

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：15401  
研究種目：若手研究  
研究期間：2019～2020  
課題番号：19K17600  
研究課題名（和文）メタボローム解析によるアルドステロン産生腺腫の治療標的因子や診断マーカーの開発

研究課題名（英文）Exploratory research of treatment target or marker for aldosterone producing adenoma by using of metabolome analysis

研究代表者  
小武家 和博（Kobuke, Kazuhiro）  
広島大学・医系科学研究科（医）・寄附講座助教

研究者番号：80805648  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、アルドステロン産生腺腫（APA）にみられる体細胞遺伝子変異の一つであるATP1A1遺伝子変異を副腎癌培養細胞株に導入し、APAモデル細胞株を得た。このモデル細胞のRNA-Seqならびにメタボローム解析を行い、遺伝子発現の変化および細胞内代謝の変化を分析した。その結果、ATP1A1変異をもつAPAにおいて、核酸合成が促進されていることが示唆された。RNA-Seqにおける遺伝子発現の変化と合わせ、この結果は細胞増殖の活性化を意味しており、副腎皮質細胞にATP1A1変異が入ることにより、細胞増殖が促進され、APA腫瘍形成の引き金となっている可能性が示唆された。

#### 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）は難治性の二次性高血圧の原因となり、高頻度に動脈硬化性疾患を合併することから、この疾患克服は国民の生命予後、ならびに生活の質の向上のために重要である。PAの原因の多くを占めるアルドステロン産生腺腫（APA）において、疾患克服に向けて、病因となる分子メカニズムの解明が多数試みられており、アルドステロン産生機構への理解は深まりつつある。しかしながらAPAの腫瘍形成機構の解明につながる知見は未だ少なく、今回の知見を踏まえ、APA腫瘍形成の分子メカニズムが明らかになれば、将来のAPA治療、あるいは予防につながる発見にも発展し得ると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We introduced the ATP1A1 gene mutation, one of the somatic gene mutations found in aldosterone-producing adenoma (APA), into adrenal carcinoma cell lines to obtain an APA model cell line. We performed RNA-Seq and metabolome analysis of these model cells to analyze changes in gene expression and intracellular metabolism. The results suggest that nucleic acid synthesis is enhanced in APA with ATP1A1 mutation, which, together with the change in gene expression in RNA-Seq, indicates activation of cell proliferation, suggesting that ATP1A1 mutation in adrenocortical cells promotes cell proliferation and triggers APA tumorigenesis. The results suggest that the ATP1A1 mutation in adrenocortical cells promotes cell proliferation and may trigger APA tumor formation.

研究分野：高血圧

キーワード：原発性アルドステロン症 メタボローム 二次性高血圧 腫瘍形成

## 1. 研究開始当初の背景

原発性アルドステロン症 (PA) は、最も頻度の高い二次性高血圧症であり、全高血圧症の 3.3~10.0%と報告され [Lancet 371:1921-1926, 2008], 治療抵抗性であり心血管疾患や動脈硬化症を高率に発症する [J Am Coll Cardiol. 45:1243-1248, 2005]. よって、PA におけるアルドステロン合成制御機構の解明は、PA の治療を通じて、心血管疾患など動脈硬化性疾患の治療薬開発につながる。また、PA の診断マーカーの開発により、PA の診断を著しく煩雑としている、複数回の内分泌機能検査や副腎静脈サンプリングなどを軽減できると考えられ、入院・検査等に対する患者負担の軽減に加え、医療経済的にも有益である。

PA の病型はアルドステロン産生腺腫 (APA) と特発性アルドステロン症に分類される。APA は、細胞膜に存在するイオンチャネルやポンプをコードする *KCNJ5*, *ATP1A1*, *ATP2B3*, *CACNA1D* などに体細胞遺伝子変異を認め、これらの体細胞遺伝子変異は、細胞内カルシウムシグナルの活性化を誘導し、アルドステロン合成を促進することが RNA-seq 解析を基盤とした研究などからわかっている。一方で、上述の RNA-seq 解析から、APA 体細胞遺伝子変異間で遺伝子発現パターンが大きく異なっており、*ATP1A1* 変異を示す APA で、ATP により活性化される P 型 ATPase が過剰発現していることを得ている。*ATP1A1* 変異を示す APA において、カルシウムシグナルの活性化のみならず、P 型 ATPase を介したアルドステロン合成または腫瘍増殖の分子機構が存在すると考えられる。

