



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

CYP11B2遺伝子多型と食塩感受性心肥大

| | |
|-------|--|
| メタデータ | 言語: Japanese 出版者: 公開日: 2008-07-15 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 伊佐治, 真子, 宗, 友厚, 高田, 伸樹, 山本, 頼綱, 高見, 利江子, 山北, 宣由, 諏訪, 哲也, 大洞, 尚司, 武田, 則之, 森田, 浩之, 安田, 圭吾 メールアドレス: 所属: |
| URL | http://hdl.handle.net/20.500.12099/12035 |

CYP11B2 遺伝子多型と食塩感受性心肥大

伊佐治真子*, 宗 友厚*, 高田 伸樹**, 山本 頼綱**, 高見利江子***, 山北 宣由***,
 諏訪 哲也*, 大洞 尚司*, 武田 則之*, 森田 浩之*, 安田 圭吾*
 岐阜大学医学部免疫アレルギー内分泌学講座 内分泌代謝病態学分野* (主任 安田圭吾教授)
 岐阜自衛隊病院内科**
 松波総合病院内科***

CYP11B2 Polymorphisms and Salt-Sensitive Cardiac Hypertrophy

Mako ISAJI*, Tomoatsu MUNE*, Nobuki TAKADA**, Yoritsuna YAMAMOTO**,
 Rieko TAKAMI***, Nobuyoshi YAMAKITA***, Tetsuya SUWA*, Hisashi DAIDO*,
 Noriyuki TAKEDA*, Hiroyuki MORITA* and Keigo YASUDA*

*Division of Bioregulatory Medicine, Department of Endocrinology,
 Diabetes and Rheumatology, Gifu University School of Medicine
 (Director : Prof. K. YASUDA)*

*Department of Internal Medicine, Gifu Self-Defence Hospital
 Department of Internal Medicine, Matsunami General Hospital*

We studied the association of two common diallelic polymorphisms in the aldosterone synthase gene (*CYP11B2*), one in the promoter (-344T/C, in complete linkage disequilibrium with Lys 173Arg) and the other an intron 2 gene conversion, with blood pressure, urinary aldosterone or electrolytes excretion and echocardiographic measurements in a Japanese population. A significant linkage disequilibrium between these polymorphic loci was confirmed. Although the allele frequencies did not differ between normotensives and hypertensives or between higher- and lower-renin hypertensives, the subjects with -344C allele or intron 2 conversion (-) allele had mild association with the parameters of cardiac concentric hypertrophy, independently of blood pressures or hormonal levels. However, we have observed a positive correlation between left ventricular mass and 24hr urinary excretion of sodium and potassium in the subjects with -344CC genotype or intron 2 conversion (-) (-) genotype. These data suggest that the -344C allele, in a complete or significant linkage disequilibrium with the 173Arg allele or the conversion (-) allele, respectively, can be a risk factor for developing salt sensitive cardiac hypertrophy.

Acta Sch Med Univ Gifu 50 : 61-69 (2002)

Key words: *CYP11B2*, -344C/T, intron 2 conversion, cardiac hypertrophy

緒 言

本態性高血圧症はその3～5割が遺伝的な影響を受けるとされ、少なくとも十数種類の疾患感受性遺伝子の関与が想定されている。アルドステロンに代表されるミネラルコルチコイドは、血圧や循環血漿量の調節に必須の役割を果たしているが、効果器での作用発現に至るまでには、副腎での生成と分泌、リセプター前での修飾、リセプターとの結合、誘導蛋白の転写・翻訳の調節など、

複数のステップを経る必要がある。興味深いことに、現在までに判明した単一遺伝子異常による高血圧症や低血圧症は、いずれもこれら過程の遺伝子異常であることから、各過程における遺伝的多様性(遺伝子多型)が血圧異常症に関連する可能性が示唆される。本態性高血圧では、その概ね10～20%において血中のアルドステロン/レニン比が高値、すなわちアルドステロン分泌が比較的亢進していることが知られている。特にこれらの低レニン性高血圧や食塩感受性高血圧においては、アルドステ

ロンの生成から効果発現までの各ステップに存在する頻度の高い遺伝子多型が、単独あるいは総体的にその病因に関連する可能性が考えられる。さらにアルドステロンには血圧や体液増加を介した血行力学的な作用とは別に、心筋線維化や心肥大を起こす直接作用が報告されており、これらの遺伝子多型が血圧のみならず、心機能・心肥大と関連する可能性も示唆される。

副腎皮質の球状層に主として存在するアルドステロン合成酵素 (ミトコンドリア P-450_{aldo}) は、基質である11-デオキシコルチコステロンから、11 β 位水酸化、続く18位水酸化、18位脱水素化を経てアルドステロンを生合成する。一方、11 β 水酸化酵素 (P-450_{c11}) は、副腎皮質束状層において11-デオキシコルチゾールを水酸化しコルチゾールを生合成する。すなわち、これら2つの酵素はアルドステロンおよびコルチゾール生合成の最終段階を担っている。アルドステロン合成酵素遺伝子 (*CYP11B2*) および11 β -水酸化酵素遺伝子 (*CYP11B1*) は、8q24.3に隣接して存在し、これら遺伝子の変異によって、遺伝性的高血圧や低血圧疾患が生じる¹¹⁻¹⁴。例えば、グルココルチコイド反応性アルドステロン症 (GSH) は、5'側の *CYP11B1* と3'側の *CYP11B2* が融合したキメラ遺伝子により、ACTH の支配を受ける形で *CYP11B2* の発現が増加、アルドステロン分泌が亢進、ミネラルコルチコイド過剰型の高血圧を呈する優性遺伝疾患である⁵。一方、*CYP11B2* の変異によりアルドステロンの生合成が障害され塩類喪失にいたる、アルドステロン合成酵素欠損症⁶も知られている。

