, Oyama T, Takeyoshi I, Mori M. Expression and mutations of KCNJ5 mRNA in Japanese patients with aldosterone-producing adenomas. J. Clin. Endocrinol. Metab. 97:1311-1319, 2012.

2．学会発表

1．山田 正信, 田口 亮, 中島 康代, 小澤 厚志, 渋沢 信行, 橋本 貢士, 佐藤 哲郎, 小山 徹也, 竹吉 泉, 森 昌朋本邦アルドステロン産生腺腫におけるKチャンネルKCNJ5遺伝子変異の特徴　第109回日本内科学会講演会 京都　2012年4月13日-15日

2．山田 正信, 田口 亮, 中島 康代, 登丸 琢哉, 小澤 厚志, 渋澤 信行, 橋本 貢士, 佐藤 哲郎, 六反田 奈和, 高他 大輔, 鯉渕 幸生, 堀

口 淳, 小山 徹也, 竹吉 泉, 森 昌朋 本邦アルドステロン産生腺腫におけるKCNJ5遺伝子変異の特徴と発現
第85回日本内分泌学会学術総会　名古屋
2012年4月19日-21日

３．中島 康代, 山田 正信, 田口 亮, 登丸 琢也, 小澤 厚志, 渋沢 信行, 橋本 貢士, 佐藤 哲郎, 森 昌朋 コルチゾール分泌の合併は原発性アルドステロン症の心脳血管障害の強い危険因子である第85回日本内分泌学会学術総会　名古屋　2012年4月19日-21日

４．田口 亮, 山田 正信, 橋本 貢士, 佐藤 哲郎, 森 昌朋 機能性副腎腫瘍は糖尿病と心脳血管障害の明らかな危険因子である　第54回日本糖尿病学会年次学術総会　札幌
2011年5月19日-21日

H．知的財産権の出願・登録状況

１．特許取得
（特願2012-078098）

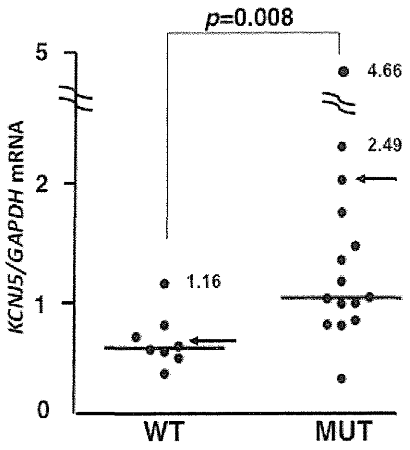


図 1 アルドステロン産生腺腫における KCNJ5mRNA 発現量
WT：KCNJ5 遺伝子野生型
MUT：KCNJ5 遺伝子変異型 矢印で示した症例は図 2 における免疫染色施行例

