

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：13301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22935

研究課題名(和文)アルドステロン産生副腎過形成の成因となる脂肪組織由来miRNAの探索と機能解析

研究課題名(英文)Exploring the circulating microRNA connecting obese and idiopathic aldosteronism

研究代表者

中野 雄二郎(Nakano, Yujiro)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：10883895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：原発性アルドステロン症(PA)は心血管疾患のリスクが高いとされる。生涯の内服が必要である特発性アルドステロン症(IHA)は肥満症との関連が指摘されており、満IHAにおいて特異的に上昇する血中マイクロRNA(miR)の病的意義について検討した。肥満IHA患者、非肥満IHAおよび肥満非IHA、4例ずつから血中エクソソームを抽出しmiR発現を網羅的に定量解析し特徴的なmiRを複数検出した。得られたmiRが制御する遺伝子群についてオンラインデータベースをもとに予測したところ、アルドステロン産生に関わる遺伝子群、複数のイオンチャネル発現、またはWntシグナルに関わる遺伝子群を制御しうることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の網羅的解析は過去の研究とは根本的に異なることにより、肥満症と特発性アルドステロン症(IHA)を結び付ける因子として複数のマイクロRNAを初めて同定した。この結果これらのマイクロRNAの病態意義を研究することで肥満症がIHAの原因になることの証明の足がかりとなる。その結果、肥満症の解消がIHAの軽快・治癒に繋がりを、生涯のアルドステロン拮抗薬内服を回避する可能性が示唆される。すなわち、生涯のアルドステロン拮抗薬内服とは異なり、治癒を目標にしたIHA治療戦略が広がると考えている。

研究成果の概要(英文)：Primary aldosteronism (PA) increases the risk of cardiovascular disease. Idiopathic aldosteronism (IHA) which requires lifelong medication, is suggested to be associated with obesity. We examined the pathological significance of circulating microRNA (miR) which is specifically elevated in the obese IHA. MiRs in circulating exosomes were extracted from obese IHA patients, non-obese IHA, and obese non-IHA, in 4 cases each, and miR expression was comprehensively analyzed. Target genes of the obtained candidate miRs were predicted using an online database. Several genes involved in aldosterone production; the expression of multiple ion channels or Wnt signal, were found.

研究分野：内分泌代謝

キーワード：aldosterone obesity miRNA-seq 特発性アルドステロン症 血中microRNA 脂肪組織

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

**PA** は高血圧症の約 **10%** を占めるコモンディーズともいえる二次性高血圧症である。**PA** を本態性高血圧と比較すると、血圧コントロールとは独立して、過剰アルドステロンが高リスクで心血管疾患を引き起こすため (**Milliez P, J Am Coll Cardiol. 2005**)、病態に基づいた治療戦略は臨床的に重要である。**PA** は左右の副腎に発生し、アルドステロン産生腺腫 (**APA**) と **IHA** に分けられる。近年、手術適応がなく生涯の **MRA** 内服が必要とされる **IHA** が増加している (**Fujii H, J Hum Hypertens. 2020**) (図 1: 自験)。しかし **IHA** は副腎サンプルが得られないこともあり病因の多くは未解明であった。これまでに、**IHA** は肥満症との関連が多く報告されており、脂肪組織が副腎のアルドステロン産生の原因である可能性についても言及されているが、未だに介在する物質は確定されず、長年の研究課題である。

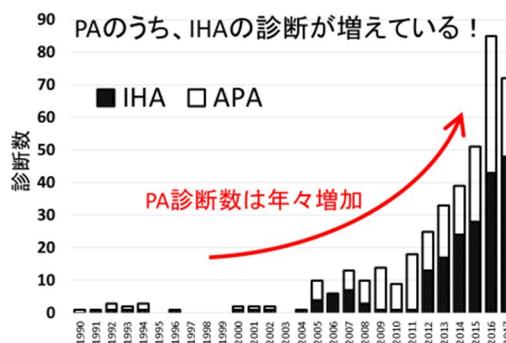


図1: PA診断数の推移(単一施設)

