

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460668

研究課題名(和文) 原発性アルドステロン症鑑別における新たなバイオマーカーの可能性

研究課題名(英文) Possibility of a new biomarker in the diagnosis of primary aldosteronism

研究代表者

神 繁樹 (JIN, SHIGEKI)

北海道大学・保健科学研究院・助教

研究者番号：60531845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：原発性アルドステロン症は高血圧症の原因の約10%とされ、治療法の異なるサブタイプの鑑別は重要である。本研究で我々はアルドステロン産生腺腫(APA)において他のサブタイプと比較して尿中に多く検出される物質を新たに見出し、新規バイオマーカーとしての可能性について検討した。物質の単離・構造決定までには至らなかったものの、高血圧患者検体の分析の結果、本態性高血圧や両側過形成を原因とする特発性アルドステロン症(IHA)に対して1.5～2倍の量が検出された。

研究成果の概要(英文)：Primary aldosteronism is considered as approximately 10% of the causes of hypertension, so the diagnosis of its subtype is crucially important issue because cures are required on different kind of subtype. In this study, we found the substance which was detected more amount in the aldosterone-producing adenoma (APA) patient urine than that in the other subtypes of primary aldosteronism. We investigated the possibility of employing this substance as a new biomarker. The substance was detected as 1.5-2.0 fold amount in APA against essential hypertension and idiopathic hyperaldosteronism (IHA). However, its isolation and the structural analysis had not been executed until now.

研究分野：病態検査学

キーワード：臨床検査医学

1. 研究開始当初の背景

原発性アルドステロン症 (PA) は高血圧症全体の 2.6~14.4% を占め、内分泌性高血圧の最も重要な原因である。PA は副腎の腫瘍や過形成によるアルドステロンの過剰産生により引き起こされ、数種のサブタイプがある。その中で主にアルドステロン産生腺種 (APA) と両側過形成を原因とする特発性アルドステロン症 (IHA) がそれぞれ PA の 70~80%、10~20% と大部分を占める。それらの治療法は異なっており、APA は手術で根治できるが IHA は薬物療法を行なうため、両者の鑑別診断は臨床的に非常に重要である。

現在用いられている原発性アルドステロンの鑑別診断法は、血漿アルドステロン濃度 (PAC) と血漿レニン活性 (PRA) の測定から始まり、数種の負荷試験、CT や MRI などの高価な検査を行っている。場合によってはカテーテル挿入による副腎静脈採血など非常に侵襲的な手技も行われる。これは時間が掛かる上に、患者にとってかなりの負担となる。そこでより簡便で安定したスクリーニング法や確定診断法が望まれている。

そのような状況の中、近年 APA の患者においてハイブリッドステロイドと呼ばれる 18-ヒドロキシコルチゾール (18-OHF) や 18-オキソコルチゾール (18-oxoF) の尿中および血中濃度が高いことが報告され、その測定は有用であることが示された (Corrie JET, et al. Clin Chem 31: 849-52, 1985; Hamlet SM, et al. Clin Exp Pharmacol Physiol 15: 317-22, 1988; Ulick S, et al. J Clin Endocrinol Metab 76: 873-78, 1993)。

このハイブリッドステロイドは鑑別マーカーとして注目されるのには、その産生機序に理由がある。通常副腎皮質で合成されるステロイドホルモンは部位によって異なっており、最も外側に位置する球状帯ではステロイドの 18 番炭素が酸素化された鉱質コルチコイドが産生される。中央の束状帯では 17 番炭素が酸素化された糖質コルチコイド、さらに深部の網状帯ではアンドロゲン類が産生する。それは各部位で作用する合成酵素によるものであるが、APA では副腎皮質に腫瘍が発生することにより球状帯と束状帯の組織が混ざり、結果としてステロイドの 17 番と 18 番炭素の両方が酸素化されたハイブリッドステロイドが多量に合成されるのである。

我々の研究グループはこれまでに 18-OHF のモノクローナル抗体を開発し、酵素免疫測定法 (Kohn H, et al. Clin Biochem 27:277-282, 1994) に応用して尿中 18-OHF を定量してきた。また近年目覚しく発展してきた高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) を用いた測定法も開発し、尿のみならず血中の定量を行い、18-OHF の有用性について研究を行ってきた。いずれの測定法を用いても APA と IHA に有意差が認められ、鑑別診断に有用であることが示された。しかし

