

令和 2 年 5 月 24 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09877

研究課題名(和文)自己免疫性原発性アルドステロン症の確立と自己抗体測定法の開発

研究課題名(英文) Establishment of autoimmune primary aldosteronism and development of autoantibody assay

研究代表者

出村 昌史 (DEMURA, MASASHI)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：00507080

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：原発性アルドステロン症は、国内患者数は200万-400万人(全人口の1-2%、高血圧患者の10-20%)と推定されるほど、非常に患者数の多い疾患である。60-80%のPAが両側性過剰分泌であると判明しているが、両側性過剰分泌の原因には不明な点が多く、その原因が特定できる患者はほとんどいない。原因として自己抗体による機序を考え、両側性PAの血清中にアルドステロン刺激性IgGを有する症例を見出した。さらに、それらIgGが認識するタンパク質(自己抗原候補)を15種類同定した。今後、さらなるデータ補強を行うことにより自己免疫性原発性アルドステロン症という新規病態、抗体測定法の確立が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

両側性原発性アルドステロン症の原因として、自己抗体によるアルドステロン分泌過剰症の存在が示唆される。これまで原因不明とされてきた多くの両側性原発性アルドステロン症の病態解明つなげる成果と考えられる。社会的意義としては、不要な検査の回避：PA診断に必要な機能確認検査(薬剤などの負荷)や副腎静脈サンプリングを回避できる。正確な診断できる。簡便・簡単・低侵襲：末梢静脈採血のみで診断できる。すべての施設で実施可能：AVS実施可能施設は極めて限定されるのに対し、採血はすべての医療機関で実施可能である。安価：抗体検査は、機能確認検査や副腎静脈サンプリングより安価である。

研究成果の概要(英文)：Primary aldosteronism (PA) is a common disease, with an estimated 2-4 million domestic patients (1-2% of the total population, 10-20% of hypertensive patients). Although 60-80% of PA patients have been found to be bilateral hypersecretion, there are many unclear causes of bilateral hypersecretion, and few patients can identify the cause. Considering the mechanism of autoantibody as a cause, we found a case with aldosterone-stimulating IgG in the serum of bilateral PA. Furthermore, 15 types of proteins (self-antigen candidates) recognized by these IgGs were identified. In the future, it is expected that a new pathological condition of autoimmune primary aldosteronism and the establishment of an antibody measurement method will be established by further reinforcing the data.

研究分野：内分泌

キーワード：原発性アルドステロン症 自己抗体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高血圧症は、国内患者数 4300 万人と推定されるほど多い国民病であり、脳卒中、心臓病、腎臓病などを予防するうえで重要である。高血圧症は、原因が特定できない本態性高血圧症 (EH, Essential Hypertension) と原因が特定できる 2 次性高血圧症とに分類される。2 次性高血圧症の原因として、原発性アルドステロン症 (PA, Primary Aldosteronism) が最も頻度が高い。PA とはアルドステロン過剰状態をさし、国内患者数は 200 万-400 万人 (全人口の 1-2%、高血圧患者の 10-20%) と推定されるほど、非常に患者数の多い疾患である。

PA では年齢・血圧が同等の EH と比べて、脳卒中、心肥大、心房細動、冠動脈疾患、心不全などの脳、心血管合併症の頻度が高い。PA の脳・心血管合併症のオッズ比は、脳卒中 4.2、心筋梗塞 6.5、心房細動 12.1、心エコー上の左室肥大 1.6、心電図上の左室肥大 2.9 といずれも EH と比較して有意に高い。PA と腎機能障害の関連性も指摘されている。また、PA では肥満や耐糖能障害、睡眠時無呼吸症候群の合併頻度が高い。また、アルドステロンの作用により血清カリウム (K) が低下するが、低 K 血症を合併する PA では正常 K 血症の PA よりも、狭心症、心不全、不整脈の頻度が多かったことから、アルドステロン過剰に伴う低カリウム血症が高血圧と共に心血管イベントの発生に関与すると考えられる。更に、この他、年齢と高血圧罹病期間が PA の心血管イベントに関与することが報告されている。

心血管合併症を高頻度に引き起こす PA を早期に診断し、適切に治療することは重要であると考えられる。しかし、多くの高血圧診療では、PA などの 2 次性高血圧の検索がなされないまま、特別な理由なしに各種降圧剤が選択されているのが実状である。PA の薬物療法は、アルドステロンブロッカーが適切であり、どんな降圧剤でもよい、というわけではない。また、片側性 PA は手術による完治も望める。このように PA の的確な診断は重要である。

