

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22896

研究課題名（和文）オミックス解析を利用したKCNJ5変異を有するアルドステロン産生腺腫の病態解明

研究課題名（英文）Omics analysis of APA with KCNJ5 mutation

研究代表者

村上 正憲（Murakami, Masanori）

東京医科歯科大学・東京医科歯科大学病院・助教

研究者番号：00740432

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、アルドステロン産生腺腫（APA）を対象にした遺伝子発現解析と、ヒト副腎皮質癌細胞由来の培養細胞を用いた機能解析を行った。ホルモン過剰をもたらすCYP11B2と同期して発現変動するカルシウムチャネル遺伝子CACNB2や、特定の体細胞変異を有するAPAで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を見出した。さらに、これらの遺伝子発現の制御にはmiRNAが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

難治性高血圧の原因の一つであるアルドステロン産生腺腫（APA）は、原発性アルドステロン症の約30%を占めており、その発症メカニズムを明らかにすることは新規診断・治療法の開発につながる。本研究によってAPA発症に関与すると考えられる候補遺伝子を見出し、機能解析を開始することが出来た。候補遺伝子の制御にはmiRNAの関与も示唆されており、ホルモン分泌能と腫瘍化の両面を有する内分泌腫瘍研究に貴重な知見を与えたと言える。

研究成果の概要（英文）：We conducted transcriptome analysis of aldosterone-producing adenoma and functional analysis of candidate genes using human adrenocortical carcinoma cell line. In this study, we found that one of the calcium channel gene, CACNB2, and aldosterone synthase gene, CYP11B2, showed positive correlation in mRNA expression. We also found that HPSE gene, which is involved with cleavage of heparan sulfate proteoglycans, was specifically expressed in APA with KCNJ5 mutation. Furthermore, our analysis suggested that both CACNB2 and HPSE genes were possibly regulated by miRNA in APA tissues.

研究分野：内分泌学

キーワード：内分泌学 副腎腫瘍 原発性アルドステロン症 高血圧

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

原発性アルドステロン症 (PA) は難治性高血圧の一つであり、長期に渡り心血管病加療が必要となる。アルドステロン産生腺腫 (APA) は PA の主要病型であり、手術による治癒が可能なことから臨床的にも早期診断が望まれる (1)。しかし確定診断には、侵襲を伴い、技術的にも高度で高額な副腎静脈サンプリングが必要なことが問題である。近年、カリウムチャネル遺伝子である KCNJ5 (potassium inwardly rectifying channel subfamily J member 5) 遺伝子の体細胞変異を APA の約半数以上が有することが示され、術後の高血圧寛解率が高いことも示された。そのため、KCNJ5 体細胞変異を伴う APA の発症メカニズムを検討することは、非侵襲的に早期診断が可能なバイオマーカーや新規治療法に資する可能性が高く、臨床上極めて有益と言える。APA に代表される内分泌腫瘍は、自律的ホルモン産生を有する良性腫瘍である。悪性腫瘍では、がん遺伝子の関与をはじめ、分子生物学的メカニズムがよく研究されているが、自律的ホルモン産生と腫瘍化の両面を有する内分泌腫瘍についてはその病態や発症メカニズムが明らかではない。KCNJ5 体細胞変異を伴う APA は他の体細胞変異と比してアルドステロン合成酵素 (CYP11B2) の発現量がより高く、腫瘍径も大きいことが知られている (2)。カリウムチャネル遺伝子である KCNJ5 遺伝子の体細胞変異は、チャネル機能の異常から副腎皮質細胞内への Ca²⁺流入を促進し、脱分極を起こすとされる。細胞内の Ca²⁺濃度上昇に応じ、カルモジュリンを介した転写因子の活性化がアルドステロン合成酵素 (CYP11B2) 遺伝子の発現上昇をもたらすと想定されるが、不明点が多い (3)。また、KCNJ5 体細胞変異を培養細胞に導入しても増殖能の上昇は観察されないことから (4)、KCNJ5 体細胞変異下で発現変動している他の遺伝子の腫瘍化メカニズムに与える影響を検討する必要があると言える。

