

令和 5 年 5 月 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16058

研究課題名（和文）ATP1A1変異により促進される細胞増殖および腫瘍形成機構の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of Cell proliferation and tumorigenesis in ATP1A1 gene mutated adrenal cells

研究代表者

小武家 和博（Kobuke, Kazuhiro）

広島大学・医系科学研究科（医）・寄附講座助教

研究者番号：80805648

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：アルドステロン産生腺腫の原因の一つであるATP依存性Na/Kポンプ遺伝子（ATP1A1）の変異により生じる、細胞増殖および腫瘍形成のメカニズムの解明を目的に研究を行った。生理的濃度の強心配糖体がAPAに発現増加したNa/Kポンプの受容体シグナルを活性化し、APAに至る腫瘍増殖機構を明らかにした。また、APA腫瘍増殖にはビタミンD受容体シグナル活性が必須であり、ビタミンD受容体発現はDNA脱メチル化により調節されていることが示された。また、生理的濃度の強心配糖体の投与やビタミンDの投与あるいは除去はアルドステロン合成には影響を及ぼさなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回明らかになった細胞増殖促進メカニズムは、必要なアルドステロン分泌を抑制することなく、細胞増殖によるアルドステロン過剰分泌、ならびに腫瘍形成を抑制することができると考えられ、正常の生体ホメオスタシスを障害しない新たな創薬につながる可能性がある。また、本研究過程においてATP1A1変異副腎皮質腫瘍モデル細胞株の樹立や、副腎腫瘍細胞の増殖を定量的に評価するメソッドなどの今後の本領域の研究における重要なツールの開発・確立も果たされた。このことは今後の本領域研究の進展に寄与する。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to elucidate the mechanisms of cell proliferation and tumorigenesis caused by mutations in the ATP-dependent Na/K pump gene (ATP1A1), which is one of the causes of aldosterone-producing adenomas. We found that physiological concentrations of strong glycosyltransferases activate the receptor signal of the Na/K pump, which is upregulated in APA, and elucidate the mechanism of tumor growth that leads to APA. We also showed that vitamin D receptor signaling activity is essential for APA tumor growth and that vitamin D receptor expression is regulated by DNA demethylation. In addition, administration of physiological concentrations of strong cardiac glycosides and administration or removal of vitamin D had no effect on aldosterone synthesis.

研究分野：二次性高血圧

キーワード：二次性高血圧症 アルドステロン産生腫瘍 副腎皮質腫瘍 原発性アルドステロン症

## 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、最も頻度の高い二次性高血圧であり、全高血圧症の 3.3 ~ 10.0% と報告されている [Lancet 371:1921-1926, 2008]。PA の病型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分類され、いずれもアルドステロンを過剰に合成し、心血管疾患や腎障害を高率に発症する [J Am Coll Cardiol. 45:1243-1248, 2005]。PA の発症機構の解明は、PA のみならず心血管疾患や腎障害の発症制御機構の解明に繋がる。

APA の病因としては、細胞膜に存在するイオンチャネルやポンプをコードする KCNJ5, ATP1A1, ATP2B3 などに体細胞変異を認め、これらの体細胞変異がアルドステロン合成を促進することが報告されている。しかし、これらの遺伝子変異による、APA の発症機構または腫瘍増殖機構については、全く報告されていない。

副腎皮質球状帯におけるアルドステロン合成細胞の局在は加齢とともに非連続性となり、その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。本研究者は既に、遺伝子変異解析と病理学的解析から、ATP1A1 変異をもつ副腎皮質細胞が、APCC を経て APA に移行する可能性を報告している。

つまり、ATP1A1 変異をもつ APA は、アルドステロン合成細胞に ATP1A1 変異が入ると細胞増殖が促進され、腫瘍が形成されることにより PA を発症する、という仮説が考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、副腎皮質由来の細胞株に ATP1A1 変異を導入した細胞株を用い、腫瘍増殖の鍵因子を同定し、その機能解析から腫瘍増殖および腫瘍増殖制御機構を解明する。