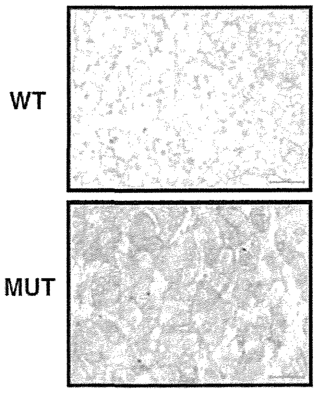


図 2 アルドステロン産生腺腫における KCNJ5 免疫染色
WT：KCNJ5 遺伝子野生型
MUT：KCNJ5 遺伝子変異型

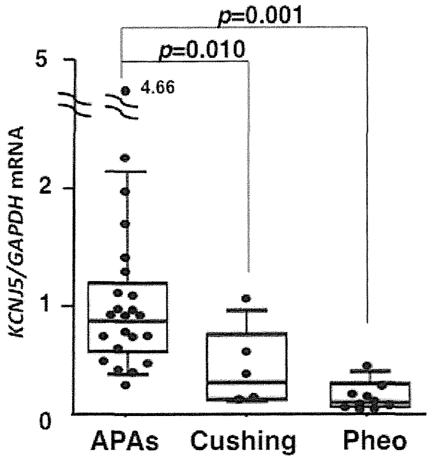


図 3 副腎腫瘍組織における KCNJ5mRNA 発現量
APAs： アルドステロン産生腺腫
Cushing： クッシング症候群
Pheo： 褐色細胞腫

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
分担研究報告書

特発性アルドステロン症患者における血清中アルドステロン分泌促進因子の検討

分担研究者　柴田洋孝　慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科

【研究要旨】

原発性アルドステロン症は、本態性高血圧と比べて、心血管疾患やメタボリックシンドロームの有病率が高い。原発性アルドステロン症の成因に関しては、アルドステロン産生腺腫(APA)の一部は、KCNJ5遺伝子変異によるCYP11B2過剰発現が示されたが、特発性アルドステロン症(IHA)の成因は不明である。ヒト脂肪細胞からアルドステロン分泌促進因子が分泌されるとの報告がなされており、本研究では、患者血清中のCYP11B2活性化因子の存在に関して検討した。

IHA患者において、尿中アルドステロン排泄量はBMI、腹囲、空腹時血糖、HbA1c, HOMA-Rと有意な正相関を認めた。IHA血清では、CYP11B2レポーターアッセイにおいて、コントロールと比較して有意な高値を認めた（$P<0.05$）。IHA血清による上昇は、PKA阻害薬H89またはolmesartanを添加してもnon-PA血清と比べて高値を認めた($P<0.05$)。＜考察＞IHA患者における高アルドステロン血症は、臨床的に肥満との関連を認め、IHA血清中のPKAおよびangiotensin II非依存性のアルドステロン分泌促進因子が存在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、心血管疾患および心血管死が本態性高血圧患者と比べて有意に多いことが報告されている。また、PAでは本態性高血圧と比べて、メタボリックシンドローム(MetS)の頻度が高いことも示されている。血中アルドステロン濃度と内臓脂肪量が有意な相関関係を認めるとの報告をふまえると、PAでは高アルドステロン血症により内臓脂肪量が増加して、MetSや心血管合併症を来たす可能性が示唆される。さらに、PAのサブタイプの中では、アルドステロン産生腺腫(APA)と比べて両側副腎過形成による特発性アルドステロン症(IHA)において、MetSの有病率が高いことも示されている。APAの病因は、腺腫部におけるCYP11B2の過剰発現や最近報告されたKCNJ5遺伝子の体細胞変異の関与が約40%の症例で示されている。一方、IHAの病因についてはマウスではK+チャネルTASK1/TASK3ダブルノックアウトマウスや時計遺伝子Cry1/Cry1ダブルノックアウトマウスがIHAと類似の表現型を示すことから、これらの遺伝子の関与が推察されるが、ヒトにおいては全く不明である。本研究では、IHA患者における病因が肥満と強く関連するという仮説につき、患者血清を用いた検討を行った。

B. 研究方法

対象は、PA診療ガイドライン（日本内分泌学会2009）に準拠して診断されたPA121例および非PA81例を対象とした。PA確定診断として施行した経口食塩負荷試験における24時間尿中アルドステロン排泄量と各種臨床指標との関連を検討した。

インフォームドコンセントを得られたIHAおよび非PA患者血清を、ヒト副腎皮質由来H295R細胞に添加して、CYP11B2プロモーター-luciferaseレポーター活性および培地中アルドステロン濃度を測定した。

C. 研究結果

1) 24時間尿中アルドステロン排泄量と臨床的指標との相関の検討

APA (N=36), IHA (N=85)およびNon-PA (N=81)を対象に24時間尿中アルドステロンとBMI, 腹囲、HbA1c(JDS), 空腹時血糖(FPG)、HOMA-R, HDL-C, LDL-C, TGとの相関を検討した結果、APA患者ではHbA1c(JDS)のみと有意な相関(P=0.02)を認め、IHA患者では、BMI (P=0.01), 腹囲(P=0.01)、HbA1c(JDS) (P=0.01), 空腹時血糖(P=0), HOMA-R (P=0)と有意な相関を認めたが、Non-PA患者では有意な相関を認めなかった。以上の結果から、IHA患者では肥満やインスリン抵抗性とアルドステロン過剰の強い関連が示唆された。

