

令和元年5月17日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06893

研究課題名(和文)小胞体シャペロンを基盤としたアルドステロン合成制御機構の解明と創薬標的分子の探索

研究課題名(英文)Elucidation of regulatory mechanism of aldosterone synthesis based on ER chaperone

研究代表者

一町 澄宜 (Itcho, Kiyotaka)

広島大学・病院(医)・助教

研究者番号：00805666

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：原発性アルドステロン症(PA)は、アルドステロンの過剰分泌により高血圧を来すだけでなく心血管疾患や腎機能障害を高率に合併する疾患である。本研究では、ERシャペロンであるcalmegin (CLGN)がアルドステロン産生腺腫において発現が亢進し、アルドステロン合成酵素(CYP11B2)を翻訳調節している可能性があることを明らかにした。以上の知見より、CLGNは今後の創薬標的として有望な因子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

原発性アルドステロン症(PA)は高血圧患者の5-10%程度を占め、極めて頻度の高い疾患である。アルドステロン過剰分泌により、高血圧を来すだけでなく心血管疾患や腎機能障害を高率に合併するため、PAの診断・治療およびアルドステロン合成の制御は極めて重要である。しかしPAの診断は複数回の煩雑な検査や入院精査を必要とし、アルドステロン合成を直接阻害する薬剤は現在までない。本研究結果はPAや高血圧に対する新しい診断や治療戦略の開発に役立つ可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Primary aldosteronism, which is a the most common form of secondary hypertension, leads to cardiovascular disease and renal dysfunction by excess aldosterone secretion. This study revealed that ER chaperone calmegin (CLGN) was up-regulated in aldosterone producing adenoma and CLGN up-regulated aldosterone synthesis (CYP11B2) by translational regulation. These findings could be useful for the development of agents of targeting aldosterone production.

研究分野：高血圧

キーワード：循環器 高血圧

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

## 1. 研究開始当初の背景

30歳以上の日本人男性の60%、女性の45%以上が高血圧と言われ、また、高血圧患者の5-10%程度を原発性アルドステロン症(PA)が占め、PAは極めて頻度の高い疾患である[Endocr J 58:711-21, 2011]。アルドステロン過剰分泌により、高血圧を来すだけでなく心血管疾患や腎機能障害を高率に合併するため[J Clin Endocrinol Metab 98:4826-33, 2013]、PAの診断・治療およびアルドステロン合成の制御は極めて重要である。申請者らは、アルドステロン産生腺腫においてアルドステロン合成酵素であるhCYP11B2-mAbを用いた免疫組織化学染色を行い、アルドステロン合成が活発な組織、つまりCYP11B2が高発現している組織の抽出に成功した。さらに網羅的遺伝子発現解析・Gene Ontology解析を行い、アルドステロン産生腺腫においてG蛋白共役受容体(GPCR)や小胞体関連遺伝子が過剰発現していることを明らかとした。GPCRについては、Gonadotropin-releasing hormone receptor (GNRHR)を介したアルドステロン合成機構を既に報告し、次に小胞体関連遺伝子について着目した。

小胞体には分子シャペロン(蛋白高次構造の形成)、細胞内Ca<sup>2+</sup>貯蔵、ステロイドホルモン合成などの機能が備わっている。そこで、小胞体に発現する遺伝子を機能別に分類し発現パターンを解析したところ、小胞体内での分子シャペロンに関わる因子がアルドステロン産生腺腫で増加していることを得た。ヤギの顆粒膜細胞でステロイド合成を促進すると分子シャペロンや小胞体ストレス応答が亢進することが報告されている[J Reprod Dev 63:27-36, 2017]。また、申請者の予備研究では、還元剤やタプシガルジンなどによる小胞体ストレス付加でアルドステロン合成が低下することもわかっている。以上より、アルドステロン過剰合成時においても小胞体分子シャペロンの誘導によりアルドステロン合成に関わる蛋白の高次構造が維持され、アルドステロン合成を調節する分子機序が存在することが示唆された。

## 2. 研究の目的

以上より、申請者は「アルドステロン産生腺腫や副腎皮質球状帯において、小胞体分子シャペロンがアルドステロン合成を調節する」と仮説した。本研究では、アルドステロン合成時における小胞体分子シャペロンの機能解析を行い、小胞体シャペロンを介したアルドステロン合成機構を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