60 - 80% の PA が両側性過剰分泌であると判明しているが、両側性過剰分泌の原因には不明な点が多く、その原因が特定できる患者はほとんどいない。そんな中、両側性 PA の中に、アルドステロン過剰分泌が自然緩解する症例が存在することを見出した。現在、自然緩解現象について、前向き研究を実施中であるが、少なからずの症例に認められることが判明してきている。この現象を説明し得るものとして、自己抗体によるアルドステロン分泌過剰の可能性を考え、研究を進めた。

2. 研究の目的

自己抗体による両側性アルドステロン分泌過剰症、すなわち、自己免疫性原発性アルドステロン症 (Autoimmune-Induced Primary Aldosteronism, AIPA) という新規病態を明らかにすること。

3. 研究の方法

患者

高血圧患者に対し、アルドステロン - レニン比高値 (>200) と 血漿アルドステロン濃度が一定値以上 (>120pg/ml) であることを組み合わせたスクリーニングを実施した。陽性者に対し少なくとも 1 つの機能確認検査 (カプトリル負荷試験、生理食塩水負荷試験、立位フロセミド試験、副腎皮質刺激ホルモン負荷試験) を実施し、陽性の場合に PA と診断した。PA 患者のうち、副腎静脈サンプリング (AVS, Adrenal Venous Sampling) により、病型診断 (両側性あるいは片側性) された患者を対象に末梢静脈血を採取した。

IgG抽出

患者血清より、Melon Gel IgG Spin Purification Kit (Thermo Scientific) を用いて、IgG を抽出した。

細胞培養

副腎皮質癌由来 H295R 細胞を培地 (DMEM/Ham 's F-12 medium (L-glutamine and 15mM HEPES medium; GIBCO), 5% NU-1 serum (Becton Dickinson), 0,1% insulin, transferrin, selenium (100U/ml; GIBCO), 1% penicillin (100 U/ml; GIBCO) and streptomycin (100 µg/ml; GIBCO)) を用いて増殖、維持した

遺伝子発現の測定

リアルタイムPCRによる遺伝子発現解析のため、SuperPrep Cell Lysis & RT Kit for qPCR (TOYOBO) を用いて total RNA を含む細胞ライセートを調整した。細胞ライセートを用いて逆転写反応 (ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover; TOYOBO) を行い、cDNA を合成し

た。KAPA PROBE FAST qPCR Kitを用いてアルドステロン合成酵素遺伝子CYP11B2(Hs01597732_m1; Thermo Scientific)のリアルタイムPCRを行った。また、内部コントロールにはACTB(HA067803; TaKaRa)を使用し、KAPA SYBR FAST qPCR Kitを用いた。遺伝子発現は比較定量法、Ct法にて解析した。

アルドステロン刺激抗体活性の検出

4x10⁴cells/100ulのH295R細胞を96ウェルプレートに播種し、翌日IgG(60mg/ml)1.5ulを添加し、48時間インキュベートした。その後、細胞を溶解し、遺伝子発現を測定した。PA患者と健常者のCYP11B2遺伝子発現を比較することによりアルドステロン刺激抗体活性を検出した(図1)。

免疫沈降および質量分析によるタンパク質同定

H295R細胞を非イオン性界面活性剤、プロテアーゼ阻害剤を含んだバッファーで溶解した。その細胞溶解液と血清より抽出したIgGを混合し、オーバーナイト、4℃でインキュベートし、免疫(抗原-抗体)複合体を形成させた。その免疫複合体を、界面活性剤を含まないバッファーで洗浄し、非特異的結合タンパク質と残っている界面活性剤を除いた。免疫複合体からプロテインA/Gを解離させるため、低pH溶出バッファーを用いた。この一連の工程にはPierce MS-Compatible Magnetic IP Kit(Thermo Scientific)を用いた。免疫複合体を形成したタンパク質(抗原)を同定するため、液体クロマトグラフィー質量分析を行った(Orbitrap QE plus; Thermo Scientific)。

膜タンパク質合成

In-Fusion HD Cloning Kit(TaKaRa)を用いて膜タンパク質のコード領域をプラスミドベクター(pEU-E01-DYKDDDDK-MCS-N2; セルフリーサイエンス)に挿入し、膜タンパク質合成のための鋳型DNAを作製した。次に、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系にてリポソームを用いて、膜タンパク質をプロテオリポソームとして合成した(ProteoLiposome PLUS Expression Kit; セルフリーサイエンス)。リポタンパクの発現をウエスタンブロットにより確認した(図2)。

