

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07885

研究課題名(和文) 原発性アルドステロン症におけるバイオマーカーとしてのマイクロRNAの意義

研究課題名(英文) significance of micro RNA as biomarker in primary aldosteronism

研究代表者

吉本 貴宣 (Yoshimoto, Takanobu)

東京医科歯科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：80297457

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：原発性アルドステロン症(PA)は高血圧症全体の10%を占める二次性高血圧症であり、本研究はその病因であるアルドステロン産生腺腫(APA)の手術検体のマイクロRNA網羅的に解析した。次世代シーケンサーと定量PCRを組み合わせることで網羅的に解析し、PAの腫瘍組織において特徴的な発現動態を示す複数のmiRNAを発見した。中でもmiR-299は細胞間基質であるヘパラン硫酸プロテオグリカンの分解に関与する酵素であるHPSEの発現制御に関わり得ることを培養細胞レベルで確認した。miR299-3pはAPA発症において細胞間基質などの面で腫瘍発症に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルドステロン産生腺腫(APA)の発症機序はいまだ不明な点が多いが、今回のAPA腫瘍組織におけるmiRNAの網羅的発現解析により、複数のmiRNAが特徴的な発現を示している事が明らかとなった。加えていくつかのmiRNAはAPAの病因あるいは病態と関連する各種遺伝子発現と相関しており、特にmiR299については細胞間基質の発現制御を介して腫瘍発症に関与する可能性が新たに示された。miRNAome研究は、APAの病態発症で未解明であった領域のさらなる解明に重要な役割を担うと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The present study was undertaken to comprehensively explore micro(mi)RNAs which are specifically expressed in aldosterone-producing adenoma (APAs), an adrenocortical tumor which causes hypertension through aldosterone hypersecretion. We characterized several unique miRNAs in surgical specimen of APAs by the combination of NGS and qPCR. Among these, we found that miR299 is associated with the regulation of HPSE expression, an enzyme involved in the degradation of heparan sulfate proteoglycan. MicroRNAome study would be one of the important research methods for elucidating the pathogenesis of APAs.

研究分野：内分泌代謝領域

キーワード：アルドステロン 副腎腫瘍 マイクロRNA

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

1. 研究開始当初の背景

(1) 原発性アルドステロン症(PA)は高血圧症の約10%と、コモンディージーズともいえる二次性高血圧症であり、特にアルドステロン産生腺腫(APA)はアルドステロン自律産生がより過剰で臓器障害に至るリスクが高い点、また手術により治癒可能な点から臨床的重要性が高い疾患である。

(2) 手術治療が可能であるAPAの部位診断には副腎静脈サンプリング(AVS)による左右副腎静脈のアルドステロン濃度比較という侵襲的検査が必要であり、APA特異的な血中バイオマーカーの探索は臨床的意義が大きい。またAPA術後に降圧薬が不要になる完全寛解率は50%弱であり、また術後に糸球体濾過量が低下し慢性腎臓病(CKD)に進展する例も多い。これらのAPA手術抵抗症例の予測因子としての新たなバイオマーカーが必要である。

(3) 近年、新たな臨床バイオマーカーとしてのmiRNAの意義が注目されている。miRNAは血中に豊富に存在し、腫瘍や各種病態下で特異的な発現変動を示すことからバイオマーカーとして関心が高まっている。加えて、組織局所においてmiRNAは標的となるmRNAに結合し、翻訳抑制やmRNA不安定化に作用することで標的遺伝子の発現を負に制御し様々な生命現象に関与することが明らかとなりつつある。

2. 研究の目的

当研究室の保有するAPAの凍結手術標本、血清検体と症例コホート用いて、エピゲノムマーカーのひとつであるマイクロRNA(miRNA)に焦点を当て、1) APAを有するPA患者の血中miRNAおよびAPA腫瘍組織でのmiRNAプロファイリングを行い、同患者での血中および腫瘍組織内で特異的に発現量が変化しているmiRNAを探索し、2) APA腫瘍組織でのmiRNA発現動態とAPAでの体細胞遺伝子変異型および腫瘍内遺伝子発現動態との関連性、3) APA患者での特異的な血中miRNAについて、特発性アルドステロン症との鑑別診断可能な血中バイオマーカーとしての意義、の検討を通してPAにおけるmiRNA検査を通じた病態の解明および診断マーカーとしての臨床応用を目指す。