ながら大きくオーバーラップが観察され、スクリーニング (カットオフ) 基準値を明確に決定することは難しく、さらに検討を進めている。

これらの研究の中で、酵素免疫測定における交差反応物質中に新たにマーカーとなり得る物質の存在を見出した。その物質については今のところ質量分析を用いた解析でステロイドであることが推測されているが、その詳細な構造は不明である。また量的関係は簡易測定によって得られた基準物質との相対値でしか議論できず、さらなる研究が必要であった。

2. 研究の目的

本研究では原発性アルドステロン症の鑑別診断における新たなバイオマーカーとなりうる可能性を秘めた物質を単離し、各種スペクトル測定や化学合成を用いてその化学構造を明らかにする。また、物質の測定法を開発して実際に多くの患者検体について測定を行い、有用性の評価・検証する。

3. 研究の方法

【当初計画】

本研究は以下の点について順序立てて (場合によっては平行して) 進めることとした。

(1) 新規バイオマーカー物質の探索

当該物質は元々、開発した 18-OHF モノクローナル抗体を用いた酵素免疫測定 (ELISA) の交差物質として確認されたものである。ゆえに物質探索はこの ELISA の反応性を指標に物質の探索を進める。

(2) 物質の単離

物質は APA 患者の尿に多く含まれていることが分かっており、研究協力者である市立札幌病院の医師に依頼して収集・提供してもらう。上記の探索方法をもとに提供された多量の尿検体を各種クロマトグラフィーで物質の分離・精製を進める。

(3) 物質の構造決定

物質の単離後は核磁気共鳴 (NMR) や紫外線吸収 (UV) スペクトル、赤外線吸収 (IR) スペクトル等の測定で構造解析を行い、高分解能質量分析 (HR-MS) 等で分子量および分子式を決定し、化学構造を明らかにする。構造推定後は当該物質を化学合成する。この合成は構造確認のためだけでなく、これに続く定量法の開発時に必要な標準物質の確保も兼ねる。

(4) 物質の測定法の開発

物質の測定法は LC-MS を用いて開発する。LC-MS における検出は高感度・高選択 (特異) 的検出法である選択反応検出法 (SRM) を採用する。各種バリデーションのほか、検体の前処理についても検討し、簡便で正確な測定法の開発を目指す。

(5) 当該物質について患者におけるデータ採取 (定量)

市立札幌病院の患者 (APA, IHA) の検体 (尿、血液) について物質の測定をする。これまでの実績から考えると、年間で APA と HA それぞれ 10~15 症例程度を予定。

(6) データの解析と評価、およびこれまでのバイオマーカーとの比較・検討

得られた測定データは有意差検定などの統計処理を行い原発性アルドステロン症鑑別に対する有用性の評価を行う。また、当該物質の測定において同時にこれまで研究してきた 18-OHF も同時に測定できるため、それらのデータとの比較も行う。

4. 研究成果

(1) 新規バイオマーカー物質の探索・単離・構造解析

市立札幌病院の高血圧症患者の 24 時間蓄尿検体 (17 名分、計 31.6L) 用いて物質の探索と単離・精製を同時に行った。精製の第 1 段階では逆相担体を用いた固相抽出を行い、固相吸着物の溶出条件を段階的に変えることにより大まかな精製を行うことができた。この段階で得られたターゲット物質を含む抽出物重量は 12.4g であった。次に抽出物をオープンカラムクロマトグラフィー、続いて高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で精製を進めた。物質の探索には当初酵素免疫測定 (ELISA) を指標として用いていたが、結果が出るまでに操作の煩雑さと時間が掛かり過ぎるため検出法を再検討し、質量分析を用いることにした。しかしながら予想外に単離困難な夾雑物の影響が強く現状では物質の単離には至っていない。

ターゲット物質の検出法の検討の際には質量分析の詳細なデータ解析を行い、その化学構造が推測できた。質量分析のタンデム測定 (MS/MS) よりステロイドに特徴的なシグナルパターンが示され、特に我々が扱ってきた 18-OHF に類似した構造であることが示唆された。まずメインのイオンシグナルが 18-OHF より 2 大きく検出され、そのシグナルの衝突誘起解離 (CID) 反応で得られたプロダクトイオンのシグナルも 2 大きく観測された。ステロイドの開裂パターンから 18-OHF の A 環の一部が水素還元された物質が予想された。可能性のある 2 種の物質の合成を行い、ターゲット物質との比較を行った。結果として 2 種ともターゲット物質に対して質量分析のシグナルパターンはほぼ一致したものの、高速液体クロマトグラフィーでの挙動が異なっており同定には至らなかった。

