

令和元年6月4日現在

機関番号：85402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16166

研究課題名(和文) 転写因子の動態解析に基づくアルドステロン合成酵素のエピゲノム制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of epigenetic regulation mechanism of aldosterone synthesis

研究代表者

吉井 陽子 (Yoshii, Yoko)

独立行政法人国立病院機構(呉医療センター臨床研究部)・その他部局等・その他

研究者番号：00795320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：原発性アルドステロン症は高血圧患者の5-10%を占め、高血圧のみならず心血管疾患や慢性腎臓病の合併率が高い。私たちはアルドステロン合成制御の新規標的因子探索のため、アルドステロン産生腺腫(APA)やヒト副腎皮質癌細胞株を用いてDNAメチル化解析、及びマイクロアレイ解析や既知のデータベースと統合解析することによってアルドステロン合成に最も関わるカルシウム関連因子としてVDRを選抜した。免疫組織染色ではNaKポンプであるATP1A1変異をもったAPAではVDRが強く発現していた。ATP1A1変異をもつAPAではVDRがアルドステロン合成及び腫瘍増殖に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高血圧患者の5-10%を占める原発性アルドステロン症(PA)は高血圧のみならず、心血管疾患や慢性腎臓病の合併率が高いが、PA患者におけるアルドステロン合成・分泌制御機構については十分に明らかにされていない。本研究において、ATP1A1変異をもつアルドステロン産生腫瘍ではVDRがアルドステロン合成及び腫瘍増殖に関与していることが示唆され、創薬標的因子の同定につながる可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：Primary aldosteronism (PA) is the most frequent cause of secondary hypertension with autonomous excess aldosterone production. DNA methylation array and transcriptome analysis revealed VDR is the most associated factor related with Ca<sup>2+</sup> homeostasis in aldosterone producing adenoma (APA). Immunohistochemical analysis showed VDR is strongly expressed in ATP1A1 mutated APA. These findings suggests VDR might associates with tumor growth and aldosterone production in ATP1A1 mutated APA.

研究分野：アルドステロン合成

キーワード：アルドステロン エピゲノム DNAメチル化

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

### 1. 研究開始当初の背景

原発性アルドステロン症 (PA)は高血圧患者の約 5-10%を占めるとされ、極めて頻度の高い疾患である [Endocr J 58:711-21, 2011]。PA はアルドステロンを過剰分泌することによって、高血圧を来すだけでは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 の早期診断・治療、更にはアルドステロン合成の制御は極めて重要である。アルドステロン合成にカルシウムシグナルの活性化が関与することがこれまで知られている。アルドステロン産生腫瘍 (APA)では、カリウムチャネルである KCNJ5 やナトリウムカリウムポンプである ATP1A1 に代表される様々なチャネル変異が 細胞内カルシウムシグナルを活性化させアルドステロン過剰産生を来すことが近年明らかにされている [J Mol Endocrinol 59:R47-R63, 2017]。しかし、その詳細な機序については不明な点も多い。申請者らはこれまでアルドステロン合成制御の新規標的因子探索のため、アルドステロン合成を制御する DNA メチル化に焦点を当てたエピジェネティック調節機構の解明を行ってきた。アルドステロン合成の律速酵素である CYP11B2 の mRNA 発現とその DNA メチル化が逆相関し、さらに CYP11B2 プロモーター領域の DNA メチル化部位に結合する複数の転写因子候補を同定してきた [Hypertension 68:1432-37, 2016]。これらの知見から、アルドステロン合成にはエピジェネティックな調節機構を介し、カルシウムシグナル活性化に関与する因子があることが示唆された。

### 2. 研究の目的

以上より、申請者は「APA や副腎皮質球状帯において、エピジェネティックな調節機構を介し、カルシウムシグナル活性化に関与する因子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に関与する上記因子を同定、およびエピジェネティックな機序を介したアルドステロン合成制御機構を解明し、PA や高血圧に対する新しい治療・診断戦略の基盤を構築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最も関わるエピジェネティックな調節機構を介した因子の同定

