

令和元年6月5日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06894

研究課題名（和文）エピゲノム調節を介したアルドステロン合成制御機構の解明と創薬標的分子の探索

研究課題名（英文）Discovery of aldosterone synthesis mechanisms and drug target via epigenomic regulation

研究代表者

小武家 和博（KAZUHIRO, KOBUKE）

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） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：Bioinformaticsによる解析により、低メチル化が起きている領域と、関係する遺伝子について実際に発現が増加している因子について同定した。また、低メチル化がおきているDNA配列のモチーフ探索を行い、それに結合する転写因子について絞り込みを行った。候補としてあがった転写因子について、該当する遺伝子の低メチル化配列との結合について検討を行い、実際に両者が結合していることを証明し、標的因子の同定を行った。これによりPCP4遺伝子やGPCR遺伝子の低メチル化がCEBPAなどの転写因子との相互作用を介してアルドステロン合成に関与していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性の二次性高血圧および重症の動脈硬化性疾患の原因となりうる原発性アルドステロン症、なかでも重症となりうるアルドステロン産生腺腫について、その特異的なアルドステロンの過剰産生機構については未だ明らかでない部分が多いが、本研究により、DNAのメチル化を介した遺伝子発現調節機構の変化が、アルドステロン産生腺腫において重要な働きを担っていることが明らかとなった。アルドステロン合成制御機構の分子メカニズムについて詳細が明らかになることにより、新規分子標的治療薬や診断法の開発につながり、疾病の克服につながる。

研究成果の概要（英文）：This study reports a comprehensive integration analysis of DNA methylation and mRNA expression in APAs. We demonstrated that GPCR or GPCR-related genes had a much higher incidence of CpG island demethylation in APAs, and due to this demethylation, some receptors were in a state that would facilitate gene transcription. Also We showed that the PCP4 promoter was one of the most hypomethylated in APAs and that PCP4 transcription may be associated with demethylation as well as with CEBPA in APAs.

This study provides important information regarding the molecular mechanisms of ectopic or aberrant receptor expression in APAs and identifies therapeutic or diagnostic targets that could be studied further.

研究分野：内分泌

キーワード：エピゲノム調節 アルドステロン 副腎腫瘍 二次性高血圧

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

1. 研究開始当初の背景

アルドステロンは血圧を規定する重要なホルモンであり、副腎皮質球状層細胞において分泌される。本来アルドステロンの分泌は、腎臓の輸入細動脈に存在する傍系球体細胞から分泌されるレニンと、レニンにより血液中のアンジオテンシノーゲンから変換されるアンジオテンシン I およびアンジオテンシン I からアンジオテンシン変換酵素により変換され合成されるアンジオテンシン II によって厳密に制御されている。

しかしながら原発性アルドステロン症という疾患においては、アルドステロンの自律的かつ過剰な分泌が生じ、そのため治療抵抗性かつ重症の高血圧をきたす。重症の高血圧症においては全身の動脈硬化症の発症が惹起され、冠動脈疾患、脳血管疾患、末梢血管閉塞性疾患など、多数の動脈硬化性疾患の原因となるのみならず、原発性アルドステロン症では、過剰のアルドステロンが原因となり、心筋や血管壁のリモデリング、ステロイド作用による体液恒常性への影響、糖脂質代謝異常、肥満、骨粗鬆症など、全身の多臓器への影響が相互に作用し、重篤な代謝性疾患に発展しうる。

原発性アルドステロン症は、最も頻度の高い二次性高血圧症（本態性高血圧以外の、何らかの原因疾患に続発する高血圧症）であり、全高血圧症のなかでも、3.3~10.0%の割合で存在すると報告されている。すなわち本疾患は疾患頻度と重症度の両面からみて、その克服は重要な医学的課題と言える。