2) 患者血清添加によるCYP11B2-luciferaseおよび培地中アルドステロン濃度への影響の検討

同意が得られた対象(IHA, N=65; Non-PA, N=81)の血清をヒト副腎皮質由来H295R細胞に添加して、CYP11B2プロモーター活性をルシフェラーゼアッセイにて検討した（表1，図1）。その結果、IHA血清ではNon-PA血清と比べて有意にCYP11B2-luciferase活性の高値を認めた（図1）また、この活性はPKA阻害薬H89を添加してもIHA血清がNon-PA血清と比べて高値を示したことから、PKA非依存性の因子であると示唆された（図1）。同様に、AT1受容体拮抗薬olmesartanを添加しても変化を認めなかった（データ非表示）。次に、H295R細胞培地中のアルドステロン濃度を検討したが、CYP11B2-luciferase活性と同様の結果であった（図2）。

さらに、CTスキャンから算出した内臓脂肪面積とCYP11B2-luciferase活性の相関を検討した結果、IHAでは有意な相関を認めた(R=0.325, P=0.028)が、Non-PAでは有意な相関を認めなかった（図3）。以上の結果から、IHA血清は、内臓脂肪に由来する、アルドステロン分泌を有意に増加させる液性因子を含むことが示唆された（図4）。

D. 考察

本研究の結果、IHA患者における高アルドステロン血症の成因として、内臓脂肪細胞に由来するCYP11B2活性化因子が関与することが示唆された。以前、脂肪細胞由来アルドステロン分泌促進因子の存在が報告されたが、同因子は未だ未同定であることや、肥満者が常に高アルドステロン血症を示さないという観察も報告されており、controversialであった。本結果からは、IHAという病態では、高アルドステロン血症と肥満との強い関連が示唆されたことから、IHA患者に体重減量の介入を行い、実際に高アルドステロン血症が改善するかを実証することが期待される。また、CYP11B2活性化因子の同定も並行して行っていく予定である。

E. 結論

PAのサブタイプのうち、IHA患者では肥満に関連して内臓脂肪から分泌されるCYP11B2活性化因子が関与することが示唆された。

G. 研究発表

1．論文発表

論文

1．S.Monticone, N.G. Hattangady, K.Nishi-

moto, F.Mantero, B.Rubin, M.V. Cicala, R.J.Auchus, H.K.Ghayee, H.Shibata, I. Kurihara, T.A. Williams, J.G. Giri, R.J. Bollag, H.A.Edwards, C.M.Isales, W.E.Rainey. Effect of KCNJ5 mutations on gene expression in aldosterone-producing adenomas and adrenocortical cells. J.Clin.Endocrionl.Metab. 97: 1567-72, 2012

2．K. Kitada, D.Nakano, Y.Liu, Y. Fujisawa, H.Hitomi, Y.Shibayama, H. Shibata, Y.Nagai, H.Mori, T.Masaki, H.Kobori, A. Nishiyama. Oxidative Stress-Induced Glomerular Mineralocorticoid Receptor Activation Limits the Benefit of Salt Reduction in Dahl Salt-Sensitive Rats. PLoS ONE 2012;7(7):e41896. Epub 2012 Jul 24.

3．S.Hattori, A.Miyajima, T.Maeda, M.Hasegawa, T.Takeda, T.Kosaka, E.Kikuchi, K.Nakagawa, H.Shibata, M.Oya. Risk factors for perioperative complications of laparoscopic adrenalectomy including single-site surgery. J Endourol. 26:1463-1467, 2012.

4．城　理絵、柴田洋孝．原発性アルドステロン症の画像診断の適用.ホルモンと臨床、59: 35-40, 2011.

5．横田健一、柴田洋孝．原発性アルドステロン症の局在診断：副腎静脈サンプリングの問題点、ホルモンと臨床、59: 53-58, 2011.

6．栗原　勲、柴田洋孝．原発性アルドステロン症の治療法による予後、ホルモンと臨床、59: 73-78, 2011.

7．柴田洋孝．原発性アルドステロン症(Conn症候群)．日本臨床　別冊 腎臓症候群（第２版）（下）、302-307, 2012.

8．柴田洋孝．家族性アルドステロン症．日本臨床　別冊　腎臓症候群（第２版）（下）、291-294, 2012.

9．柴田洋孝．低レニン血性低アルドステロン症．日本臨床　別冊 腎臓症候群（第２版）（下）、321-325, 2012.

10．柴田洋孝．原発性アルドステロン症　診断と治療、100: 1187-1193, 2012.

11．柴田洋孝．副腎疾患、症候から診断へ. Medical Practice, 29臨増：179-181, 2012.