2. 研究の目的

申請者はこれまで、APA 組織を対象にトランスクリプトーム、メチローム、miRNA、メタボロームなどのオミックス解析に取り組んできた。KCNJ5 体細胞変異に特異的に発現上昇する遺伝子として、CTNND2、TWIST1、PRRX1 など他の癌腫で細胞増殖に関与している遺伝子などを特定したが、副腎皮質細胞での機能は未検討である (5)。miRNA の解析では、アルドステロン合成酵素 (CYP11B2) の遺伝子発現と miR299 が逆相関することを見出し、miR299 の標的遺伝子として CACNB2 を抽出した (6)。しかし、CACNB2 による CYP11B2 の発現制御メカニズムの解析は未検討である。本研究では、オミックス解析の結果 (5-7) を利用し、KCNJ5 体細胞変異を有する APA の病態 (自律的ホルモン産生と腫瘍化) に関与する候補遺伝子の機能解析を行うことで、内分泌腫瘍の発症メカニズムに新知見を与えることを目指す。

3. 研究の方法

オミックス解析を用いた候補遺伝子の抽出: 申請者が所属する研究室で、これまでに施行した APA のオミックス解析データを利用し、KCNJ5 体細胞変異に伴って変動している遺伝子を抽出し qPCR 法で validation を行う。

H295R 細胞を用いた in vitro 解析: 体細胞変異の分布と関連の強い候補遺伝子について、ヒト副腎皮質癌由来の H295R 細胞を用い過剰発現や siRNA によるノックダウンを利用して、CYP11B2 の発現とそれに伴ったステロイド合成能の変化などの機能評価を行う。

4. 研究成果

(1) CACNB2 の機能解析

次世代シーケンサーを用いた網羅的解析により、KCNJ5 体細胞変異を有する APA (KCNJ5 mut+) に特異的な分布をする miRNA として、KCNJ5 mut+ において発現が低下している miR-299 を同定し、その標的遺伝子としてカルシウムイオンチャネル遺伝子 CACNB2 を抽出した。CACNB2 は KCNJ5 mut+ において遺伝子発現量が上昇しており、miR-299 の制御を受けてアルドステロン合成能や腫瘍化に関与している可能性がある。さらにアルドステロン合成能への関与を評価するために、ヒト副腎皮質癌細胞である H295R に対してアンギオテンシン を作用させ、アルドステロン合成酵素 (CYP11B2) の発現上昇時における CACNB2 の遺伝子発現動態について解析した。CYP11B2 はアンギオテンシンの投与後 6 時間で発現上昇のピークを迎え、24 時間後には発現量が低下傾向となる。Nurr1 や Nur77 といったステロイド合成に関与する転写因子については投与後 1 時間の早期から発現上昇が見られることが特徴である一方、CACNB2 については CYP11B2 と同様に投与 6 時間で発現上昇のピークを迎え、24 時間後には投与前と同様の発現量へ戻っていることを見出した。この結果は、アンギオテンシンの作用に対して CACNB2 と CYP11B2 が並行した遺伝子発現動態を示しており、CACNB2 がアルドステロン合成能を修飾している可能性を示したと言える。

さらに CACNB2 の CYP11B2 遺伝子発現に与える影響について検討するために、発現ベクターを作成し、H295R への遺伝子導入による過剰発現を評価した。CACNB2 の遺伝子発現については、過剰発現させた細胞ではコントロールに比して 1000 倍以上の発現を認めた。CYP11B2 については 1.2 倍以上の発現量上昇を認めた一方、コルチゾール合成酵素 (CYP11B1) については発現量の上

昇を認めなかった。以上より、CACNB2 がアルドステロン合成酵素特異的に発現量の修飾を行っている可能性が示唆された。

(2) miR-337 の機能解析

次世代シーケンサーによる網羅的解析によって、KCNJ5 体細胞変異を有する APA(KCNJ5 mut+) に特異的な分布をする miRNA を抽出した。そのうち、KCNJ5 mut において発現が低下している miRNA の一つとして miR-337 を同定した。さらに、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、miR-337 の発現量を 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る。

