

令和元年5月23日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08962

研究課題名(和文) 原発性アルドステロン症の病態・予後予測因子としてのゲノム・エピゲノム因子の意義

研究課題名(英文) Genomics in primary aldosteronism

研究代表者

吉本 貴宣 (Yoshimoto, Takanobu)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80297457

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではKCNJ5遺伝子変異を有するAPAと同変異を有しないAPAの腫瘍細胞の遺伝子発現動態やエピゲノムの機序で遺伝子発現に影響をあたえるとされるDNAメチル化動態を比較することで、KCNJ5遺伝子変異APAの腫瘍細胞における分子生物学的特徴について解析した。その結果、APAは、遺伝子変異によって異なる多様な分子生物学的動態を示す腫瘍群であり、中でもKCNJ5遺伝子変異を有するAPAは均一な特徴を示し、副腎腫瘍球状層あるいはその前駆細胞由来のDNA低メチル化状態をもった細胞集団由来であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ホルモン産生副腎皮質腫瘍のうち原発性アルドステロン症(PA)、Cushing症候群(CS)は多様な心血管系・代謝系の合併症を生じ、またPAは高血圧の約10%、CSはサブクリニカルなものも含めると副腎偶発腫の約8.5%と頻度も高く、臨床的に重要である。本研究により本邦のアルドステロン産生腺腫の7割を占めるKCNJ5変異陽性腫瘍は腫瘍全ゲノムの低メチル化とそれに関連した特異な遺伝子発現を示したことから、DNAメチル化異常といった後天的エピゲノム要因が本腫瘍の発生に関与することが示唆され、内分泌腫瘍の発症メカニズムの一端が示された。

研究成果の概要(英文)：We conducted transcriptome and methylome analyses of 29 aldosterone-producing adenomas (APAs) with KCNJ5 mutations, 8 APAs without KCNJ5 mutations, and 5 cortisol-producing adenomas. Genome-wide gene expression and CpG methylation profiles were obtained from RNA and DNA samples extracted from these 42 adrenal tumors. Cluster analysis of the transcriptome and methylome revealed molecular heterogeneity in APAs depends on their mutational status. DNA hypomethylation and gene expression changes in Wnt signaling and inflammatory response pathways were characteristic of APAs with KCNJ5 mutations. Comparisons between transcriptome data from our APAs and data from normal adrenal cortex obtained from the Gene Expression Omnibus suggested similarities between APAs with KCNJ5 mutations and zona glomerulosa. The present study indicates the molecular heterogeneity of APAs depends on their mutational status.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：アルドステロン 副腎腫瘍

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) ホルモン産生副腎皮質腫瘍のうち原発性アルドステロン症 (PA)、Cushing 症候群 (CS) は多様な心血管系・代謝系の合併症を生じ、また PA は高血圧の約 10%、CS はサブクリニカルなものも含めると副腎偶発腫の約 8.5%と頻度も高く、臨床的に重要である。

(2) 近年のゲノム解析の進歩により、両疾患での遺伝性および孤発性の症例において、遺伝子の胚細胞および体細胞変異と病態の関連が明らかになりつつあるが、腺腫、過形成、癌といった多彩な病態発症の分子機序の解明には至っていない。また、大多数の PA および CS が成人以降発症の孤発例であることより、ゲノム因子に加え後天的なエピゲノム因子も両者の発症に関与する可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では機能性副腎皮質腫瘍発症の分子機構のさらなる解明をめざし、PA および CS 患者を対象に副腎切除手術で得られる主にアルドステロン産生腺腫 (APA)、コルチゾール産生腺腫 (CPA) の腫瘍組織とその隣接する副腎組織 (AAG) の全ゲノムレベルでの網羅的メチローム解析を行い、腫瘍組織のトランスクリプトーム、既知の機能性副腎腫瘍遺伝性変異の有無と統合解析する事で、機能性副腎皮質腫瘍の DNA メチル化動態を介したエピゲノム機構と病態との関連を検討した。

3. 研究の方法

PA および CS 患者での機能性副腎皮質腫瘍 (APA37 例, CPA5 例) を対象に、手術で得られる同一患者の腫瘍組織と隣接副腎組織 (AAG) (あるいは末梢血) の DNA よりゲノムワイドでの網羅的メチローム解析とトランスクリプトーム解析、既知の体細胞遺伝子変異解析を行った。

