

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860707

研究課題名(和文)アルドステロン産生腺腫を基盤にした新規アルドステロン合成機構の解明

研究課題名(英文)The novel mechanism of aldosterone production in aldosterone-producing adenoma

研究代表者

沖 健司 (OKI, KENJI)

広島大学・病院(医)・病院助教

研究者番号：30638995

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：アルドステロン産生腺腫(APA)における網羅的遺伝子発現解析から、遺伝子変異を認めないAPA(APA-WT)でKCNJ5変異を認めるAPA(APA-KCNJ5)に比較し、GNRHR(Gonadotropin-releasing hormone receptor)が高発現していることがわかった。さらに、副腎皮質癌細胞株にKCNJ5遺伝子変異を導入するとGNRHR発現が低下した。APA症例のGnRH刺激試験から、GnRH刺激によるアルドステロン上昇率とGNRHR発現量に強い正の相関がみられた。また、GNRHRが発現するAPA-WTにおいてのみ、GnRH刺激によるアルドステロン上昇が顕著であった。

研究成果の概要(英文)：Microarray analysis targeting GPCR-associated genes was conducted using APA without known mutations (APA-WT) samples and APA with the KCNJ5 mutation (APA-KCNJ5). Gonadotropin-releasing hormone receptor (GNRHR) was the highest expression in APA-WT by microarray analysis. The quantitative polymerase chain reaction (qPCR) assay results revealed higher GNRHR expression levels in APA-WT samples than those in APA-KCNJ5 samples. Patients with APA-WT (n=9), which showed higher GNRHR and LHCGR levels, had significantly higher GnRH-stimulated aldosterone response than those with APA-KCNJ5 (n=13) (P<0.05). HAC15 cells with KCNJ5 gene carrying T158A mutation exhibited a significantly lower GNRHR expression than that in control cells. We clarified increased expression of GNRHR and LHCGR in APA-WT, and the molecular analysis including the receptor expression associated with clinical findings of GnRH stimulation.

研究分野：医歯薬学

キーワード：原発性アルドステロン症 アルドステロン G蛋白共役型受容体

1. 研究開始当初の背景

高血圧症は40歳以上の約40%が罹患し、高血圧患者の3.3-10%程度を原発性アルドステロン症が占めると報告され [Endocr J 58:711-21, 2011], 本邦における原発性アルドステロン症の罹病者数は300-400万人程度にのぼると推測される。アルドステロンは血圧のみならず、心臓や腎臓などの臓器障害に強く影響し、アルドステロン合成・分泌の制御は臨床的に極めて重要である。

原発性アルドステロン症は、アルドステロン産生腺腫 (APA) と特異性アルドステロン症に大別され、近年、内向き整流性カリウムチャンネルのひとつ Kir3.4 をコードする *KCNJ5* の体細胞変異が APA の原因である可能性が報告された [Science 331:768-72, 2011]。我々は、*KCNJ5* の遺伝子変異が、アルドステロン合成を促進する詳細な機序を明らかにした [Endocrinology 153:1774-82, 2012]。続いて、*ATPIA1*、*ATP2B3*、*CACNA1D* の体細胞変異が APA におけるアルドステロン過剰症をもたらすことも報告された [Nat Genet 45:440-4, 2013. Nat Genet 45:1055-60, 2013.]。ただし、約半数の APA には遺伝子変異を認めず、その腫瘍におけるアルドステロン合成機序は全く解明されていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、遺伝子変異を認めない APA (APA-WT) を対象に、アルドステロン合成機序を解明し、APA における新規分子標的アルドステロン合成阻害薬やアルドステロン合成をターゲットにした降圧薬の開発につなげることを目的とした。

3. 研究の方法

網羅的遺伝子発現解析

APA-WT (n=3) と *KCNJ5* 変異を有する APA (APA-KCNJ5, n=3) を用いて、網羅的遺伝子発現解析を行った。G 蛋白共役型受容体 (192 遺伝子) に焦点をあて、両群での遺伝子発現の違いを検討した。

腫瘍における遺伝子発現解析

高発現する遺伝子を、両群 (APA-WT n=9, APA-KCNJ5 n=13) において qPCR で確認した。

APA 症例に対する内分泌検査

APA-WT において、GNRHR (Gonadotropin Releasing Hormone Receptor) が高発現していたため、APA (APA-WT n=9, APA-KCNJ5,

n=13) を対象に GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) 負荷試験を実施した。

副腎皮質癌細胞株を用いた in vitro 解析

KCNJ5 遺伝子異常が GNRHR に与える影響を検討するため、ヒト副腎皮質癌細胞株 (HAC15) に *KCNJ5*-T158A をレンチウイルスで導入し、GNRHR 発現に与える影響を検討した。