(3) シングル核解析を利用した解析

APA については、組織内の不均一性が知られており、単一細胞レベルでの RNA-seq が詳細な病態解析に有用と考えられた。APA 組織を対象に核抽出法を用いた single-nucleus RNA-seq (シングル核解析) に取り組み、約 4000 核を対象にした解析を施行したところ、13 個のクラスターを得ることが出来た。CYP11B2 を高発現するクラスターは、アルドステロン産生腺腫を特徴づける分化度の高い集団と考えられた。同クラスターでは CACNB2 も同様に高発現し、マーカー遺伝子として抽出されることが明らかとなった。APA 組織中の腫瘍内不均一性を考慮した解析で、単一細胞レベルにおける発現量の相関を確認出来たことは世界的にみて貴重な報告例であると考えられる。

< 引用文献 >

1. Hannemann A, Wallaschofski H. Prevalence of primary aldosteronism in patient's cohorts and in population-based studies--a review of the current literature. *Horm Metab Res* 2012;44:157-62.
2. Lenzini L, Rossitto G, Maiolino G, Letizia C, Funder JW, Rossi GP. A meta-analysis of somatic *knj5* k(+) channel mutations in 1636 patients with an aldosterone-producing adenoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100:E1089-95.
3. Aristizabal Prada ET, Castellano I, Susnik E, Yang Y, Meyer LS, Tetti M, et al. Comparative genomics and transcriptome profiling in primary aldosteronism. *Int J Mol Sci* 2018;19.
4. Yang Y, Gomez-Sanchez CE, Jaquin D, Aristizabal Prada ET, Meyer LS, Knosel T, et al. Primary aldosteronism: *Knj5* mutations and adrenocortical cell growth. *Hypertension* 2019:HYPERTENSIONAHA11913476.
5. Murakami M, Yoshimoto T, Nakabayashi K, Tsuchiya K, Minami I, Bouchi R, et al. Integration of transcriptome and methylome analysis of aldosterone-producing adenomas. *Eur J Endocrinol* 2015;173:185-95.
6. Nakano Y, Yoshimoto T, Watanabe R, Murakami M, Fukuda T, Saito K, et al. *Mirna299* involvement in *cyp11b2* expression in aldosterone-producing adenoma. *Eur J Endocrinol* 2019;181:69-78.
7. Murakami M, Yoshimoto T, Nakabayashi K, Nakano Y, Fukaishi T, Tsuchiya K, et al. Molecular characteristics of the *knj5* mutated aldosterone-producing adenomas. *Endocr Relat Cancer* 2017;24:531-41.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Murakami M, Sun N, Reincke M, Karl Walch A, Kroiss M, Beuschlein F, et al.	4. 巻 185
2. 論文標題 Mass spectrometry imaging identifies metabolic patterns associated with malignant potential in pheochromocytoma and paraganglioma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Eur J Endocrinol.	6. 最初と最後の頁 P179-P191
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1530/EJE-20-1407	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 Reincke Martin, Albani Adriana, Murakami Masanori, Ritzel Katrin, et al.	4. 巻 184
2. 論文標題 Corticotroph tumor progression after bilateral adrenalectomy (Nelson's syndrome): systematic review and expert consensus recommendations	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Endocrinology	6. 最初と最後の頁 P1 ~ P16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1530/EJE-20-1088	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13件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中野雄二郎, 吉本貴宣, 渡邊 亮, 村上正憲, 藤井靖久, 田中敏博, 山田哲也, 成瀬光栄, 小川佳宏, JRAS研究班
