

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月23日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790889

研究課題名（和文） 心血管アルドステロンの合成制御機構の解明

研究課題名（英文） Molecular genetic analyses of the CYP11B2 gene in cardiovascular tissues

研究代表者

出村 昌史 (DEMURA MASASHI)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：00507080

研究成果の概要（和文）：アルドステロンは水・Na 保持という古典的作用以外に、心血管障害作用を有する。副腎に比べ微量だが、障害臓器局所ではアルドステロン合成酵素遺伝子(CYP11B2)発現が亢進し、その病態形成に寄与する。今回、CYP11B2 プロモーターのメチル化依存性発現抑制を明らかにし、さらには、ヒト障害心筋(肥大型心筋症、高血圧性心肥大、拡張型心筋症)での、脱メチル化に伴う CYP11B2 発現亢進を明らかにした。また、CYP11B2 発現に関わる核内受容体(NGFIB, NURR1, NOR1, SF1)が複数のプロモーターにより発現調節され、これらプロモーターの使用頻度は、副腎、心血管で異なることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In addition to the primary effect of aldosterone to induce sodium and fluid retention, excess aldosterone has direct inflammatory and fibrotic effects contributing to target organ deterioration, leading to the development of vascular, renal, and cardiac inflammation; fibrosis; and hypertrophy. Although the adrenal gland is a major source of aldosterone, aldosterone production and levels of mRNA coding for CYP11B2 are induced in the ventricles during hypertrophy, and aldosterone synthesis from heart itself causes cardiac hypertrophy. We showed a role for DNA methylation in CYP11B2 gene repression and suggest an epigenomic mechanism may be causally linked with an increase in cardiac aldosterone production in the pathophysiology of the heart. Meanwhile, nuclear receptors (NGFIB, NURR1, NOR1, SF1) involved in aldosteronogenesis differentially employed multiple alternative promoters (APs) in a tissue-specific manner. The use of APs was different between human adrenal and cardiovascular tissues.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：アルドステロン、エピジェネティクス、DNA メチル化、組織特異的プロモーター、CYP11B2、核内受容体、心筋症、心肥大

1. 研究開始当初の背景

| 血液中を循環するアルドステロン(Aldo)は、

ほとんどが副腎由来と考えられ、主な作用は、腎遠位尿細管上皮でのナトリウム再吸収とカリウム分泌を介した循環血漿量増加、血圧上昇と考えられてきた。しかし、我々を含めた複数の研究グループが、心血管局所での Aldo 合成を報告し (Hypertension, 36, 495-500, 2000)、その局所でイントラクリン、パラクリン的に作用すると考えられるようになってきた。また、我々も報告しているように (Endocrinol, 141, 1901-4, 2000. Circulation, 105, 677-9, 2002)、Aldo の心血管系 (心筋細胞、血管内皮、血管平滑筋細胞) への障害作用が明らかとなっている。また、ヒト心臓では、大規模臨床試験 RALES (Randomized Aldactone Evaluation Study) や EPHEBUS (Eplerenone Post-AMI Heart Failure Efficacy and Survival Study) にて、血中 Aldo が必ずしも高値でない病態でも、降圧効果のない程度の少量アルドステロンブロッカーが心不全患者の生命予後を著明に改善することが明らかとなった (N Engl J Med, 341, 709-17, 1999. N Engl J Med, 348, 1309-21, 2003)。不全心からの Aldo 分泌亢進 (Circulation, 103, 72-7, 2001) を考え合わせると、副腎由来 Aldo を抑制しなくても、不全心の局所で亢進した Aldo のみを抑制することの重要性が示唆される。一方、アルドステロンブロッカーにより生じうる高カリウム血症のため、腎機能障害患者への投与が禁忌となっていることが、臨床問題である。我々は、高食塩水投与により血中 (副腎由来) Aldo を抑制したラットにおいて、心臓では逆に、Aldo 合成が亢進していることを見出した (J Hypertens, 19(3 Pt 2), 635-9, 2001)。これは副腎と心臓での Aldo 合成制御の違いを示している。その差異の解明は、副腎由来の Aldo 分泌を抑制せず、心臓のみの Aldo 合成を抑制する治療へつながると期待される。これは、副腎 Aldo を抑制しないため、高カリウム血症をきたさないと考えられ、有効な治療となり得る。従って、心臓と血管の保護の観点から、心血管と副腎 Aldo の制御機構の解明は重要である。