3. 研究の方法

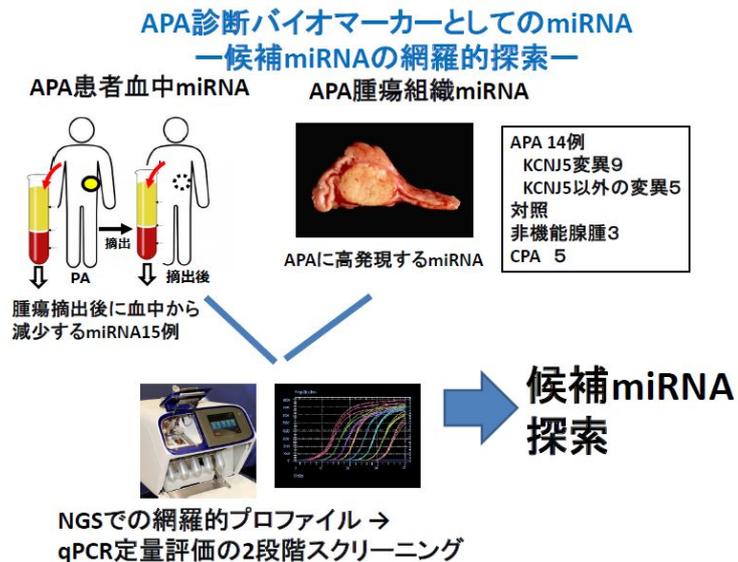
当院で副腎摘出術を受けたAPA14例(KCNJ5変異APA9例、非KCNJ5変異APA5例)、および比較対象として、コルチゾール産生腺腫(SH)5例と非機能性副腎皮質腺腫(NF)3例を比較対照として用いた。以上の検体を用い以下の検討を行った。

(1) APAにおける血中および腫瘍組織miRNAの網羅的探索 (図)

APA14例(KCNJ5変異APA9例、それ以外が5例)、比較対象としてコルチゾール産生腺腫5例、非機能性副腎腺腫3例を同時に解析した。プロファイリングには次世代シーケンサー(NGS)を用いる。この手法の組み合わせにより、1) APA腫瘍組織に特異的に発現変動を示し、2) 腫瘍摘出により血中レベルが減少する(すなわち、腫瘍からの血中への分泌が示唆される)miRNAを探索した。NGSで得られた各miRNA配列情報はアダプター配列の除去、low qualityリードの除去の後、ヒトゲノム配列(hg19)にマッピングし、マッピングされたリードのカウントとTMM正規化処理により定量化し、すべての既知のmiRNA網羅的に発現解析プロファイリングを行った。NGSにより得られたmiRNAプロファイリング結果はTaqmanプローブを用いた定量的RT-PCR法にて確認し、両者の結果が合致したmiRNAを候補miRNAとして策定した。

(2) APA腫瘍組織でのmiRNA発現動態とAPAでの体細胞遺伝子変異型および遺伝子発現動態との関連性の検討

各候補miRNAについてAPA腫瘍内にて当該miRNAが発現を制御しうる遺伝子の予測解析を行った。まず、各miRNAについて制御しうる遺伝子の候補をonline tool (<http://www.mirdb.org/mirDB/>)を用いて抽出し、次いで遺伝子候補の中からmiRNA発現とは逆相関する遺伝子を、以前に我々がAPAとコルチゾール産生腺腫のRNAシーケンズ解析を施行し構築した既報のトランスクリプトームデータベース (<https://doi.org/10.1530/ERC-17-0117>)と照合解析することでスクリーニングを行った。本



スクリーニングについて得られた miRNA と予想標的遺伝子について、さらに APA 内発現量を realtime RT-PCR にて定量し、当該 miRNA 発現との逆相関を確認した。

