167　体液性因子を介したアルドステロン過剰分泌機構の解明	小林　洋輝

【目的】本研究では①原発性アルドステロン症（PA）患者の血液検体を用いて、網羅的蛋白の測定を行い PA の一病型である特発性アルドステロン症（IHA）に特徴的な血中蛋白を同定し、②同定した蛋白について Pathway 解析、ヒト副腎皮質細胞を用いた機能解析を行い IHA の病態を明らかにすることを目的とした。以上から IHA の治療標的、診断バイオマーカーを同定することが最終目標である。

【方法】１．Discovery cohort における蛋白の測定、解析：所属施設を受診し、副腎静脈サンプリング、臨床所見、病理所見から診断されたアルドステロン産生腺腫（APA）40 人、IHA40 人、本態性高血圧（EH）患者 40 人を対象に、保存血清 100μl を用いた網羅的蛋白測定（SomaScan platform を用いた蛋白測定）を行い、①IHA 群に特徴的な蛋白群を明らかにした。また②候補蛋白の発現量と PAC、及び 3 次元画像解析システムで計測した内臓脂肪量との相関解析を行った。統計処理には、SAS 9.4 を用いた。2. Pathway 解析、媒介解析による候補蛋白の統合解析：同定された蛋白群については、DAVID を用いた KEGG 解析を行い、IHA の病態に重要な Pathway を明らかにした。また媒介解析による因果解析を行い、内臓脂肪量と PAC の関連性について同定した候補蛋白がどの程度媒介するのかを明らかにした。

【結果】本研究で PA 患者の血液検体を用いて、網羅的に蛋白の測定を行い IHA に特徴的な血中蛋白プロファイルを同定した。同定した蛋白のうちの複数で内臓脂肪量と PAC との優位な相関関係を認め、IHA の発症に寄与している可能性が示唆された。

Fold change analysis の結果（上位 5 つのタンパクの結果を提示）

	APA vs IHA（Fold change analysis）				PA vs EH（Fold change analysis）			
蛋白	APA (Median)	IHA (Median)	FC	P	EH (Median)	PA (Median)	FC	P
蛋白 A	484	594	1.23	1.30E-05	434	539	1.24	5.60E-07
蛋白 B	1270	1529	1.20	1.70E-04	1123	1353	1.20	2.10E-05
蛋白 C	711	804	1.13	3.10E-04	658	757	1.15	3.90E-04
蛋白 D	1375	1507	1.10	4.60E-04	1278	1462	1.14	7.10E-07
蛋白 E	538	602	1.12	4.60E-04	492	563	1.14	1.50E-05

167. 体液性因子を介したアルドステロン過剰分泌機構の解明

小林　洋輝

日本大学 医学部 内科学系 腎臓高血圧内分泌内科学分野

Key words：原発性アルドステロン症，特発性アルドステロン症，病型診断，内臓脂肪，プロテオミクス

緒　言

二次性高血圧の代表疾患である原発性アルドステロン症（PA）は、外科手術の適応となる片側性アルドステロン産生腺腫：APA と、内科治療が一般的な特発性アルドステロン症（両側性副腎皮質過形成: IHA）に大別されるが、KCNJ5 遺伝子等の体細胞変異が原因とされる APA に対し、IHA の病因は未解明であり、治療方針決定のための両者の鑑別法も確立されていない。我々は各病型の臨床所見の違いに着目し、IHA 患者では APA に比して肥満を含めた生活習慣病の罹患率が高く、IHA 発症に肥満が関与している可能性を報告した［1］。さらに IHA 患者では血漿アルドステロン濃度（PAC）と内臓脂肪量に有意な相関関係があることを明らかにした（未発表）。我々の研究結果を裏付けるものとして、脂肪細胞由来の体液性因子と副腎アルドステロン過剰分泌との関連が報告されているが［2］、その詳細は未解明である。そこで本研究では、血中生理活性物質としてマイクロ RNA（miRNA）［3］と蛋白に着目し、「IHA では脂肪細胞由来の血中生理活性物質が副腎アルドステロン分泌制御機構に関与する」という仮説を立て、PA 患者の血液検体を用いた網羅的 miRNA および蛋白の測定を通じて、IHA に特徴的な体液性因子を明らかにし、①IHA の病態解明と治療標的の同定、②IHA の診断のための新たな血中バイオマーカーの同定を目的とする。