ELISA(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

マイクロプレートに膜タンパク質を固相化し、ヒト血清と反応させる。その後、HRP標識した抗ヒトIgGを反応させ、洗浄後、マイクロプレートに残る酵素活性を検出した(吸光度測定)。

4. 研究成果

アルドステロン刺激性IgGの存在

両側性PAと確定診断された症例19例のIgGを、副腎皮質培養細胞H295Rに添加したところ、健常者IgGよりもアルドステロン合成酵素遺伝子CYP11B2発現を増加させる症例の存在(12例)が明らかになった(図1)。

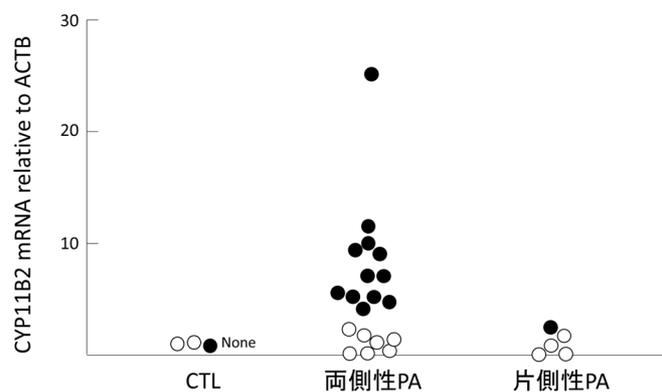


図1 アルドステロン刺激抗体活性

; 免疫沈降 質量分析解析の実施者

アルドステロン刺激性IgGを有する症例にのみ認識されるタンパク質（自己抗原）の存在

図1の黒丸()のサンプルについて、血清より抽出したIgGと副腎皮質培養細胞H295Rの蛋白抽出物で免疫沈降を行い、質量分析によりIgGと結合しているタンパク質解析した。健常者や片側性PAに認められず、両側性PAのみに認められるタンパク質をすべて抽出した。その結果、15種類のタンパク質が選定され、これらはすべて膜タンパク質でイオン輸送にかかわるチャンネルやポンプであった(表1)。

| タンパク質 (kDa) | 患者数 | 機能 |
|----------------|-----|-----------|
| 112 | 2 | Na/K輸送 |
| 138 | 2 | Ca輸送 |
| 221 | 1 | Caチャンネル |
| 262 | 1 | |
| 245 | 1 | |
| 95 | 3 | |
| 9 | 1 | CAMK2阻害 |
| 147 | 1 | Kチャンネル |
| 126 | 1 | チャンネル |
| 111 | 1 | Caチャンネル |
| 106 | 2 | |
| 123 | 1 | |
| 95 | 1 | |
| 69 | 2 | Ca/K/Na輸送 |
| 56 | 1 | Na輸送 |

