

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790172

研究課題名(和文) コルチゾール11 $\beta$ -HSD2酵素活性と高血圧発症に関する研究研究課題名(英文) The relationship between 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 2 enzyme activity and blood pressure in patients with renal disease

研究代表者

横川 彰朋 (YOKOKAWA, Akitomo)

東京薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：70328558

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)：本研究では、申請者の研究室で開発された新しいヒトin vivo 11 $\beta$ -HSD2酵素活性評価法(補正した尿中コルチゾン/コルチゾール比)を用い、11 $\beta$ -HSD2酵素活性と血圧上昇との関連性を解明することを目指した。腎疾患患者70名を対象に、11 $\beta$ -HSD2活性を評価した結果、11 $\beta$ -HSD2活性が低下した患者は8名であった。活性低下した患者では、拡張期血圧が高い結果となったことから、11 $\beta$ -HSD2活性の低下が腎性高血圧の一因となっていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, the relationship between 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 2 (11 $\beta$ -HSD2) enzyme activity and blood pressure was evaluated using the new index of in vivo human 11 $\beta$ -HSD2 activity that was developed in our laboratory (urinary ratio of free cortisone to cortisol correlated with the urinary concentration of cortisol, which is represented as UFE/UFF-cortisol concentration). Among 70 patients with renal disease, eight patients exhibited decreased 11 $\beta$ -HSD2 activity as indicated by the UFE/UFF-cortisol concentration. These patients had high diastolic blood pressure, suggesting that decreases in 11 $\beta$ -HSD2 activity contribute to the elevated blood pressure in patients with renal disease.

研究分野：医歯薬学

キーワード：コルチゾール コルチゾン 11 $\beta$ -HSD2 腎疾患 本態性高血圧 酵素活性

## 1. 研究開始当初の背景

11 $\beta$ -HSD2 は、副腎皮質ホルモンであるコルチゾールを生理学的に不活性なコルチゾンへ変換する酵素であり、主に腎臓に存在する。コルチゾールは、*in vitro* でアルドステロンと同程度のミネラルコルチコイド作用を持つが、*in vivo* では、コルチゾールがミネラルコルチコイドレセプターへ結合する前段階で 11 $\beta$ -HSD2 によりコルチゾンへと変換するためミネラルコルチコイド作用を示さない。これは、"pre-receptor mechanism"と呼ばれ、過剰のコルチゾールがミネラルコルチコイドレセプターへ結合することを防いでいる。従って、11 $\beta$ -HSD2 活性の欠損や低下は、みかけのミネラルコルチコイド過剰症状となり、高血圧や低カリウム血症を引き起こす。遺伝的に 11 $\beta$ -HSD2 活性が欠損した apparent mineralocorticoid excess 症候群では、出生児低体重、低レニン性高血圧、低カリウム血症などの症状を呈する。また、甘草の主成分であるグリチルレチン酸は、11 $\beta$ -HSD2 阻害作用を持ち、偽アルドステロン症を引き起こすことが知られている。

一方、本態性高血圧症や腎性高血圧症では、血圧上昇の原因の一部に 11 $\beta$ -HSD2 活性の低下が指摘され、Mariniello らや Soro らは、本態性高血圧患者で 11 $\beta$ -HSD2 活性の低下が認められたと報告している。一方で、本態性高血圧患者の 11 $\beta$ -HSD2 活性は健常人と差が無いという報告もあり、11 $\beta$ -HSD2 活性低下と高血圧症の関連性には一定の見解が得られない。その原因としては、*in vivo* での 11 $\beta$ -HSD2 活性評価法に問題があると考えられる。

ヒト *in vivo* における 11 $\beta$ -HSD2 活性の評価する指標として、古くよりコルチゾール、コルチゾンの尿中 A 環還元代謝物の比 [尿中 THE/(THF+alloTHF) 比] が利用されてきた。しかし、THF, alloTHF, THE は肝臓の A 環還元代謝酵素により生成することから、尿中