方　法

本研究の目的は、IHA に特徴的な血中 miRNA、及び蛋白を同定し、IHA の病態を明らかにすることである。再現性を検証するため、本研究は我々の所属施設と共同研究施設である Monash 大学（豪州）のコホートを用いて実施予定である。これら 2 施設での研究計画については、すでに我々の所属施設における研究倫理審査委員会から受理されている　(RK-20071-406)。今後計画している具体的な研究項目を以下に示す。

1. Discovery cohort における蛋白の測定、解析

我々の所属施設を受診し、副腎静脈サンプリング、臨床所見、病理所見から診断された APA40 人、IHA40 人、本態性高血圧（EH）患者 40 人を対象に、保存血清 100 ul を用いた網羅的蛋白測定（SomaScan platform を用いた 7500 種類の蛋白測定）を行い、①IHA 群に特徴的な miRNA、蛋白群を明らかにした。また②候補蛋白の発現量と PAC、及び 3 次元画像解析システムで計測した内臓脂肪量との相関解析を行った。統計処理には、SAS 9.4 を用いた。

2. Validation cohort を用いた蛋白の検証

1. で同定された蛋白の検証のため、Monash 大学（Dr. Jun Yang）の PA 患者 70 人（APA 35 人、IHA 35 人）と EH 患者 30 人について同様の測定、解析を行う。同定された体液性因子のうち、PAC および内臓脂肪量と正の相関があるものをリスク因子、負の相関があるものを防御因子の候補とした。

3. Pathway 解析、媒介解析による、候補 miRNA、蛋白の統合解析

同定された蛋白群については、DAVID を用いた KEGG 解析を行い、IHA の病態に重要な Pathway を明らかにした。また媒介解析による因果解析を行い、内臓脂肪量と PAC の関連性について同定した候補蛋白がどの程度媒介するのかを明らかにした。

4. 候補 miRNA、蛋白の H295R 細胞（ヒト副腎皮質細胞セルライン）に対する作用の評価

同定したリスク、および防御因子としての miRNA、蛋白について、ヒト副腎皮質細胞株である H295R 細胞に対する作用を評価する。具体的には miRNA の mimic、inhibitor による miRNA の発現制御、及び recombinant 蛋白の刺激による H295R 細胞のアルドステロン合成能に対する作用をアルドステロン合成酵素である CYP11B2、HSD3B1 の発現量（quantitative PCR、Western blotting）、及び細胞培養液中へのアルドステロン分泌量（化学発光酵素免疫測定法）で評価する。

結　果

IHA 患者における血漿アルドステロン濃度と内臓脂肪量の相関関係を Spearman 順位相関係数で検討した。その結果、有意な相関関係を認めた（r＝0.40, P＝0.0069）。