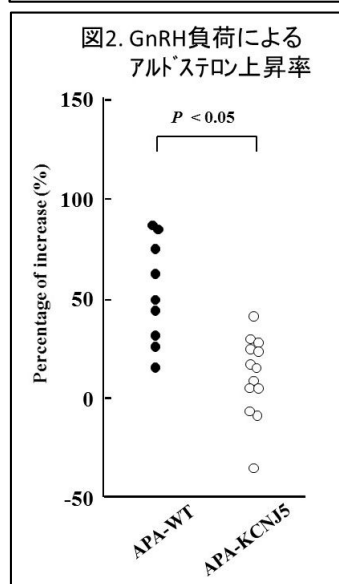
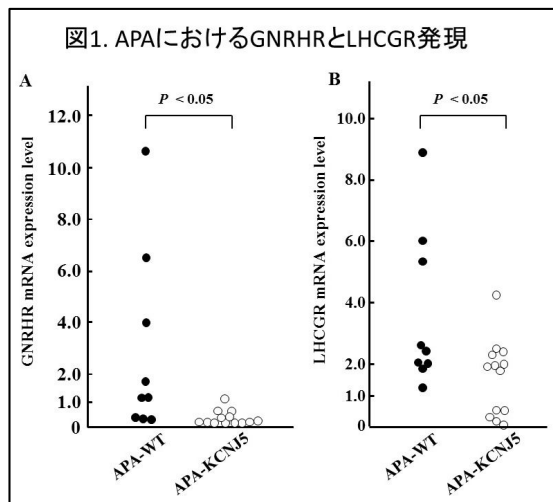
4. 研究成果

網羅的遺伝子発現解析

GPCR に焦点をあてた網羅的遺伝子発現解析から、両群間で2倍以上の差がみられた13遺伝子が抽出された。それらの中で、APA-WT で最も高発現していた GNRHR に着目した。

腫瘍における遺伝子発現解析

qPCR で GNRHR 発現を検討したところ、APA-KCNJ5 に比較し、APA-WT で GNRHR は高値であった (図 1A)。さらに、過去の報

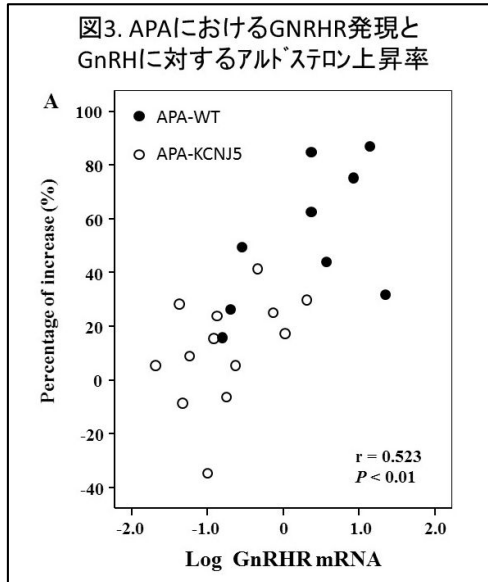


告で GNRHR が高発現する APA において、LHCGR 発現も増えていることが報告されている [Eur J Endocrinol 160:443-51, 2009]。そこで、LHCGR 発現についても qPCR で比較検討したところ、APA-WT において有意

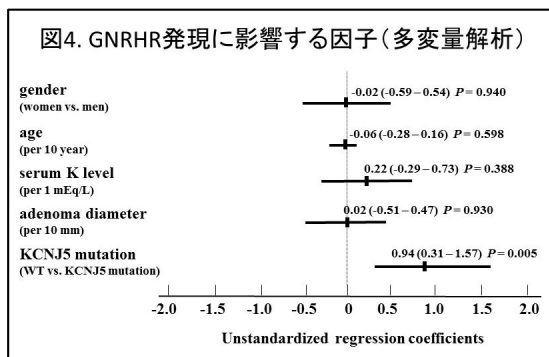
に発現量が増加していた (図 1B)。

APA 症例に対する内分泌検査

GnRH 負荷試験後のアルドステロン上昇率を両群間で比較した。APA-WT において、アルドステロン上昇率は有意に高値であり (図 2)、さらに、GnRHR 発現量とアルドステロン上昇率は有意な正の相関を示した (図 3)。



