

令和元年6月7日現在

機関番号：13301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06711

研究課題名(和文) 原発性アルドステロン症の罹病率と遺伝子学的背景及びステロイドプロファイルの検討

研究課題名(英文) The Prevalence, Genetic background and the Steroid profile of the primary aldosteronism

研究代表者

唐島 成宙 (Shigehiro, Karashima)

金沢大学・附属病院・医員

研究者番号：30801584

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：2013-2017年度までの健診事業においては、原発性アルドステロン症(PA)のスクリーニング陽性の受診者が68名存在し、21名が二次健診を受診し5名がPAと診断された。性別と年齢によりARRの分布が異なり、閉経後の女性においてARRが高値になることを示した。今後、卵巣機能、血清エストロゲンとPAの発症やARRへの影響に注目し解析を行う方針である。質量分析計を用いて、網羅的ステロイドホルモンの高感度測定法を確立とした。誘導体化試薬のジラル試薬でステロイドのカルボニル基を誘導体化し検出感度を増加させ、10pg/mL以下の低濃度測定も可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、一般住民に少なくとも2.6%のPA患者が存在することを報告した。PAの発症には、KCNJ5遺伝子などの遺伝子異常が報告されているが、その要因として環境因子の影響が疑われている。本研究で閉経以後の50歳以降の女性においてARRが高値になることを示した。これは、PA発症に女性ホルモン分泌低下が関与している可能性を示唆する。今回、質量分析計による女性ホルモンを含めた網羅的ステロイドホルモンの高感度測定法が確立した。網羅的ステロイド測定を経年的に行うことにより、エストロゲンとアルドステロン分泌の関係を明らかにし、ステロイドをターゲットにしたPAの発症予防や創薬へ応用することが目標である。

研究成果の概要(英文)：1. 68 subjects had an ARR >200. In 21 subjects who underwent captopril suppression test, PA was documented in 5 subjects in Shika Study. 2. Females subjects demonstrated significant differences in ARR between subjects with age <50 (172 ± 105) and those with age 51-60 (388 ± 531), although there were no differences in male subjects. In future, we plan to analyze an ovarian function, serum estrogen levels and influence on ARR and onset of PA. 3. We established comprehensive and high sensitive assay of the steroidal hormone the with mass spectrometer. The carbonyl group of the steroid derivatized with the Girard reagent increased detectivity of steroids, and the low-concentrated measurement less than 10pg/mL was enabled.

研究分野：内分泌学

キーワード：アルドステロン レニン エストロゲン 質量分析

1. 研究開始当初の背景

PA は約 20 年前までは、低カリウム血症を伴う高血圧で、全高血圧患者の約 1%前後と考えられていた。しかし、近年では高血圧症全体の約 5~10%と報告されており、本邦でも Omura らが、一般外来において約 6%の患者が PA を有していることを報告している (*Hypertens Res* 2004;27:193-202)。しかし国内外を含めて、一般住民における PA の有病率・罹患率に関する疫学的研究は存在しなかった。申請者らは、金沢大学医薬保健研究域医学系環境生態医学・公衆衛生学教室と志賀町が中心に行っている「生活習慣病における革新予防医学研究」において、アルドステロン/レニン比 (ARR) を用いて、PA 患者のスクリーニングを行っている。一般住民における PA の有病率の調査を行っている。一方、PA の原因は後天的な副腎細胞における遺伝子異常が報告され、その変異誘導には、何らかの後天的な環境因子が原因であることが推測されている。

2. 研究の目的

今回の研究では、PA に関する 4 つの研究によって構成され、それぞれの目的を下記に記す。

(1) PA の一般住民における罹患率

申請者研究グループが以前に行った基礎的研究 (*Hypertension* 36, 495-500, 2000) やその研究を基に行われた臨床研究 (*N Engl J Med.* 351, 33-41, 2004.) では血漿アルドステロン濃度 (PAC) が高値の症例は将来的に高血圧の発症が多いことは既に報告されている。しかし、そのような症例が PA に移行していくのかは明らかにされていない。我々が継続している健診事業は、2013 年度から毎年継続的に行われるため、すでに ARR が高値でスクリーニング陽性である症例の自然経過を追跡することが可能である。