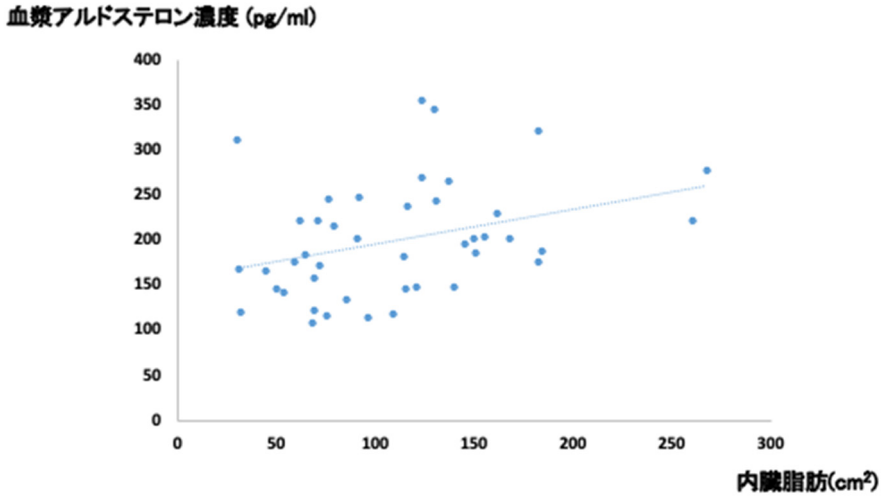


図 1. 血漿アルドステロン濃度と内臓脂肪の相関関係
IHA 患者における血漿アルドステロン濃度と 3 次元画像解析システムで計測した内臓脂肪量の相関関係を示す。Spearman 順位相関係数で検討したところ、有意な相関関係を認めた（r＝0.40, P＝0.0069）。

上記の研究結果は、脂肪細胞由来の体液性因子（microRNA、蛋白）と副腎アルドステロン過剰分泌との関連の既報［2, 3］を裏付けるものである。

次に、PA 患者と EH 患者の血清サンプルの Quality check を行い、SOMAscan proteomics platform による 7,500 の蛋白測定を行った。その結果、表 1 のように、APA と IHA、PA と EH で異なる蛋白プロファイルを明らかにした。尚、miRNA の測定については世界的物価高、円安の影響を大きく受けており当初の価格が大幅に高騰しているため測定の見込みが立たない状況である。

表 1. Fold change analysis

	APA vs IHA （Fold change analysis）				PA vs EH （Fold change analysis）			
蛋白	APA (Median)	IHA (Median)	FC	P	EH (Median)	PA (Median)	FC	P
蛋白 A	484	594	1.23	1.30E-05	434	539	1.24	5.60E-07
蛋白 B	1270	1529	1.20	1.70E-04	1123	1353	1.20	2.10E-05
蛋白 C	711	804	1.13	3.10E-04	658	757	1.15	3.90E-04
蛋白 D	1375	1507	1.10	4.60E-04	1278	1462	1.14	7.10E-07
蛋白 E	538	602	1.12	4.60E-04	492	563	1.14	1.50E-05
蛋白 F	1470	1625	1.11	4.80E-04	1419	1518	1.07	7.90E-04
蛋白 G	1336	1499	1.12	4.90E-04	1202	1419	1.18	7.10E-08
蛋白 H	1299	1497	1.15	5.00E-04	1167	1351	1.16	3.40E-05
蛋白 I	1636	1995	1.22	5.30E-04	1422	1812	1.27	1.80E-08
蛋白 J	1026	1123	1.10	5.30E-04	1007	1094	1.09	3.20E-04
蛋白 K	702	784	1.12	5.40E-04	643	760	1.18	2.80E-07
蛋白 L	539	625	1.16	6.60E-04	450	568	1.26	1.70E-07
蛋白 M	1903	2151	1.13	7.10E-04	1595	2044	1.28	6.50E-08
蛋白 N	1967	2643	1.34	9.40E-04	1671	2415	1.45	6.90E-05

アルドステロン産生腺腫（APA）と特発性アルドステロン症（IHA）における選択された候補蛋白の濃度の中央値とその Fold change 解析。

さらに、PAC と内臓脂肪のいずれにも優位に相関関係を認める蛋白プロファイルを明らかにした（表 2)。

表 2. Spearman rank correlation

	皮下脂肪		内臓脂肪		PAC	
蛋白	Correlation coefficient	P	Correlation coefficient	P	Correlation coefficient	P
蛋白 O	0.51	2.30E-05	0.55	3.30E-06	-0.46	2.90E-04
蛋白 P	0.33	8.70E-03	0.46	1.30E-04	-0.48	1.10E-04
蛋白 Q	0.47	1.00E-04	0.34	5.80E-03	-0.45	4.10E-04
蛋白 R	-0.04	7.80E-01	-0.35	5.10E-03	0.47	1.60E-04
蛋白 S	-0.29	2.40E-02	-0.41	7.90E-04	0.42	8.80E-04
蛋白 T	-0.30	1.70E-02	-0.47	9.70E-05	0.43	6.70E-04
蛋白 U	-0.28	2.50E-02	-0.49	4.90E-05	0.42	9.00E-04
蛋白 V	-0.38	1.90E-03	-0.65	1.00E-08	0.42	9.90E-04