ATP1A1 変異が腫瘍増殖をもたらす調節機構または因子は何か、さらに、その調節因子の制御により腫瘍増殖は制御できるかを明らかにすることが目的である。

### 3. 研究の方法

APA 組織標本および ATP1A1 変異を導入した細胞株において、RNA-seq 解析を行い、網羅的遺伝子発現解析を行う。その結果を基に、両者で共通して発現上昇している因子を抽出し、Bioinformatics や遺伝子の gene ontology から腫瘍増殖に関わる因子を絞り込む。

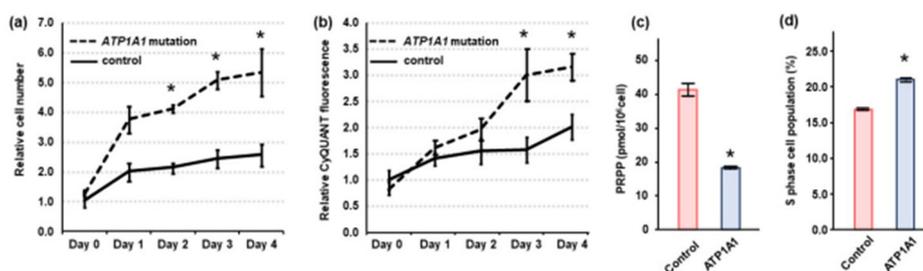
副腎皮質由来培養細胞株 (HAC15) に ATP1A1 変異遺伝子を導入し、変異 ATP1A1 高発現培養細胞株を樹立する。前述の絞り込んだ因子について、APA 標本での免疫組織化学や ATP1A1 変異培養細胞株でのウェスタンブロッティングによる発現解析を行う。ATP1A1 変異により HAC15 の細胞増殖に生じる変化について、細胞増殖速度、アポトーシス・ネクローシス頻度、細胞周期変化などの観点から評価する。さらに、ATP1A1 変異がもたらす細胞増殖の分子メカニズムについて検索し、増殖を制御する因子の増減による細胞増殖の変化について *in vitro* で観察を行う。

上記細胞株を用いたプロテオーム解析を行い、細胞増殖に関わる因子の同定を行う。PA においてアルドステロン量を調節しているとされる、Na/K ポンプ機能を調節する強心配糖体を用い、ポンプ機能により細胞増殖に影響がみられるかを *in vitro* で検討する。

で増殖を制御する因子として検索された、ビタミン D 受容体 (VDR) について、APA 標本、および上記細胞株を用いて、タンパク発現解析を行う。また、発現調節因子について検索するため、RNA-seq 解析、DNA メチル化解析、プロテオーム解析を行う。で樹立した ATP1A1 変異 APA モデル細胞株に、VDR 発現を調節するレンチウイルスを用いて、ATP1A1 遺伝子変異および VDR 発現変化による細胞増殖やアルドステロン分泌の変化について検討する。

### 4. 研究成果

ATP1A1 変異副腎皮質培養細胞株において、対照群と比べ、細胞増殖は有意に増加した。メタボローム解析の結果からは PRPP の有意な減少と、細胞周期における検討では S 期の



細胞比率増加をみとめた。アポトーシスとネクローシスには変化はみとめなかった（図1）

上記結果から、細胞増殖に関わる因子として SRC のリン酸化制御が重要な役割を果たしていると考えられた。強心配糖体であるウアバインは、副腎皮質細胞機能を、Na/K ポンプ機能の調節によって制御していると考えられている。今回の検討で、薬理的濃度のウアバインは、確かに副腎皮質培養細胞株の細胞増殖を抑制していることが確かめられた（図2b）。一方でアルドステロン分泌能には変化がなく、ウアバインはアルドステロン分泌よりも細胞数制御に関わっている可能性が示唆された（図2c）。また、ごく低濃度の生理的濃度のウアバインが、高発現した ATP1A1 を活性化し細胞増殖を促進する可能性が示され、この傾向は ATP1A1 変異細胞でより顕著であった（図2a）。