上記の研究をさらに推し進めることで、以下の研究も可能となる。

(2) PA の発症要因に関する解析

本邦における PA の患者数は約 200 万人と推定されているが、PA 発症の成因は十分に明らかにされていない。近年、PA の発症に *KCNJ5* 遺伝子などの体細胞遺伝子異常が関与し、特に本邦においてその頻度が高いと報告されているが、その遺伝子変異を誘導する要因は不明のままである。しかし、本邦にこれらの体細胞遺伝子異常を伴う PA が多いことから、何らかの環境因子の可能性を指摘している。本研究の基にある「生活習慣病における革新予防医学研究」では、公衆衛生学的な観点から受診者個々の詳細な栄養調査や生活実態調査、および生活習慣病に関連した遺伝子に関する次世代シーケンサー (NGS) を用いた解析も行う。この事業により得られた結果を共有することで、PA 発症に関与する環境要因を明らかにし、その成因に迫れる可能性が高い。

(3) ゲノム・エピゲノム情報から見た PA 発症要因の解析

健診事業では、同意を得た住民から DNA を抽出し、NGS を用いて全ゲノム情報を抽出することで、上記の調査項目とゲノムバンクを絡めたビッグデータを得ることが可能である。このデータを利用して、PA 発症の要因を金沢大学医薬保健研究域医学系環境生態医学・公衆衛生学教室と協力し解析する。

(4) PA 診断や生活習慣病発症予測因子としての 18-オキシコルチゾール (18-oxoF)、18-ヒドロキシコルチゾール (18-OHF) などの新規ステロイドバイオマーカーの有用性

国内外の PA ガイドラインでは、ARR を用い PA のスクリーニング法を行うが、近年、18-oxoF、18-OHF などの新規ステロイドホルモンの PA の診断時の有用性が報告されている (*Hypertension.* 65:1096-102, 2015., *Clin Chem* 62, 514-24, 2016)。アルドステロン (Aldo) は、コルチコステロン (B) を基質にアルドステロン合成酵素 (CYP11B2) の作用を受け合成されるが、18-oxoF も、生体内でコルチゾール (F) を基質として CYP11B2 によって、18-OHF を経て 18-oxoF に変換される。「ドイツ Conn レジストリー」では、PA ではメタボリックシンドロームは 56.8%に見られ、

対象の 44.8% に比べ有意に高値であったこと (*Eur J Endocrinol* 175, 665-675, 2015.)、F や Aldo 過剰状態が生活習慣病や心血管イベントの発症に、関与していること (*J Clin Endocrinol Metab.* 96, 1478-1485, 2011, *Clin Endocrinol.* 81, 775-83, 2014.) から、その合成に F と CYP11B2 の作用を受ける 18-oxoF や 18-OHF などのホルモンは、生活習慣病発症の予測因子として強い関連を示し、生活習慣病発症の新たなバイオマーカーとなる可能性がある。

3 . 研究の方法

申請者らは、2011 年 3 月 12 日に締結された「志賀町地域健康づくり推進協定」に基づき、「生活習慣病における革新予防医科学研究」において、PA 患者のスクリーニングを行っている。この研究では、2013 年度から志賀町内モデル地区（堀松地区、東増穂地区）の 40 歳以上の全住民を対象に、質問票による聞き取り調査・問診・身体計測・尿検査・血液検査・PAC や PRA を含んだ研究用採血（一次検診）を行い、これらに含まれる項目と動脈硬化性疾患、糖尿病等の生活習慣病との関連を調査している。

本研究はこの健診事業を土台として実施する。

(1) PA の一般住民における罹患率の調査

研究対象者：「生活習慣病における革新予防医科学研究」の受診者

研究方法：健診事業の継続により、多くの住民の血圧、PAC、PRA などの推移を経年的に評価している。縦断研究を行うことで、PA の罹患率を明らかにし、さらに、ARR にてスクリーニング陽性の人、新たに ARR が高値になった受診者の血圧やその他の動脈硬化性疾患、糖尿病等の生活習慣病に関連した検査項目がどのように推移するのか観察する。

