

令和 4 年 6 月 18 日現在

機関番号：85402
研究種目：若手研究
研究期間：2019～2021
課題番号：19K17972
研究課題名(和文) エピゲノム調節を基盤にしたRXRを介したアルドステロン産生腺腫増殖機構の解明
研究課題名(英文) Mechanism of RXR-mediated cell proliferation in aldosterone-producing adenomas based on epigenomic regulation
研究代表者
吉井 陽子 (Yoshii, Yoko)
独立行政法人国立病院機構(呉医療センター臨床研究部)・その他部局等・その他
研究者番号：00795320
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)は高血圧患者の5-10%程度を占め頻度の高い疾患である。PAはアルドステロン産生腺腫(APA)と特発性アルドステロン症に大別され、両者ともアルドステロンを過剰産生し心血管疾患を合併しやすい。本研究では、DNA低メチル化によって誘導されるVDR発現がATP1A1変異APAにおいて細胞増殖に不可欠であること、及びNKA刺激がATP1A1変異APAの増殖に関与することを示した。これらの知見はAPAの治療標的因子の同定に結びつくと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

原発性アルドステロン症(PA)は高血圧患者の5-10%程度を占める頻度の高い疾患で、アルドステロンを過剰産生することで高血圧を発症するだけでなく心血管疾患を合併しやすい。そのため、PAの早期診断や治療、アルドステロン合成の制御は重要である。本研究で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や細胞増殖機構の一部を解明し、PAにおける治療標的や予防法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 a common disease that accounts for 5-10% of hypertensive patients. PA is classified into aldosterone-producing adenoma (APA) and idiopathic hyperaldosteronism, both of which overproduce aldosterone and are associated with cardiovascular disease. In this study, we show that VDR expression induced by DNA hypomethylation is essential for cell proliferation in ATP1A1 mutant APA and that NKA stimulation is involved in the proliferation of ATP1A1 mutant APA. These findings lead to the identification of therapeutic target factors for APA.

研究分野：内分泌

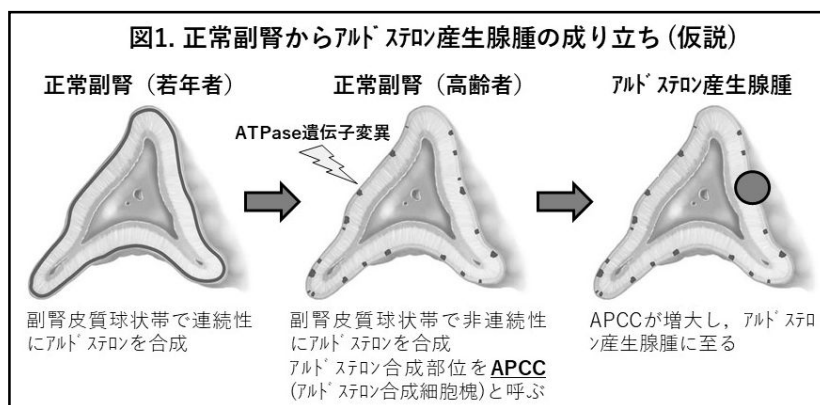
キーワード：原発性アルドステロン症 内分泌 高血圧

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 5-10%程度を原発性アルドステロン症 (PA) が占めると報告され [Endocr J 58:711-21, 2011]、本邦における PA の罹病者数は 200-400 万人程度にのぼると推測される。PA は、アルドステロン産生腺腫 (APA) と特発性アルドステロン症に大別され、両者ともアルドステロン自律・過剰分泌を認める。PA 患者は、高血圧を呈するのみならず、心血管疾患や慢性腎臓病の合併率が高く [J Clin Endocrinol Metab 98:4826-33, 2013]、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。

APA において、細胞膜に存在する K チャネル (*KCNJ5*)、ATPase (*ATP1A1*, *ATP2B3*)、または、電位依存性 Ca チャネル (*CACNA1D*) の体細胞変異を認め、これらの変異がアルドステロン合成を促進する。一方で、副腎皮質球状帯のアルドステロン合成は年齢を経るごとに非連続性となり、その非連続性となったアルドステロン合成部位をアルドステロン合成細胞塊 (APCC) と呼ぶ (図 1) [Circulation 136:347-55, 2017]。APCC に ATPase 変異を認めるものの、K チャネル変異は認めないことが報告され

