

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17964

研究課題名（和文）単一細胞解析を基盤にしたアルドステロン合成機構の解明と創薬標的因子の同定

研究課題名（英文）Elucidation of aldosterone synthesis mechanism based on single cell analysis

研究代表者

一町 澄宜（Itcho, Kiyotaka）

広島大学・病院（医）・助教

研究者番号：00805666

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：原発性アルドステロン症（PA）は最も頻度が高い二次性高血圧を来す疾患である。アルドステロン過剰分泌は高血圧を来すだけでなく心血管疾患や腎機能障害を高率に合併するため、PAの診断・治療およびアルドステロン合成の制御は極めて重要である。本研究ではこれまで着目されていない細胞接着因子や細胞間情報伝達を介したアルドステロン合成機構を解明することを目的とし、遺伝子変異別にアルドステロン産生腫瘍（APA）のシングルセル解析を行うことにより候補因子Aを選抜した。アルドステロン合成やAPA腫瘍化など創薬標的因子となり得る機序を推定するための解析を現在行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

30歳以上の日本人男性の60%、女性の45%以上が高血圧と言われ、また高血圧患者の5-10%程度を原発性アルドステロン症（PA）が占めることから、PAは極めて頻度の高い疾患である。PAはアルドステロンを過剰分泌することにより、高血圧を来すだけでなく心血管疾患や腎機能障害を高率に合併するため、その診断・治療は極めて重要である。本研究ではこれまで着目されていない機序を介したアルドステロン合成機構に関与する候補因子を選抜し、PAの新しい治療戦略の開発に役立つ可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Primary aldosteronism (PA) is the most frequent cause of secondary hypertension. The diagnosis and treatment of PA are extremely important because excess aldosterone secretion not only causes hypertension but is also associated with a high rate of cardiovascular and renal dysfunction. In this study, we aimed to elucidate the mechanism of aldosterone synthesis via cell adhesion factors and intercellular signaling, which have not been focused on so far. We selected candidate factor A by single-cell analysis of aldosterone-producing adenoma (APA). Analysis is currently underway to infer the mechanism of aldosterone synthesis and APA tumorigenesis.

研究分野：内分泌

キーワード：原発性アルドステロン症 高血圧

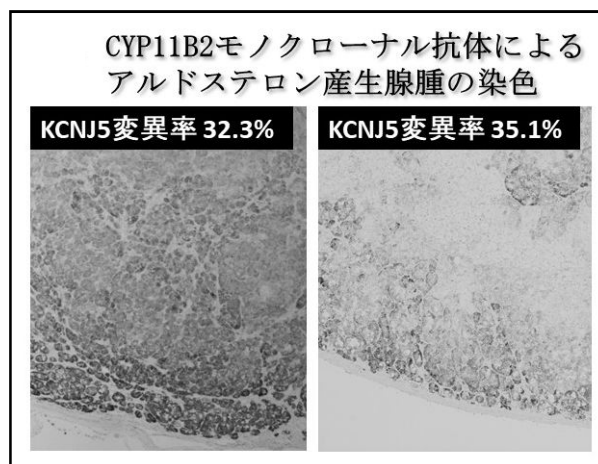
## 1. 研究開始当初の背景

30歳以上の日本人男性の60%、女性の45%以上が高血圧と言われ、また、高血圧患者の5-10%程度を原発性アルドステロン症 (PA) が占め、PA は極めて頻度の高い疾患である [Endocr J 58:711-21, 2011] . PA はアルドステロンを過剰分泌することにより、高血圧を来すだけではなく心血管疾患や腎機能障害を高率に合併するため [J Clin Endocrinol Metab 98:4826-33, 2013] , 本態性高血圧と比較し予後が悪い . そのため、PA の診断・治療およびアルドステロン合成の制御は極めて重要である .