THE/(THF+alloTHF) 比は腎における 11 $\beta$ -HSD2 活性評価の良い指標とは言えない。一方、尿中コルチゾン/コルチゾール比は 11 $\beta$ -HSD2 の基質となるコルチゾールとその代謝物であるコルチゾンを用いて評価することから、尿中 THE/(THF+alloTHF) 比よりも腎臓の 11 $\beta$ -HSD2 活性を反映するという報告もある。しかし、尿中コルチゾン/コルチゾール比には大きな日内・日間変動が存在することから、11 $\beta$ -HSD2 活性以外にも変動要因がある可能性が指摘され、適切な 11 $\beta$ -HSD2 活性評価法の開発が必要とされていた。このような背景から、申請者らは、尿中コルチゾン/コルチゾール比に及ぼす因子を検討した結果、尿量や尿中コルチゾール濃度が尿中コルチゾン/コルチゾール比と高い相関性を示すことを明らかとし、尿中コルチゾン/コルチゾール比を尿中コルチゾール濃度で補正する「新しいヒト *in vivo* 11 $\beta$ -HSD2 酵素活性評価法 (補正した尿中コルチゾン/コルチゾール比)」を提案した。これは、健常成人における尿中コルチゾン/コルチゾール比と尿中コルチゾール濃度の回帰直線の 95%信頼区間を正常範囲として 11 $\beta$ -HSD2 酵素活性を評価するものである。この指標は、尿中コルチゾン/コルチゾール比と比較して日内・日間変動が少なく 11 $\beta$ -HSD2 活性を正確に評価できる (図 1)。

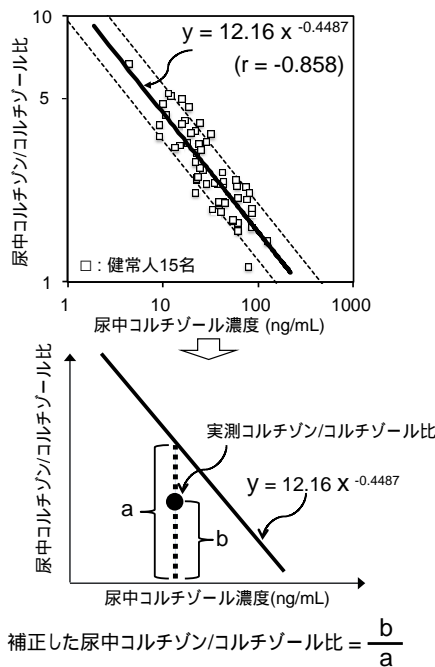


図1 新しいヒト in vivo 11β-HSD2 酵素活性評価法 (補正した尿中コルチゾン/コルチゾール比)

## 2. 研究の目的

本研究では、申請者が提案した補正した尿中コルチゾン/コルチゾール比 (ヒト in vivo 11β-HSD2 酵素活性評価法) を指標とし、11β-HSD2 酵素活性が血圧上昇に及ぼす影響を解明し、11β-HSD2 活性低下に起因する高血圧症患者の鑑別診断へ応用することを目指した。

## 3. 研究の方法

(1) 健常人へのグリチルレチン酸投与を利用した「新しいヒト in vivo 11β-HSD2 酵素活性評価法」の信頼性評価: 健常人 3 名 (subject ~ ) を対象に、11β-HSD2 阻害作用を持つグリチルレチン酸 130 mg を 1 日 1 回 5 日間投与し、経時的に尿を採取した。GC-MS にて尿中コルチゾール、コルチゾン濃度を測定した。グリチルレチン酸投与前と投与中の補正した尿中コルチゾン/コルチゾール比 (11β-HSD2 活性) を比較し、酵素活性評価法の妥当性を判断した。なお、健常人へのグリ

