

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591110

研究課題名(和文)アルドステロンにより血管内皮で発現誘導される新規遺伝子群の病態生理学的意義の解明

研究課題名(英文)Pathophysiology of aldosterone inducible genes

## 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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：原発性アルドステロン症(PA)で血管障害に関与する遺伝子を細胞・動物レベルおよびPA患者臨床検体を用い疾患との関連性を解明することを目的とした。

最終的にアルドステロン産生腺腫(APA)7例で遺伝発現解析とゲノムDNAメチル化の網羅的解析を検討を行い、APAにおいて遺伝子プロモーター領域の脱メチル化とmRNA発現上昇を伴う34遺伝子を同定した。これらの遺伝子の中には、アルドステロン合成に関わるCYP11B2やMC2R、腫瘍の転移や悪性度に関わるPRRX1, RAB38, FAP, GCNT2, ASB4などが含まれており、APAでのアルドステロン自律性分泌や腫瘍化との関わりが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The role of epigenetics in aldosterone-producing adenomas (APA) is not fully understood. Here we explored the relationship between gene expression and DNA methylation status in APA. We conducted an integrated analysis of transcriptome and methylome data of the paired APA-adjacent adrenal gland (AAG) samples from the same patient. The adrenal specimens were obtained from 7 Japanese patients with APA. Gene expression and genome-wide CpG methylation profiles were obtained from RNA and DNA samples from those 7 paired tissues. Methylome analysis showed global CpG hypomethylation in APA relative to AAG. Integration of gene expression and methylation status showed that 34 genes are upregulated with CpG hypomethylation in APA. Of these, 3 genes (CYP11B2, MC2R and HPX) may be related to aldosterone production and 5 genes (PRRX1, RAB38, FAP, GCNT2 and ASB4) are potentially involved in tumorigenesis.

研究分野：内分泌代謝学 高血圧 血管生物学

キーワード：アルドステロン 副腎腫瘍

## 1. 研究開始当初の背景

(1) アルドステロンは、心血管組織のミネラルコルチコイド受容体 (MR) を介し直接的に心血管障害作用を示す機序が注目されているが、その分子機序の詳細は不明である。MR 拮抗薬が RALES、EPHESUS 等の大規模臨床試験で心血管保護作用を示すことや、各種病態モデル動物の検討で、高血圧以外の動脈硬化モデルでも血管保護作用を示すことより、アルドステロンが血圧に依存しない直接的な心血管障害機序を示すことが明らかとなっている。

(2) 我々は以前よりアルドステロンが血管内皮細胞において各種向炎症性因子の遺伝子発現を誘導する事や NADPH オキシダーゼを介した活性酸素種産生機序について報告し、血管内皮細胞が心血管組織におけるアルドステロンの標的細胞として重要である点を報告してきた。さらに我々はヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞株 (EAhy926 細胞) にレトロウイルス発現系にてヒト MR 遺伝子を恒常的に導入した細胞株 MR-EAhy を確立しこれを用いたスクリーニングと、Aldo 負荷高血圧モデルラットの血管壁での検討により 3 遺伝子 (ANGPTL4, ESM-1, SNF1LK) を抽出した。これら各因子のアルドステロンによる心血管障害での病態生理学的意義の検討は全く新規の研究であり、アルドステロンによる心血管障害機序の全容解明の一端を担うものと考えられる。

(3) 一方、高アルドステロン血症により心血管障害を来す代表疾患である原発性アルドステロン症 (PA) は副腎皮質由来の片側性のアルドステロン産生腺腫 (APA) および両側性過形成 (IHA) に分類される。しかしこれら PA よりアルドステロンが自律性分泌される分子機構には不明な点が多い。近年、アルドステロン産生副腎腫瘍 (APA) のトランスクリプトーム解析に関する報告ではアルドステロン産生酵素やその発現を規定する上流因子の発現上昇については報告毎に差があり、一定の見解は得られていない。さらに PA 遺伝子発現を規定するエピゲノム解析についての報告は、ゲノムワイド DNA メチル化も含め極めて乏しい。