**試験** アルドステロン合成に関わる新規小胞体シャペロン鍵分子の同定

アルドステロン産生腺腫において小胞体シャペロン関連因子は明らかに著増している。そこで、申請者の研究室では、アルドステロン合成に関与するいくらかのマイクロアレイ解析結果を有しており、それらを統合し鍵分子を同定する。1) 副腎皮質癌細胞株(HAC15)におけるアンジオテンシンII、カリウム、cAMP刺激による遺伝子発現解析。2) HAC15にアルドステロン過剰産生を示す遺伝子変異を導入し樹立したアルドステロン産生腺腫のモデル細胞株における遺伝子発現解析。さらに、Bioinformaticsデータベース、RNA-seqによる臓器・組織別遺伝子発現解析データベースなどを活用し、アルドステロン合成に最も関わる小胞体因子を選抜する。

**試験** アルドステロン合成に関わる小胞体シャペロン鍵分子の発現解析

試験 で同定した鍵分子に対し，アルドステロン産生腺腫，非機能性副腎皮質腺腫，およびヒトまたはラット副腎皮質球状帯組織における小胞体シャペロン関連因子の発現を組織毎に比較解析する．これらの組織は，広島大学の倫理審査の承認を得て，全ての組織が揃っている．発現解析には qPCR，免疫組織化学染色，ウエスタンブロッティングなどの手法を用いる．

試験 アルドステロン産生腺腫における CYP11B2 との関連を検討

CYP11B2 と小胞体シャペロン関連因子の mRNA 発現量の関連をアルドステロン産生腺腫や副腎皮質球状帯組織を対象に解析する．また，免疫組織化学染色を用いて標的因子とステロイド合成酵素の二重染色を行い，細胞内および組織内局在の解析を行う．

試験 In vitro での標的因子操作による機能解析

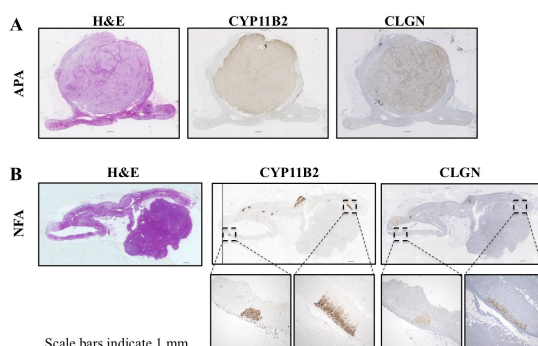
アルドステロン合成に関与する小胞体シャペロン関連因子を試験 ~ で同定後，副腎皮質癌細胞株 (HAC15) におけるステロイド合成酵素やアルドステロン合成に与える影響を，拮抗薬や阻害薬を用いて検討する．レンチウイルスを用いた標的因子の過剰発現または抑制を行い，上述の方法を組み合わせ新規因子によるシグナル伝達やアルドステロン合成機序を検討する．

#### 4．研究成果

アルドステロン産生腺腫 (APA)，非機能性副腎皮質腺腫 (NFA)，ヒト副腎皮質癌細胞株 (HAC15) におけるアンジオテンシン II，カリウム，cAMP 刺激，および HAC15 にアルドステロン過剰産生を示す遺伝子変異を導入し樹立したアルドステロン産生腺腫のモデル細胞株においてマイクロアレイ解析を行い，さらに既存の Bioinformatics データベースや RNA-seq による臓器・組織別遺伝子発現解析データベースなどを活用し，アルドステロン合成に最も関わる小胞体因子 calmegin (CLGN) を選抜した．