チルレチン酸投与に関しては、東京薬科大学倫理委員会の承認を得ており、被験者からの文書によるインフォームドコンセントを得て行った。

(2) 健常人における 11β-HSD2 酵素活性の日内・日間での変動の評価: 健常人 15 名 (subject 1~15) を対象とし、10:00~18:00 までの 2 時間毎、18:00~22:00 (4 時間)、22:00~翌 10:00 (12 時間) の蓄尿を行い、日内変動を検討した。日間変動は、健常人 2 名 (subject A, B) を対象に、2 時間 (10:00~12:00) の蓄尿を約 40 日間行った。

(3) 腎疾患患者の 11β-HSD2 酵素活性と血圧との関連性: 杏林大学医学部付属病院腎臓内科に入院中の腎疾患患者 70 名を対象に、24 時間の蓄尿を行った。サンプルの採取は、杏林大学医学部第一内科学教室、山田明教授、川嶋聡子医師の協力を受け、倫理委員会の承認を得たのち、インフォームドコンセントが得られた患者を対象とした。尿中コルチゾール、コルチゾン濃度を測定し、11β-HSD2 酵素活性が血圧に与える影響を調査した。

## 4. 研究成果

(1) グリチルレチン酸投与前と投与中の補正した尿中コルチゾン/コルチゾール比は、投与前と比較して、subject では 28%、subject では 14%、subject では 42%低下した (Table 1)。このことから、補正した尿中コルチゾン/コルチゾール比は、正確に 11β-HSD2 低下を評価できると判断した。

Table 1 グリチルレチン酸投与前と投与中の補正した尿中コルチゾン/コルチゾール比

subject	投与前	投与中	低下率
	0.79 ± 0.05	0.51 ± 0.08	-28%
	0.81 ± 0.10	0.70 ± 0.14	-14%
	1.13 ± 0.06	0.65 ± 0.13	-42%

(2) 15 名の健常人における 11β-HSD2 酵素活

性の個人内変動は、日内で 1.1~1.6 倍であり、15 名の最大値と最小値から算出された個人間変動は 2.5 倍となった (図 2)。日中 (10:00~22:00) と夜間 (22:00~翌 10:00) の補正した尿中コルチゾン/コルチゾール比は、日中では  $0.96 \pm 0.14$ 、夜間では  $0.76 \pm 0.16$  となり、夜間で 20%程度活性が低下する可能性が示唆された。

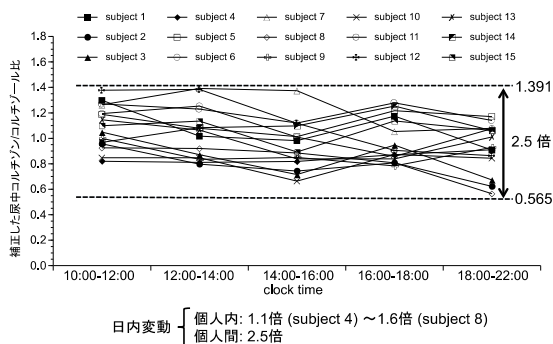


図 2 補正した尿中コルチゾン/コルチゾール比の日内変動

健常人 2 名を対象とした日間変動は、subject A では 1.35 倍 (0.85~1.15)、subject B では 1.38 倍 (1.04~1.43) であった (図 3)。

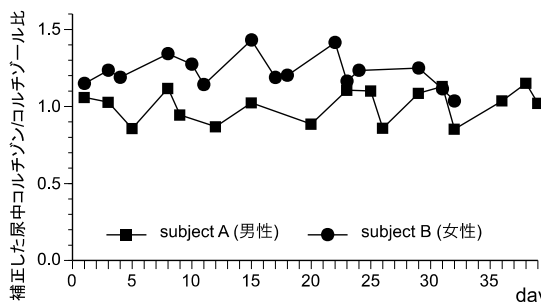


図 3 補正した尿中コルチゾン/コルチゾール比の日間変動

以上、補正した尿中コルチゾン/コルチゾール比で評価した  $11\beta$ -HSD2 酵素活性の日内・日間での変動は比較的小さく、活性が低下する夜間を除く時間であれば、 $11\beta$ -HSD2 酵素活性を評価できると考えられる。これまで集積した 19 名の健常人での補正した尿中コル