表1 抗原候補膜タンパク質

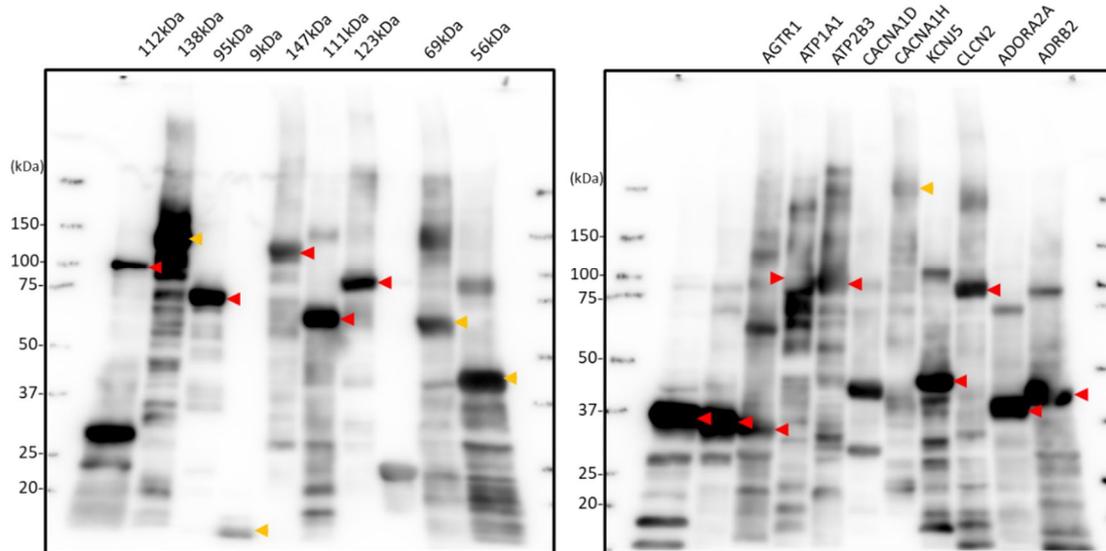


図2 リボソームタンパクの発現確認

ウエスタンブロットによりリボソームタンパクに発現を確認した。

リボソームリボタンパク発現

膜タンパク質を固相化したELISAにより抗体価測定を試みたが、測定が困難であった。これは、本疾患の病態がV型アレルギーによるためと考えられる。V型アレルギーの代表的疾患であるバセドウ病では、甲状腺刺激ホルモン(TSH, Thyroid Stimulating Hormone)受容体に対する自己抗体が産生され、その自己抗体がTSHと同様に受容体を刺激することで、甲状腺から甲状腺ホルモンが分泌され続けるために起こる。このTSH受容体刺激抗体はTSH受容体の細胞外領域の構造を認識していることが知られる。AIPAの病態もバセドウ病とよく似ていると考えられる。すなわち、膜タンパク質、特にイオンチャンネルやポンプの細胞外の構造を認識して結合する自己抗体によってイオン輸送が変化することが原因であると考えられる。膜タンパク質を単にウエ

ルに固相化した場合には、膜に埋め込まれている膜タンパク質の立体構造が再現できない。そこで、膜タンパクが膜に埋め込まれている状態を再現するため、プロテオリポソームをウエルに固相化する方法に取り組むことにした。16種類のリポソームタンパクの合成が終了した(図2)。今後、抗体価測定系を確立し、AIPAを感度、特異度よく診断できる自己抗原を選定する。遺伝学的に判明しているPAの原因タンパク(KCNJ5, ATP1A1, ATP2B3, CACNA1D, CACNA1H, CLCN2)が自己抗原となっている可能性も考え、これら原因遺伝子タンパクおよび、同定した15種の自抗原候補タンパク質について抗体価を測定していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Takeda Y, Demura M, Wang F, Karashima S, Yoneda T, Kometani M, Hashimoto A, Aono D, Horike SI, Meguro-Horike M, Yamagishi M, Takeda Y. | 4. 巻 7 |
| 2. 論文標題 Epigenetic Regulation of Aldosterone Synthase Gene by Sodium and Angiotensin II. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 J Am Heart Assoc. | 6. 最初と最後の頁 e008281 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/JAHA.117.008281 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Kometani M, Yoneda T, Aono D, Karashima S, Demura M, Nishimoto K, Yamagishi M, Takeda Y. | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Impact of aldosterone-producing cell clusters on diagnostic discrepancies in primary aldosteronism. Oncotarget. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Oncotarget. | 6. 最初と最後の頁 26007-26018 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.25418 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Sawada K, Karashima S, Kometani M, Oka R, Takeda Y, Sawamura T, Fujimoto A, Demura M, Wakayama A, Usukura M, Yagi K, Takeda Y, Yoneda T. | 4. 巻 65 |
| 2. 論文標題 Effect of sodium glucose cotransporter 2 inhibitors on obstructive sleep apnea in patients with type 2 diabetes. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Endocr J. | 6. 最初と最後の頁 461-467 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1507/endocrj.EJ17-0440 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Karashima S, Tsuda T, Kometani M, Oka R, Demura M, Kawashiri MA, Takeda Y, Hayashi K, Yoneda T. | 4. 巻 2 |
| 2. 論文標題 Severe Mitral Regurgitation As a Result of Rupture of Mitral Valve Chordae Tendineae in a Patient With Graves Disease. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 J Endocr Soc. | 6. 最初と最後の頁 1246-1250 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/js.2018-00173 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

| | | |
|-------------------------------|--------------|-----------------------|
| 産業財産権の名称 原発性アルドステロン症の検査方法 | 発明者 出村 昌史 | 権利者 国立大学法人金 沢大学 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、2018-202619 | 出願年 2018年 | 国内・外国の別 国内 |

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-----------|--|------------------------------------|----|
| 研究 分担者 | 西條 清史 (SAIJOH Kiyofumi) (00178469) | 金沢大学・医学系・教授 (13301) | |