原発性アルドステロン症の病型はアルドステロン産生腺腫と特発性アルドステロン症に分類され、いずれの病型においても、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系非依存的にアルドステロン自律過剰分泌を呈する。このとき高アルドステロン血症が高血圧をもたらすのみならず、心血管疾患や腎障害を高率に発症する。したがって、原発性アルドステロン症の治療においては、アルドステロン合成量をいかにして低下させるかが、最も根本的な解決であり、現在ではアルドステロン受容体拮抗薬を永続的に内服するか、アルドステロン産生病変を手術的に取り除く（片側性アルドステロン腺腫の場合のみ有効）のみである。内服薬による加療については、アルドステロン受容体の発現増加など、長期にわたる加療中に、薬効が減弱する変化が人体に生じることが知られており、異なる機序からの治療メソッドの開発が、問題解決に有用であると考えられている。その一つとしてアルドステロン合成そのものの低減は有力と考えられる方法であり、そのためには原発性アルドステロン症における、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系を介さないアルドステロン合成制御機構の解明が、極めて重要である。

原発性アルドステロン症におけるアルドステロン過剰産生の分子メカニズムに関する解析は、現在のところ特にアルドステロン産生腺腫において中心に進んでいる。副腎皮質細胞の細胞膜上に存在する、各種のイオンチャネルやトランスポーターをコードする遺伝子について、アルドステロン産生腺腫の細胞においてはその体細胞突然変異が生じていることが見出され、病因として同定されてきている。

アルドステロン合成は、コレステロールを基質に、複数のステロイド合成酵素を必要とするが、中でもアルドステロン合成酵素(CYP11B2) が律速酵素として知られている。アルドステロン産生腺腫の原因として見いだされた体細胞遺伝子変異群は、その変異により細胞内カルシウムイオンレベルの上昇をもたらし、その結果 CYP11B2 の発現増加を引き起こし、アルドステロン合成を亢進させていると考えられている。しかしながら CYP11B2 はアルドステロン合成の律速酵素であるものの、コルチゾールを合成する CYP11B1 とアミノ酸配列で 95% の相同性があり、CYP11B2 を選択的に阻害する創薬は困難を極めている。そこで、CYP11B2 の上流を標的にし、最終的に CYP11B2 の発現を選択的に抑制することで、原発性アルドステロン症の治療に結びつく創薬の、アンメットニーズを達成できると考える。

近年、プロモーター領域の DNA メチル化は、細胞内シグナルを介さずとも、ホルモン合成に関与する遺伝子発現を調節することが報告された。そのため、DNA メチル化を介したアルドステロン合成酵素の発現調節について明らかにすることで、新たなアルドステロン合成制御機構の解明につながると思量される。それらの新たな制御機構を見出すことができれば、原発性アルドステロン症や難治性高血圧治療の創薬基盤とすることができる。

2. 研究の目的

我々の先行研究で CYP11B2 プロモーターに 5 カ所のメチル化部位を同定し、またそれらのうち 4 カ所まで有意に脱メチル化していることを報告しており、アルドステロンを産生する組織において、アルドステロン合成に関わる多くの遺伝子が脱メチル化により発現調節されていることが示唆されている。しかしながら遺伝子発現に関わる転写調節因子との相互作用や、因子の同定には至っていない。そこで、本研究では、CYP11B2 の低メチル化部位に結合する転写因子を同定し、その転写因子の機能解析を実施することにより、原発性アルドステロン症や高血圧の治療および診断の新たな標的因子を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

まず当院で副腎腫瘍摘出手術を行った副腎腫瘍症例について、内分泌学的特徴をもとに非機能性と考えられる腫瘍(NFA; アルドステロンを産生しない副腎皮質腺腫)12 症例、アルドステロン産生腺腫 35 症例を抽出した。それぞれの遺伝子発現について mRNA を抽出し、さらにアルドステロン産生腺腫では、免疫組織化学により CYP11B2 発現が増加している部位を特定し、そ