チゾン/コルチゾール比の平均は、 $1.07 \pm 0.18$  (0.77~1.38) であり、これを正常範囲として腎疾患患者における検討を行った。

(3) 腎疾患患者 70 名の  $11\beta$ -HSD2 酵素活性を補正した尿中コルチゾン/コルチゾール比で評価したところ、明らかに  $11\beta$ -HSD2 酵素活性が低下したと考えられる 0.50 以下の患者が 8 名認められた。血圧との関連性を調査したところ、活性が低下した患者では、活性が正常な患者と比較して、投与された降圧薬の投与が多いにもかかわらず (3.4 vs 1.6 剤  $p < 0.05$ )、拡張期血圧が有為に高かった (86 vs 74 mmHg,  $p < 0.05$ )。これらより  $11\beta$ -HSD2 活性の低下が腎性高血圧の一因となる可能性が示唆された (図 4)。

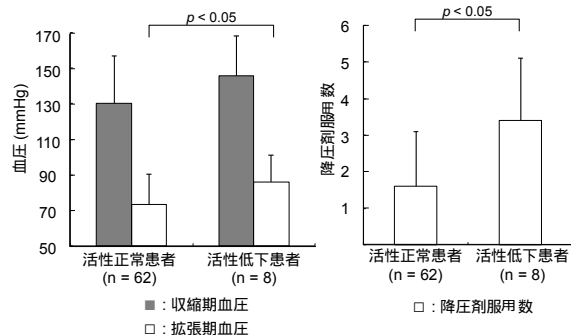


図 4 腎疾患患者における  $11\beta$ -HSD2 活性と血圧、降圧薬投与数

以上の結果より、 $11\beta$ -HSD2 酵素活性の低下は血圧上昇の一因となることが示唆された。甘草の主成分であるグリチルレチン酸による偽アルドステロン症では、抗アルドステロン薬であるスピロノラクトンが治療に効果を示すことが報告されている。今後、 $11\beta$ -HSD2 酵素活性を評価し、低下が認められた高血圧患者では、抗アルドステロン薬による治療が高い効果を示すことが予測され、降圧薬の選択に役立つことが期待される。

(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)

Yokokawa A, Takasaka T, Shibasaki H, Kasuya Y, Kawashima S, Yamada A, and Furuta T, The effect of water loading on the urinary ratio of cortisone to cortisol in healthy subjects and a new approach to the evaluation of the ratio as an index for in vivo human 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 2 activity, *Steroids*, **77**, 1291-1297, 2012 ,査読有 ,doi: 10.1016/j.steroids.2012.07.008

〔学会発表〕(計 3 件)

横川彰朋, 柴崎浩美, 細田香織, 石井和夫, 古田隆, ヒト in vivo における 11 $\beta$ -HSD2 活性の日内・日間変動に関する研究, 第 53 回日本臨床化学学会年次集会, 2013 年 8 月, 徳島

Yokokawa A, Shibasaki H, Furuta T, Individual variability of cortisone/cortisol ratio correlated to the cortisol concentration in human urine as a new index for phenotyping in vivo 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 2 activity, 6th European Congress of Pharmacology, 2012, Granada, Spain

横川彰朋, 柴崎浩美, 古田隆, 尿量増加による尿中 cortisone/cortisol 比の変動とヒト in vivo 11 $\beta$ -HSD2 酵素活性評価法, 第 52 回日本臨床化学学会年次集会, 2012 年 9 月, 盛岡

〔その他〕

平成 25 年度 日本臨床化学学会 学会賞「奨励賞」, 受賞題目: ヒト in vivo における 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 2 の活性評価法の開発

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

横川 彰朋 (YOKOKAWA Akitomo)

東京薬科大学・薬学部・助教

研究者番号: 70328558

(2) 研究協力者

東京薬科大学

古田 隆 (臨床薬学教室教授)

柴崎 浩美 (臨床薬学教室准教授)

杏林大学医学部

山田 明 (第一内科学教室教授)

川嶋 聡子 (第一内科学教室)