(3) 培養細胞を用いた検討

アルドステロン産生能を有する副腎癌由来細胞株 (H295R) への候補 miRNA の遺伝子導入実験により標的候補遺伝子やその他の遺伝子発現への影響を検討した。

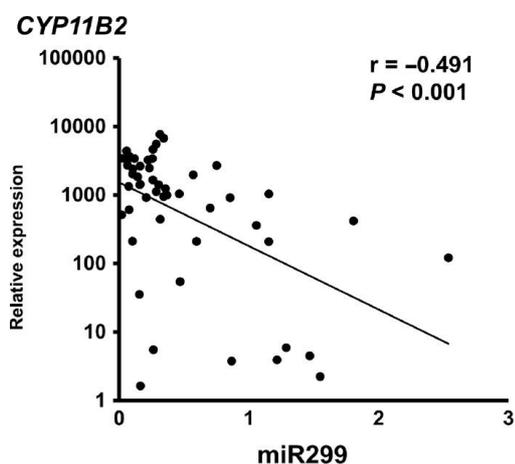
4. 研究成果

(1) APA における血中および腫瘍組織 miRNA の網羅的探索

本研究は次世代シーケンサーを用いて、重症型原発性アルドステロン症 (PA) の原因疾患であるアルドステロン産生腺腫 (APA) に特徴的な microRNA (miRNA) を探索し、その病態生理における役割を検討することとした。次世代シーケンサーによる網羅的解析の結果、21種類の miRNA が APA もしくは KCNJ5 変異 APA に特異的な発現動態を示し、手術によって血中発現量が減少することが示唆された。これら 21 の miRNA のうち qPCR において 5 つの miRNA が次世代シーケンサーの結果と合致した。すなわち APA において非 APA と比べて発現量が高い miRNA 370、および KCNJ5 変異 APA にてそれ以外の APA に比べて発現量が低い miRNA 299, 337, 362, 4526, 589 を得た。

(2) APA 腫瘍組織での miRNA 発現動態と APA での体細胞遺伝子変異型および遺伝子発現動態との関連性の検討

更に、これら 6 つの miRNA が制御する標的遺伝子候補をバイオインフォマティクス解析で選定して、実際に当該 miRNA と標的候補遺伝子 mRNA 発現量を相関解析したところ、miRNA 299 は L 型 Ca チャンネルサブユニットをコードする遺伝子 CACNB2 の mRNA 発現量と有意に逆相関を示すことが示された。APA サンプル数を 62 例に増やして APA における miRNA 299 と CACNB2 および CYP11B2 の相関を見たところ、miRNA 299 と CACNB2 の逆相関が確認され、更に CACNB2 と CYP11B2 の正相関が認められた。また miRNA 299 と CYP11B2 の逆相関もみとめた。次世代シーケンサーと定量 PCR を組み合わせた今回の検討で、APA の腫瘍組織において特徴的な発現動態を示す複数の miRNA を発見した。中でも miRNA 299 は CACNB2 を抑制的に制御することで CYP11B2 の発現量を調節している可能性が示唆された。



また、KCNJ5 mut において発現が低下している miRNA

の一つである miR-337 について、ホルモン分泌能をもたない非機能性腺腫 (NF)、コルチゾール産生腺腫 (CPA)、KCNJ5 体細胞変異をもたない APA (KCNJ5 mut-) と KCNJ5 mut+ の組織から抽出した RNA を対象に、発現量を qPCR で比較すると、KCNJ5 mut+ において有意な低下 ($P < 0.05$) を認めた。さらにバイオインフォマティクス解析で miR-337 が制御する標的遺伝子候補を選定し、miR-337 と mRNA 発現量との相関を評価したところ、ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HS-PG) の分解に関与する酵素をコードする遺伝子 HPSE が miR-337 の発現量と有意に逆相関することが示された ($r = -0.46$, $P < 0.03$)。また、HPSE の遺伝子発現は他の腺腫組織と比較し KCNJ5 mut+ で有意に増加していることも示された ($P < 0.05$)。HS-PG は細胞表面受容体であり、増殖因子や形態形成因子などの修飾因子として種々のシグナル伝達に関与することが知られている。KCNJ5 mut+ において、miR-337 によって HPSE の発現が上昇した結果 HS-PG が分解され、シグナル伝達を介して細胞増殖能やステロイド合成能に影響を与える可能性が考えられた。

(3) 副腎癌由来細胞株 (H295R) を用いた検討

上述のとおり、miR-299-3p は APA 組織において、アルドステロン合成酵素である CYP11B2 の遺伝子発現と逆相関を示したことから、APA の発症メカニズムにおける miR-299-3p の機能を明らかにするため、副腎皮質癌細胞由来の H295R を用いた解析を施行した。まず miR299-3p mimic の遺伝子導入を行い、下流のターゲットと予想される遺伝子発現の解析を行ったところ、アンギオテンシン受容体をコードする AGTR1 や、マトリックス・メタロプロテナーゼをコードする MMP-2 といった遺伝子の発現量低下を有意に認めた ($P < 0.05$)。一方で、APA 組織を用いた検討で miR299-3p と有意に逆相関していることが分かっていた CACNB2 遺伝子については発現量の明らかな変化を認めず、CYP11B2 遺伝子についても発現量の変化は認めなかった。一方、miR-299-3p inhibitor による knockdown 実験で、標的遺伝子のタンパク質発現量を評価したところ、ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HS-PG) の分解に関与する酵素である HPSE の発現量上昇を確認した。また、CYP11B2 のタンパク質発現量についても有意な変動は認めなかった。以上より、miR299-3p は APA 発症においてアルドステロン合成能の点では関与しておらず、細胞間基質などの面で腫瘍発症に関与していることが示唆された。