CYP11B2 にはこれまでにいくつかの多型が報告されているが、特に注目すべきは、プロモーター領域の-344 C/T 多型である。この多型は、ステロイド合成酵素の主な転写因子である SF-1¹⁷の想定結合部位の一部である、スタートコドンより344塩基上流部位が、シトシン (C) またはチミジン (T) 塩基 (-344C または-344T アリル) となる多型である。*CYP11B2* の第3エクソンに位置する Lys173Arg (K173R) は、-344T/C と連鎖することが報告され、低レニン性高血圧症との関連も示唆されている⁸⁾⁻¹⁰⁾。さらに、*CYP11B2* の第2イントロンの塩基配列のほとんどが、近接する *CYP11B1* の塩基配列に置き換わった遺伝子転換 (gene conversion) 多型がある¹¹⁾ (intron 2 conversion)。この遺伝子転換は、-344T との関連においてのみ認められるとされている。近年、これらの遺伝子多型と、血圧や心室構造、心機能との間の関連が報告されているものの、一致した結論には至っていない。

本研究では、日本人における *CYP11B2* 遺伝子多型の頻度、さらにこれらの多型と血圧、尿中電解質およびアルドステロン排泄量、心エコー計測所見との関連について検討した。

対象と方法

対象

対象は岐阜大学医学部附属病院第3内科の内分泌・高血圧外来に通院中の高血圧患者、岐阜自衛隊病院および松波総合病院を受診した検診者から無作為に抽出した。尿中アルドステロンおよび電解質排泄量と心エコーデータとの関連の解析にあたっては、運動負荷による心機能への影響、および薬剤によるホルモン値への影響といったバイアスを避けるため、投薬を受けていない岐阜自衛隊病院の検診者 (221名の男性) を対象とした。安静時血圧は、座位にて水銀式血圧計を使用し上腕動脈にて測定した。正常血圧群は、降圧剤を内服しておらず心疾患を有さない、血圧が140/90mmHg未満の者とした。治療なしに収縮期血圧が140mmHg以上または拡張期血圧90mmHg以上の者、あるいは既に本態性高血圧症の診断にて降圧剤を内服中の患者を高血圧群とした。二次性高血圧は身体所見、生化学的および放射線学的検査により除外した。なお、ホルモン検査および心エコー所見の解析にあたっては、カルシウム拮抗薬やACE阻害薬内服中の患者は除外した。身長、体重は軽い着衣にて測定し、BMIは身長/体重² (kg/m²) により算定した。対象からはインフォームドコンセントを得た。

対象となった正常血圧群および高血圧群の臨床所見を Table 1 に示す。高血圧群は正常血圧群に比し年齢が高く、BMI が大きい傾向にあった。血圧については、一部の高血圧群での血圧測定が降圧剤内服下に行なわれたにもかかわらず、収縮期、拡張期とも正常血圧群に比し有意に高値であった。

Table 1 Clinical Parameters of the studied subjects

| | Normotensives | Hypertensives |
|------------------------|------------------|-------------------|
| Male/Female | 440 / 95 | 230 / 130 |
| Age, y | 49.6 \pm 7.7 | 54.6 \pm 10.5 |
| BMI, kg/m ² | 23.3 \pm 2.8 | 24.6 \pm 3.6 |
| systolic BP, mmHg | 117.9 \pm 12.3 | 154.0 \pm 17.1* |
| diastolic BP, mmHg | 73.2 \pm 28.7 | 90.6 \pm 12.1* |
| serum Na, mEq/L | 142.3 \pm 2.0 | 141.0 \pm 2.6 |
| serum K, mEq/L | 4.15 \pm 0.29 | 4.14 \pm 0.44 |

Data are mean \pm SD, *; p<0.05

血中および尿中電解質、ホルモン測定

24時間蓄尿検体にて尿中アルドステロン、ナトリウム、カリウム、クレアチンを測定した。末梢血液は、早朝空腹時臥位にて少なくとも30分以上の安静後に採取し、血中電解質およびホルモンの測定に供した。尿中アルドステロン (U-Ald)、血中アルドステロン (PAC) は Aldosterone-RIA Kit (シオノギ) により、血中レニン活性 (PRA) は Renin RIA Bead (ダイナボット) により測定した。全ての計測において2回測定の平均値を採

用した。PAC/PRA 比は PAC(pg/ml)/PRA(ng/ml/hr) として表示した。なお本態性高血圧患者における PAC/PRA 比は200未満と報告されている¹²⁾。

カリウムクリアランス (C_K) は

$$C_K \text{ (ml/min)} = (U_K \times V) / P_K$$

U_K : 尿中カリウム濃度, P_K : 血中カリウム濃度, V : 分時尿量

ナトリウム排泄率 (FENa) は

$$\text{FENa (\%)} = 100 \times (P_{Cr} \times U_{Na}) / (P_{Na} \times U_{Cr})$$

P_{Cr} : 血中クレアチニン濃度, U_{Cr} : 尿中クレアチニン濃度, P_{Na} : 血中ナトリウム濃度, U_{Na} : 尿中ナトリウム濃度

にて算定した。

心エコー計測

左室拡張終期径 (LVEDD), 左室収縮終期径 (LVESD), 拡張終期心室中隔厚 (IVST), 左室後壁厚 (LVPWT) は, 3.75MHzプローベを用い (Powervision 380A, 東芝), アメリカ心エコー学会のガイドライン¹³⁾に則り, Mモードの2方向計測にて測定した。体表面積 (BSA), 左室心筋重量 (LVM)¹⁴⁾, 相対的左室壁厚 (RWT) は下記により算定した。

$$\text{BSA (m}^2\text{)} = \text{体重}^{0.425} \text{ (kg)} \times \text{身長}^{0.725} \text{ (cm)} \times 0.007184$$

$$\text{LVM (g)} = (1.04 [\text{LVEDD} + \text{LVPWT} + \text{IVST}]^3 - \text{LVEDD}^3) - 13.6\text{g}$$

$$\text{RWT} = (\text{IVST} + \text{LVPWT}) / \text{LVEDD}$$

遺伝子多型の検出

遺伝子多型の検出は PCR-RFLP 法により行った。末梢血を EDTA-2Na またはヘパリン Na 入りのチューブに採取し, 標準的なフェノールクロロホルム法により末梢リンパ球から高分子 genomic DNA を抽出, 4°C にて保存した。ヘパリン採血より抽出した DNA サンプルでは, ヘパリンによる阻害作用を取り除くため, ヘパリナーゼ I (シグマケミカル) を 1U/ μg DNA 添加し 30°C にて 30分間処理した¹⁵⁾。