原発性アルドステロン症 (PA) 患者における候補蛋白濃度と皮下脂肪、内臓脂肪、血漿アルドステロン濃度 (PAC) の Spearman 相関係数（Correlation coefficient）

今後は、上記の結果について他施設のコホートを用いて Validation し、最終的に同定した蛋白について細胞実験を進める予定である。

続いて、PA と EH について有意に差のあった 300 種類の蛋白について Pathway 解析を行った。その結果を表 3 に示す。

表 3. Pathway 解析

Term	Count	%	List Total	Pop Hits	Pop Total	Fold Enrichment	P value
Pathway 1	18	6.34	174	251	8205	3.38	2.0E-5
Pathway 2	12	4.23	174	159	8205	3.56	5.2E-4

DAVID Bioinformatics Resources（https://david.ncifcrf.gov/ ）を用いた 300 種類の候補蛋白（7,500 種類の蛋白を background として使用）に対する Pathway 解析の結果を示す。選択された Pathway のみ提示する。

考　察

二次性高血圧の代表疾患である原発性アルドステロン症（PA）は、外科手術の適応となる片側性アルドステロン産生腺腫：APA と、内科治療が一般的な特発性アルドステロン症（両側性副腎皮質過形成: IHA）に大別されるが、KCNJ5 遺伝子等の体細胞変異が原因とされる APA に対し、IHA の病因は未解明であり、治療方針決定のための両者の鑑別法も確立されていない。

その中で我々は本研究で PA 患者の血液検体を用いて、網羅的に蛋白の測定を行い IHA に特徴的な血中蛋白プロファイルを同定した。同定した蛋白のうちの複数で内臓脂肪量と PAC との優位な相関関係を認め、IHA の発症に寄与している可能性が示唆された。今回同定した蛋白はいずれも IHA や APA との関連を報告した論文は

なく新規性は極めて高い。

我々は以前の研究で IHA 患者では APA に比して肥満の頻度が高く、IHA 発症に肥満が関与している可能性を報告した［1］。さらに IHA 患者では血漿アルドステロン濃度（PAC）と内臓脂肪量に有意な相関関係を認めることを明らかにした（未発表）。さらに、脂肪細胞由来の体液性因子と副腎皮質アルドステロン過剰分泌との関連が報告されている［2］。本研究の結果はこれらの関係を媒介する蛋白群を明らかにしたものであり、今後は同定した蛋白について細胞実験を行い、実際にアルドステロン分泌との因果関係を明らかにする必要がある。

文　献

1） Ohno Y, Naruse M, Beuschlein F, Schreiner F, Parasiliti-Caprino M, Deinum J, Drake WM, Fallo F, Fuss CT, Grytaas MA, Ichijo T, Inagaki N, Kakutani M, Kastelan D, Kraljevic I, Katabami T, Kocjan T, Monticone S, Mulatero P, O'Toole S, Kobayashi H, Sone M, Tsuiki M, Wada N, Williams TA, Reincke M, Tanabe A. Adrenal Venous Sampling-Guided Adrenalectomy Rates in Primary Aldosteronism: Results of an International Cohort (AVSTAT). J Clin Endocrinol Metab. 2021 Mar 8;106(3):e1400-e1407. doi: 10.1210/clinem/dgaa706. PMID: 33031550.

2） Ehrhart-Bornstein M, Lamounier-Zepter V, Schraven A, Langenbach J, Willenberg HS, Barthel A, Hauner H, McCann SM, Scherbaum WA, Bornstein SR. Human adipocytes secrete mineralocorticoid-releasing factors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Nov 25;100(24):14211-6. doi: 10.1073/pnas.2336140100. Epub 2003 Nov 12. PMID: 14614137; PMCID: PMC283571.

3） Thomou T, Mori MA, Dreyfuss JM, Konishi M, Sakaguchi M, Wolfrum C, Rao TN, Winnay JN, Garcia-Martin R, Grinspoon SK, Gorden P, Kahn CR. Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues. Nature. 2017 Feb 23;542(7642):450-455. doi: 10.1038/nature21365. PMID: 28199304