## 2. 研究の目的

(1) アルドステロンによる心血管障害に、より関連すると考えられるトランスクリプトームマイクロアレイで選定した遺伝子 (Sekizawa N et al. Mol Cell Endocrinol 2011;341:77-88.) 中でも特に ANGPTL4, ESM-1, SNF1LK を中心に、培養細胞レベル、疾患動物モデル、および原発性アルドステロン症患者での採血検体での解析、を総合的に検討し、MR 特異的な血管細胞情報伝達およびアルドステロンによる心血管障害の解明を目指す。

(2) 高アルドステロンによる心血管障害を引き起こす PA 特に、手術による検体が入手可能な APA に焦点を当て、手術で得られる腫瘍組織と隣接する副腎組織 (AAG) の DNA (CpG) メチローム解析を行い、トランスクリプトーム解析および既知の遺伝子変異解析および臨床データとの統合により DNA メチル化を介したエピゲノム因子が APA の病態特にアルドステロン過剰産生や腫瘍発生にどのように関連しているかを検討する。

## 3. 研究の方法

(1) アルドステロン誘導高血圧モデルラットおよび PA 患者の血中 ANGPTL4、IGFBP3 動態、末梢血単核球遺伝子発現の検討：  
ANGPTL4 は市販の抗体 (Sant Cruz 社、ウサギ IgG) を用いた血清のイムノブロット、EMS-1 は市販の ELISA キット (Lunginnov Sas, France) を用い検討した。

(2) MR-EAhy およびヒト初代培養血管内皮細胞での細胞機能の検討：  
ANGPTL4、EMS-1、SNF1LK の各因子についてはアルドステロン刺激による蛋白発現が確認されている (Sekizawa N et al. Mol Cell Endocrinol 2011;341:77-88.) ことから MR-EAhy への細胞機能の差異を検討する。特に ANGPTL4 は LPL 阻害作用を有することが知られており、MR-EAhy 細胞培養に LPL 標準品を添加した際の LPL 活性を蛍光色素法にて検討した。

(3) APA のトランスクリプトーム解析：  
APA の患者より同意取得後、手術時に採取した 7 症例の APA とその隣接副腎組織 (AAG) の 14 検体より、DNA と RNA を抽出した。100ng の全 RNA を cRNA 増幅、Cy3 標識、断片化した後、SurePrint G3 Human GE 8x60K Microarray (Agilent 社) にて網羅的ランスクリプトーム解析を施行した。

(4) APA の網羅的メチル化解析 (メチローム解析)：  
上述の 14 検体の DNA (1 μg) をバイサルファイト変換し Infinium Human Methylation 450 BeadChip (Illumina 社) にてメチローム解析を施行した。メチル化の指標である値 (0-1) のうち 0.1 を低メチル化、0.1 を高メチル化と定義した。

トランスクリプトーム解析とメチローム解析の結果を統合し特に遺伝子発現が増加しており、かつ当該遺伝子プロモーター領域 (TSS200/TSS1500) が低メチル化している遺伝子を抽出した。

## 4. 研究成果

(1) アルドステロン誘導高血圧モデルラットおよび PA 患者の血中 ANGPTL4 をイムノブロットで、血中 EMS-1 濃度を市販の ELISA キットでそれぞれ対照ラットおよび本態性高

血圧患者の血清を対照として比較したが有意な差を得られなかった

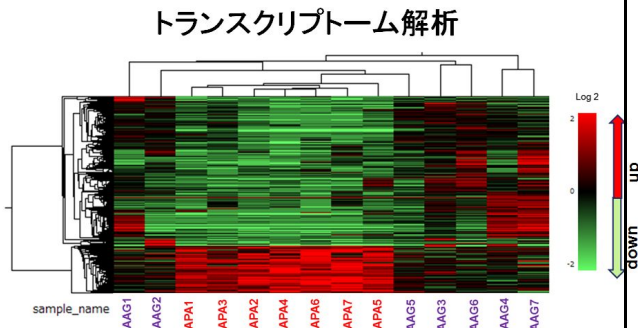
(2) ANGPTL4 の LPL 阻害作用について、MR-EAhy 培地に LPL 標準品あるいは 3T3L1 細胞上清を添加した際の LPL 活性の有意差は認められなかった。以上初年度の諸検討にて陽性データが得られなかったため、以下の APA での検討へ移行した。