-344C/T プロモーター領域の増幅には, 5'-CAT TTG TCA AAA CCC ACA GC-3' (センス, nt-579~560) および 5'-TCA CGT CAT GGG AGA ACT GG-3' (アンチセンス, nt-90~-71) の各プライマーを使用した。各 DNA サンプル 50ng に対し, 各 5 pmol のセンスおよびアンチセンスプライマー, 既報¹⁶⁾の PCR バッファーを用い, 0.25U の Ex Taq DNA ポリメラーゼ (タカラ) を添加, 10 μl 容量で, DNA 断片を増幅した。96°C にて 2 分の最初の熱変性後, 96°C にて 20 秒の熱変性, 62°C にて 20 秒のアニーリング, 72°C にて 20 秒の伸長反応を 32~40 サイクル行い, さらに 72°C にて 5 分の最終伸長反応を行った。PCR 反応物は HaeIII 制限酵素により, 37°C にて一晩処理し, 3.5% アガロースゲルにて電気泳動後, エチジウムブロマイドにて染色し UV 光下に観察した。T アリルは 234bp 長のバンドとして, C アリルは 305

bp 長のバンドとして観察された。

Lys173Arg と intron 2 conversion は, 5'-GCT CGG GCC CCT AGG ACG-3' (センス, エクソン 1, nt 85-102) および 5'-TGG GGC TGG ACC TTC CCG CAT-3' (アンチセンス, 5'-イントロン 3) プライマーを使用し, 前述の PCR バッファーと 0.25U の XL Taq DNA ポリメラーゼ (タカラ) により増幅した。96°C にて 2.5 分の最初の熱変性後, 80°C にてマニュアルホットスタートすなわち DNA ポリメラーゼを添加し, 96°C にて 25 秒の熱変性, 68°C にて 2.5 分のアニーリングおよび伸長反応を 35~42 サイクル行い, 72°C にて 10 分の最終伸長反応を行った。増幅された DNA 断片は, Lys173Arg については Cvn I, intron 2 conversion については Apa I 制限酵素により 37°C にて一晩処理後, 前者は 2.2%, 後者は 0.8% のアガロースゲルにて電気泳動した。173Arg アリルは 111bp および 517bp のバンドとして, 173Lys アリルは 628bp のバンドとして観察された。一方, intron 2 conversion 多型の conversion なしを (-), conversion ありを (+) とすると, conversion (-) アリルは 1402bp のバンドとして, conversion (+) アリルはそれより短いバンド (1200~1350bp 付近であるが正確な断片長は確定していない) として観察された。

統計解析

頻度データの解析は χ^2 乗検定により行い, $P < 0.05$ を有意とした。各遺伝子型間の身体計測データ ($n=762$, 無治療群) の差の検定は, SAS (Statistical Analysis System) の重回帰分析 (GLM Procedure) を用い, 年齢, 性別, BMI で補正した後に比較解析した。心エコーデータ ($n=221$) については, 年齢, BMI, 収縮期血圧にて補正の後, 比較解析した。なお, 遺伝子型が心エコーデータ計測値におよぼす影響を解析する際には, 尿中電解質排泄も補助変数に加えた。3 群間の比較時には, 補正した P 値, すなわち $P < 0.01695$ の場合を 5% 以下の危険率で有意差ありと判定した。各々の遺伝子型における電解質およびホルモン値の, 心拡大や心筋重量との相関については, Pearson の部分相関解析法にて解析した。

結 果

高血圧との関連

今回の検討全例で, 173Arg アリルは -344C アリルと完全に連鎖していたため, 以下 Arg173Lys 多型は -344C/T 多型と同義として記載する。CYP11B2 の, -344C/T 多型と intron 2 conversion 多型との頻度分布を Table 2 に示す。二つの多型の間には連鎖不均衡が確認され ($P < 0.001$), intron 2 conversion (+) アリルは -344T アリルとの関連においてのみ認められた。従って, -344C/Arg173 と -344T/Lys173 ハプロタイプは, 後者のハプロタイプから intron conversion 多型が発生する以前に存在していたことが推察される。-344C/T 多型は, TT が 353 人, CT が 428 人, CC が 114 人に認められ,

T アリル: C アリルの頻度は正常血圧群で63.6:36.4%, 高血圧群で63.1:36.9%であり, 正常血圧群, 高血圧群間に頻度差を認めなかった ($\chi^2=0.022$, $P=0.883$)。intron 2 conversion 多型では, (+/+)が303人, (+/-)が446人, (-/-)が146人に認められ, (+)アリル: (-)アリル頻度は正常血圧群で59.6:40.4%, 高血圧群では57.5:42.4%であり, やはり両群間に差を認めなかった ($\chi^2=0.083$, $P=0.774$)。

低レニン性高血圧との関連

早朝空腹安静下のレニン, アルドステロン測定を行った126名の高血圧患者において, 中央値 (PAC/PRA=100)を基準に低レニン性高血圧群と高レニン性高血圧群とに分け, アリル頻度を検討した。Table 3に示すように, 低レニン性高血圧群において conversion (+) アリルの頻度が絶対数としては多かったが, -344C/T 多型 ($P=0.343$)に関しても, intron 2 conversion 多型 ($P=0.192$)に関しても, 有意なアリル頻度差を認めず, 低レニン性高血圧と特定のアリルとの関連は確認できなかった。