## 2. 研究の目的

本研究では **IHA** の成因となる脂肪組織由来 **miR** の探索と機能解析を目的とする。現在までにヒト **IHA** と肥満症に関連した網羅的な **omics** 解析は行われておらず、今回の網羅歴解析は過去の研究とは根本的に異なる。また、候補 **miR** が属する遺伝子を同定し、その発現制御機構から、**miR** 発現を制御する薬剤や介入方法を推測することが可能となる。本研究の立証は、これまで長年未解明であったヒトの肥満症と **IHA** の関連を世界で初めて直接証明し、生涯の **MRA** 内服のみであった **IHA** の治療戦略が広がると考えている。

## 3. 研究の方法

### A. ヒト肥満**IHA**における特徴的な血中**miR**の網羅的解析

対象を肥満かつ **IHA** 症例とし、非肥満の非 **PA** 症例、肥満の非 **PA** 症例を比較とし、各 4 例ずつの血漿検体を採取した。検体は採取後直ちに **-80** で保存した。エクソソーム内の **miR** を抽出は、**miRCURY Exosome Serum/Plasma Kit (Qiagen)** および、**miRNeasy mini kit (Qiagen)** を用いて **miR** を抽出した。**spike in control** として **cel-miR-39** を添加する。**miR** サンプルは濃度調整をした後に、**illumina NOVAseq** にて網羅的発現解析を行った。得られた結果から、肥満 **IHA** でのみ発現上昇している **miR** を **adjusted P value** を用いた有意性、絶対値判定を加味して絞り込んだ。得られた候補 **miR** はサンプル数を各 10 例に増やした後、**qPCR** によって特異性を確認した。**qPCR** は **TaqMan advanced microRNA assay (Thermo Fisher)** を用いた **RT**、**qPCR** を行い、**Cel-miR-39**、もしくは次世代シーケンサーにてサンプル間発現変動が少ない **miR** をコントロールとした **ddCT** 法で定量し、有意 (**P < 0.05**) な候補 **miR** を選択した。

### B. 特徴的な血中 **miR** の標的遺伝子の探索

**online database** を用いて候補 **miR** の標的遺伝子を検討し、アルドステロン産生に関わる遺伝

子群のいずれかを標的とする **miR** を絞込む。

### C. 肥満IHAの体重減少による血中miRおよびIHA病勢変化の解析(1~2年目)

肥満 **IHA** 患者の体重減少に伴うアルドステロン自律産生 **marker** (**ARR** や機能検査) の変化を解析する。特に、体重変化とアルドステロン自律産生能の変化と相関を確認する。

	N = 4 in the each group		
	肥満-非IHA	痩せ-IHA	肥満-IHA
Age	43 (40-47)	62 (57-65)	36 (28-46)
BMI	34.7 (30.3-40.5)	21.5 (20.9-21.8)	34.9 (31.9-41.0)
sBP	133 (119-150)	126 (123-131)	138 (129-148)
dBP	97 (88-99)	84 (81-86)	89 (80-101)
Cre	0.79 (0.7-0.85)	0.70 (0.64-0.71)	0.62 (0.56-0.70)
eGFR	82.7 (74.9-90.8)	86.4 (81.7-91.3)	100.1 (95.0-103.4)
renin	1.8 (1.4-2.4)	0.4 (0.3-0.4)	0.6 (0.3-0.8)
aldosterone	299 (189-351)	155 (105-188)	157 (145-161)
ARR	96 (88-160)	309 (298-352)	251 (196-350)
ACTH	53.1 (34.0-58.8)	47.1 (42.4-48.0)	64.1 (51.1-85.2)
cortisol	6.1 (5.9-12.1)	15.3 (14.2-15.7)	14.3 (13.4-15.5)