ており [Proc Natl Acad Sci USA. 112:4591-9, 2015]、さらに、申請者らの病理学的な解析を踏まえると、APCC が APA に移行する可能性を報告した [Mol Cell Endocrinol 441:124-3, 2017]。つまり、ATPase 変異をもつ APA は、ATPase



変異を First hit に腫瘍形成およびアルドステロン合成が促進されると考えられる。上述のように、APCC に K チャネル変異を認めないことから、遺伝子変異間で APA 発生・増殖機構やアルドステロン合成機構は異なっていると考えられる。

2. 研究の目的

ATPase 変異による腫瘍増殖機構およびアルドステロン合成機構の解明は、ATPase 変異をもつ APA の治療標的因子の同定に繋がると考える。また、本機構の解明は、APCC の増殖抑制機構の解明にも繋がり、つまり APA 発症の予防法の開発に結びつくと考えられる。ATPase 変異をもつ APA は、ATPase 変異が直接腫瘍形成を促進すると推察され、さらに、申請者の予備研究を踏まえると、「ATPase 変異をもつ APA は、DNA 脱メチル化により調節された RXR 共役因子 X が RXR と共役して APA を形成し、アルドステロン過剰合成に至る」と仮説している。したがって、本研究では、ATPase 変異による RXR を介した APA の腫瘍増殖機構および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

方法 1. RXR 関連因子を遺伝子調節した副腎皮質癌細胞株における機能解析 (In vitro 解析).

ATPase 変異あるいは K チャネル変異を導入した APA モデル細胞株に、レンチウイルスによる RXR 関連因子 X の遺伝子発現調節、拮抗薬や阻害薬を用いて、腫瘍増殖能あるいはアルドステロン合成能を評価する。また、腫瘍増殖への影響は、細胞数、DNA 量、蛋白量、ミトコンドリア機能などを標的にした ELISA、免疫組織化学の検討により同定する。申請者らは、副腎皮質癌細胞株 (HAC15) に対する腫瘍増殖を標的にした基礎研究を既に実施しており、過去の方法を用い、応用し解析する。

RXR 関連因子の遺伝子発現調節をおこなった HAC15 における RNA-seq 解析から、腫瘍増殖に RXR を介し転写調節を受けた遺伝子群を抽出する。腫瘍増殖に関わるパスウェイを同定し、RXR 関連因子以外の創薬標的分子を探索する。同定した分子を、さらに、遺伝子発現調節あるいは阻害薬等を用いて、腫瘍増殖に与える影響を検討する。

RXR は、核内受容体であり、申請者らが同定している因子 X と共役し機能し、腫瘍増殖に関わっていると考えられる。したがって、RXR と共役していることを示すため、免疫沈降法により、RXR と結合していることを確認し、RXR 共役因子の RXR 結合部位の遺伝子変異をもつプラスミドを作製し、変異型 RXR 共役因子は、腫瘍増殖作用をもたないことを証明する。

方法 2. RXR 関連因子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・アンジ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する [Clin Exp Pharmacol Physiol 39:90-5, 2012]。さらに、方法 1 で作製している ATPase 変異レンチウイルスをラット副腎に注入することでアルドステロン過剰合成を示す APA モデルラットを作製する。作製したラットに対し、方法 1 で同定した標的因子または経路を阻害する化学物質などにより阻害し、ラットの血圧およびアルドステロン値を測定する。抽出した副腎組織における腫瘍または副腎皮質球状帯 (ラットでは外側層) を DAB2 (副腎皮質球状帯や APA に発現) の免疫組織化学で検討する。さらに、アルドステロン合成酵素 (CYP11B2) を、qPCR による mRNA 発現量や免疫組織化学による蛋白発現量を評価する。必要に応じて、方法 1 で同定した因子や経路の定量を、ELISA、LC/MS、蛍光色素などを用いる。

