慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	原発性アルドステロン症患者における血中アルドステロン分泌促進因子の検討
Sub Title	Investigation of serum aldosterone inducing factors in patients with idiopathic hyperaldosteronism
Author	小林, 佐紀子(Kobayashi, Sakiko)
Publisher	
Publication year	2014
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2013.)
JaLC DOI	
Abstract	原発性アルドステロン症(PA)はアルドステロン産生腺腫(APA)と特発性アルドステロン症(IHA)の2つの病型に大別される。IHAの病因は不明である。我々は①尿中アルドステロン排泄量はIHA患者でBMI、腹囲、空腹時血糖、HOMA-Rと有意な正の相関を認めるがAPA, nonPA患者では相関を認めないこと、②IHA患者血清のアルドステロン分泌促進能(CYP11B2遺伝子転写活性)は患者の尿中アルドステロンおよび内臓脂肪面積と有意な正の相関があることを示した。このことからIHA患者の血清中の内臓脂肪由来CYP11B2活性化因子の存在および肥満改善によりIHAの病態が改善される可能性が示された。 Aldosterone-producing adenoma (APA) and bilateral idiopathic hyperaldosteronism (IHA) are the most common subtypes of primary aldosteronism. The etiology of IHA is still unknown and the radical treatment for IHA is not established.In our study, we have shown that 1) urinary aldosterone secretion positively correlated with body mass index, abdominal circumference, fasting blood glucose and HOMA-R only in patients with IHA, not in APA and non-PA patients and 2)the ability to promote aldosterone secretion by serum of IHA patients positively correlated with patients' aldosterone and visceral fat area. These results suggest that there are CYP11B2 activating factors derived from visceral fat in serum of IHA patients and there is a possibility that IHA is improved by amelioration of obesity.
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2012～2013 課題番号：24790953 研究分野：医歯薬学 科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_24790953seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２６ 年　 ５ 月 ２９ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2012～2013
課題番号：２４７９０９５３

研究課題名（和文）原発性アルドステロン症患者における血中アルドステロン分泌促進因子の検討

研究課題名（英文）Investigation of Serum Aldosterone Inducing Factors in Patients with Idiopathic Hyperaldosteronism

研究代表者
小林　佐紀子（Kobayashi, Sakiko）

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：８０３８３７２７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　3,300,000円、（間接経費）　990,000円

研究成果の概要（和文）：原発性アルドステロン症（PA）はアルドステロン産生腺腫(APA)と特発性アルドステロン症(IHA)の2つの病型に大別される。IHAの病因は不明である。我々は①尿中アルドステロン排泄量はIHA患者でBMI、腹囲、空腹時血糖、HOMA-Rと有意な正の相関を認めるがAPA, nonPA患者では相関を認めないこと、②IHA患者血清のアルドステロン分泌促進能（CYP11B2遺伝子転写活性）は患者の尿中アルドステロンおよび内臓脂肪面積と有意な正の相関があることを示した。このことからIHA患者の血清中の内臓脂肪由来CYP11B2活性化因子の存在および肥満改善によりIHAの病態が改善される可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：Aldosterone-producing adenoma (APA) and bilateral idiopathic hyperaldosteronism (IHA) are the most common subtypes of primary aldosteronism. The etiology of IHA is still unknown and the radical treatment for IHA is not established.In our study, we have shown that 1) urinary aldosterone secretion positively correlated with body mass index, abdominal circumference, fasting blood glucose and HOMA-R only in patients with IHA, not in APA and non-PA patients and 2)the ability to promote aldosterone secretion by serum of IHA patients positively correlated with patients' aldosterone and visceral fat area.These results suggest that there are CYP11B2 activating factors derived from visceral fat in serum of IHA patients and there is a possibility that IHA is improved by amelioration of obesity.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：原発性アルドステロン症　特発性アルドステロン症　高血圧症　肥満症　内臓脂肪

１．研究開始当初の背景

原発性アルドステロン症（PA）は、副腎からアルドステロンが自律的に過剰分泌され高血圧を来たす疾患であり、本態性高血圧症に比べて脳卒中や心筋梗塞などの心血管疾患の罹患率が 3～5 倍高く（Arch Intern Med, 2008）、適切な診断および早期の治療開始が必要である。近年の報告では高血圧症患者の5～10%を占めるとされ、本邦における推定患者数は 200 万以上に上る。PA は、アルドステロン産生腺腫(APA)と両側副腎過形成を呈する特発性アルドステロン症(IHA)の 2 つの病型に大別される。APA は、病因として腫瘍組織中の CYP11B2 過剰発現が示されており、副腎摘出術により治癒可能である。一方、IHA では、なぜ両側副腎過形成病変を呈するか、その病因は未解明であり、現時点で根治療法は知られていない。PA による心血管リスクを回避するためには、ミネラルコルチコイド受容体（MR）拮抗薬の生涯にわたる内服が必要とされる。