メタボローム解析は細胞内の代謝物質を網羅的に同定できるが、それらの中でも、細胞内の糖代謝(解糖系・PPP TCA サイクル)の代謝に着目し、その代謝に関わる酵素や経路を標的とした新規アルドステロン合成機構の解明が期待できる。さらに、メタボローム解析により増加した代謝物質の測定は、APA の診断マーカーになる可能性もある。

## 2. 研究の目的

APA 検体や *ATP1A1* 変異または *KCNJ5* 変異を導入した副腎皮質癌細胞株 (APA モデル細胞株) を用いて、メタボローム解析による細胞内代謝物質を明らかにし、新たな酵素活性を介した腫瘍形成機構およびアルドステロン合成機構を解明する。

APA でのメタボロームを同定し、細胞内酵素活性または代謝経路を介したアルドステロン合成分子機構を解明することにより、治療抵抗性高血圧症の原因となる原発性アルドステロン症 (PA) の治療標的因子の同定に繋げることが目的である。

## 3. 研究の方法

### (1) 副腎皮質癌細胞株に APA 遺伝子変異を導入した APA 細胞株でのメタボローム解析

*KCNJ5* 変異, *ATP1A1* 変異, *ATP2B3* 変異の plasmid を用い、レンチウイルス作製を行ってこれらの変異を副腎皮質癌細胞株に導入した。これらの変異を導入した細胞株に対し、本学の自然科学研究室の援助を得てメタボローム解析を行った。

### (2) メタボローム解析の結果から遺伝子変異間で活性化されている細胞内代謝を同定

メタボローム解析の結果から遺伝子変異間で活性化または抑制されている細胞内代謝に関わる酵素の予測を行った。既存の RNA-seq 解析と統合することにより、酵素発現の転写を予測した上で、細胞内代謝に関わっている酵素または経路を同定した。

### (3) 副腎皮質癌細胞株での標的因子操作による機能解析

APA モデル細胞株において、同定した代謝経路に影響する薬剤として強心配糖体を用いて、細胞内代謝およびアルドステロン合成に及ぼす影響を検討した。細胞増殖、細胞周期調整、アポトーシスなどへの影響を FACS (fluorescence-activated cell sorting) を用いて解析し、アルドステロン合成量については ELISA 法を用いて定量した。標的因子であるタンパクの発現量変化について、ウェスタンブロット法により解析した。

## 4. 研究成果

まず、*ATP1A1* 変異を導入した APA モデル細胞株では、変異を持たない細胞株にくらべて DNA 合成と細胞周期 S 期の細胞が増加し、細胞増殖が促進されていることが明らかになった (図 1A, B, D)。メタボローム解析において、*ATP1A1* 変異をもつ APA は、核酸合成が盛んな際に低下する Phosphoribosyl Diphosphate (PRPP) が著明に低下していることを得た (図 1C)。PRPP の 30-40% は核酸合成に利用され、10-15% がヒスチジンやトリプトファン合成に用いられるが、*ATP1A1* 変異をもつ APA において、ヒスチジンやトリプトファン値に変化なく、核酸合成が促進されていることが示唆された。RNA-Seq における遺伝子発現の変化も、この結果と矛盾しないものであった。DNA 合成が盛んになることはすなわち細胞増殖の活性化を意味しており、副腎皮質細胞に *ATP1A1* 変異が入ることにより、細胞増殖が促進され、APA 腫瘍形成の引き金となっている可能性が示唆された。このとき強心配糖体は変異株のミニ促進的にはたらく可能性が示唆された (図 2A)。一方アルドステロン分泌は *ATP1A1* 変異を導入した APA モデル

ル細胞株では増加するものの、代謝阻害によっては変化なく(図 2B),今回見出された因子はアルドステロン合成には関与していない可能性が示唆され, *ATP1A1* 変異でのアルドステロン分泌は細胞数の増加に拠るところが大きいと推測された. この条件から転写因子のリン酸化変化について検討したところ *ATP1A1* 変異細胞株における転写因子リン酸化の増加が明らかとなった(図 3).