2. 研究の目的

心筋組織 (不全心、正常心)、動脈、副腎腫瘍、正常副腎組織を用いて、CYP11B2 プロモーター領域の DNA メチル化の状態を検討する。また、CYP11B2 の発現を調節する核内受容体 NGFIB, NURR1, NOR1, SF1 について、それらの選択的プロモーターの利用割合、遺伝子発現量を比較し、副腎と心血管での差異を明らかにする。以上より、心血管特異的 CYP11B2 発現制御機構を解明する。

3. 研究の方法

①アルドステロン合成酵素遺伝子 (CYP11B2) プロモーターの DNA メチル化; CYP11B2 プロ

モーター領域の DNA メチル化の状態をバイサルファイト法により検討する。DNA メチル化のプロモーター活性に与える影響をルシフェラーゼ活性にて検討する。DNA メチル化による蛋白-DNA 結合に与える影響を EMSA (in vitro), ChIP アッセイ (in vivo) にて検討する。

② CYP11B2 転写に関連する核内受容体の発現調節機構; NGFIB, NURR1, NOR1, SF1 の選択的プロモーターを 5' -RACE (Rapid amplification of 5' -cDNA ends) により同定する。同定されたそれぞれのプロモーターの利用割合を multiplex RT-PCR により検討する。また、遺伝子発現量を real time PCR により検討する。

以上より、CYP11B2 に関連する心血管と副腎での合成制御の差異を明らかにする。

4. 研究成果

①アルドステロン合成酵素遺伝子 (CYP11B2) プロモーターの DNA メチル化; プロモーター内の CRE のメチル化 DNA 標的部 CpG (-68/-67) (CpG1), Ad5 の CpG (-112/-111) (CpG2) のメチル化状態を評価した。また、CpG (-219/-218) (CpG3) も解析に加えた。アルドステロン産生腫瘍 (n=9)、非アルドステロン産生腫瘍 (n=5)、正常副腎 (n=4)、動脈 (n=3) において、CpG1, 2, 3 のメチル化比率と CYP11B2 発現量と逆相関し、アルドステロン産生腫瘍では、低メチル化状態、動脈では、高メチル化状態であった。また、プロモーターアッセイでも、DNA メチル化の程度と CYP11B2 プロモーター活性は逆相関した。以上より、CYP11B2 プロモーター活性はメチル化依存性に抑制されることが判明した。DNA-蛋白結合の検討から、メチル化により活性化因子 CREB や NGFIB, NURR1, NOR1 のプロモーターへの結合が阻害され、また抑制因子のメチル化 CpG 結合蛋白 MECP2 の結合が促進されることが判明した。これらの事実と DNA メチル化による転写抑制との関連性が強く示唆された。

ヒト心筋 (心筋疾患 n=17, 非心筋疾患 n=10) における CYP11B2 メチル化と遺伝子発現量の関係を検討した。その結果、①非心筋疾患での CYP11B2 プロモーターは、動脈、白血球、肝、肺、非ホルモン産生性副腎腫瘍などのいわゆる“非アルドステロン産生組織”と同程度に高メチル化状態であること、②DNA メチル化の程度と遺伝子発現は逆相関すること、③心筋疾患では、非心筋疾患より有意に低メチル化状態で、さらには遺伝子発現も亢進していること、が判明した。心筋疾患での DNA 脱メチル化と心筋局所からのアルドステロン産生亢進との関連性が強く示唆された。

② CYP11B2 転写に関連する核内受容体の発現調節機構;

CYP11B2 活性化因子 NR4Afamily (NGFIB, NURR1, NOR1)、抑制因子 NR5A1 (SF-1) のすべ
てにおいて、複数のプロモーターを同定した。
また、それらプロモーターが、ヒト副腎、動
脈、心筋、アルドステロン産生腫瘍、心筋症
心筋でも発現していることが判明した。さら
には、これら核内受容体のプロモーター使用
頻度は、それぞれの組織で異なることが分か
った。特に、NGFIB のプロモーター使用頻度
は、アルドステロン産生腫瘍と動脈で有意に
異なっていた。即ち、蛋白コード領域から
11kb 上流のプロモーターの使用頻度が、副腎
では 9.9%、動脈では 35.5% と有意に異なる
ことが判明した。NGFIB の作用は、アルドス
テロン産生腫瘍では CYP11B2 転写促進、動脈で
は抗動脈硬化的である。アルドステロン産生
腫瘍で活性が高く、動脈において活性の低い、
プロモーターのみを抑制することにより、動
脈での NGFIB の機能を保持しつつ、アルドス
テロン産生腫瘍のみで CYP11B2 の発現を抑制
しうる可能性がある。