(1) 網羅的メチローム解析: 手術検体から得られた DNA (1 μ g) をバイサルファイト変換し Infinium Human Methylation 450 BeadChip (イリミナ社) にて解析する。本チップは NCBI (RefSeq) 登録の遺伝子の 99%、CpG アイランドの 96% とゲノムを包括的かつ高精度に解析可能なことが特徴である。ゲノムのメチル化部位である CpG アイランドは遺伝子プロモーター領域 (TSS200/1500) のみならず、5' -UTR より 3' -UTR までの遺伝子各機能領域に散在している。メチローム解析で得られた各領域毎のメチル化動態の差異をクラスター解析して APA 間、CPA 間、あるいは APA-CPA 間で比較することで、ゲノムワイド DNA メチル化動態によるクラス分類を行った。

(2) トランスクリプトーム解析: 手術検体より得られた RNA (0.1 μ g) を LIQUA kit (Agilent 社) を用い、逆転写と Cy3 ラベルによる cRNA 増幅処理を行い、SurePrint G3 Human GE 8x60K Microarray ver.2.0 (非翻訳 RNA も含め 50000 以上の RNA 発現を網羅的に解析可能な遺伝子発現解析アレイ) を用いた全ゲノム領域のトランスクリプトーム解析を行った。(非翻訳 RNA も含め 50000 以上の RNA 発現を網羅的に解析可能な遺伝子発現解析アレイ)

(3) 遺伝子変異解析: これまでの機能性副腎皮質腫瘍の遺伝子変異として APA では *KCNJ5*, *ATP1A1*, *ATP2B3*, CPA では *PRAKCA* が報告されており、いずれも変異のホットスポットを含む DNA 領域の PCR 増幅が可能となっている。腫瘍組織および AAG (あるいは末梢血) DNA から各遺伝子の当該領域を PCR 増幅し、サンガー法で塩基配列決定をし、各候補遺伝子の体細胞変異および胚細胞性変異の有無を同定した。

4. 研究成果

(1) 患者情報と体細胞遺伝子変異解析

37 例の APA 患者は年齢 50 ± 11 歳、男性 18 名、5 例の CPA 患者は年齢 52 ± 8 歳、男性 1 名であった。APA の体細胞遺伝子変異解析では 37 例中 29 例で *KCNJ5* 遺伝子変異陽性 (K-APA) であった。APA 残り 8 例の非 *KCNJ5* 遺伝子変異例 (NK-APA) の変異の内訳は、*ATP1A1* 変異 2 例、*ATP2B3* 変異 1 例、*CACNA1D* 例の既知の変異を認めた。残り 4 名の既存の体細胞変異の確認できなかった患者の腫瘍 DNA のエクソーム解析にて 1 名の *CTNNB1* 変異を確認したが、3 名については既知の遺伝子エクソン内に変異を確認しえなかった (Null 群)。

(2) トランスクリプトーム解析

APA37 例および CPA5 例の腫瘍 RNA 検体を用い、マイクロアレイ法によるトランスクリプトーム解析を実施した。APA は全体として不均質な遺伝子発現動態を示した。すなわち K-APA は *ATP1A1* 変異、*CACNA1D* 変異と類似した遺伝子発現動態を示す一方、*CTNNB1* 変異および Null 群は CPA と類似した遺伝子発現動態を示した (図 1)。K-APA 群と NK-APA 群の遺伝子発現動態の差については、両群間の発現が 2 倍以上差のある遺伝子が K-APA > NK-APA で 106 個、K-APA < NK-APA で 68 個抽出された。これら 174 個の遺伝子について遺伝子オントロジー (GO)

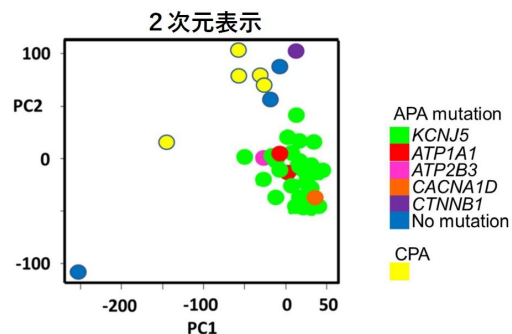


図 1 APA のトランスクリプトーム主成分解析

解析を実施すると、形質膜関連、チャンネル、受動的膜貫通輸送体、筋肉系関連などの GO term が抽出された。

(3)メチローム解析

APA37 例および CPA5 例の腫瘍 RNA 検体を用い、マイクロアレイ法によるメチローム解析を実施した。クラスター解析および主成分解析いずれでも APA は全体として不均質な遺伝子発現動態を示した。これは K-APA 群と NK-APA 群の DNA メチル化動態の違いに基づくものであり、両群間の DNA メチル化動態を比較したスキャッチャード解析では、K-APA 群は NK-APA 群にくらべ全ゲノムレベルで低メチル化状態であることが明らかとなった(図 2)。K-APA 群で低メチル化を示した遺伝子群は 1413 検出されたのに対し、K-APA 群で高メチル化を示した遺伝子はわずか 13 であった。K-APA 群で低メチル化を示した遺伝子群の GO 解析では、トランスクリプトーム解析と同様、細胞膜、細胞構成成分や膜共役型 G 蛋白などの Go term が抽出された。

