

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26670174

研究課題名(和文)ステロイドの前駆体が切り拓く新たなアルドステロン症の原因診断法と分子標的治療薬

研究課題名(英文)Development of plasma steroid precursor-based new differential diagnosis and molecular targeted therapies for hyperaldosteronism

研究代表者

土居 雅夫 (Masao, Doi)

京都大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20432578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、アルドステロン合成の中間段階を担う酵素3 β -HSDの異常が原発性アルドステロン(PA)症の原因となることをマウスにおいて見出し(Nat Med 2010)、実際にこの酵素がヒトのPA症病変部においても過剰な発現を示すことを見出した(JCEM 2014)。我々はPA症患者の副腎静脈血サンプル中に含まれるステロイド前駆体濃度を測定し、患部側の3 β -HSD酵素活性が健側に比べ有意に高くなっていることを明らかにした。また本酵素遺伝子は、血圧の重要な制御ホルモンであるAngiotensin IIによっても核内受容体NGF1Bを介して制御されることを見出した(Mol Cell Biol 2014)。

研究成果の概要(英文)：We previously showed that the enzyme 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD) is involved in the development of primary aldosteronism (PA) in mice (Nat Med 2010) and found that this enzyme is indeed inappropriately expressed in the lesions of PA in humans (JCEM 2014). Here we measured plasma concentrations of steroid precursors and demonstrated that adrenal vein samples from PA patients exhibit a significant increase in 3 β -HSD enzymatic activity, compared with that of contralateral, nondiseased adrenal glands. These data clearly show that enhanced activity of 3 β -HSD is involved in human PA pathology. We also revealed that angiotensin II can stimulate expression of this enzyme through de novo protein synthesis of the orphan nuclear receptor NGF1B (Mol Cell Biol 2014). Thus, 3 β -HSD appears to play a key role in the regulation of aldosterone synthesis in normal physiology and pathophysiology.

研究分野：内分泌

キーワード：アルドステロン 副腎

1. 研究開始当初の背景

本研究は、いまだ原因不明のヒトの原発性アルドステロン症に対する原因酵素診断法を開発しようとするマウスからヒトへのトランスレーショナルリサーチである。研究代表者は2010年にマウスにおいて新型の3 β -水酸化ステロイド脱水素酵素(3 β -HSD)を発見した(Doi et al, Nat Med 2010)。この酵素はステロイド合成の中間段階を担う必須の酵素であり、副腎皮質の中でもアルドステロン産生を担う球状層にのみ発現すること、そして過剰発現により原発性アルドステロン症様の病態がマウスに生じることが判明した。重要なことに、同種の酵素はヒトにも存在する。したがってヒトでもこの酵素が律速となって疾病を誘引する可能性が高い。しかし、この酵素が本当にヒトでも原発性アルドステロン症の原因となっているかについては、実際に本症の患者の血液を用いて3 β -HSD酵素の活性を見積もる必要があった。またヒトにおける本酵素遺伝子の発現調節機構も不明であった。

2. 研究の目的

血中のステロイド前駆体を利用することにより、ヒトの原発性アルドステロン症の原因酵素を診断することができるかどうか、臨床的な検証を行うことを目的とした。具体的には原発性アルドステロン症患者から採取した副腎静脈血サンプルに含まれるステロイド中間代謝物プロゲステロン(P4)およびプレグネノロン(P5)を質量分析によって定量し、その濃度比から見積もられる3 β -HSD酵素活性値が本症の診断に応用できるかどうかを検証した。また本検証の結果、3 β -HSDがヒトでも原発性アルドステロン症の原因となっていることが分かってきたため、本研究ではさらに、当該酵素を対象とした臨床応用を加速させるため、本酵素遺伝子の発現制御機構の解明にもあたった。

3. 研究の方法

本研究では、血液検査の対象として、東北大学医学部病院 腎・高血圧・内分泌科(伊藤貞嘉教授・佐藤文俊講師)保有の副腎静脈血サンプル(AVS)を用いた。検査は、原発性アルドステロン症患者の患部側AVS(計15検体)とその対側健常AVS(計15検体)を用い、年齢・性別・血圧・血糖等に相違のない群間比較を行った。AVS中に含まれるP5およびP4のそれぞれの濃度をLC-MS/MS法により測定し、その濃度比から3 β -HSD酵素活性値を見積もり、患部側と健常側の活性値と比較した。またさらに、臨床応用を見据え、ヒトにおける本酵素遺伝子の発現調節機構をヒトの副腎細胞を用いて解析した。