12．柴田洋孝．副腎疾患、疾患各論．Medical Practice, 29臨増: 181-187, 2012.

13．柴田洋孝．クッシング症候群、内科、109: 1285-1288, 2012.

14．柴田洋孝．原発性アルドステロン症の診断ガイドライン、医学のあゆみ、241: 1135-1142, 2012.

15．柴田洋孝、伊藤　裕．ミネラルコルチコイド高血圧の最近の動向、Urology Today、19: 110-115, 2012.

16．横田健一、柴田洋孝．副腎不全、medicina, 49: 1588-1592, 2012.

17．柴田洋孝、伊藤　裕．ミネラルコルチコイド受容体活性化の分子機構の最新の知見、医学のあゆみ、243: 219-224. 2012.

18．武田彩乃、柴田洋孝．原発性アルドステロン症、ホルモンと臨床, 59: 57-63, 2011.

著書

1．柴田洋孝．チャネル異常：Liddle症候群、Bartter症候群、Gitelman症候群.
代謝・内分泌疾患診療最新ガイドライン（門脇　孝、下村伊一郎編著）、総合医学

社、p.290-295, 2012.

２．柴田洋孝．症状、スクリーニング、機能検査．褐色細胞腫診療マニュアル（改訂第２版）、診断と治療社、p.31-34, 2012.

３．柴田洋孝、伊藤　裕．ミネラルコルチコイド受容体関連高血圧、Annual Review2013糖尿病・代謝・内分泌、中外医学社、
p.185-192、2012

学会発表

１．柴田洋孝、伊藤　裕．ミネラルコルチコイド受容体関連高血圧におけるアルドステロン拮抗薬の使い分け．第35回日本高血圧学会総会・パネルディスカッション　2012.9．名古屋市

２．柴田洋孝、伊藤　裕．睡眠時無呼吸症候群とアルドステロン．第35回日本高血圧学会総会・日本高血圧学会日本内分泌学会合同シンポジウム　2012.9　名古屋市

３．柴田洋孝．原発性アルドステロン症の臨床：an update．第３回九州HPA axis研究会・特別講演　2012.6 博多市

４．柴田洋孝．生活習慣病におけるMR関連高血圧と臓器障害．第８回分子循環器病セミナー・特別講演　2012.6　東京

５．柴田洋孝．ミネラルコルチコイド受容体関連高血圧と臓器障害．アルドステロンフォーラム2012・シンポジウム講演　2012.5 東京

６．柴田洋孝、栗原　勲、横田健一、武田彩乃、三石木綿子、城　理絵、林　毅、大山貴子、須田徳子、伊藤　裕．治療抵抗性高血圧のサブタイプとしてのミネラルコルチコイド受容体関連高血圧の重要性．第85回日本内分泌学会学術総会・クリニカルアワー　2012.4 名古屋

７．柴田洋孝、糖尿病におけるミネラルコルチコイド受容体の活性化機構．第85回日本内分泌学会学術総会・シンポジウム（核内受容体のエピジェネティクスと内分泌代謝疾患）2012.4 名古屋

８．H.Shibata, H. Itoh, Clinical relevance of mineralocorticoid receptor -associated hypertension: a subtype of resistant hypertension. A satellite symposium of the 24th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, Aldosterone & Salt: Heart and Kidney. 2012.10. Palm Cove, Australia.