GnRHR 発現に与える因子を重回帰分析で検討したところ、APA における遺伝子変異のみが有意な説明因子となった (図 4)。



副腎皮質癌細胞株を用いた in vitro 解析

KCNJ5 変異が GnRHR 発現に与える影響を検討するために、KCNJ5 変異を導入したアルドステロンを合成する副腎皮質癌細胞株を用意した。以前に、我々が報告したように、KCNJ5 変異を導入するとアルドステロン合成酵素 (CYP11B2) の発現量は 17.7 倍増加した [Endocrinology 153: 1774-82, 2012]。GnRHR の発現量を検討すると、KCNJ5 変異の導入で GnRHR 発現量は 0.64 倍に低下した。つまり、KCNJ5 変異により、GnRHR 発現量が低下していることが示唆された。

本研究から、APA-WT において GnRHR や LHCGR が高発現し、さらに APA-WT では Gonadotropin によりアルドステロン合成が促進さ

れることが示唆された。APA-WT の病因は全く同定されていないが、本研究が病因の解明につながる一助になると考える。また、異所性受容体発現を制御したアルドステロン合成阻害を検討する基盤研究に結びつく可能性もある。

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 10 件)

1. Nishimoto K, Koga M, Seki T, Oki K, et al. Immunohistochemistry of aldosterone synthase leads the way to the pathogenesis of primary aldosteronism. *Mol Cell Endocrinol.* 2017; 441: 124-33. (査読有)
DOI: 10.1016/j.mce.2016.10.014
2. Oki K, et al. YPEL4 modulates HAC15 adrenal cell proliferation and is associated with tumor diameter. *Mol Cell Endocrinol.* 2016; 434: 93-8. (査読有)
DOI: 10.1016/j.mce.2016.06.022
3. Kishimoto R, Oki K, et al. Gonadotropin-Releasing Hormone Stimulate Aldosterone Production in a Subset of Aldosterone-Producing Adenoma. *Medicine (Baltimore).* 2016; 95(20): e3659. (査読有)
DOI: 10.1097/MD.0000000000003659
4. Yoshii Y, Oki K, et al. Hypomethylation of CYP11B2 in Aldosterone-Producing Adenoma. *Hypertension.* 2016; 68(6): 1432-7. (査読有)
DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.08313
5. Asao T, Oki K, et al. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity is associated with the prevalence of chronic kidney disease in diabetic patients. *Endocr J.* 2016; 63(2): 119-26. (査読有)
DOI: 10.1507/endocrj.EJ15-0360
6. Nagano G, Ohno H, Oki K, et al. Activation of Classical Brown Adipocytes in the Adult Human Perirenal Depot Is Highly Correlated with PRDM16-EHMT1 Complex Expression. *PLoS One.* 2015; 10(3): e0122584. (査読有)
DOI: 10.1371/journal.pone.0122584
7. Shiwa M, Yoneda M, Nakanishi S, Oki K, et al. Japanese Lifestyle during Childhood Prevents the Future Development of Obesity among Japanese-Americans. *PLoS One.* 2015; 10(3): e0120804. (査読有)
DOI: 10.1371/journal.pone.0120804