4. 研究成果

原発性アルドステロン症患者AVS中に含まれるステロイド前駆体濃度を測定し、3 β -HSD酵素活性値を見積もったところ、調査した15

検体すべてにおいて、患部側の酵素活性が健側に比べて有意に高くなっていることが分かった。この結果は、マウスと同様、ヒトでも3 β -HSDの異常な酵素活性の亢進が原発性アルドステロン症の重要な原因の1つとなっていることを強く示唆している。また我々はさらなる臨床を見据え、今回明らかにしたヒトの原発性アルドステロン症の原因酵素HSD3B1に関し、その発現様式を調べた結果、本酵素遺伝子はサーカディアンクロックのみならず、血圧の重要な制御ホルモンであるアンジオテンシンによっても核内受容体NGFIBを介して制御されることを見出した(Ota et al, Mol Cell Biol, 2014)。これらの結果は、3 β -HSDの動的な制御によってアルドステロンの合成速度が制御されていることを示しており、その制御の異常が原発性アルドステロン症の発症につながる可能性を示唆している。

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9件)

Konosu-Fukaya S, Nakamura Y, Satoh F, Ono Y, Felizola SJ, Ise K, Maekawa T, Takeda K, Katsu K, Fujishima F, Kasajima A, Watanabe M, Arai Y, Gomez-Sanchez EP, Gomez-Sanchez CE, Doi M, Okamura H, and Sasano H: 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms in human aldosterone-producing adenoma. Mol. Cell. Endocrinol. (in press)
DOI: 10.1016/j.mce.2014.10.008

Azmahani A, Nakamura Y, Felizola SJ, Ozawa Y, Ise K, Inoue T, McNamara KM, Doi M, Okamura H, Zouboulis CC, Aiba S, and Sasano H: Steroidogenic enzymes, their related transcription factors and nuclear receptors in human sebaceous glands under normal and pathological conditions. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 144, 268-279 (2014)
DOI: 10.1016/j.jsbmb.2014.07.010

Ota T, Doi M, Yamazaki F, Yarimizu D, Okada K, Murai I, Hayashi H, Kunisue S, Nakagawa Y and Okamura H: Angiotensin II triggers expression of the adrenal gland zona glomerulosa-specific 3 β -HSD isoenzyme through de novo protein synthesis of the orphan nuclear receptors NGFIB and NURR1. Mol. Cell. Biol. 34, 3880-3894 (2014)
DOI: 10.1128/MCB.00852-14

Doi M, Satoh F, Maekawa T, Nakamura Y, Fustin JM, Tainaka M, Hotta Y, Takahashi

Y, Morimoto R, Takase K, Ito S, Sasano H, and Okamura H: Isoform-specific monoclonal antibodies against 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ isomerase family provide markers for subclassification of human primary aldosteronism. J. Clin. Endocrinol. Metab. 99, E257-E262 (2014)
DOI: 10.1210/jc.2013-3279

Nugrahaningsih DAA, Emoto N, Vignon-Zellweger N, Purnomo E, Yagi K, Nakayama K, Doi M, Okamura H, and Hirata KI: Chronic hyperaldosteronism in Cryptochrome null mice induces high-salt- and blood pressure-independent kidney damage in mice. Hypertension Res. 37, 202-209 (2014)
DOI: 10.1038/hr.2013.143

Yamamura K, Doi M, Hayashi H, Ota T, Murai I, Hotta Y, Komatsu R, and Okamura H: Immunolocalization of murine type VI 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in the adrenal gland, testis, skin, and placenta. Mol. Cell. Endocrinol. 382, 131-138 (2014)
DOI: 10.1016/j.mce.2013.09.014

土居雅夫, 岡村均:
時計遺伝子 Clock genes
医学のあゆみ 249, 373 (2014)

岡村均, 土居雅夫:
体内時計とアンジオテンシン II により
制御される新規アルドステロン合成酵
素と高血圧
最新医学 2014年11月 pp. 133-144

岡村均, 土居雅夫:
生体リズムと高血圧
循環 Plus 14, 10-12 (2014)

[学会発表](計16件)

Masao Doi: Identification of a new class of GPCR signalling that tunes the central clock. The 4th International Symposium on Molecular Clock, Kyoto, Japan, March 27, 2015

Masao Doi: A New Class of G-protein Signaling in the Suprachiasmatic Nucleus. International Symposium on RNA and Clock 2015, Awaji, Japan, March 25, 2015

Takumi Ota, Masao Doi, and Hitoshi Okamura: The gene encoding the type I 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase is acutely induced by Angiotensin II

through orphan nuclear receptor NGFIB signaling in human adrenocortical H295R cells. The 8th SKO Joint Symposium on Biology, Osaka, Japan, Jun 10, 2014

Yuta Atobe, Masao Doi, and Hitoshi Okamura: Mechanism of circadian transcription of clock core gene Per2. The 8th SKO Joint Symposium on Biology, Osaka, Japan, Jun 10, 2014