Table 2 Distribution of promoter -344C/T genotypes in relation to intron 2 conversion genotypes

| | Normotensives | | | Hypertensives | | |
|--------|---------------------|---------|---------|---------------------|---------|---------|
| | Intron 2 conversion | | | Intron 2 conversion | | |
| | (-)/(-) | (-)/(+) | (+)/(+) | (-)/(-) | (-)/(+) | (+)/(+) |
| -344CC | 71 | 0 | 0 | 43 | 0 | 0 |
| -344CT | 11 | 237 | 0 | 15 | 165 | 0 |
| -344TT | 3 | 25 | 188 | 3 | 19 | 115 |

Table 3 Allele Frequencies by the PAC/PRA ratios in hypertensives

| | -344 C/T | | Intron 2 conversion | |
|---------------|----------|------|---------------------|--------|
| | T(%) | C(%) | (+)(%) | (-)(%) |
| PAC/PRA ≤ 100 | 61.2 | 38.8 | 53.7 | 46.3 |
| PAC/PRA > 100 | 66.9 | 33.1 | 61.9 | 38.1 |

Table 4 Anthropometric and Biochemical Data according to the -344C/T and the Intron 2 conversion genotype

| | n | promoter -344 C/T | | | intron 2 conversion | | |
|---------------------|-----|-------------------|-----------|-----------|---------------------|-----------|-----------|
| | | CC | CT | TT | (-)/(-) | (-)/(+) | (+)/(+) |
| systolic BP (mmHg) | 762 | 127.6±20 | 129.5±1.1 | 128.7±1.2 | 129.6±1.8 | 129.7±1.0 | 127.4±1.2 |
| diastolic BP (mmHg) | 762 | 80.3±1.3 | 79.2±0.6 | 79.1±0.7 | 80.9±1.1 | 79.2±0.6 | 78.7±0.8 |
| FENa (%) | 238 | 0.76±0.11 | 0.82±0.06 | 0.79±0.06 | 0.81±0.11 | 0.81±0.05 | 0.78±0.07 |
| Ck (ml/min) | 238 | 7.6±0.9 | 7.6±0.4 | 7.6±0.5 | 7.8±0.9 | 7.5±0.4 | 7.7±0.6 |
| uAld (μg/24hr) | 212 | 5.8±0.7 | 6.2±0.4 | 6.2±0.4 | 5.8±0.7 | 6.1±0.4 | 6.5±0.5 |

Above data were derived from subjects without medication. Data are LS Mean ± SE.

BP; blood pressure, FENa; fractional excretion of sodium, Ck; potassium clearance, uAld; urinary pH1 aldosterone excretion.

Table 5 Echocardiographic Data according to the -344C/T and the Intron 2 conversion genotype

| | n | promoter -344 C/T | | | intron 2 conversion | | |
|------------|---|-------------------|-------------|------------|---------------------|------------------|-----------------|
| | | CC n=30 | CT n=108 | TT n=83 | (-)/(-) n=33 | (-)/(+) n=116 | (+)/(+) n=72 |
| LVEDD (mm) | | 49.5±0.8 | 48.5±0.4 | 49.0±0.5 | 49.2±0.8 | 48.6±0.4 | 49.1±0.5 |
| LVESD (mm) | | 31.1±0.7 | 30.6±0.4 | 30.7±0.4 | 30.9±0.7 | 30.7±0.4 | 30.8±0.5 |
| IVST (mm) | | 9.6±0.3 | 10.2±0.1** | 9.7±0.2 | 9.7±0.3 | 10.2±0.1** | 9.7±0.2 |
| LVPWT (mm) | | 9.5±0.2 | 10.0±0.1 | 9.6±0.1 | 9.6±0.2 | 10.0±0.1* | 9.6±0.2 |
| RWT | | 0.39±0.01 | 0.42±0.01* | 0.40±0.01 | 0.39±0.01 | 0.42±0.01* | 0.39±0.01 |
| LVM (g) | | 197±9 | 207±5 | 199±6 | 197±9 | 207±5 | 198±6 |

Above data were derived from 221 male subjects without medication. Data are LS Mean ± SE. *, $0.05 < P < 0.10$, **, $P < 0.05$ vs TT or (+)/(+).

LVEDD and LVESD; left ventricular end-diastolic and end-systolic dimension, IVST; interventricular septal thickness, LVPWT; left ventricular posterior wall thickness
RWT; relative wall thickness [(septal wall+posterior wall) / left ventricular end-diastolic dimension], LVM; left ventricular mass

血圧、電解質、ホルモンデータと遺伝型との関連

-344C/T 多型および intron 2 conversion 多型に関して、各遺伝型における血圧, FENa, Ck, 尿中アルドステロン排泄量を Table 4 に示す。各遺伝型間の比較において、これらの指標に有意な差は検出されなかった。

心エコー計測データと遺伝型との関連

Table 5 に示すように、-344CT 遺伝型の IVST および RWT は、-344TT 遺伝型に比し有意に大きく (P=0.0149 および P=0.0225), 同様に intron 2 conversion 多型に関しても、(-/+)型においては (+/+)型に比し、IVST (P=0.0138), LVPWT (P=0.0228), RWT (P=0.0176) が有意に大であった。これらの関連は、年齢, 性別, BMI, 収縮期血圧, 尿中ナトリウム排泄量といった心エコー計測数値に影響する因子とは無関係であり、同様の傾向は、正常血圧群, 高血圧群に区分して検討した場合にも認められた。

各多型間での比較における心エコー計測値と尿中ナトリウム, カリウム排泄との関連

正常血圧者と高血圧者を含む、内服治療を受けていない221名の男性における、LVM と、24時間尿中ナトリウム排泄量 (uNa) およびカリウム排泄量 (uK) との関連を、各-344C/T 多型の遺伝型ごとに比較したものを、Fig. 1 に示す。年齢, 体表面積, 血圧で補正した後も、-344CC 遺伝型においてのみ、LVM と uNa (r=0.50, P=0.011) および uK (r=0.54, P=0.006) との間に有意な正の相関を認めた。同様に LVEDD についても、-344CC 遺伝型においては uNa (r=0.50, P=0.011), uK (r=