8. Shiwa T, Oki K, et al. A Patient with an Extra-adrenal Pheochromocytoma and Germ-line SDHB Mutation Accompanied by an Atypical Meningioma. Intern Med. 2015; 54(18): 2355-60. (査読有)
DOI: 10.2169/internalmedicine.54.4663
 9. Matsumoto T, Oki K, et al. Effect of aldosterone-producing adenoma on endothelial function and rho-associated kinase activity in patients with primary aldosteronism. Hypertension. 2015; 65(4): 841-8. (査読有)
DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.05001
 10. Gomez-Sanchez CE, Oki K. Minireview: potassium channels and aldosterone dysregulation: is primary aldosteronism a potassium channelopathy? Endocrinology. 2014; 155: 47-55. (査読有)
DOI: 10.1210/en.2013-1733
- [学会発表] (計 22 件)
1. Itcho K, Oki K, et al. The regulation of PCP4 transcription via DNA methylation in aldosterone-producing adenoma. 42th Meeting of the International Aldosterone Conference. 2016/3/30-31. Orlando, USA.
 2. Yoshii Y, Oki K, et al. The effects of Angiotensin II metabolites on aldosterone production in the HAC15 human adrenocortical cell line. 42th Meeting of the International Aldosterone Conference. 2016/3/30-31. Orlando, USA.
 3. Kobuke K, Oki K, et al. Ca²⁺ Binding Protein, Calneuron 1, Increased Ca²⁺ in Endoplasmic Reticulum and Aldosterone Production in Aldosterone-producing Adenoma. 42th Meeting of the International Aldosterone Conference. 2016/3/30-31. Orlando, USA.
 4. 沖 健司. アルドステロン合成に関わるエピジェネティック制御機構. 第 24 回日本ステロイドホルモン学会学術集会. 2016/12/3. 大分市.
 5. 一町 澄宜, 沖 健司, 他. アンジオテンシン II 代謝産物によるアルドステロン合成制御機構に関する検討. 第 24 回日本ステロイドホルモン学会学術集会. 2016/12/3. 大分市.
 6. 吉井 陽子, 沖 健司, 他. APA 及び遺伝子変異に基づくステロイド合成酵素の DNA メチル化解析. 第 26 回臨床内分泌代謝 Update. 2016/11/18-19. 大宮市.
 7. 吉井 陽子, 沖 健司, 他. アルドステロン産生腺腫におけるステロイド合成酵素のエピジェネティック調節機構. 第 39 回日本高血圧学会総会. 2016/9/30-10/2. 仙台市.
 8. Yoshii Y, Oki K, et al. DNA hypo-methylation of Aldosterone synthesis (CYP11B2) in aldosterone producing adenoma, but not regulated by somatic mutations of adenoma. International Society of Hypertension 2016 satellite symposium Renin-angiotensin-aldosterone system. 2016/9/23-24. Tokyo, Japan.
 9. 一町 澄宜, 沖 健司, 他. 遺伝子変異を認めないアルドステロン産生腺腫におけるアルドステロン合成機構の探索. 第 89 回日本内分泌学会学術総会. 2016/4/21-23. 京都市.
 10. 吉井 陽子, 沖 健司, 他. アルドステロン産生腺腫におけるステロイド合成酵素のエピジェネティック調節機構. 第 89 回日本内分泌学会学術総会. 2016/4/21-23. 京都市.
 11. 伊達 真琴, 一町 澄宜, 沖 健司, 他. 原発性アルドステロン症の精査中に診断したクッシング病の一例. 第 25 回臨床内分泌代謝 Update. 2015/11/27-28. 東京.
 12. 一町 澄宜, 沖 健司, 他. アンジオテンシン II 代謝産物によるアルドステロン合成制御機構に関する検討. 第 88 回日本内分泌学会学術総会. 2015/4/23-25. 東京.
 13. 小武家 和博, 沖 健司, 他. ATP1A1 変異を有するアルドステロン産生腺腫の網羅的遺伝子発現解析による検討. 第 88 回日本内分泌学会学術総会. 2015/4/23-25. 東京.
 14. 岸本 瑠衣, 沖 健司, 他. アルドステロン過剰分泌の心合併症への影響. 第 24 回臨床内分泌代謝 Update. 2014/11/28-29. さいたま市.
 15. 沖 健司, 他. アルドステロン絶対値を考慮した PA の一次スクリーニング. 第 24 回臨床内分泌代謝 Update. 2014/11/28-29. さいたま市.
 16. 沖 健司, 他. 原発性アルドステロン症の一次スクリーニングにおけるアルドステロン絶対値の有効性. 第 3 回臨床高血圧フォーラム. 2014/5/24-26. 広島市.
 17. 岸本 瑠衣, 沖 健司, 他. 原発性アルドステロン症が心合併に与える影響. 第 3 回臨床高血圧フォーラム. 2014/5/24-26. 広島市.
 18. 沖 健司, 他. 副腎皮質細胞の増殖およびアルドステロン合成における YPEL4 の役割. 第 87 回日本内分泌学会学術総会. 2014/4/24-26. 福岡市.
 19. 小武家 和博, 志和 亜華, 沖 健司, 他. CYP11B2 抗体を用いたアルドステロン産生腺腫の免疫組織化学による検討. 第 87 回日本内分泌学会学術総会. 2014/4/24-26. 福岡市.
 20. 一町 澄宜, 沖 健司, 他. ATP1A1 体細胞変異を有するアルドステロン産生腺腫の臨床的および病理学的検討. 第 87 回日本内分泌学会学術総会. 2014/4/24-26. 福岡市.
 21. Itcho K, Kobuke K, Oki K, et al. The Relationship Between Tumor Genotype and

Clinical or Pathological Characteristics in Patients with Aldosterone Producing Adenoma. The Endocrine society's 96th Annual Meeting and Expo. 2014/6/21-24. Chicago, USA.

22. Kobuke K, Itcho K, Okii K, et al. The clinical and pathological characteristics of aldosterone producing adenoma with ATP1A1 mutation. 40th Meeting of the International Aldosterone Conference. 2014/6/19-20. Chicago, USA.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

沖 健司 (OKI Kenji)

広島大学・大学病院・病院助教

研究者番号：30638995

(4)研究協力者

Celso E. Gomez-Sanchez

University of Mississippi Medical Center