これらの知見は、病的状態(アルドステロン
産生腫瘍、心筋疾患)におけるアルドステロ
ン産生を制御する新規治療への足がかりと
なる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に
は下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Zhao H, Pearson EK, Brooks DC, Coon V JS, Chen D, Demura M, Zhang M, Clevenger CV, Xu X, Veenstra TD, Chatterton RT, Demayo FJ, Bulun SE. A Humanized Pattern of Aromatase Expression Is Associated with Mammary Hyperplasia in Mice. *Endocrinology*, in press, 査読有, doi: 10.1210/en.2011-1761
- ② Yoneda T, Demura M, Takata H, Kometani M, Karashima S, Yamagishi M, Takeda Y. Unilateral primary aldosteronism with spontaneous remission after long-term spironolactone therapy., *J Clin Endocrinol Metab.* 2012, 97:1109-13., 査読有, doi: 10.1210/jc.2011-2563
- ③ Takata H, Takeda Y, Zhu A, Cheng Y, Yoneda T, Demura M, Yagi K, Karashima S, Yamagishi M., Protective effects of mineralocorticoid receptor blockade against neuropathy in experimental diabetic rats. *Diabetes Obes Metab.* 2012, 14:155-62. 査読有, doi: 10.1111/j.1463-1326.2011.01499.x.
- ④ Demura M, Demura Y, Ameshima S, Ishizaki T, Sasaki M, Miyamori I, Yamagishi M,

Takeda Y, Bulun SE., Changes in aromatase (CYP19) gene promoter usage in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2011, 73:289-93., 査読有, doi:10.1016/j.lungcan.2011.01.003

- ⑤ Karashima S, Takeda Y, Cheng Y, Yoneda T, Demura M, Kometani M, Ohe M, Mori S, Yagi K, Yamagishi M., Clinical characteristics of primary hyperaldosteronism due to adrenal microadenoma. *Steroids.* 2011, 76:1363-6, 査読有, doi:10.1016/j.steroids.2011.07.004
- ⑥ Demura M, Wang F, Yoneda T, Karashima S, Mori S, Oe M, Kometani M, Sawamura T, Cheng Y, Maeda Y, Namiki M, Ino H, Fujino N, Uchiyama K, Tsubokawa T, Yamagishi M, Nakamura Y, Ono K, Sasano H, Demura Y, Takeda Y. Multiple noncoding exons 1 of nuclear receptors NR4A family (nerve growth factor-induced clone B, Nur-related factor 1 and neuron-derived orphan receptor 1) and NR5A1 (steroidogenic factor 1) in human cardiovascular and adrenal tissues. *J Hypertens.* 2011, 29:1185-95., 査読有, DOI: 10.1097/HJH.0b013e32834626bb
- ⑦ 出村昌史、山岸正和、武田仁勇
アルドステロン産生のエピジェネティクス、最新医学、2010、65 巻(10)、p71-78、査読無
- ⑧ Demura M, Yoneda T, Karashima S, Higashikata T, Mabuchi H, Kawano M, Yamagishi M, Takeda Y. A possible new syndrome with double endocrine tumors in association with an unprecedented type of familial heart-hand syndrome: a case report. *J Med Case Reports.* 2010, 29:4:347., 査読有, doi: 10.1186/1752-1947-4-347
- ⑨ Demura M, Yoneda T, Wang F, Zen Y, Karashima S, Zhu A, Cheng Y, Yamagishi M, Takeda Y. Ectopic production of parathyroid hormone in a patient with sporadic medullary thyroid cancer. *Endocr J.* 2010, 57:161-70. 査読有, doi.org/10.1507/endocrj.K09E-131

[学会発表] (計 10 件)

- ① Masashi Demura, Fen Wang, Takashi

Yoneda, Shigehiro Karashima, Shunsuke Mori, Mistuhiro Kometani, Masashi Oe, Yuan Cheng, Yuji Maeda, Mikio Namiki, Katsuhiko Ono, Yasuhiro Nakamura, Hironobu Sasano, Kiyofumi Saijoh, Yoshiyu Takeda
Multiple noncoding exons 1 of nuclear receptors NR4A family (NGFIB, NURR1, NOR1) and NR5A1 (SF1) in human vascular and adrenal tissues

The Endocrine Society's 93th Annual Meeting, the Boston Convention & Exhibition Center, Boston, MA, USA, June 4-7, 2011