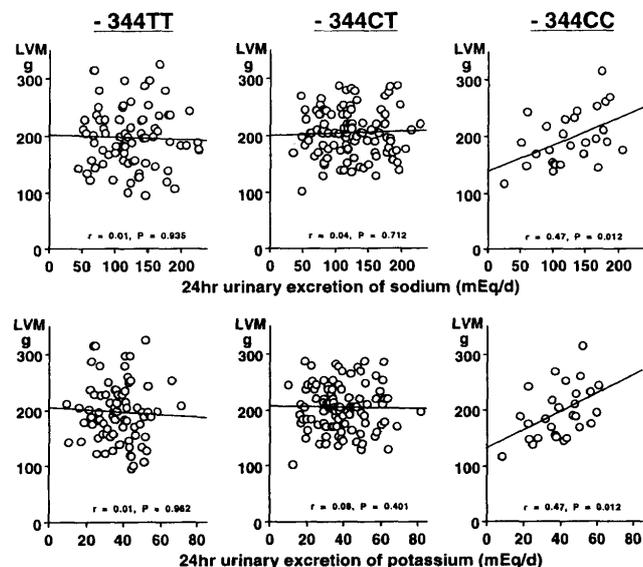


Fig. 1 The association of left ventricular mass with 24hr urinary excretion of sodium and potassium in relation to the -344C/T polymorphism. Results of Pearson's correlation analysis without any adjustment were indicated.

0.52, P=0.008) と有意な正相関を認めたが、-344CT および-344TT 遺伝型においては相関を認めなかった。intron 2 conversion 多型での同様の解析では、(-/-)型において LVEDD と LVM が uNa (r=0.39, P=0.043 および r=0.42, P=0.031), uK (r=0.47, P=0.012 および r=0.51, P=0.006) と有意な相関を示した。

考 察

今回、我々は、CYP11B2 の-344C/T 多型(Arg173Lys 多型と完全に連鎖), intron 2 conversion 多型が、日本人において連鎖不均衡にあることを確認した。これまでに報告された-344C/T 多型のアリル頻度を比較すると、有意な人種差が認められる。Fig. 2 に示すように日本人, チリ人, アメリカ黒人, イタリア人では、ドイツ人, スコットランド人, フィンランド人, フランス人, アメリカ白人に比し、-344C アリルの頻度が低かった。このような人種差は、遺伝子多型といくつかのパラメーター間の関連に関して、これまでの報告結果が一致しない原因の一つと考えられる。

Ethnicity <Reference No.>

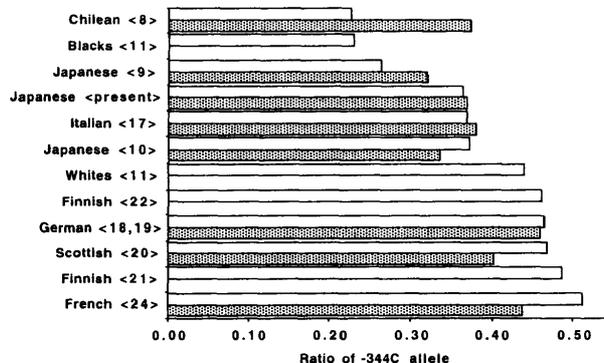


Fig. 2 Racial differences in -344C allele frequency. The open columns denote the ratio of C allele of -344 C/T polymorphism in normotensives and the hatched columns denote those in hypertensives.

Table 6 に、これらの遺伝子多型と血圧, 心室構造や機能などとの関連について、これまでの報告をまとめた^{8)-10),17)-25)}。-344C/T 多型については、-344T アリルが高血圧と関連するとの報告もあれば^{8),10),20),25)}、関連しないという報告もある^{9),17)-19),22)-24)}。ホルモンデータでは、-344C アリルが高 PAC/PRA および低レニン性高血圧に関与するという報告^{9),24)}がある一方、-344T アリルにおいて尿中アルドステロン排泄量高値という報告もみられる^{20),21)}。心エコー計測データでは、Kupari らは-344C アリルと心拡大, 心筋重量増大, 心拡張能障害²²⁾ および心筋梗塞のリスク増大²³⁾との関連を報告しているが、別の人種での大規模集団を対象とした検討においては、これらの関連は確認されていない^{18),19)}。また intron 2 conversion 多型に関する報告は少ないが、高血圧群において conversion (+) アリルが有意に多いとする報

Table 6 Summary of the studies on the association between CYP11B2 genotypes and blood pressure, hormonal or echocardiographic parameters.