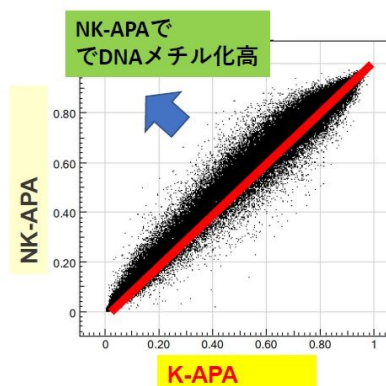


図2 K-APA、NK-APAのDNAメチル化動態比較

(4)トランスクリプトーム・メチローム統合解析

統合解析にて K-APA 群で遺伝子の転写開始点上流 200 塩基の低メチル化と遺伝子発現増加が相関する遺伝子群を抽出した。これらの遺伝子群は K-APA 群特有のエピゲノム制御 (DNA 低メチル化) に関連して発現が変動する遺伝子群の候補であるが、その個々の遺伝子と APA の病態との関連は今後の検討課題である。

(5) Pathway 解析

トランスクリプトーム解析の結果を元に、GennMAPP パスウェイ解析を用いて、1) K-APA 群において CPA より発現が 1.5 倍以上変動しかつ、2) K-APA 群で NK-APA 群より 1.5 倍以上変動している遺伝子を抽出し、K-APA で特徴的に変動している遺伝子群を検討した。その結果、K-APA 群での Wnt シグナル経路の発現増加と炎症反応経路の発現減少が示された。

(6)正常副腎皮質とのトランスクリプトーム比較

我々の上記計 42 例の副腎腫瘍 (APA37 例、CPA5 例) のトランスクリプトーム解析と既存の正常副腎 (正常副腎皮質の球状層 (ZG) および束状層 (ZF) のマイクロアレイデータ (GEO accession No. GSE68889)) の比較解析を行った。その結果、K-APA、ATP1A1、ATP2B3、CACNA1D 群は ZG の遺伝子発現動態と類似しており、一方、CTNNB1 および Null 群、CPA は ZF と遺伝子発現動態が類似していることが示された。

(7)結語

以上より APA は、遺伝子変異によって異なる多様な分子生物学的動態を示す腫瘍群であり、中でも K-APA は均一な特徴を示し、副腎腫瘍球状層あるいはその前駆細胞由来の DNA 低メチル化状態をもった細胞集団由来であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

1. Nakano Y, Yoshimoto T, Fukuda T, Murakami M, Bouchi R, Minami I, Hashimoto K, Fujii Y, Kihara K, Ogawa Y. Effect of Eplerenone on the Glomerular Filtration Rate (GFR) in Primary Aldosteronism: Sequential Changes in the GFR During Preoperative Eplerenone Treatment to Subsequent Adrenalectomy. Intern Med. 2018;57(17):2459-2466. 査読有 DOI: 10.2169/internalmedicine.0438-17.
2. Murakami M, Yoshimoto T, Nakabayashi K, Nakano Y, Fukaiishi T, Tsuchiya K, Minami I, Bouchi R, Okamura K, Fujii Y, Hashimoto K, Hata KI, Kihara K, Ogawa Y. Molecular characteristics of the KCNJ5 mutated aldosterone-producing adenomas. Endocr Relat Cancer. 2017;24(10):531-541. DOI: 10.1530/ERC-17-0117. 査読有

3. Murakami M, Yoshimoto T, Nakano Y, Tsuchiya K, Minami I, Bouchi R, Fujii Y, Nakabayashi K, Hashimoto K, Hata KI, Kihara K, Ogawa Y. Expression of inflammation-related genes in aldosterone-producing adenomas with KCNJ5 mutation. Biochem Biophys Res Commun. 2016;476(4):614-619. 査読有
DOI:10.1016/j.bbrc.2016.06.007.

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 吉本貴宣 「アルドステロン産生腺腫 (APA) のゲノム・エピゲノム解析」第 91 回日本内分泌学会学術総会 2018 年
2. 吉本貴宣 「アルドステロン産生腺腫 (APA) のゲノミクス」心血管代謝週間 CVMW2017 2017 年
3. 吉本貴宣、村上正憲、中野雄二郎、小川佳宏「ゲノム・エピゲノム解析からみた原発性アルドステロン症 (APA) の多様性」第 90 回日本内分泌学会学術総会 2017 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者 なし。

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：秦 健一郎

ローマ字氏名：Hata Kenichiro

研究協力者氏名：木原 和徳

ローマ字氏名：Kihara Kazunori

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。