副腎皮質ホルモン合成には複数のステロイド合成酵素が必要であるが、アルドステロン合成の律速酵素は、CYP11B2であることを応募者らは示してきた . 応募者らは、CYP11B2のみを In vivo [Clin Exp Pharmacol Physiol 39:90-5, 2012] や In vitro [未発表結果] で過剰発現するとアルドステロン合成が促進することを明らかにした . さらに、応募者の共同研究施設である Gomez-Sanchez 研究室では、世界で初めてヒト CYP11B2 モノクローナル抗体 (hCYP11B2-mAb) 作製に成功した [Mol Cell Endocrinol 383:11-7, 2014] . CYP11B2 はコルチゾール合成に関わる CYP11B1 とアミノ酸配列で 93%の相同性を有することから、世界中の研究者が hCYP11B2-mAb の作製、および CYP11B2 選択的阻害薬の開発に困難を極めていた [Ann Biochem 394:56-61, 2009] . よって、CYP11B2 の転写を制御するアルドステロン合成機構の解明が、選択的アルドステロン合成阻害薬の開発に繋がると考えられる . さらに、高頻度で心血管疾患をもたらす PA におけるアルドステロン合成機構の解明、および創薬標的因子の同定は、PA の治療薬・診断薬の開発に繋がり、さらには、心血管疾患や腎疾患の予防にも結びつく可能性がある .

応募者らはこれまで、APA に認められる *KCNJ5* 変異によるアルドステロン合成の分子機構として、細胞内カルシウムシグナル伝達の活性化でアルドステロン合成の律速酵素である CYP11B2 の転写が促進されることを示した [Endocrinology. 153:1774-82, 2012, 図 1 左側] . さらに、遺伝子変異をもつ *KCNJ5* をヒト副腎皮質癌細胞株 (HAC15) に導入することにより、APA モデル細胞株 (HAC15-KCNJ5) の樹立に成功し、APA におけるアルドステロン合成分子機構の解明を行ってきた .

しかし、*KCNJ5* 変異をもつ APA において CYP11B2 は斑状に染色される腫瘍と均一に染色される腫瘍がある (未発表結果, 右図) . 興味深いことに、これらの APA 内における *KCNJ5* 変異率はどの APA においても 30%程度であり、つまり、*KCNJ5* 変異率は一定であるものの CYP11B2 発現量は腫瘍により異なることがわかっている . 以上の予備研究から、*KCNJ5* 変異が CYP11B2 発現を誘導している細胞と誘導していない細胞があり、また、逆に「*KCNJ5* 変異を認めない細胞



からも CYP11B2 は誘導され、アルドステロン合成が促進される」と考えることができ、既知の機構では説明できない CYP11B2 の発現調節機構があることが示唆される .

## 2. 研究の目的

応募者はこれまでの報告および予備研究から、「KCNJ5 変異を有さない細胞において、接着因子を介した細胞間情報伝達により CYP11B2 発現を促進する分子機序が存在する」と仮説している。よって、本研究では、シングルセル解析を基盤にした遺伝子変異と遺伝子発現解析を基に、KCNJ5 変異の有無での遺伝子発現を比較検討し、細胞接着因子や細胞間情報伝達を介したアルドステロン合成機構を解明することを目的とする。

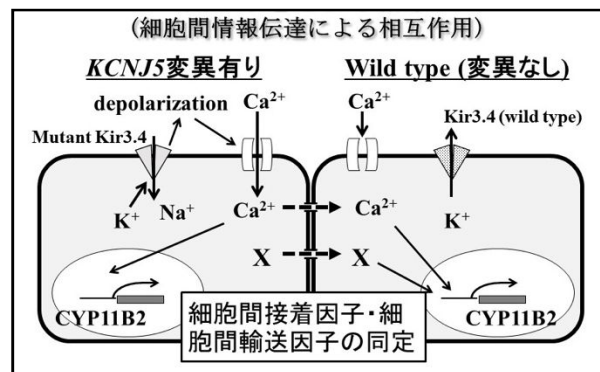
## 3. 研究の方法

**試験** シングルセル解析を用いた遺伝子変異の有無による遺伝子発現量の同定とアルドステロン合成に関わる候補接着因子の同定と発現解析。

手術で摘出した APA 標本を個々の細胞に分離する。KCNJ5 変異が陽性であった腫瘍を対象として、分離した単一細胞を次世代シーケンサーで、遺伝子変異解析、DNA・クロマチンメチル化解析、遺伝子発現解析を組み合わせた多層的オミクス解析を行う。遺伝子変異の有無により群分けし、KCNJ5 変異をもたない細胞 (wild type) における結果を Bioinformatics により、アルドステロン合成機構を推定する。KCNJ5 変異をもたない細胞 (wild type) における細胞の鍵因子を同定後、APA 組織において免疫組織化学により蛋白発現の局在を確認する。KCNJ5 変異または他の遺伝子変異をもつ APA における蛋白発現を比較検討する。