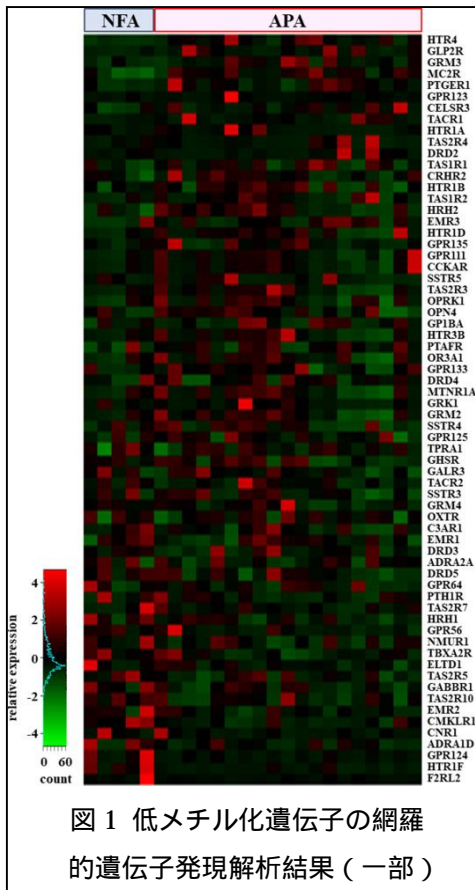


図1 低メチル化遺伝子の網羅的遺伝子発現解析結果(一部)

はアルドステロン産生腺腫で低メチル化を示していた。つまり、アルドステロンを産生する組織において、アルドステロン合成に関わる多くの遺伝子が脱メチル化により発現調節されていることが示唆された。

網羅的遺伝子発現解析(図1)・DNAメチル化解析を統合すると、アルドステロン産生腺腫において発現量は有意に上昇し、低メチル化を示すDNAメチル化部位が約3800箇所同定された。DNAメチル化のため、1つの遺伝子に対し20カ所以上低メチル化を示す遺伝子のみを抽出すると、13遺伝子に絞り込まれた。網羅的遺伝子発現解析からは、アルドステロン産生腺腫に有意に高発現する15の転写因子を得られた。

これらの中からGPCR遺伝子に着目すると、HTR4, MC2R, TACR1, GRM3, and PTGER1の遺伝子でアルドステロン産生腺腫とNFAの間で有意なメチル化の変化をみとめたが、アルドステロン産生腺腫の遺伝子変異間での差は認めなかった。また、遺伝子発現解析では、HTR4, PTGER1の遺伝子発現はAPAでNFAよりも増加しており(図2)、強くDNAメチル化と相関していた(表1)。

アルドステロン産生腺腫において高発現しており、アルドステロン産生に関与すると考えられている遺伝子PCP4は、そのメチル化と発現に相関があることが示された(図3)。そこでモチーフ解析を行うことにより、CEBPAとの間で相互作用する可能性が示唆された(図4)、そ

DNA methylation site	r	P value
<i>HTR4</i>		
a	0.057	0.702
b	-0.336	0.021
c	0.030	0.842
<i>PTGER1</i>		
d	-0.112	0.455
e	-0.353	0.015
f	-0.208	0.161
g	-0.091	0.545

表1 HTR4, PTGER のメチル化と遺伝子発現の相関

強く関わる因子であるが、低メチル化はそれとは別の機序によってもたらされるものであり、メチル化を制御している因子は、腫瘍形成のより根幹となる部分で関わっている可能性も考え

こから抽出したDNAについてDNAシーケンスを行い、アルドステロン産生腺腫の遺伝子変異についても同定した。得られた結果を非機能性腺腫とアルドステロン産生腺腫、あるいはアルドステロン産生腺腫の遺伝子変異別などで解析し、その遺伝子発現結果の違いなどについてBioinformaticsから転写因子とプロモーター結合を予測し、ゲルシフトアッセイでプロモーターに結合する転写因子の同定を行った。

つぎに、上記の結果をもとに、標的転写因子に対するDNA結合領域をより明確にするため、in vivoでの検討を行うべく、副腎皮質癌培養細胞株(HAC15)に対して、レンチウイルスを用いて、KCNJ5-T158A遺伝子変異を導入し、アルドステロン過剰産生細胞、すなわちアルドステロン産生腺腫のモデルとして用いた。この細胞と対照群を用いて、同定した低メチル化因子において同様に低メチル化が生じているか、メチル化ビーズアレイによって確認し、また同定した転写因子が実際に低メチル化部位に結合しているかを確認するため、クロマチン免疫沈降(ChIP)を行った。ChIPから得られたサンプルに対し、転写因子結合領域のDNA配列に応じたprimerを複数準備し、qPCRで定量解析を行った。