Hida Hayashi, Masao Doi, and Hitoshi Okamura: Isoform-specific monoclonal antibodies against 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ isomerase family provide markers for subclassification of human primary aldosteronism. The 7th International Aldosterone Forum in Japan, Yokohama, Japan, May 31, 2014

Takumi Ota, Masao Doi, and Hitoshi Okamura: Angiotensin II triggers transcription of the adrenal gland zona glomerulosa-specific 3 β -HSD isoenzyme through de novo synthetic NGFIB pathway. The 7th International Aldosterone Forum in Japan, Yokohama, Japan, May 31, 2014

Daisuke Yarimizu, Masao Doi, Takumi Ota, and Hitoshi Okamura:
Stimulus-selective induction of the orphan nuclear receptor NGFIB underlies different influences of angiotensin II and potassium on the human adrenal zona glomerulosa 3 β -HSD isoform in H295R cells. 第37回日本分子生物学会、横浜、2014年11月25日

Daisuke Yarimizu, Masao Doi, Takumi Ota, Yuuki Nakagawa, and Hitoshi Okamura:
Angiotensin II-regulatable cell-autonomous circadian oscillators in adrenocortical zona glomerulosa cells. 第21回日本時間生物学会年会、福岡、2014年11月8日

明石真, 土居雅夫: 時間生物学の次世代を切り拓く新技術:植物からヒトまで. 第21回日本時間生物学会年会、福岡、2014年11月8日(シンポジウム企画)

本間さと, 土居雅夫: 時計遺伝子のその先にあるもの:視交叉上核神経ネットワークがつくる哺乳類の時計機構. Circadian pacemaking beyond clock genes: Neural network-based coherent oscillation and adaptive phasing by the suprachiasmatic nucleus. Neuroscience

2014 - 第37回日本神経科学大会、横浜、
2014年9月11日 (シンポジウム企画)

Sumihiro Kunisue, Masao Doi, and
Hitoshi Okamura: Agonist-independent
basal activity of G-protein coupled
receptor GPR54 leads to reduced
intracellular cAMP levels.
Neuroscience 2014 - 第37回日本神経科学
大会、横浜、2014年9月11日

Masao Doi and Hitoshi Okamura: Atlas of
circadian clock gene expression in the
body. 平成26年度 自然科学研究機構 生
理学研究所研究会 臓器相関による生体制
御システムとその変容の仕組み、岡崎、
2014年9月27日

土居雅夫、中村保宏、佐藤文俊、笹野公伸、
岡村均: 原発性アルドステロン症の病態
鑑別を可能にするヒト3 β -HSD酵素サブタ
イプ選択的モノクローナル抗体の樹立。
第32回内分泌代謝学サマーセミナー、河口
湖、2014年7月11日

鎌水大介、土居雅夫、太田拓巳、岡村均: 核
内オーファン受容体NGF1Bの新規合成を介
したAngiotensinIIによる副腎球状層特異
的3 β -HSDアイソザイムの発現誘導メカニ
ズム。第32回内分泌代謝学サマーセミナ
ー、河口湖、2014年7月11日

土居雅夫: 生体リズム異常に伴う高血圧
発症メカニズム - 原発性アルドステロン
症の原因診断学の再構築を目指して - .
第9回神戸生活習慣病研究会、神戸、2014
年7月26日

土居雅夫、岡村均: 生体リズム異常に伴
う高血圧発症メカニズム - 原発性アルド
ステロン症の原因診断学の再構築を目指
して - . 第87回日本内分泌学会学術総会、
福岡、2014年4月26日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計1件)

名称: 原発性アルドステロン症の検出方法及
びモノクローナル抗体

発明者: 岡村均、土居雅夫、佐藤文俊、笹野
公伸、森本玲、伊藤貞嘉、中村保宏

権利者: 国立大学法人京都大学

種類: 特許

番号: 特許願 2014-539773

出願年月日: 平成 27 年 3 月 27 日

国内外の別: 国内

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/system-b
iology/doimasao/](http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/system-biology/doimasao/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土居 雅夫 (DOI, Masao)

京都大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号: 20432578

(2) 連携研究者

岡村 均 (OKAMURA, Hitoshi)

京都大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号: 60158813

Fustin Jean-Michel

京都大学・大学院薬学研究科・特定講師
研究者番号: 50711818

笹野 公伸 (SASANO, Hironobu)

東北大学・医学部・教授
研究者番号: 50187142

中村 保宏 (NAKAMURA, Yasuhiro)

東北大学・医学部・准教授
研究者番号: 80396499

佐藤 文俊 (SATO, Fumitoshi)

東北大学・医学部・講師
研究者番号: 70343051

(3) 研究協力者

太田 拓巳 (OTA, Takumi)

鎌水 大介 (YARIMIZU, Daisuke)

中川 優紀 (NAKAGAWA, Yuuki)