APA においてアルドステロン産生機構への理解は深まりつつあるが, 腫瘍形成機構の解明につながる知見は未だ少なく, 今回の知見を踏まえ, APA 腫瘍形成の分子メカニズムが明らかになれば, APA 治療,あるいは予防につながる発見にも発展し得る.

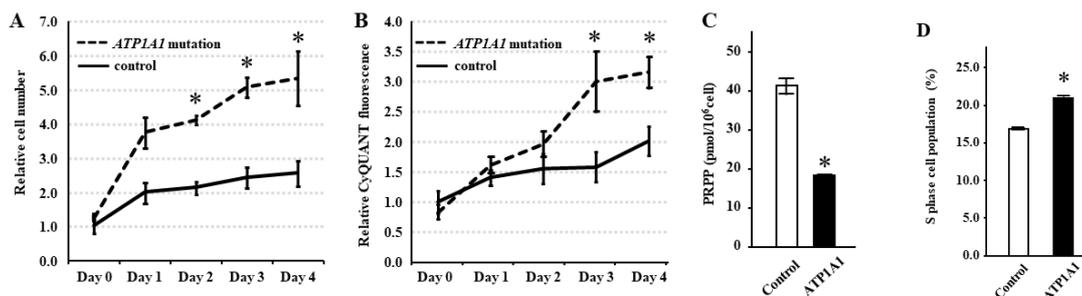


図 1 *ATP1A1* 変異は細胞増殖を促進し、PRPP を低下させる。(\*;  $P < 0.05$  vs control)

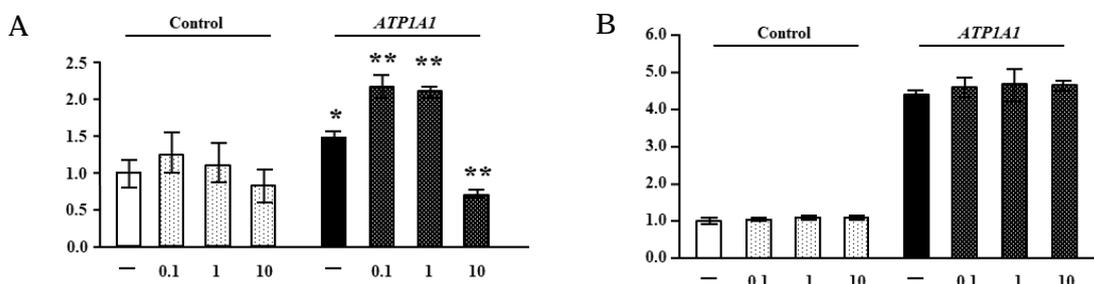


図 2 強心配糖体の投与による細胞増殖(A 縦軸は細胞量相対値)とアルドステロン分泌(B 縦軸はアルドステロン量相対値)の変化

\*;  $P < 0.05$  vs control -

\*\*;  $P < 0.05$  vs *ATP1A1* -

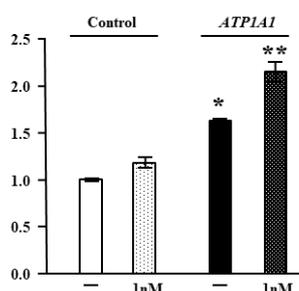


図 3 強心配糖体投与によるリン酸化転写因子の増加(ウェスタンブロットから数値化)

縦軸はタンパク量(バンド濃度)相対値

\*;  $P < 0.05$  vs control -

\*\*;  $P < 0.05$  vs *ATP1A1* -

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------