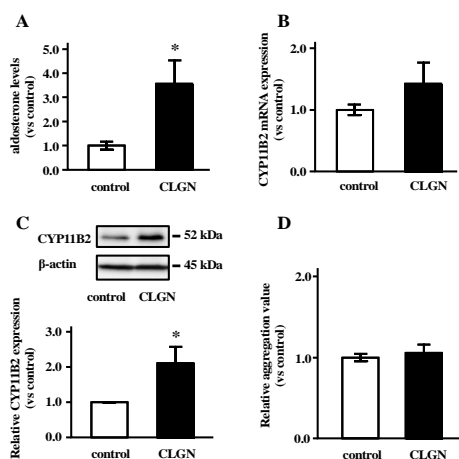
続いて，CLGN の発現を APA48 例，NFA13 例での腫瘍組織より抽出した RNA において qPCR で検討し，CLGN が NFA に比べて APA で有意に発現が亢進していることを確認した．さらに上述の APA や NFA，Sprague-Dawley rat の副腎組織で免疫組織化学染色を行うことにより，CLGN は APA 腫瘍部で発現が亢進していることを確認した (図 1A)．一方，CLGN は NFA 腫瘍部では発現を認めないものの，腫瘍周辺にみられる Aldosterone-producing cell clusters (APCC) では CYP11B2 と一致した局在で CLGN の発現を認めた (図 1B)．ラット副腎皮質球状帯組織における検討では，CYP11B2 は球状帯に一致して発現を認めるものの，CLGN の発現は認めなかった．以上より，CLGN は APA におけるアルドステロンの自律過剰産生に深く関与する因子であることが推定された．

図 1 APA における免疫染色



in vitro における機能解析では、HAC15 に アンジオテンシン II 刺激もしくは KCNJ5 変異を導入しても CLGN の発現に変化は認めず、CLGN は APA 特異的な変異による細胞内 Ca シグナルでは発現が誘導されないことが示唆された。CLGN を過剰発現させたところ、HAC15 のアルドステロン合成量は有意に増加した (図2A)。CLGN 過剰発現は CYP11B2 のタンパク発現を有意に増加させたが、mRNA 発現には変化を認めなかった (図2B, 2C)。以上より CLGN は post-transcriptional な機序によって CYP11B2 発現を亢進しアルドステロン合成に関与していると考えられた。CLGN は小胞体シャペロンであることから、過剰発現がタンパクの高次構造形成に影響を与えている可能性を考慮してタンパク凝集能を測定したが、CLGN 過剰発現において変化は認めなかった (図2D)。

図2 HAC15 におけるアルドステロン合成量・CLGN 発現・タンパク凝集レベル



当初 vivo での検討を予定していたが、上記結果より CLGN が CYP11B2 発現を調節する機序について再検討するため、CLGN 過剰発現群とコントロール群より RNA を抽出し RNA-seq 解析を行い、pathway 解析および GO 解析を行った。CLGN 過剰発現群では tRNA metabolic process、特に tRNA aminoacylation に関する生物学的プロセスが有意な因子として抽出された (表 1)。CLGN 過剰発現群ではコントロール群と比べて多くのアミノアシル tRNA 合成酵素の発現が上昇していた。以上より、CLGN は tRNA aminoacylation を介した CYP11B2 の翻訳調整によってアルドステロン合成に関与している可能性が示された。

表 1 CLGN 過剰発現群で有意に発現変動している遺伝子が濃縮しているパスウェイ

GO	KEGG	REACTOME
TRNA METABOLIC PROCESS	AMINOACYL TRNA BIOSYNTHESIS	CYTOSOLIC TRNA AMINOACYLATION
PROTEASOME COMPLEX	OTHER GLYCAN DEGRADATION	FORMATION OF TUBULIN FOLDING INTERMEDIATES BY CCT TRIC
GLYCOLIPID METABOLIC_PROCESS	LYSOSOME	BASIGIN INTERACTIONS
INTEGRIN COMPLEX	CITRATE CYCLE TCA CYCLE	TRNA AMINOACYLATION
CYTOPLASM ORGANIZATION AND BIOGENESIS	GLYCOSAMINOGLYCAN DEGRADATION	AMINO ACID TRANSPORT ACROSS THE PLASMA MEMBRANE

Pathway enrichment were conducted by using bioinformatics such as Gene ontology (GO, <http://geneontology.org/>), KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>), and REACTOME (<https://reactome.org/>).

## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 2 件)

発表者名: Kiyotaka Itcho

発表演題: Molecular chaperone Calmegin is up-regulated in aldosterone-producing adenoma

and associates with aldosterone production.

学会名: 43rd Meeting of the International Aldosterone Conference

発表年: 2018 年

発表者名: Kiyotaka Itcho

発表演題: Molecular chaperone CLGN associates with aldosterone production in APA and APCC.

学会等名: 44th Meeting of the International Aldosterone Meeting(国際学会)

発表年: 2019 年

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

なし

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。