**試験** アルドステロン合成に関わる細胞接着因子の機能解析 (In vitro 解析)。

アルドステロン合成に関与する細胞間情報伝達因子を推定後、HAC15 または摘出標本の初代培養細胞におけるステロイド合成酵素やアルドステロン合成に与える影響を、レンチウイルスによる遺伝子発現調節、拮抗薬や阻害薬を用いて検討する。また、細胞間情報伝達の活性化は、mRNA 発現と蛋白発現の差を比較することによっても明らかとなり、qPCR やウエスタンブロッティングを組み合わせて行う。細胞間情報伝達による細胞間カルシウムイオン移動を一因と考えており、時間的・局所的に増減する細胞内カルシウムイオン濃度測定が必要となるが、申請者らは細胞内小器官に遍在するカルシウムイオンを同定する技術をもっている [Hypertension. 71(1):125-33, 2018.]。また、細胞内で輸送される因子の同定には (細胞内カルシウムイオンが関与しない場合)、単一細胞のプロテオミクス解析も検討している。最終的に右図に示す分子機序を明らかにする。



**試験** 細胞接着因子調節を調節した動物モデルの表現型解析 (In vivo 解析)

Splague-Dawley rat を低ナトリウム食で飼育することにより、レニン・アンギオテンシン系が

亢進し、高アルドステロン血症のモデルラットを作製できる [Clin Exp Pharmacol Physiol 39:90-5, 2012] . 細胞間情報伝達を阻害する化学物質の投与を行い表現型に与える影響を検討する . 全身性に発現する分子を阻害する場合は、アルドステロン合成への影響を検討できない可能性があるため、副腎皮質球状帯特異的に発現する Dab2 のプロモーター下に Cre を発現するマウスを利用する . 標的因子 flox マウスと交配し副腎皮質球状帯特異的ノックアウトモデルを作製し、副腎の病理学的検討、表現型解析を行う .

#### 4 . 研究成果

アルドステロン産生腺腫 (APA) による原発性アルドステロン症と診断した患者より摘出した副腎腫瘍検体から腫瘍細胞を分離し、KCNJ5 L168R 変異が同定された副腎腫瘍細胞検体について、Fluidigm C1 Single-Cell Auto Prep システムを用いてシングルセル解析を行った . 96 細胞中 cDNA 増幅が得られた 22 検体において、DNA シークエンス (遺伝子変異検索) と RNA シークエンス (遺伝子発現解析) を行い、KCNJ5 変異 APA における KCNJ5 変異をもたない細胞 (wild type) でのアルドステロン合成機構に関わる鍵因子の検討を行い、最も有意に発現が変動していた候補因子 A を選抜した .

候補因子 A の APA 組織における蛋白発現の局在を検討するため、KCNJ5 変異およびその他既知の遺伝子変異をもつ、あるいは既知の遺伝子変異もない APA における免疫組織染色による検討を行った . しかし、APA 腫瘍部において候補因子 A の発現は認められなかった . また、APA で認められる既知の遺伝子変異の違いによる候補因子 A の発現差異は認められなかった . 続いて、アルドステロン合成に関わる細胞接着因子の機能解析 (In vitro 解析) を行うため、副腎皮質癌細胞株 (HAC15) に候補因子 A を過剰発現させ、ステロイド合成酵素やアルドステロン合成に与える影響を検討した . コントロール群と比較して候補因子 A の過剰発現群では、HAC15 のアルドステロン合成量やアルドステロン合成酵素 (CYP11B2) mRNA 発現量に変化を認めなかった .

以上より、アルドステロン合成以外に APA の腫瘍化など候補因子 A が関与する創薬標的因子となり得る機序を推定するため、HAC15 における候補因子 A の過剰発現群、コントロール群の RNA を用いて RNA-seq 解析を行っており、現在結果を解析中である .

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Itcho Kiyotaka, Oki Kenji, Ohno Haruya, Yoneda Masayasu	4. 巻 9
2. 論文標題 Update on Genetics of Primary Aldosteronism	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 409 ~ 409
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biomedicines9040409	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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
---------	---------