| Reference <No.> Authors | genetic background | sex | age (yrs) | number of subjects | -344C/T C allele (%) | association | intron 2 conversion conv.(+) allele (%) | association |
|---|-----------------------|-----|----------------|----------------------------|-------------------------|-----------------------------------|--|-----------------------|
| <8.> Fardella et al. | Chilean | F/M | mean 48-52 | H: 52 N: 52 | H: 37.5 N: 22.7 | T (Lys173); HTN | | |
| Data in this report <9.> Tamaki et al. | Japanese | F/M | mean 50-55 | H: 360 N: 535 | H: 36.9 N: 36.4 | C; IVST, RWT | H: 57.5 N: 59.6 | (-): IVST, RWT, LVPWT |
| <10.> Komiya et al. | Japanese | F/M | <65 | H: 255 N: 227 | H: 32.2 N: 26.4 | C: HTN, LVD, PAC/PRA | | |
| <17.> Mulatero et al. | Italian | F/M | 44-65 | H: 73 N: 134 | H: 33.6 N: 37.3 | T; low-renin HTN | | |
| <18.> Schunkert et al. | German | F/M | mean 50-52 | H: 72 N: 102 | H: 38.2 N: 36.9 | | | |
| <19.> Hengstenbrg et al. | German | F/M | mean 51.9-52.3 | H&N: 1445 | H&N: 46.5 | | | |
| <20.> Davies et al. | Scottish | F/M | 25-64 | N: 1675 MI: 606 | H: 46.0 N: 46.5 | T; HTN T; urinary Ald | H: 44.0 N: 57.5 | (+); HTN |
| <21.> Hautanena et al. | Finnish | M | 30-55 | H: 138 N: 138 N: 486 | H: 40.3 N: 46.9 | C; systolic HTN T; urinary Ald | | (+); urinary Ald |
| <22.> Kupari et al. | Finnish | F/M | 36-37 | H: 24 N: 68 | N: 48.8 | C; LVM, LVD, E/A | N: 35.7 | (-); LVD, LVM, E/A |
| <23.> Hautanen et al. | Finnish | M | 40-57 | N: 270 MI: 141 | | C; MI risk | | |
| <24.> Pojoga et al. | French | F/M | mean 46.5-48.4 | H: 211 | | C; PAC T; PRA | | |
| <25.> Brand et al. | French | F/M | mean 44-52 | H: 395 N: 293 | H: 43.9 N: 51.2 | T: HTN | | |

F; female, M; male, H; hypertensives. N; normotensives. MI; subjects with myocardial infarction, HTN; hypertension

C; -344C, T; -344T, (+); conversion (+) allele, (-); conversion (-) allele. The parameters listed after alleles indicate the parameters of positive association.

告²⁰⁾がある一方、関連を認めないとする報告²¹⁾も見られる。また、conversion(+)アレルにて尿中アルドステロン排泄量高値という報告²¹⁾や、conversion(-)アレルにて心拡大、心筋重量増大とは関連するが、心室中隔壁厚とは関連しないとする報告²²⁾もあり、やはり一致した見解には至っていない。

今回の我々の検討では *CYP11B2* 多型と血圧やホルモンレベルとの間に明らかな関連や相関は確認できなかったが、-344CT あるいは intron 2 (-/+) 遺伝型では、それぞれ TT あるいは (+/+) 遺伝型に比し、心臓の求心性肥大のパラメーターである心室中隔壁厚は増大しており、相対的左室壁厚、左室後壁厚においても同様の傾向を示していた。

近年、アルドステロンが局所のミネラルコルチコイドリセプターを介して、心筋線維化(コラーゲン生成と線維芽細胞増殖)を促進し^{26),27)}、求心性肥大(リモデリング)を引き起こすことが示唆されている。アルドステロンは小血管中膜のフィブリノイド壊死、引き続く組織壊死と線維化を惹起するが²⁸⁾、この作用は血圧とは無関係に血中アルドステロン濃度に応じて起こるとされる。アルドステロンが、血圧と無関係な心筋肥大作用を有することは、健常者のみならず本態性高血圧、原発性アルドステロン症、慢性腎不全の患者においても臨床的に証明されている²⁹⁾⁻³²⁾。最近の RALES (Randomized Aldactone

Evaluation Study) 試験においても、ACE 阻害剤のみならず、スピロラクトンが血中電解質濃度や血圧に影響することなく、心不全による入院や心不全・突然死などによる死亡リスクを減少させることが証明され³³⁾、慢性心不全に果たすアルドステロンの役割が注目されている。従って少なくとも-344C および intron 2 (-) アレルを有する日本人では、おそらく後述する食塩摂取とアルドステロン分泌との総合的なミネラルコルチコイド作用の増加が心臓の求心性肥大に影響するのではないかと推察される。

今回の結果で注目すべきは、-344CC および intron 2 (-/-) 遺伝型においてのみ、心筋重量と左室拡張終期径が尿中ナトリウムおよびカリウム排泄量と正相関することが明らかになった点である。心筋重量と食塩摂取量との関連は、Kupari ら²²⁾が報告しているが、今回の24時間排泄量の結果はこの関係をさらに支持、補強するものといえる。すなわち、-344C あるいは intron 2 (-) アレル保有者は食塩負荷に際し心肥大を生じやすい(食塩感受性心肥大を起こしやすい)、別の言い方をすれば食塩制限により心肥大を回避できるのではないかと推察される。さらに特有の遺伝型におけるこの食塩摂取と心肥大との関連は、これまでの *CYP11B2* 多型と主に心肥大との関連についての報告が一致しないことを一部説明できると思われる。前述の *CYP11B2* 多型頻度に加え食塩

摂取量にも人種差があることはよく知られている。日本人は、心筋重量に関して食塩の影響を受けやすい-344Cあるいはintron 2 (-)アリの頻度が少ないため、食塩摂取量が多くても、総体的に影響が出にくい可能性がある。これに対し、これらのアリ頻度の高い人種のうち食塩摂取の多いフィンランド人では *CYP11B2* 多型と心筋重量などの関連がより強く検出された^{22),23)}可能性が考えられる。逆に、-344C・intron 2 (-)アリ頻度が高い人種でも、比較的食塩摂取量の少ない場合にはこれらのアリによる心肥大などへの影響がマスクされる可能性があり、既報の結果^{18),19)}を一部説明可能と考えられる。