- ② Fen Wang, Masashi Demura, Takashi Yoneda, Shunsuke Mori, Masashi Oe, Yuan Cheng, Hidekazu Ino, Noboru Fujino, Uchiyama Katsuharu, Toshinari Tsubokawa, Masakazu Yamagishi, Yasuhiro Nakamura, Katsuhiko Ono, Hironobu Sasano, Yoshiki Demura, Kiyofumi Saijoh, Yoshiyu Takeda
Epigenomic alterations activate the CYP11B2 (aldosterone synthase) gene in cardiomyopathy
The 4th International Aldosterone Forum in Japan, Grand Hall, Tokyo, May 14, 2011 (Poster presentation)
- ③ Fen Wang, Masashi Demura, Takashi Yoneda, Shigehiro Karashima, Shunsuke Mori, Mistuhiro Kometani, Masashi Oe, Yuan Cheng, Katsuharu Uchiyama, Chiaki Nakanishi, Toshinari Tsubokawa, Hidekazu Ino, Noboru Fujino, Masakazu Yamagishi, Yuji Maeda, Mikio Namiki, Yoshiyu Takeda
Epigenetic regulation of the

aldosterone synthase CYP11B2 gene
23rd Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, Vancouver Convention Centre, Canada, Sept. 26-30, 2010

- ④ Masashi Demura, Fen Wang, Takashi Yoneda, Shigehiro Karashima, Shunsuke Mori, Mistuhiro Kometani, Masashi Oe, Yuan Cheng, Katsuharu Uchiyama, Masakazu Yamagishi, Yuji Maeda, Mikio Namiki, Yoshiyu Takeda
Effect of DNA Methylation on Aldosterone Synthase Gene
The Endocrine Society's 92th Annual Meeting, San Diego Convention Center, San Diego, CA, USA, June 19-22, 2010
- ⑤ Masashi Demura, Fen Wang, Takashi Yoneda, Shigehiro Karashima, Shunsuke Mori, Mistuhiro Kometani, Masashi Oe, Yuan Cheng, Yuji Maeda, Mikio Namiki, Masakazu Yamagishi, Yoshiyu Takeda
Multiple noncoding first exons of nuclear receptors NR4A family (NGFIB, NURR1, NOR1) and NR5A1 (SF1) in human adrenal and vascular tissues
The 3rd International Aldosterone Forum in Japan, Grand Hall, Tokyo, May 15-16, 2010
- ⑥ Masashi Demura, Fen Wang, Takashi Yoneda, Shigehiro Karashima, Shunsuke Mori, Mistuhiro Kometani, Masashi Oe, Yuan Cheng, Katsuharu Uchiyama, Chiaki Nakanishi, Toshinari Tsubokawa, Hidekazu Ino,

Noboru Fujino, Masakazu Yamagishi,
Yuji Maeda, Mikio Namiki, Yoshiyu
Takeda

Epigenetics in aldosterone
production

International Symposium on
Cardiovascular Endocrinology and
Metabolism CVEM 2010, Nara

Prefectural New Public Hall, Nara,
Japan, March 31-April 1, 2010

- ⑦ Masashi Demura, Takashi Yoneda, Shigehiro Karashima, Fen Wang, Yuan Cheng, Masakazu Yamagishi, Yoshiyu Takeda

Epigenetic transcriptional repression of the human CYP11B2 gene

The 14th International Congress of
Endocrinology ICE 2010, 国立京都
国際会館, Kyoto, Japan, March
26-30, 2010

- ⑧ Masashi Demura, Fen Wang, Takashi Yoneda, Shigehiro Karashima, Yuan Cheng, Yoshiyu Takeda

Epigenetic regulation of aldosterone production

International Symposium for
Aldosterone and Related Substances
in Hypertension (ISARSH 2010),
Hotel Metropolitan Sendai, Sendai,
Japan, March 23-24, 2010

- ⑨ Masashi Demura, Takashi Yoneda, Shigehiro Karashima, Aoshuang Zhu, Masakazu Yamagishi, Yoshiyu Takeda
Regulation of the orphan nuclear receptor NR4A family by multiple promoters in the adrenocortical H295R cells

19th European Meeting on

Hypertension ESH2009, Milan
Convention Center, Milan, Italy,
June 12-16, 2009

- ⑩ Masashi Demura, Takashi Yoneda, Shigehiro Karashima, Aoshuang Zhu, Masakazu Yamagishi, Yoshiyu Takeda
Epigenetic transcriptional repression of the CYP11B2 gene in human adrenocortical cells
The 2nd International Aldosterone Forum in Japan, Grand Hall, Tokyo, May 16-17, 2009

[その他]

ホームページ等

http://www.aldosterone.jp/conference_report/090516/j04/index.php

6. 研究組織

(1) 研究代表者

出村 昌史 (DEMURA MASASHI)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：00507080