(2) 物質の測定と評価

ターゲット物質の構造は明らかにならなかったもののこれまでに得られた質量分析情報からターゲット物質の定量分析法を検討した。LC-MS 測定において、SRM 条件としてメインシグナル m/z 381 を選択して衝突誘起解離反応で得られたプロダ

クトイオン m/z 269 を検出する条件を用いて測定法を開発した。定量には内部標準に 18-OHF 測定と同じ 6-メチルプレドニゾロンを用いた内部標準法を採用した。その他の分析条件は以下である (発表論文参照)。

【LC-MS/MS 測定条件】

装置 : TSQ Quantum Access ,
Accela <サーモインテック>
HPLC カラム : Hypersil GOLD
(5 μ m, 50 mm \times 2.1 mmID)
<サーモインテック>
移動相 : (A) 0.05% ギ酸水溶液
(B) アセトニトリル
0 5 分 A/B=15/85 65/35
5 10 分 A/B=65/35
流速 : 0.2 mL/min
カラム温度 : 35
イオン化法 : ESI (正イオン)
イオン化電圧 : 3.0 kV
スプレーガス : 窒素 (50 psi)
衝突ガス : アルゴン (1.5 mmTorr)
CID 条件 : 19 V
SRM 検出 : m/z 381 269
(IS, m/z 375 358)

以上の測定条件を用いて患者の尿検体 (早朝第一尿) を測定した。対象は本態性高血圧群 (3 例) 両側過形成を原因とする特発性アルドステロン症群 (IHA, 4 例) アルドステロン産生腺腫群 (APA, 4 例) であった。定量値はターゲット物質が単離されていないため絶対量が決められないことから任意の健常者 (1 例) の値を 1 として計算し、検体のクレアチニン値で補正した。

結果は症例数が少ないものの APA 群が他の群に対して高値傾向にあることが示された (図 1)。症例数の少なさや物質の構造が明らかになっていないなどの課題は多いものの、この時点では当該物質が APA に対する新規マーカーである可能性は大いにあるも考える。今後これらの課題をクリアし更なる検討が必要である。

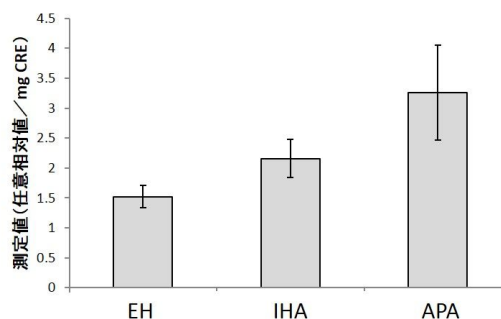


図 1. 各症例群のターゲット物質測定結果

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1件)

- 1) Jin S, Wada N, Takahashi Y, Hui S-P, Sakurai T, Fuda H, Takeda S, Fujikawa M, Yanagisawa K, Ikegawa S, Kurosawa T, Chiba H: Quantification of urinary 18-hydroxycortisol using LC-MS/MS. Ann Clin Biochem 50:450-456, 2013. (査読有)

〔学会発表〕(計2件)

- 1) Wada N, Jin S, Hui S-P, Kurosawa T, Chiba H: Serum and urine 18-hydroxycortisol measured by LC-MS/MS in the diagnosis of primary aldosteronism and its subtypes. International Symposium of Aldosterone and Related Substances in Hypertension 2013 (ISARSH2013), Sendai International Center, Miyagi, Sendai, 2013.4.
- 2) 和田典男, 神 繁樹, 惠 淑萍, 柳澤克之, 黒澤隆夫, 千葉 仁: シンポジウム2「ハイブリッドステロイド質量分析による原発性アルドステロン症の鑑別診断」. 第60回日本臨床検査医学会学術集会, 神戸国際会議場, 兵庫県, 神戸市, 2013.10.

〔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〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

神 繁樹 (JIN, Shigeki)

北海道大学・大学院保健科学研究院・助教
研究者番号: 60531845

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

千葉仁志 (CHIBA, Hitoshi)

北海道大学・大学院保健科学研究院・教授
研究者番号: 70197622

惠 淑萍 (HUI, Shu-Ping)

北海道大学・大学院保健科学研究院・教授
研究者番号: 90337030

(4)研究協力者

和田典男 (WADA, Norio)

市立札幌病院・内分泌内科・医師