4. 研究成果

アルドステロン産生腺腫と非機能性副腎皮質腺腫を用いて解析した450万か所のメチル化部位のうち、約2万7千か所で、両者で有意にメチル化率が異なっており($P < 0.01$)、それらのうち2万4千箇所

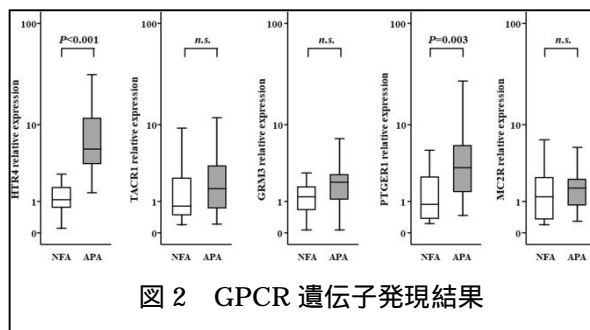


図2 GPCR 遺伝子発現結果

でPCP4とCEBPAの間でChIP-qPCRを行うことによりPCP4のプロモーター領域にCEBPAが結合し、その発現を調節することで、強力にアルドステロン合成に影響を与えていることが示唆された(図5)。しかしながらPCP4のメチル化レベルそのものはKCNJ5遺伝子変異とは関連していなかった。すなわちKCNJ5遺伝子変異は、アルドステロン産生腺腫においてアルドステロン過剰産生に

られた。

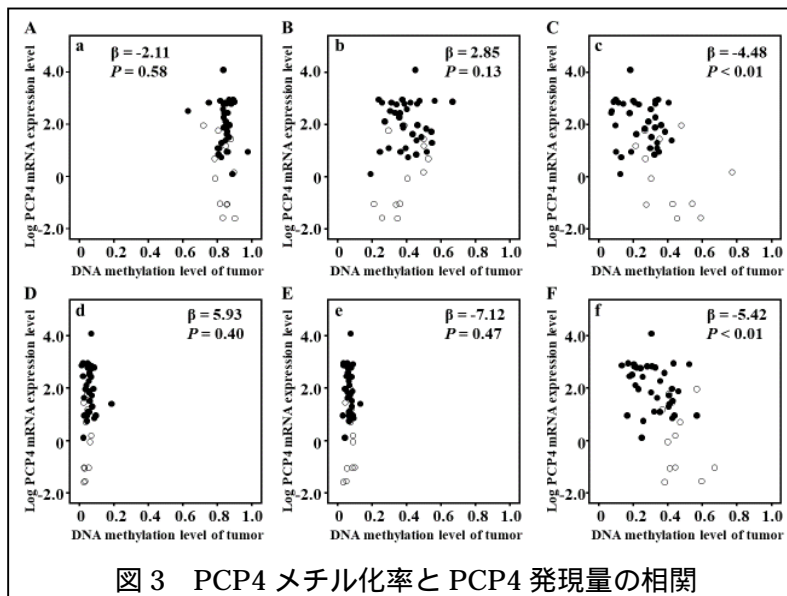


図3 PCP4メチル化率とPCP4発現量の相関

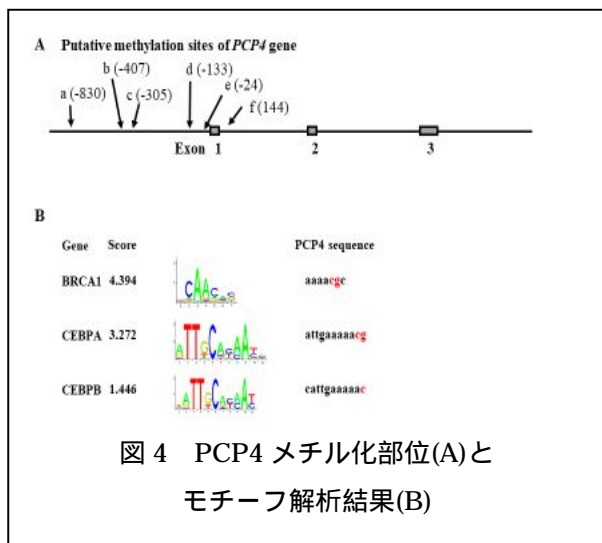


図4 PCP4メチル化部位(A)とモチーフ解析結果(B)