(3) 検討した 7 例の APA 症例では、内分泌検査で PA と確定診断のうえ、副腎静脈サンプリングにて腫瘍側のみ片側のアルドステロン過剰産生が証明され、手術による副腎切除後にレニン・アルドステロン系の正常化を示し、APA であることが臨床的に証明された症例である。

(4) この 7 例の APA においてトランスクリプトーム解析では、APA において AAG に比し、277 遺伝子が 2 倍以上の発現量増加を示した。

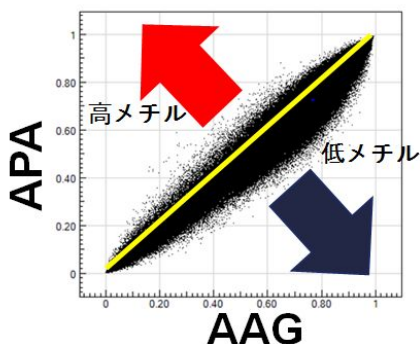
発現増加した遺伝子群には PCP4、ALDH1A2、CYP11B2 など APA において既報のトランスクリプトーム解析で報告のあった遺伝子が含まれており、今回のマイクロアレイ結果の妥当性が示唆された。一方、HOXA7 などの HOX 遺伝子の発現上昇が初めて明らかとなり、腫瘍化との関連が示唆された。

図1 トランスクリプトーム解析 Heatmap



(5) メチローム解析では、APA では AAG と比較して特定の遺伝子領域に限らずゲノム全体が低メチル化状態であることが明らかになった。副腎皮質癌ではゲノム全体の低メチル化状態に加えて特定のプロモーター領域の高メチル化状態が報告されていることから、ホルモン産生能を保持した良性腫瘍である APA と悪性腫瘍では DNA メチル化パターンが異なると考えられ、病態との関わりが示唆された。

図2 APA - AAG の DNA メチル化動態



(6) 遺伝子発現と DNA メチル化修飾の統合解析により、34 遺伝子において遺伝子発現の上昇とプロモーター領域における DNA メチル化の低下の関係が認められた。これらの遺伝子の中には、アルドステロン合成促進に関わる CYP11B2 や MC2R、腫瘍の転移や悪性度に関わることが知られている PRRX1、RAB38、FAP、GCNT2、ASB4 など含まれており、APA におけるアルドステロンの自律性分泌や腫瘍化との関与が示唆された。

本研究は同一症例において APA と AAG のトランスクリプトーム解析とメチローム解析を統合的に比較検討し、APA の発症に DNA 脱メチル化による遺伝子発現制御の関与を示唆した初の報告である。

図3 APA において遺伝子発現が増加しており、かつ当該遺伝子プロモーター領域が低メチル化している 34 遺伝子

Gene Symbols	Fold Change	Mean $\Delta\beta$ value TSS	
		1500	200
CLRN1	16.47	-0.095	-0.231
CLRN1	15.18	-0.144	0.000
AQP2	8.691	-0.058	-0.071
RAB17	6.710	0.014	-0.122
CYP11B2	5.315	-0.067	-0.136
ERP27	4.055	0.000	-0.103
MC2R	3.708	-0.123	-0.040
CPS1-IT1	3.444	-0.101	0.000
TMEM200A	2.997	-0.070	-0.150
MPP4	2.967	-0.038	-0.150
PRRX1	2.946	-0.056	NA
RAB38	2.894	-0.063	-0.074
PPY	2.815	-0.142	-0.100
ATP8A2	2.694	-0.049	NA
FAP	2.684	-0.030	-0.122
IGSF5	2.597	-0.044	-0.126
KRT222	2.535	-0.071	-0.029
TMEM246	2.529	-0.185	-0.013
SATL1	2.508	-0.023	-0.105
HAS2-AS1	2.416	-0.080	-0.014
BEST3	2.201	-0.001	-0.150
HPX	2.071	-0.042	-0.126
HEPH	1.929	-0.013	-0.104
KCNA10	1.902	-0.100	-0.088
FOXS1	1.840	-0.088	-0.175
HK1	1.743	-0.054	-0.039
GCNT2	1.675	-0.063	-0.154
CLEC1A	1.652	-0.103	-0.029
ASB4	1.647	-0.010	-0.041
FBXO41	1.640	-0.104	0.000
OR2Y1	1.612	-0.182	-0.186
GABRR1	1.554	-0.070	-0.131
FOXO2-AS1	1.539	-0.051	-0.068
CALML3	1.515	-0.134	-0.053