2. 発表標題 アルドステロン産生腺腫におけるmiRNAを利用した新規バイオマーカーの探索
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福田夏菜, 青木惇, 木内英美, 平野瑛子, 岡崎玲, 濱田大輔, 内田諭, 村上正憲, 柴久美子, 辻本和峰, 小宮力, 池田賢司, 山田哲也
2. 発表標題 糖尿病教育入院中に先端巨大症が判明した1例
3. 学会等名 第31回臨床内分泌update
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田彩水, 青木惇, 村上正憲, 柴久美子, 辻本和峰, 小宮力, 池田賢司, 田中一, 山田哲也
2. 発表標題 ACTH上昇から副腎皮質機能低下と診断した免疫関連有害事象の1例
3. 学会等名 第31回臨床内分泌update
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 青木惇, 村上正憲, 柴久美子, 辻本和峰, 小宮力, 池田賢司, 泉山肇, 工藤篤, 山田哲也
2. 発表標題 再発時ガストリン産生能を獲得した悪性インスリノーマの1例
3. 学会等名 第31回臨床内分泌update
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 濱田 大輔, 徳山 喜心, 木内 英美, 平野 瑛子, 岡崎 玲, 青木 惇, 内田 諭, 村上 正憲, 柴 久美子, 辻本 和峰, 小宮 力, 池田 賢司, 山田 哲也.
2. 発表標題 食道狭窄から誤嚥性肺炎を繰り返したガストリノーマの1例
3. 学会等名 第31回臨床内分泌update
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 白岩 允乃, 木内 英美, 平野 瑛子, 岡崎 玲, 濱田 大輔, 青木 惇, 内田 諭, 村上 正憲, 柴 久美子, 辻本 和峰, 小宮 力, 池田 賢司, 坂東 夏菜, 角田 龍太, 山田 哲也 .
2. 発表標題 高Ca血症を契機に診断されたパラガングリオーマ多発骨転移の一例 .
3. 学会等名 第31回臨床内分泌update
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 朱 理絵, 木内 英美, 濱田 大輔, 村上 正憲, 柴 久美子, 辻本 和峰, 小宮 力, 池田 賢司, 山田 哲也
2. 発表標題 ペンプロリズム投与後にACTH高値を伴う破壊性甲状腺炎を来した1例.
3. 学会等名 第672回日本内科学会関東地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平野 瑛子, 内田 諭, 木内 英美, 濱田 大輔, 岡崎 玲, 重松 嵩朗, 青木 惇, 柴 久美子, 村上 正憲, 辻本 和峰, 小宮 力, 池田 賢司, 山田 哲也
2. 発表標題 副腎不全を合併したインスリノーマの1例
3. 学会等名 第22回日本内分泌学会関東甲信越支部学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本間 遥, 重松 嵩朗, 村上 正憲, 柴 久美子, 辻本 和峰, 小宮 力, 池田 賢司, 泉山 肇, 山田 哲也.
2. 発表標題 アテゾリズム投与後に下垂体性副腎皮質機能低下症を発症した1例.
3. 学会等名 日本内科学会関東地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 細井 穂愛, 青木 惇, 村上 正憲, 柴 久美子, 辻本 和峰, 小宮 力, 池田 賢司, 泉山 肇, 松木 裕子, 山田 哲也.
2. 発表標題 PRL・GH同時産生下垂体腺腫に対しカベルゴリンを使用した1例.
3. 学会等名 日本内科学会関東地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村上 正憲, Luis Gustavo Perez-Rivas, Ludwig Frei-Stuber, Matthias Kroiss, Martin Reincke, 山田 哲也, Axel Walch, Martin Fassnacht, Felix Beuschlein
2. 発表標題 副腎皮質癌におけるHSP90発現量の臨床的意義の評価
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森 祥子, 辻本和峰, 中島英俊, 塩村美帆, 堀江晃子, 重松高朗, 青木惇, 村上正憲, 柴久美子, 小宮力, 池田賢司, 泉山肇, 田中一, 山田哲也
2. 発表標題 診断に難渋した異所性ACTH症候群 (EAS) を合併した褐色細胞腫の一例
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masanori Murakami
2. 発表標題 In Situ Metabolomics (Mass spectrometry imaging) in Adrenal Tumor
3. 学会等名 AOCE-SICEM 2020 (The 17th Asia-Oceania Congress of Endocrinology and the 8th Seoul International Congress of Endocrinology and Metabolism) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔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
---------	---------