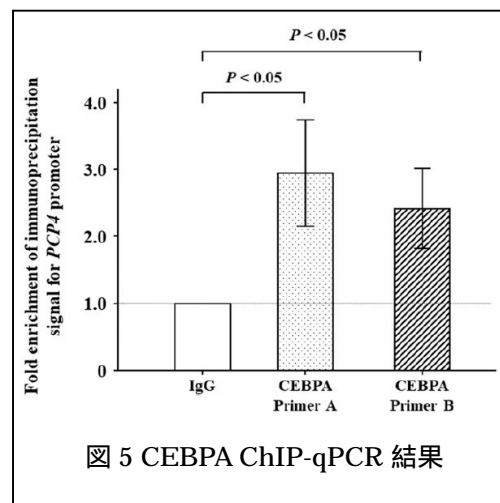


図5 CEBPA ChIP-qPCR 結果

以上の結果から、アルドステロン産生腺腫における核内転写因子や転写調節因子、GPCR およびシグナル伝達因子における低メチル化は、アルドステロン産生腺腫におけるアルドステロン過剰産生メカニズムについて重要な働きをもつ可能性が示唆された。しかしながら、アルドステロン産生腺腫の腫瘍化、あるいはその形成におけるメチル化の調節機構についてはまだ解明は不十分であった。したがって *in vitro* での検討を含む発展的研究においては、さらに異なるアプローチを含めた解析を踏まえたうえで取り組むことが望まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Kazuhiro Kobuke, Kenji Oki, Celso E Gomez-Sanchez, Haruya Ohno, Kiyotaka Itcho, Yoko Yoshii, Masayasu Yoneda, Noboru Hattori. Purkinje Cell Protein 4 Expression Is Associated With DNA Methylation Status in Aldosterone-Producing Adenoma. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Volume 103, Issue 3, March 2018, Pages 965–971, doi.org/10.1210/jc.2017-01996 (査読有)
2. Kiyotaka Itcho, Kenji Oki, Kazuhiro Kobuke, Yoko Yoshii, Haruya Ohno, Masayasu Yoneda, Noboru Hattori. Aberrant G protein-receptor expression is associated with DNA methylation in aldosterone-producing adenoma. *Molecular and Cellular Endocrinology* Volume 461, 5 February 2018, Pages 100-104, doi.org/10.1016/j.mce.2017.08.019 (査読有)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Nanao Y, Oki K, Kobuke K, et al. ATP1A1 Mutation Stimulates Adrenal Cell Proliferation via

Vitamin D Receptor Signal Induced by DNA Demethylation. 44th Meeting of the International Aldosterone Conference. 2019/3/21-22. New Orleans, USA

2. Kobuke K, Oki K, et al. Ouabain induced aldosterone production and cell proliferation in ATP1A1 mutated aldosterone-producing adenoma. 44th Meeting of the International Aldosterone Conference. 2019/3/21-22. New Orleans, USA
3. 小武家 和博, 沖 健司, 一町 澄宜, 吉井 陽子, 米田 真康 カルシウム結合タンパク CALN1は小胞体Ca²⁺調節を介しアルドステロン合成を促進する 第25回日本ステロイドホルモン学会学術集会 2017/11/18 東京
4. Itcho K, Oki K, Kobuke K, et al. The regulation of PCP4 transcription via DNA methylation in aldosterone-producing adenoma. 42th Meeting of the International Aldosterone Conference. 2017/3/30-31. Orland, USA

6 . 研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
研究協力者氏名 : 一町 澄宜
ローマ字氏名 : Kiyotaka Itcho

研究協力者氏名 : 沖 健司
ローマ字氏名 : Kenji Oki

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。