これまで、IHA の病因については諸家により、いくつかの考察がなされている。最近の報告で、PA、その中でも IHA では、APA と比べてメタボリックシンドロームの頻度(62% vs. 34%)と BMI(30±4 vs. 27±5)が有意に高値であることが示された(Somloova, J Hum Hypertens, 2010)。我々の診療科で経験した APA 症例(n=31)と IHA 症例(n=54)においても、尿中アルドステロン排泄量と糖代謝、脂質代謝の指標との相関を検討した結果、大変興味深いことに、IHA では尿中アルドステロン排泄量と BMI (r=0.44, P<0.005)および HOMA-IR (r=0.789, P<0.001)が有意な相関を認めたのに対し、APA では全く相関を認めなかった。すなわち、IHA では肥満やインスリン抵抗性の程度がアルドステロン分泌量と相関したことから、IHA の病因として内臓肥満との関連が強く示唆された。我々の臨床データにおける所見を裏付ける報告として、Ehrhart-Bornstein らは、脂肪細胞から放出される新たな「アルドステロン分泌促進因子」につき報告している（Proc Natl Acad Sci USA, 2003）。

そこで我々は、IHA では脂肪細胞から何らかの「アルドステロン分泌促進因子」が分泌されるために、両側副腎過形成病変が形成されるという作業仮説を立て、その関与を証明するために、IHA 患者の血清を用いたトランスレーショナルリサーチを計画した。

２．研究の目的

本研究の目的として、まず、患者血清を用いた細胞実験で、IHA の成因として患者血清中の液性因子が関与している可能性を検証する。続いて、患者血清によるアルドステロン分泌促進の程度と患者の臨床データの相関を解析し、病態の成因となる外的因子の探索を行う。当院症例における臨床的観察研究の結果から、すでに IHA と肥満の関連が強く示唆されており、外的因子としては、肥満関連パラメーターを中心に見ていく。IHA 発症に関わる外的因子が同定できた場合は、その外的因子による治療介入により、IHA の病態が改善するかを確認する。最終的には、IHA に対する根治療法の確立を目指す。

また、最近アルドステロン過剰分泌に関わる酵素として、CYP11B2 に加えて、その合成酵素の上流に位置する HSD3B1 の重要性が報告された（Doi, Nat Med, 2010）。時計遺伝子 Cry のノックアウトマウスでは、睡眠-覚醒リズムの障害をきたすと同時に、高アルドステロン、低レニン血症を示し、両側性 PA すなわち IHA 様の病態を呈することが示された。このマウスの副腎皮質球状層細胞では、Cyp11b2 と Hsd3b6（ヒト HSD3B1 ホモログ）の共局在を認めており、Cry 遺伝子の機能喪失による睡眠リズムの障害と副腎球状層細胞における HSD3B1 の過剰発現が IHA の病因に重要である可能性が示唆された。本研究では、この新規に機能解明された酵素の発現も検討し、睡眠障害という新たな局面から IHA 病態の分析も行う。

３．研究の方法

(1) IHA の臨床的検討: 予備検討をさらに症例数を増やして解析した。PA 121 名(APA(n=36)、IHA(n=85))および non-PA 症例(n=57)に分けて、尿中アルドステロン排泄量と肥満・糖脂質代謝の指標との相関を解析した。

(2) 患者血清を用いた検討: IHA 患者血清と non-PA 患者血清中のアルドステロン分泌促進能を下記の３つの手法により検討した。

① ヒト副腎皮質由来 H295R 細胞に CYP11B2 遺伝子プロモーターを有するルシフェラーゼレポータープラスミドを導入し、ルシフェラーゼアッセイによる CYP11B2 遺伝子転写活性の測定を行った。

② ELISA 法により、H295R 細胞培養上清中のアルドステロン濃度を測定し、内因性アルドステロン分泌の変化を測定した。

③ アルドステロン分泌の変化が、どの合成酵素の変化に由来しているか評価するため、定量的 real-time RT-PCR 法により、CYP11B2 や HSD3B1 などアルドステロン合成に関わる酵素の内因性 mRNA 発現の測定を行った。

(3) アルドステロン分泌促進能と肥満度の相関: 基礎実験（*in vitro*）で認められた IHA 患者血清中のアルドステロン分泌促進能と尿中アルドステロン値など PA 病態に関わるパラメーター、および内臓脂肪面積など肥満に関わるパラメーターとの相関を検討した。内臓脂肪面積および皮下脂肪面積の測定は、CT 上で臍