H．知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

１．特許取得　　　特になし
２．実用新案登録　特になし
３．その他　　　　特になし

表1　特発性アルドステロン症(IHA)および非アルドステロン症(Non-PA)患者の臨床的特徴

	IHA (N=65)	Non-PA (N=81)	P
年齢（歳）	52 ± 1	52 ± 2	n.s.
身長（cm）	155.1 ± 5.2	143.2 ± 6.0	n.s.
体重（kg）	75.1 ± 7.8	58.6 ± 1.8	<0.05
BMI (kg/m2)	26.1 ± 0.5	20.5 ± 1.0	<0.001
腹囲（cm）	70.0 ± 5.9	47.2 ± 6.1	<0.05
収縮期血圧(mmHg)	131 ± 5	125 ± 3	n.s.
拡張期血圧(mmHg)	82 ± 2	76 ± 2	n.s.
血清Na (mEq/L)	139.9 ± 2.0	140.6 ± 0.3	n.s.
血清K (mEq/L)	4.0 ± 0.1	4.2 ± 0.1	<0.05
空腹時血糖 (mg/dL)	129.4 ± 8.4	108.6 ± 3.6	<0.05
HbA1c (JDS) (%)	5.8 ± 0.2	5.6 ± 0.1	n.s.
中性脂肪(mg/dL)	159.4 ± 15.4	161.2 ± 13.4	n.s.
HDL-コレステロール (mg/dL)	50.4 ± 1.7	54.6 ± 1.9	n.s.
LDL-コレステロール (mg/dL)	110.5 ± 4.0	114.2 ± 4.5	n.s.
アルドステロン (pg/mL)	226.4 ± 11.0	141.0 ± 10.0	<0.05
活性レニン濃度 (pg/mL)	5.2 ± 0.7	15.8 ± 3.8	<0.05
ACTH (pg/mL)	28.7 ± 1.3	22.7 ± 2.0	<0.05
コルチゾール (mcg/dL)	14.2 ± 1.3	13.8 ± 0.6	n.s.
24時間尿中アルドステロン(mcg/day)	12.2 ± 0.8	5.6 ± 1.1	<0.001

P値は2群間の対応のない検定

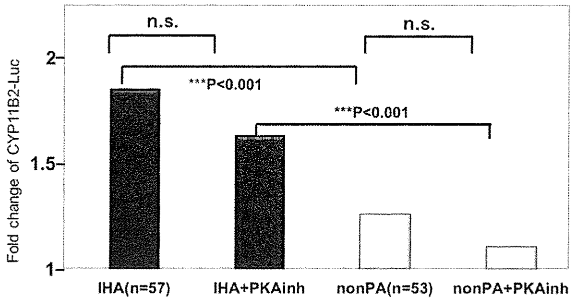


図1　IHA および NonPA 患者血清による CYP11B2-luciferase レポーター活性への影響

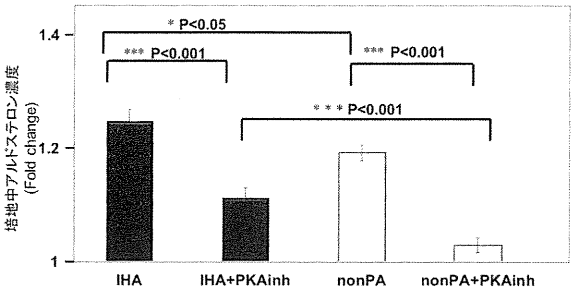


図2　IHA および NonPA 患者血清による培地中アルドステロン濃度への影響

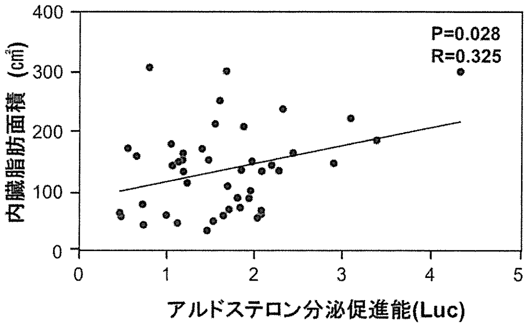


図3　IHA 患者血清による CYP11B2-luciferase 活性と内臓脂肪面積との相関

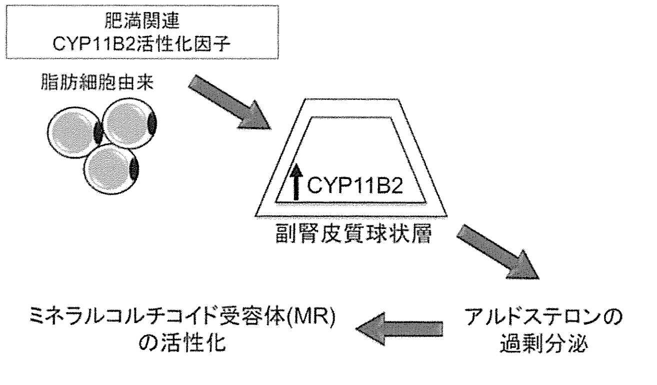


図4　特発性アルドステロン症(IHA)におけるアルドステロン過剰の分子機構の仮説：
内臓脂肪細胞由来 CYP11B2 活性化因子の関与