- 1) 非機能性副腎皮質腺腫 (NFA)および APA サンプル、さらにヒト副腎皮質癌細胞株 (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 APA のモデル細胞株においてビーズアレイを用いた網羅的な DNA メチル化解析を行う。
- 2) 申請者の研究室で保有しているアルドステロン合成に関与するマイクロアレイデータを上記 DNA メチル化解析と統合解析する。さらには公開されている 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エピジェネティックな調節を受ける因子を選抜する。

試験 アルドステロン合成に最も関わるエピジェネティックな調節機構を介した因子の発現解析

試験 で同定した因子について、APA、NFA、およびヒト副腎皮質球状帯組織における上記因

子の発現を組織毎 ,また遺伝子変異毎に比較解析する .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 In vitro での標的因子に対する機能解析

アルドステロン合成に関与する上記因子を試験 ~ で同定後 ,APA 特異的な遺伝子変異を HAC15 に過剰発現させ APA モデル細胞株を作成し ,上記因子やステロイド合成酵素 ,アルドステロン合成に与える影響を検討する .

#### 4 . 研究成果

NFA , APA , 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ビーズアレイを用いた網羅的な DNA メチル化解析を行った .また ,各種条件での刺激 (アンジオテンシン II ,カリウム , cAMP) を与えた HAC15 を上記サンプルに追加し ,マイクロアレイ解析を行った .さらに既存の Bioinformatics データベース及び 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統合解析を行った .十分なサンプル数を用いた統合解析を行うことによって ,363 のカルシウム関連因子からエピジェネティックな調節機構を介し ,よりアルドステロン合成に関わると考えられる標的因子 vitamin D receptor (VDR)を選抜した .

続いて ,APA における VDR の発現解析を行い ,VDR とアルドステロン合成について検討を行った .免疫組織染色において ,VDR は KCNJ5 変異をもつ APA と比較し ATP1A1 変異をもつ APA で有意に強く発現していた .ATP1A1 L104R を HAC15 に過剰発現させると ,コントロールと比較し CYP11B2 の mRNA 発現は上昇し ,培養上清中のアルドステロン濃度は増加した .核内受容体である VDR はリガンドであるビタミン D と核内で結合する .続いてレチノイド X 受容体 (RXR) と複合体を形成し ,いくつかの転写因子と共役して遺伝子発現調節を行う .RXR 複合体は様々な腫瘍の増殖を促進することが知られている .これらの知見より ,ATP1A1 変異をもつ APA では VDR がアルドステロン合成及び腫瘍増殖に関与していることが示唆された .

#### 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Kobuke Kazuhiro, Oki Kenji, Gomez-Sanchez Celso E., Gomez-Sanchez Elise P., Ohno Haruya, Itcho Kiyotaka, Yoshii Yoko, Yoneda Masayasu, Hattori Noboru, Calneuron 1 Increased Ca<sup>2+</sup> in the Endoplasmic Reticulum and Aldosterone Production in Aldosterone-Producing Adenoma, Hypertension, 査読有, 71 巻, 2017, 125-133, DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.10205

Kobuke Kazuhiro, Oki Kenji, Gomez-Sanchez Celso E., Ohno Haruya, Itcho Kiyotaka, Yoshii Yoko, Yoneda Masayasu, Hattori Noboru, Purkinje Cell Protein 4 Expression Is Associated With DNA Methylation Status in Aldosterone-Producing Adenoma, The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 査読有, 103 巻, 2017, 965-971, DOI: 10.1210/jc.2017-01996

Itcho Kiyotaka, Oki Kenji, Kobuke Kazuhiro, Yoshi i Yoko, Ohno Haruya, Yoneda Masayasu, Hattori Noboru, Aberrant G protein-receptor expression is associated with DNA methylation in aldosterone-producing adenoma, Molecular and Cellular Endocrinology, 査読有, 461 巻, 2018, 100-104,  
DOI: 10.1016/j.mce.2017.08.019

## 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。