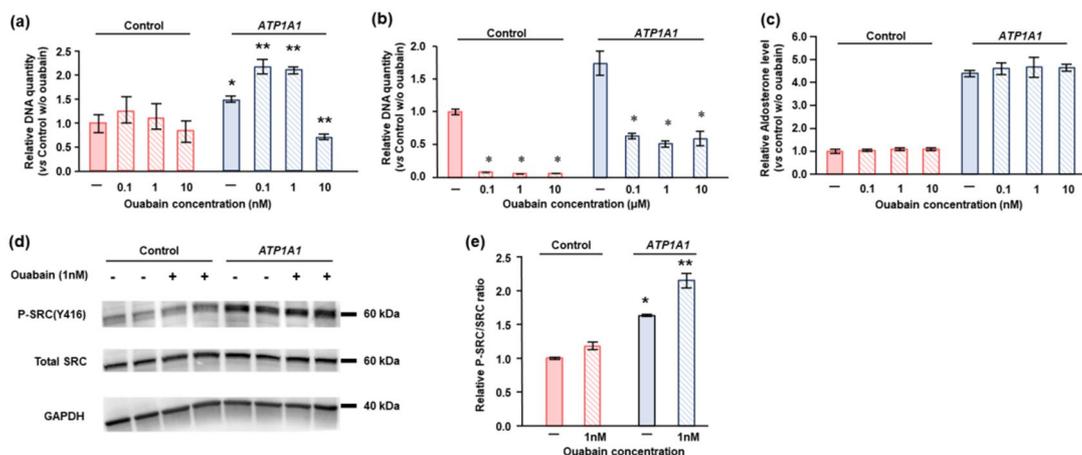


図2

また、ATP1A1 変異により SRC のリン酸化が促進されており、ATP1A1 変異のレセプター機能の活性化により、細胞内増殖シグナルの増強が生じ、細胞増殖につながっている可能性が示唆された（図2d,e）。

APA 標本における免疫組織化学より、ATP1A1 変異 APA 細胞において、ほかの遺伝子変異をもつ PA と比較して、VDR の発現が増加していることが初めて示された（図3）。

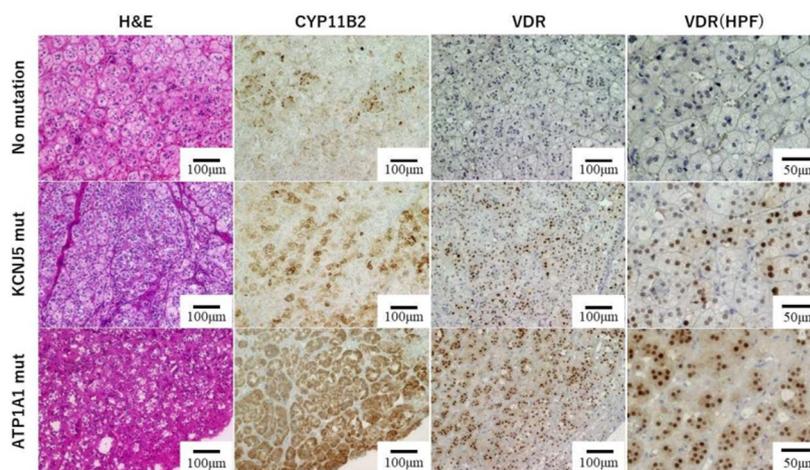


図3

また、で樹立した ATP1A1 変異 APA モデル細胞株において、同様に VDR の発現が増加していることが示された。また、同細胞株において VDR の発現レベルを低下させることで、細胞増殖速度が低下することも示された。一方で、ビタミン D の添加あるいは除去は細胞増殖速度に影響せず、細胞増殖シグナルの強度を規定しているのは VDR の発現レベルであることが示唆された（図4）。

DNA メチル化解析では、ATP1A1 変異 PA において、VDR mRNA レベルの上昇とともに、VDR 遺伝子のプロモーター領域における DNA メチル化レベルの低下が示され、ATP1A1 変異

PA における VDR の DNA メチル化の関与が示唆された ( 図 5 ) .