(2) PA 発症の要因に関する環境因子の検討

研究対象者：「生活習慣病における革新予防医科学研究」の受診者

研究方法：本研究の土台にある「生活習慣病における革新予防医科学研究」では、一般の健診項目のみならず、数百種の栄養素、微量元素、塩分摂取量、膠原病マーカー、生活習慣などを調査しており、それらの因子との PA の頻度、PAC、PRA などの関連を統計学的に評価する

(3) ゲノムバンクから見た PA の発症要因の解析

研究対象者：「生活習慣病における革新予防医科学研究」の受診者でゲノム抽出の同意を得た受診者

研究方法：健診事業の対象者の中で許可を得た受診者の血液検体から DNA を抽出し、ゲノムバンクを作成する。生活習慣病の発症に関与している可能性が高い遺伝子に関して、NGS で解析を予定している。本研究では、これらの遺伝子異常と PA の発症に関して関連の有無の検討を行う。さらに、血液検体（単球）と PA と診断され副腎摘出術まで至った症例の副腎と関連臓器に関して、DNA メチル化状態に関してパイロシーケンサーを用いて解析する。ターゲット遺伝子としては、アルドステロンへの影響が明らかとなっている、CYP11B2、11 β -HSD1、11 β -HSD2、ENaC などを中心に解析する。

(4) 一般住民における PA 診断や生活習慣病発症予測因子としての 18-oxoF、18-OHF などの新規ステロイドバイオマーカーの有用性

健診事業ではすべての受診者の血清検体は保存しており、PA の確定診断者、本態性高血圧患者、非高血圧患者の検体を用いて、これらのステロイドホルモンの PA、生活習慣病のバイオマーカーとしての意義を検討する。

研究対象者：「生活習慣病における革新予防医科学研究」の受診者

研究方法：ステロイドホルモンの網羅的な測定には、LC-MS/MS を用いる。測定を行うステロイドは、古典的なステロイドの他、生体内で CYP11B1、CYP11B2 によって合成される 18-oxoF、18-OHF など追加する。

4. 研究成果

(1) PA の一般住民における罹患率の調査

PA の有病率は、高血圧症全体の約 5～10%と報告されていたが、一般住民における PA の有病率・罹患率に関する疫学的研究は存在しなかった。申請者らは、金沢大学医薬保健研究域医学系環境生態医学・公衆衛生学教室と志賀町が中心に行っている志賀町研究において、2013～2015 年のアルドステロン (PAC) /レニン (PRA) 比 (ARR) を用いて、一般住民に少なくとも 2.6%の PA 患者が存在することを報告した (*Clin Exp Hypertens* 2018;40:118-125)。2013-2017 年度までの健診事業においては、原発性アルドステロン症 (PA) のスクリーニング陽性の受診者が 68 名存在し、21 名が二次健診を受診し 5 名が PA と診断された。また、臨床的に高血圧を認めない健康な対象においても、アルドステロン過剰産生を示す症例 (Subclinical Primary Aldosteronism) が存在し、1 年の経過で高血圧が顕在化する対象が存在することが明らかとなった。

罹患率に関しては、今後も事業を継続し縦断的な検討を行うとともに、二次健診への受診を勧めるために健診事業実施地区での健康フェアや町民公開講座などを開催し、啓蒙活動を進めていく。

(2) PA 発症の要因に関する環境因子の検討

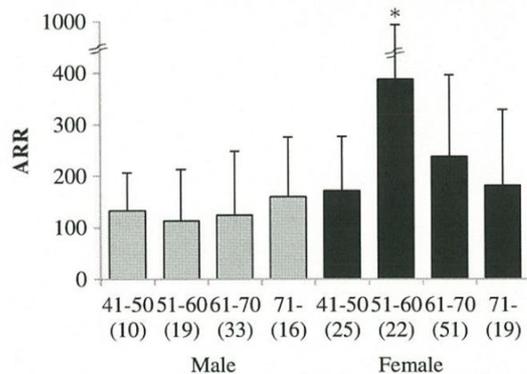


図 1. 年齢・性別による ARR の差異

2013～2015 年度分のデータを用いて高血圧、PA の発症との関連について統計学的に評価する。特に前回の検討で、アルドステロン過剰の指標でも ARR が閉経後の一般女性で有意に高値になることから、女性ホルモン機能、ホルモン補充療法の有無や年齢といった因子と PA の発症や ARR への影響に注目し解析を行う方針である(図 1: *Clin Exp Hypertens* 2018;40:118-125 より)。