高位の面で行った。

４．研究成果

(1) 尿中アルドステロン排泄量はIHA患者においてのみ BMI、腹囲、空腹時血糖、HOMA-R と有意な正相関を認めた。一方、APA 患者、non-PA 患者では、両者に有意な相関関係は認められなかった。以上より、IHA が肥満との関連が強いことが、再確認された。

(2) ルシフェラーゼアッセイによる検討において、IHA 血清では、コントロール血清と比較して、有意に CYP11B2 遺伝子転写活性を上昇させた。IHA 患者血清による CYP11B2 上昇は、アンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬で阻害されず、IHA 患者血清中に含まれるアルドステロン分泌促進因子が、アンギオテンシンⅡなどの既知の因子ではないことが確認された。また患者血清中に含まれる cAMP の影響を除外するため、PKA 阻害薬の投与を行ったが、PKA 阻害薬添加下でも、コントロール血清と比べて、IHA 血清では有意に CYP11B2 活性を上昇させた。さらに、ELISA を用いた内因性アルドステロン分泌の評価でも、IHA 患者血清では、有意なアルドステロン分泌促進能の上昇が認められた。アルドステロン合成に関わる複数の酵素の mRNA 発現を検討したが、有意な上昇を認めたのは CYP11B2 のみであった。このことから、本病態においては、HSD3B1 酵素の関与は少ないと考えられた。

(3) 上記 *in vitro* アッセイの結果として得られた患者血清によるアルドステロン分泌促進能（CYP11B2 遺伝子転写活性）は、尿中アルドステロン分泌と有意な正の相関があり、*in vitro* の評価系が、PA の病態を反映していることが確認された。さらに、IHA 患者血清によるアルドステロン分泌促進能と肥満関連パラメーターとの相関を検討したところ、内臓脂肪面積と有意な正の相関を認めた。一方、皮下脂肪面積とは有意な正の相関を認めなかった。さらに、興味深いことに、コントロール血清においては、アルドステロン分泌促進能と内臓脂肪面積に全く相関を認めず、このことから、IHA では内臓脂肪の量的変化だけではなく、質的変化もアルドステロン分泌への病態形成に関与していることが示唆された。

以上の結果から、IHA では血清中に内臓脂肪由来 CYP11B2 活性化因子があることが推測され、肥満改善により IHA の病態が改善される可能性が考えられた。PA の 2 大病型の１つである IHA は、手術治療による根治療法の適応とならず、現在では、MR 拮抗薬を中心とした永続的薬物治療が必要である。本研究の成果により、内臓脂肪を標的とした IHA に対する新規治療の有用性が示唆され、IHA の根治療法の確立に向けて、一つの起点が得られたと考えている。

IHA においては、内臓脂肪の量的変化のみならず、何らかの質的変化も生じていると思われ、脂肪細胞の質的変化を対象とした治療の有用性についても、可能性が見出されたと考えている。糖尿病治療薬の１つであるチアゾリジン誘導体（ピオグリタゾンなど）は、内臓脂肪を減少させる薬剤として知られており、ピオグリタゾンの投与により IHA の病態が改善するか否かを現在検討中である。また近年肥満症治療薬として使用可能になったリパーゼ阻害薬（セチリスタット）も、内臓脂肪を減少させるのに有効であるが、アディポネクチン分泌に対しては、チアゾリジン誘導体投与の場合と動態が異なることが知られており、その点から内臓脂肪の質的変化に対しては異なる作用を有すると考えられる。両薬剤の比較により、IHA 治療に関してさらなる有益な情報が得られると考えられ、引き続き IHA 根治療法の確立に向けた検討を続けて行く予定である。

５．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 3 件）

(1) 大山貴子、栗原　勲、<u>小林佐紀子</u>、横田健一、三石木綿子、城　理絵、中村俊文、宮下和季、柴田洋孝、伊藤　裕「特発性アルドステロン症の病態における患者血清因子と内臓脂肪の役割」平成 25 年度東京高血圧研究会、2013 年 9 月 28 日（東京）

(2) 大山貴子、柴田洋孝、栗原　勲、<u>小林佐紀子</u>、横田健一、武田彩乃、三石木綿子、林　毅、城　理絵、中村俊文、伊藤　裕「特発性アルドステロン症の病態における患者血清因子の役割」第 2 回臨床高血圧フォーラム、2013 年 5 月 25 日（東京）

(3) 大山貴子、柴田洋孝、栗原　勲、<u>小林佐紀子</u>、横田健一、武田彩乃、三石木綿子、林　毅、城　理絵、中村俊文、伊藤　裕「肥満を伴う両側性原発性アルドステロン症の病態における患者血清因子の役割」第 86 回日本内分泌学会学術総会、2013 年 4 月 25 日（仙台）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計０件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

６．研究組織
(1)研究代表者
小林　佐紀子　（Kobayashi Sakiko）
慶應義塾大学・医学部・共同研究員
研究者番号：80383727