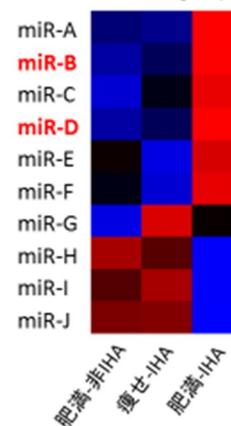
(図2)miRNA-seqを実施した患者

## 4. 研究成果

### A. ヒト肥満IHAにおける特徴的な血中miRの網羅的解析

対象患者のパラメータを図2に示した。**IHA**群では非**IHA**群に比べてアルドステロン、**ARR**が高く、肥満群では痩せ群に比べて**BMI**が高かった。エクソソームから抽出した**miR**を次世代シーケンサーで網羅的定量解析をしたところ、**512**種類の**miR**がいくつかの血液での発現が確認された。**3**群で有意に差があるものとして、**adjusted P<0.05**では**2**種類が、**adjusted P<0.05**では**10**種類が検出された(図3、赤字は**P<0.05**)。qPCRで定量性を確認したところ、複数の**miR**発現が肥満-IHAにおいて有意に異なっていた(図4)。

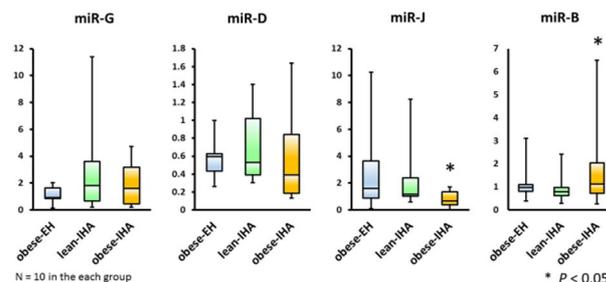
N = 4 in the each group



(図3)miRNA-seqの結果

### B. 特徴的な血中miRの標的遺伝子の探索

**online database** を用いて候補 **miR** の標的遺伝子を検討し、アルドステロン産生に関わる遺伝子群のいずれかを標的とする **miR** を検出した。**miR-J** は **CTNND2**, **GNAS**, **MTOR** 等といった遺伝子の発現を制御していることがわかった。これらの遺伝子はアルドステロン産生腺腫における研究でその病態への関与が指摘されている。



(図4)qPCRによるエクソソーム内miRNA発現定量

一報、**miR-B** は **SLC36A2** といったイオンチャネルの発現を制御していることがわかった。アルドステロン産生との関与は報告されておらず解析が必要である。

### C. 肥満IHAの体重減少による血中miRおよびIHA病勢変化の解析(1~2年目)

肥満 **IHA** 患者の体重減少に伴うアルドステロン自律産生 **marker** (**ARR** や機能検査) の変化を解析した。**1** 症例経過を評価できた。**41** 歳女性、**BMI 39.8**、カプトプリル試験で陽性であり原発性アルドステロン症と診断された。副腎腫瘍は認めず、高血圧も呈していなかったため経過観察の方針となったが、高度肥満症のためにスリーブ状胃切除術を実施された。**1** 年後、**BMI 29.8** に減少し、カプトプリル試験は正常化した。すなわち、体重減少とともに、原発性アルドステロン症は改善した。今後、血液の **miR** を評価して候補 **miR** の発現変化を確認する必要がある。

ここまでの研究で肥満 **IHA** に特徴的な血中 **miR** を複数同定した。これらの結果を足がかりに病態への直接的な関与を調べていく方針である。並行して、肥満症患者の経過における血中 **miR** の評価も行っていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中野雄二郎、後藤久典、田中健雄、青野大輔、米谷充弘、竹下有美枝、米田隆、篁俊成
2. 発表標題 特発性アルドステロン症と肥満症をつなぐ血中マイクロRNAの探索
3. 学会等名 第114回日本内科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中野雄二郎、後藤久典、田中健雄、青野大輔、米谷充弘、竹下有美枝、米田隆、篁俊成
2. 発表標題 特発性アルドステロン症と肥満症をつなぐ血中マイクロRNAの探索
3. 学会等名 第95回日本内分泌学会総会
4. 発表年 2022年

〔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
---------	---------