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. Murakami M, Yoshimoto T, Nakabyashi K et al. (他 12 名、 ) Integration of transcriptome and methylome analysis of aldosterone-producing adenoma. Eur J Endocrinol. 2015 in press 査読有 PMID:25953827

2. Bouchi R, Minami I, Ohara N, et al. (他 9 名、 ) Impact of increased visceral adiposity with normal weight on the progression of arterial stiffness in Japanese patients with type 2 diabetes. BMJ Open Diabetes Res Care. 2014 査読有 DOI: 10.1136/bmjdr-2015-000081

3. 吉本貴宣、南 勲、小川佳宏 最新高血圧学-高血圧治療の最前線-ライフステージ・タイプ別の高血圧の治療・管理 二次性高血圧内分沁性高血圧 クッシング症候群 日本臨床 72:518-521, 2014. 査読無

4. 吉本貴宣、小川佳宏 高血圧をめぐる最新の話 脂肪細胞 最新医学 69:125-132, 2014. 査読無

5. 吉本貴宣、小川佳宏 アルドステロンと病態:アルドステロンによる動脈硬化・血管障害 The Lipid 24:239-244, 2013. 査読無

6. 吉本貴宣、小川佳宏 原発性アルドステロン症の診断と治療 副腎 CT スキャンの意義と限界 カレントセラピー 31:689-693, 2013. 査読無

7. Kida M, Sugiyama T, Yoshimoto T, Ogawa Y. Hydrogen sulfide increases nitric oxide production with calcium-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells. Eur J Pharm Sci. 48:211-215, 2013 査読有 DOI: 10.1016/j.ejps.2012.11.001

8. 吉本貴宣、小川佳宏 脂肪組織からアディポサイトカインを介した代謝情報ネットワークと高血圧 血管医学 13:27-33, 2012. 査読無

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Murakami M, Yoshimoto T, et al. Integration of transcriptome and methylome analysis to dissect molecular pathogenesis of primary aldosteronism. 16<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology & the Endocrine Society 96<sup>th</sup> Annual Meetings & Expo. 2014 June 21<sup>th</sup>-24<sup>th</sup> Chicago USA.

2. 村上正憲、吉本貴宣、他 アルドステロン産生副腎腫瘍のゲノムワイド DNA メチル化解析 第 87 回日本内分沁学会学術総会

2014 年 4 月 24-26 日 福岡県福岡市

3. 杉山 徹、木田道也、吉本貴宣、小川佳宏 血管内皮細胞における硫化水素の血管新生促進作用 第 16 回日本心血管内分沁代謝学会学術総会 2012 年 11 月 23-24 日 東京

4. 大橋琢也、吉本貴宣、山口実菜、三原正朋、他 原発性アルドステロン症に対する手術・薬物治療による高血圧・心腎機能への効果 第 85 回日本内分沁学会学術総会 2012 年 4 月 19-21 日 愛知県名古屋

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称: 該当なし。  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称: 該当なし。  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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: 8 0 2 9 7 4 5 7

(2) 研究分担者  
無し。 ( )

研究者番号:

(3) 連携研究者  
無し。 ( )

研究者番号