(4) 結語

アルドステロン産生腺腫 (APA) の発症機序はいまだ不明な点が多いが、今回の APA 腫瘍組織に

おける miRNA の網羅的発現解析により、複数の miRNA が特徴的な発現を示している事が明らかとなった。加えていくつかの miRNA は APA の病因あるいは病態と関連する各種遺伝子発現と相関しており、特に miR299 については細胞間基質の発現制御を介して腫瘍発生に關与する可能性が新たに示された。miRNAome 研究は、APA の病態発生で未解明であった領域のさらなる解明に重要な役割を担うと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nishimoto Koshiro, JRAS Study Group, Umakoshi Hironobu, Seki Tsugio, Yasuda Masanori, Araki Ryuichiro, Otsuki Michio, Katabami Takuyuki, Shibata Hiroataka, Ogawa Yoshihiro, Wada Norio, Sone Masakatsu, Okamura Shintaro, Izawa Shoichiro, Miyauchi Shozo, Yoshimoto Takanobu, Tsuiki Mika, Naruse Mitsuhide	4. 巻 44
2. 論文標題 Diverse pathological lesions of primary aldosteronism and their clinical significance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hypertension Research	6. 最初と最後の頁 498 ~ 507
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41440-020-00579-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saiki A, Otsuki M, Tamada D, Kitamura T, Shimomura I, Kurihara I, Ichijo T, Takeda Y, Katabami T, Tsuiki M, Wada N, Yanase T, Ogawa Y, Kawashima J, Sone M, Inagaki N, Yoshimoto T, Okamoto R, Takahashi K, Kobayashi H, Tamura K, Kamemura K, Yamamoto K, Izawa S, Kakutani M, Yamada M, Tanabe A, Naruse M	4. 巻 105
2. 論文標題 Diabetes Mellitus Itself Increases Cardio-Cerebrovascular Risk and Renal Complications in Primary Aldosteronism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism	6. 最初と最後の頁 e2531 ~ e2537
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/clinem/dgaa177	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohno Y, Sone M, Inagaki N, Kawashima A, Takeda Y, Yoneda T, Kurihara I, Itoh H, Tsuiki M, Ichijo T, Katabami T, Wada N, Sakamoto R, Ogawa Y, Yoshimoto T, Yamada T, Kawashima J, Matsuda Y, Kobayashi H, Kamemura K, Yamamoto K, Otsuki M, Okamura S, Izawa S, Okamoto R, Tamura K, Tanabe A, Naruse M, JPAS/JRAS Study Group	4. 巻 75
2. 論文標題 Nadir Aldosterone Levels After Confirmatory Tests Are Correlated With Left Ventricular Hypertrophy in Primary Aldosteronism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hypertension	6. 最初と最後の頁 1475 ~ 1482
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.14601	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamaru R, Yamamoto K, Rakugi H, Akasaka H, Kurihara I, Ichijo T, Takeda Y, Katabami T, Tsuiki M, Wada N, Ogawa Y, Kawashima J, Sone M, Yoshimoto T, Okamoto R, Fujita M, Kobayashi H, Tamura K, Kamemura K, Okamura S, Kakutani M, Tanabe A, Naruse M, JPAS/JRAS Study Group	4. 巻 93
2. 論文標題 Obesity predicts persistence of resistant hypertension after surgery in patients with primary aldosteronism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Endocrinology	6. 最初と最後の頁 229 ~ 237
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cen.14203	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakano Yujiro, Yoshimoto Takanobu, Watanabe Ryo, Murakami Masanori, Fukuda Tatsuya, Saito Kazutaka, Fujii Yasuhisa, Akashi Takumi, Tanaka Toshihiro, Yamada Tetsuya, Naruse Mitsuhide, Ogawa Yoshihiro	4. 巻 181
2. 論文標題 miRNA299 involvement in CYP11B2 expression in aldosterone-producing adenoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European Journal of Endocrinology	6. 最初と最後の頁 69 ~ 78
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/EJE-18-0882	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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
---------	---------