4. 研究成果

ATP1A1 変異をもつアルドステロン産生腺腫 (APA) において、RXR 関連因子である vitamin D receptor (VDR) のプロモーター領域は広範囲に低メチル化し、その遺伝子発現量は増加していた。また、APA 腫瘍組織標本を用いた qPCR 解析では、KCNJ5 遺伝子変異を有する APA や、遺伝子変異がみられない APA と比較して、ATP1A1 遺伝子変異を有する APA において VDR の遺伝子発現量は有意に高値を示した。さらに、免疫組織化学検討でも、ATP1A1 遺伝子変異を有する APA において、VDR は明らかに高発現を示した。ATP1A1 L104R 遺伝子変異を導入した HAC15 細胞 (ATP1A1mut-HAC15 細胞) および空ベクターを導入した HAC15 (コントロール細胞) を通常血清下で培養した結果、ATP1A1mut-HAC15 細胞はコントロール細胞と比較し、細胞数や DNA 量が有意に増加した。さらに、ATP1A1mut-HAC15 細胞ではコントロール細胞と比較し、VDR の遺伝子発現

量は有意に増加した。また，ATP1A1mut-HAC15 細胞では，細胞数依存性にアルドステロン産生量もコントロール細胞と比較し有意に上昇した。ATP1A1mut-HAC15 細胞において，VDR をノックダウンすると ATP1A1 変異導入によって促進された細胞増殖効果は阻害された。

ATP1A1 変異 APA における Na/K-ATPase (NKA) 発現は，非機能性副腎皮質腺腫や KCNJ5 変異 APA より有意に多かった。ATP1A1mut-HAC15 細胞ではコントロール細胞と比較し細胞数や DNA 量が有意に増加した。低濃度ウアバインは，ATP1A1mut-HAC15 細胞の細胞増殖を促進した。また，ATP1A1mut-HAC15 細胞は Src のリン酸化を誘導し，低濃度ウアバイン投与によりさらに Src リン酸化が誘導された。活性型ビタミン D3 製剤であるカルシトリオールを ATP1A1mut-HAC15 細胞及びコントロール細胞に投与したが，両群において細胞増殖の促進は認めなかった。低血清培地において ATP1A1mut-HAC15 細胞はコントロール細胞と比較して細胞増殖は促進されなかったが，カルシトリオール投与しても両群において細胞増殖は促進されなかった。以上より，DNA 低メチル化によって誘導される VDR 発現は ATP1A1 変異 APA において細胞増殖に不可欠であることが示された。また，NKA 刺激が ATP1A1 変異 APA の増殖に関与することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Itcho K, Oki K, Gomez-Sanchez CE, Gomez-Sanchez EP, Ohno H, Kobuke K, Nagano G, Yoshii Y, Baba R, Hattori N, Yoneda M.	4. 巻 75
2. 論文標題 Endoplasmic Reticulum Chaperone Calmegin Is Upregulated in Aldosterone-Producing Adenoma and Associates With Aldosterone Production.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hypertension	6. 最初と最後の頁 492-499
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.14062.	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 該当する

1. 著者名 Kobuke Kazuhiro, Oki Kenji, Gomez-Sanchez Celso E., Gomez-Sanchez Elise P., Itcho Kiyotaka, Ohno Haruya, Nagano Gaku, Yoshii Yoko, Baba Ryuta, Kodama Takaya, Arihiro Koji, Hattori Noboru, Yoneda Masayasu	4. 巻 22
2. 論文標題 ATP1A1 Mutant in Aldosterone-Producing Adenoma Leads to Cell Proliferation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 10981 ~ 10981
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms222010981	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 該当する

1. 著者名 Nanao Yuta, Oki Kenji, Kobuke Kazuhiro, Itcho Kiyotaka, Baba Ryuta, Kodama Takaya, Otagaki Yu, Okada Akira, Yoshii Yoko, Nagano Gaku, Ohno Haruya, Arihiro Koji, Gomez-Sanchez Celso E., Hattori Noboru, Yoneda Masayasu	4. 巻 548
2. 論文標題 Hypomethylation associated vitamin D receptor expression in ATP1A1 mutant aldosterone-producing adenoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Endocrinology	6. 最初と最後の頁 111613 ~ 111613
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mce.2022.111613	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 該当する

〔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
---------	---------