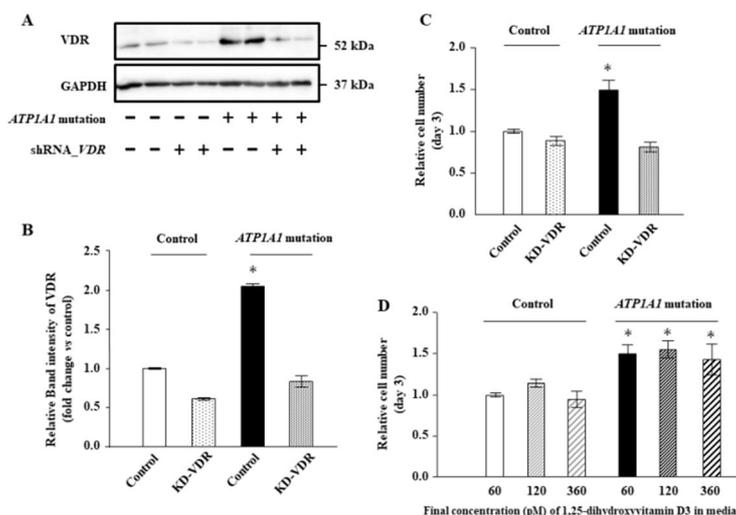


図 4

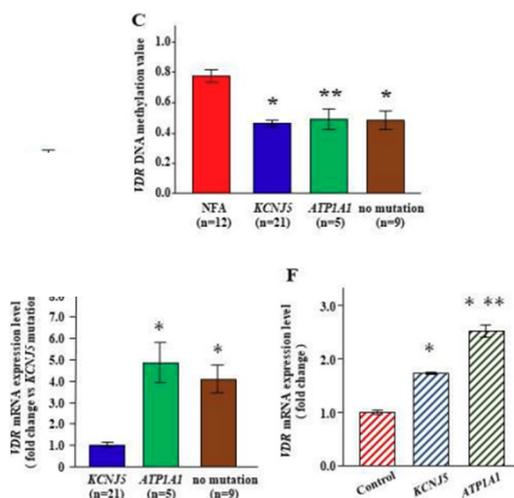


図 5

【研究成果のまとめ】

アルドステロン産生腺腫の原因の一つである *ATP1A1* の変異により生じる，細胞増殖および腫瘍形成のメカニズムの解明を目的に研究を行った．生理的濃度の強心配糖体が APA に発現増加した Na/K ポンプの受容体シグナルを活性化し，APA に至る腫瘍増殖機構を明らかにした．また，APA 腫瘍増殖にはビタミン D 受容体シグナル活性が必須であり，ビタミン D 受容体発現は DNA 脱メチル化により調節されていることが示された．この過程において，*ATP1A1* 変異副腎皮質腫瘍モデル細胞株の樹立や，副腎腫瘍細胞の増殖を定量的に評価するメソッドなどの今後の本領域の研究における重要なツールの開発・確立も果たされた．また，生理的濃度の強心配糖体の投与やビタミン D の投与あるいは除去はアルドステロン合成には影響を及ぼさなかった．このことから，今回明らかになった細胞増殖促進メカニズムは，必要なアルドステロン分泌を抑制することなく，細胞増殖によるアルドステロン過剰分泌，ならびに腫瘍形成を抑制することができると考えられ，正常の生体ホメオスタシスを障害しない新たな創薬につながる可能性がある．

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 0件 / うちオープンアクセス 2件）

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 -

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
---------	---------