

体液性因子による内臓脂肪—副腎連関に着目した 特発性アルドステロン症の病態解明と治療標的の探索

日本大学医学部 内科学系腎臓高血圧内分泌内科学分野

助教 小林 洋輝

(共同研究者)

Research Fellow, Department of Medicine, Monash University, Australia

Dr. Jun Yang

はじめに

序論：

原発性アルドステロン症 (PA) は、副腎からのアルドステロン過剰分泌により二次性高血圧をきたす疾患で、本態性高血圧と比較して脳心血管イベントの頻度が高く、本邦における推定患者数は300万人に上る。PAの病型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、これらの病型の現状唯一の鑑別法である副腎静脈サンプリング (AVS) は、①侵襲度が高い、②実施可能施設に限られる、③医療費が高額（本邦で全PA患者にAVSを施行した場合の推定医療費は約1兆円）等、頻度の高い高血圧の治療方針決定のための検査技術として重大な懸案となっている。

目的：

本研究では、「IHAでは脂肪細胞由来の体液性因子が副腎アルドステロン分泌制御に関与する」という仮説を立て、PA患者の血液検体を用いた網羅的microRNA及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の治療標的、②IHAの新規診断バイオマーカーを明らかにすることを目的とする。本研究によりIHAの治療法、そして診断法の開発、実用化につなげることが最終目標である。

方法：

- 1) 内臓脂肪と血漿アルドステロン濃度の相関関係を解析する
- 2) Discovery cohortにおけるmicroRNA (miRNA)、蛋白の測定、解析

申請者所属施設で診断されたAPA40人、IHA40人、及び本態性高血圧 (EH) 患者40人を対象に、次世代シーケンサーを基盤としたHTG EdgeSeq及びSOMAscan proteomics platformを用いて、血中miRNAと蛋白の網羅的測定を行い、①IHA群に特徴的なmiRNA、蛋白群を明らかにする、②候補miRNA、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う。統計処理に関しては、SAS 9.4を用いる。

3) Validation cohortを用いた候補miRNA、蛋白の検証

1)で同定されたmiRNAと蛋白の検証のため、Validation cohortのPA患者70人(APA 35人、IHA 35人)とEH患者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相関があるものを候補とする。

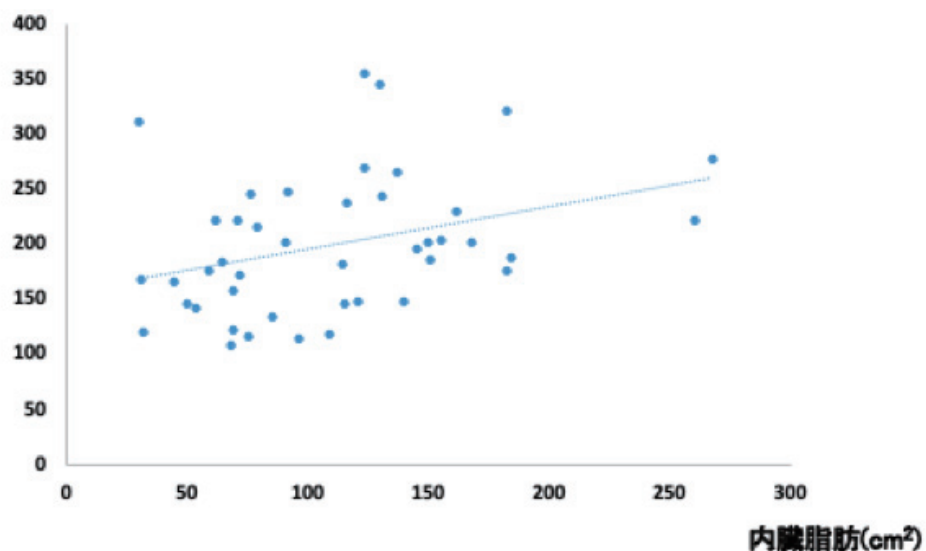
4) Pathway解析、媒介解析による、候補miRNA、蛋白の統合解析

同定したmiRNAのPathway解析として、miRWALK3.0を用いて候補miRNAの標的蛋白(遺伝子)群を明らかにし、前解析で同定した候補蛋白の結果と統合する。選択された蛋白群については、DAVID(オープンアクセス)を用いたKEGG enrichment analysisを行い、IHAの病態に重要なPathwayを明らかにする。また媒介分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miRNA、蛋白がどの程度媒介するのかを明らかにする。

5) 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

同定した候補miRNA、蛋白について、ヒト副腎皮質細胞株であるH295R細胞を用い、アルドステロン合成能に対する影響をCYP11B2、HSD3B1の発現量、アルドステロン濃度等で評価する。

血漿アルドステロン濃度 (pg/ml)



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($r=0.40$, $P=0.0069$)。

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(PNAS. 2003, Nature. 2017)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による約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。

表1 Fold change analysis

蛋白	APA vs IHA (Fold change analysis)				PA vs EH (Fold change analysis)			
	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

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

蛋白	皮下脂肪		内臓脂肪		PAC	
	CC	P	CC	P	CC	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

今後は、上記の結果について他施設のコホートをを用いて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。また、Pathway解析も同時に進める予定である。

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。

その中で申請者は本研究で 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。

要 約

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 に特徴的な極めて新規性の高い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。今後は同定した蛋白について Pathway 解析、媒介解析、細胞実験を行い病態に重要な Pathway やアルドステロン分泌との因果関係を明らかにする。最終的には IHA の病態解明と治療標的、及び診断バイオマーカーを同定することを目標とする。

文 献

1. Ohno Y, et al. 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.
2. Ehrhart-Bornstein M, et al. Human adipocytes secrete mineralocorticoid-releasing factors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Nov 25;100 (24) :14211-6.