(3) ゲノムバンクから見た PA の発症要因の解析

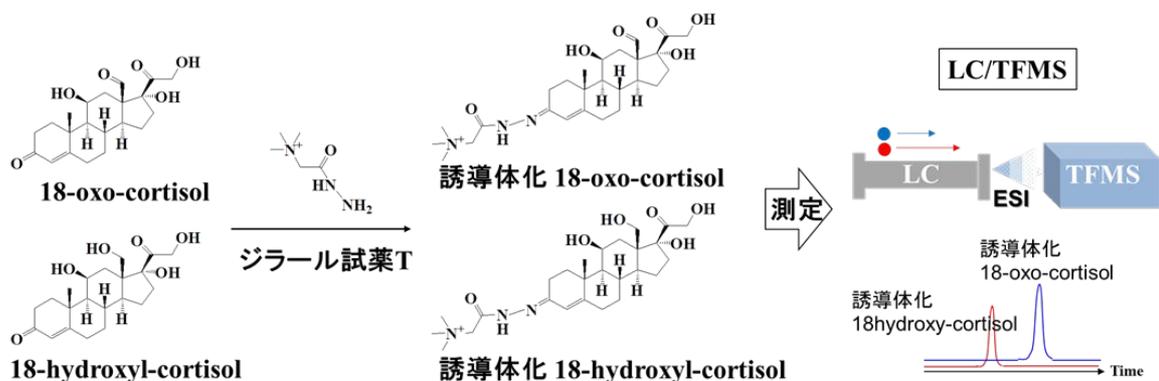
金沢大学革新ゲノム情報学分野と協力し、健診事業の対象者の血液検体から DNA を抽出し、ゲノムバンクを作成した。生活習慣病の発症に関与している可能性が高い遺伝子に対して NGS で解析を行っている。本研究では、これらの遺伝子と PA の発症についての網羅的な検討まで至らなかった。今後、アルドステロンへの影響が明らかとなっている、CYP11B2、11 β -HSD1、11 β -HSD2、ENaC だけでなく、食塩感受性遺伝子や今回アルドステロンとの関連が疑われた性腺ステロイド遺伝子などを追加し解析する。

(4) 一般住民における PA 診断や生活習慣病発症予測因子としての 18-oxoF、18-OHF などの新規ステロイドバイオマーカーの有用性

富山県立大学工学部との共同研究によって、高感度液体クロマトグラフィー (LC) とフーリエ変換型質量分析計 (FTMS) を組み合わせた LC-FTMS を用いて、10 μ L の血清検体から網羅的ステロイドホルモンの高感度分析、測定を確立とした。誘導体化試薬のジラルール試薬でステ

ロイドのカルボニル基を誘導体化し検出感度を増加させ、10pg/mL 以下の検出限界の低濃度測定も可能となった（図 2）。今後、対象血清検体を利用して測定を行う。

図 2. 18OHF と 18oxoF の測定原理（誘導体化と LC/TFMS）



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Prevalence of primary aldosteronism without hypertension in the general population: Results in Shika study. Karashima S, Kometani M, Tsujiguchi H, Asakura H, Nakano S, Usukura M, Mori S, Ohe M, Sawamura T, Okuda R, Hara A, Takamura T, Yamagishi M, Nakamura H, Takeda Y, Yoneda T. *Clinical and experimental hypertension (New York, N.Y. : 1993)* 40(2) 118-125 2018 年. doi: 10.1080/10641963.2017.1339072. (査読あり)

ステロイドの測定 (特集 副腎疾患の基礎と臨床 : 最前線を知る) -- (臨床). 唐島 成宙, 米田 隆, 武田 仁勇. *臨床泌尿器科 = Japanese journal of clinical urology* 72(6) 452-457 2018 年 5 月 (査読なし)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名 : なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：米田隆

ローマ字氏名：Yoneda Takashi

研究協力者氏名：武田仁勇

ローマ字氏名：Takeda Yoshiyu

研究協力者氏名：米谷充弘

ローマ字氏名：Kometani Mitsuhiro

研究協力者氏名：大坂一生

ローマ字氏名：Osaka Issey

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。