正常副腎組織やアルドステロン産生腫瘍における我々のプレリミナリーな検討³⁴⁾では、173Argアリ保有者は副腎における *CYP11B2* mRNA 発現量が少ないとの結果を得ている。173Argアリと完全に連鎖する-344Cアリは、-344Tアリに比し、SF-1⁷⁾(Ad 4 BP; 副腎皮質ステロイドホルモン合成酵素発現に必須の転写因子)に5倍強く結合することが知られており、この結果は一見矛盾している様に見える。しかし最近、SF-1は確かに *CYP11B1* や *CYP17* などの他のステロイド合成酵素を正に調節すなわち転写を促進するが、*CYP11B2* 転写に関してはむしろ抑制的に働くことが報告³⁵⁾され、-344Cアリでの *CYP11B2* 発現低下に合致することが判明した。-344Tアリでは、中間表現型の一つと考えられる尿中アルドステロン排泄量が多いことが示唆^{20),21)}されており、今回の検討でも遺伝型間に有意差は検出されなかったものの、-344T・intron 2 (+)アリでやや高値を示し、副腎 *CYP11B2* 発現の相対的増加を支持する結果と考えられる。しかしながら、ヒト副腎皮質培養細胞での agonists による *CYP11B2* 転写調節に関しては、-344Cアリと-344Tアリとの間に有意な差がないことも示されており、さらなる検討が必要である。いずれにせよ副腎での *CYP11B2* 基礎発現レベルが少ない状態が、どのようにして心臓の求心性肥大作用に関与するのだろうか? 副腎以外に局所でのアルドステロン生成が示唆されている部位、例えばラットの心筋³⁶⁾やヒトの血管系³⁷⁾では、副腎に比し *CYP11B2* の転写による影響が少ないとも考えられるが、我々の結果を説明するには充分ではない。副腎に充分な *CYP11B2* 発現を有する-344T・intron 2 (+)アリでは、食塩負荷に速やかに順応してアルドステロン分泌が減少する、との逆の説明も可能ではあるが推測の域を出ない。やはり食塩摂取量との相互作用によると考えるのが妥当と考えられる。

また、尿中カリウム排泄量との関連からは、アルドステロン以外のミネラルコルチコイド生成代謝経路の関与も考えられるが、その詳細は不明であり、今後の検討課題である。

結 語

CYP11B2 多型の-344C および intron 2 conversion

(-)アリの頻度分布に関する人種差が、食塩摂取量の人種差と相まって、これまでの報告結果が一致しない原因の一つと考えられる。

今後、*CYP11B2* 多型が高血圧や心肥大の病因として果たす役割を明らかにするために、また各個人の遺伝的背景に応じた生活指導をすすめていく上でも、スピロラクトンやレニン・アンジオテンシン系阻害薬の投与が各々の遺伝型において血圧や心肥大にどのように影響を及ぼすか、といった臨床的介入研究が必須と考えられる。

引 用 文 献

- 1) Curnow KM, Tusie-Luna MT, Pascoe L, Nataraajan R, Gu JL, Nadler JL, White PC: The product of the *CYP11B2* gene is required for aldosterone biosynthesis in the human adrenal cortex. *Mol Endocrinol* **5**, 1513-1522 (1991)
- 2) White PC, Curnow KM, Pascoe L: Disorders of steroid 11 β -hydroxylase isozymes. *Endocr Rev* **15**, 421-438 (1994)
- 3) Geley S, Kapelari K, Jahrer K, Peter M, Glatzl J, Vierhapper H, Schwarz S, Helmbert A, Sippell WG, White PC, Kofler R: *CYP11B1* mutations causing congenital adrenal hyperplasia due to 11 β -hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* **81**, 2896-2901 (1996)
- 4) Rayney WE. Adrenal zonation: clues from 11 β -hydroxylase and aldosterone synthase: *Mol Cell Endocrinol* **151**, 151-160 (1999)
- 5) Pascoe L, Curnow KM, Slutsker L, Connell JM, Speiser PW, New MI, White PC: Glucocorticoid-suppressible hyperaldosteronism results from hybrid genes created by unequal crossovers between *CYP11B1* and *CYP11B2*. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 8327-8331 (1992)
- 6) Mitsuuchi Y, Kawamoto T, Rasler A, Naiki Y, Miyahara K, Toda K, Kuribayashi I, Orii T, Yasuda K, Miura K, Nakao K, Imura H, Ulick S, Shizuta Y: Congenitally defective aldosterone biosynthesis in humans: the involvement of point mutations of the P-450C18 gene (*CYP11B2*) in CMOII deficient patients. *Biochem Biophys Res Commun* **182**, 974-979 (1992)
- 7) Lala DS, Rice DA, Parker KL: Steroidogenic factor I, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu

- factor I. *Mol Endocrinol* **6**, 1249-1258 (1992)
- 8) Fardella CE, Rodriguez H, Montero J, Zhang G, Vignolo P, Rojas A, Villarroel L, Miller WL: Genetic variation in P450c11AS in Chilean patients with low renin hypertension. *J Clin Endocrinol Metab* **81**, 4347-4351 (1996)
 - 9) Tamaki S, Iwai N, Tsujita Y, Kinoshita M: Genetic polymorphism of CYP11B2 gene and hypertension in Japanese. *Hypertension* **33** [part II] , 266-270(1999)
 - 10) Komiya I, Yamada T, Takara M, Asawa T, Shimabukuro M, Nishimori T, Takasu N: Lys173 Arg and -344T/C variants of CYP11B2 in Japanese patients with low-renin hypertension. *Hypertension* **35**, 699-703 (2000)
 - 11) White PC, Slutsker L: Haplotype analysis of CYP11B2. *Endocr Res* **21**, 437-442 (1995)
 - 12) Hiramatsu K, Yamada T, Yukimura Y, Komiya I, Ichikawa K, Ishihara M, Nagata H, Izumiyama T: A screening test to identify aldosterone-producing adenoma by measuring plasma renin activity: results in hypertensive patients. *Arch Intern med* **141**, 1589-1593 (1981)
 - 13) Sahn DJ, DeMaria A, Kissilo J, Weyman A: Recommendations regarding quantation in M-Mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation* **58**, 1072-1083 (1978)
 - 14) Devereux RB, Reichek N: Echocardiographic determination of left ventricular mass in man: anatomic validation of the method. *Circulation* **55**, 613-618 (1977)
 - 15) Taylor AC: Titration of heparinase for removal of the PCR-inhibitory effect of heparin in DNA samples. *Molecular Ecology* **6**, 383-385 (1997)
 - 16) Mune T, White PC: Apparent mineralocorticoid excess: genotype is correlated with biochemical phenotype. *Hypertension* **27**, 1193-1199 (1996)
 - 17) Mulatero P, Schiavone D, Fallo F, Rabbia F, Pilon C, Chiandussi L, Pascoe L, Veglio F: CYP11B2 gene polymorphisms in idiopathic hyperaldosteronism. *Hypertension* **35**, 694-698 (2000)
 - 18) Schunkert H, Hengstenberg C, Holmer SR, Broeckel U, Luchner A, Muscholl MW, Kxrzinger S, Daring A, Hense H, Riegger GAJ: Lack of association between a polymorphism of the aldosterone synthase gene and left ventricular structure. *Circulation* **99**, 2255-2260 (1999)
 - 19) Hengstenberg C, Holmer SR, Mayer B, Lawel H, Engel S, Hense HW, Riegger GAJ, Schunkert H: Evaluation of the aldosterone synthase (CYP11B2) gene polymorphism in patients with myocardial infarction. *Hypertension* **35**, 704-709 (2000)
 - 20) Davies E, Holloway CD, Ingram MC, Inglis GC, Friel EC, Morrison C, Anderson NH, Fraser R, Connell JMC: Aldosterone excretion rate and blood pressure in essential hypertension are related to polymorphic differences in the aldosterone synthase gene CYP11B2. *Hypertension* **33**, 703-707(1999)
 - 21) Hautanena A, Lankinen L, Kupari M, Jänne OA, Adlercreutz H, Nikkilä H, White PC: Associations between aldosterone synthase gene polymorphism and the adrenocortical function in males. *J Int Med* **244**,11-18 (1998)
 - 22) Kupari M, Hautanen A, Lankinen L, Koskinen P, Virolainen J, Nikkilä H, White PC: Associations between human aldosterone synthase (CYP11B2) gene polymorphisms and left ventricular size, mass, and function. *Circulation* **97**, 569-575 (1998)
 - 23) Hautanen A, Toivanen P, Mänttari M, Tenkanen L, Kupari M, Manninen V, Kayes KM, Rosenfeld S, White PC: Joint effects of aldosterone synthase (CYP11B2) gene polymorphism and classic risk factors on risk of myocardial infarction. *Circulation* **100**, 2213-2218 (1999)
 - 24) Pojoga L, Gautier S, Blanc H, Guyene T, Poirier O, Cambien F, Benetos A: Genetic determination of plasma aldosterone levels in essential hypertension. *Am J Hypertens* **11**, 856-860 (1998)
 - 25) Brand E, Chatelain N, Mulatero P, Fery I, Curnow K, Jeunemaitre X, Corvol P, Pascoe L, Soubrier F: Structural analysis and evaluation of the aldosterone synthase gene in hypertension. *Hypertension* **32**, 198-204 (1998)
 - 26) Brilla CG, Matsubara LS, Weber KT: Anti-aldosterone treatment and the prevention of myocardial fibrosis in primary and secondary hyperaldosteronism. *J Mol Cell Cardiol* **25**, 563-575 (1993)
 - 27) Young M, Head G, Funder J: Determinants of cardiac fibrosis in experimental hypermineralocorticoid states. *Am J Physiol* **269**, E657-E662 (1995)
 - 28) Rocha R, Stier CT, Kifor JI, Ochoa-maya MR, Rennke HG, Williams GH, Adler GK: Aldosterone: A mediator of myocardial necrosis and renal arteriopathy. *Endocrinology* **141**, 3871-3878 (2000)
 - 29) Schunkert H, Hense HW, Muscholl M, Luchner A, Kxrzinger S, Danser AHJ, Riegger GAJ: Asso-

- ciation between circulating components of the renin-angiotensin-aldosterone system and left ventricular mass. *Br Heart J* **77**, 24-31 (1997)
- 30) Duprez DA, Bauwens FR, De Buyzere ML, De Backer TL, Kaufman JM, Van Hoecke J, Vermeulen A, Clement DL: Influence of arterial blood pressure and aldosterone on left ventricular hypertrophy in moderate essential hypertension. *Am J Cardiol* **71**, 17A-20A (1993)
- 31) Rossi GP, Sacchetto A, Visentin P, Canali C, Graniero GR, Palatini P, Pessina AC: Changes in left ventricular anatomy and function in hypertension and primary aldosteronism. *Hypertension* **27**, 1039-1045 (1996)
- 32) Sato A, Funder JW, Saruta T: Involvement of aldosterone in left ventricular hypertrophy of patients with end-stage renal failure treated with hemodialysis. *Am J Hypertens* **12**, 867-873 (1999)
- 33) Pitt B, Zannad F, Remme W, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J: The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. *N Engl J Med* **341**, 709-717 (1999)
- 34) Tanahashi H, Mune T, Ito I, Isomura Y, Tanahashi T, Suwa T, Daido H, Morita H, White PC, Yasuda K: Association of Lys173Arg polymorphism with CYP11B2 expression in normal adrenal glands and aldosterone producing adenomas (abstract). Program of the 84th Annual Meeting of American Endocrine Society pp.599 (2002)
- 35) Bassett MH, Zhang Y, Clyne C, White PC, Rainey WE: Differential regulation of aldosterone synthase and 11 β -hydroxylase transcription by steroidogenic factor-1. *Journal of Molecular Endocrinology* **28**, 125-135 (2002)
- 36) Silvestre JS, Robert V, Heymes C, Aupetit-Faisant B, Mouas C, Moalic JM, Swynghedauw B, Delcayre C: Myocardial production of aldosterone and corticosterone in the rat. Physiological regulation. *J Biol Chem* **273**, 4883-4891 (1998)
- 37) Hatakeyama H, Miyamori I, Fujita T, Takeda Y, Takeda R, Yamamoto H: Vascular aldosterone. Biosynthesis and a link to angiotensin II-induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **269**, 24316-24320 (1994)