

Banyu Foundation Research Grant 2013—生活習慣病領域—

研究成果報告書(最終) <概要>

所 属	広島大学病院
氏 名	沖 健司
研究テーマ	内向き整流性カリウムチャネルをターゲットにしたアルドステロン合成機序の解明と新規治療法の開発

- ・ 研究助成報告として広報資料に掲載される点を留意すること。
- ・ 概要の構成は自由とするが、研究目的、手法、成果など、一般の方にもわかりやすくすること。
- ・ 枚数は1ページにまとめること。(図表、写真などの添付を含む)

【背景と目的】

高血圧症は、40歳以上の人口の約40%が罹患し、さらに、高血圧症の5-10%程度は原発性アルドステロン症が原因とされ、全世界で非常に高い有病率を呈する。近年、原発性アルドステロン症のうち、アルドステロン産生腺腫のアルドステロン過剰症の原因として、KCNJ5(Kir3)の体細胞変異が報告された。そこで、本研究では、副腎皮質球状帯やアルドステロン産生腫瘍のKir3の構造決定と機能解析により、Kir3を標的としたアルドステロン合成阻害薬の開発につながり、さらに新規高血圧治療の開発や原発性アルドステロン症の診断や治療の確立につなげることを目的とした。

【方法】

手術検体によるヒト副腎皮質球状帯、アルドステロン産生腫瘍検体に対し、パラフィン標本、生標本、Laser Capture Dissectionにより組織を摘出した。また、ヒト副腎皮質癌細胞株(HAC15)もmRNAや蛋白解析用に前処置する。Kir3.1からKir3.4のmRNAや蛋白発現レベルを確認し、Kir3.1からKir3.4分布の同定と構造の推測を行い、免疫沈降法によりKir3.1からKir3.4からなるKir3の構造を検討した。アルドステロン産生腫瘍でのKir3の構造と機能を同定した後に、そのKir3を形成するplasmid(遺伝子変異をもつものを含む)の作製とその遺伝子を導入したレンチウイルスを作製した。レンチウイルスを用いてHAC15にアルドステロン産生腫瘍に特異的なKir3を誘導しアルドステロン産生腫瘍のモデル細胞株の樹立を行った。さらに、そのモデル細胞株やアルドステロン産生腺腫の細胞株に対し、網羅的遺伝子発現解析を実施することにより、アルドステロン産生腫瘍における細胞内シグナル伝達の詳細や新規遺伝子の同定を試みた。

【結果】**1. 副腎皮質球状帯、アルドステロン産生腺腫、HAC15におけるKir3サブユニット発現解析**

mRNA発現解析やKir3.4免疫組織化学によるKir3.4の発現解析を行ったところ、副腎皮質球状帯に特異的に発現していることがわかった。さらに、アルドステロン産生腺腫においては、Kir3.4は瀰漫性に発現し、Kir3.1の発現はほとんどみられなかった。Kir3サブユニットの同定を免疫沈降法により解析した。副腎皮質球状帯におけるKir3の発現は、Kir3.1およびKir3.4のヘテロ接合体またはKir3.1とKir3.4のホモ接合体であることが推測された。次に、アルドステロン産生腺腫の検体を用いて同様の解析を行ったところ、Kir3.4によってのみ組織回収でき、Kir3.4のホモ接合体であることが推測された。

2. HAC15へのKir3の遺伝子導入

HAC15にレンチウイルスを用い、KCNJ3, 5, 6, 9およびKCNJ5 T158Aを全ての組み合わせで遺伝子導入を行った。KCNJ5 T158Aと他の遺伝子を同時に導入した場合、KCNJ5 T158A単独で導入した場合よりもアルドステロン合成は低下した。次に、HAC15にKCNJ5 T158Aを導入した安定発現細胞株の樹立を行った。コントロール細胞と比較し、上清のアルドステロン濃度は約5倍、CYP11B2発現量は約12倍高値であり、安定発現細胞株の樹立に成功した。

3. 網羅的遺伝子発現解析によるシグナル解析

網羅的遺伝子発現解析からアルドステロン産生腺腫とKCNJ5 T158Aを導入したHAC15は、高発現遺伝子のみで解析すると極めて類似した遺伝子群の上昇がみられた。

【まとめ】

本研究において、副腎皮質球状帯およびアルドステロン産生腺腫のKir3構造決定や機能解析を行った。

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> ・ 発表年順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 ・ 発表学会名、発表者名、演題を記入する。 ・ 国内外を問わない。 ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2014年6月21日 ～24日	the 16th International Congress of Endocrinology, the Endocrine society's 96th Annual Meeting and Expo Kiyotaka Itcho, Kazuhiro Kobuke, <u>Kenji Oki</u> , Rui Kishimoto, Shusaku Maeda, Haruya Ohno, Masayasu Yoneda, Nobuoki Kohno
2	2014年6月19日 ～20日	40th Meeting of the International Aldosterone Meeting Kazuhiro Kobuke, Kiyotaka Itcho, <u>Kenji Oki</u> , Rui Kishimoto, Shusaku Maeda, Haruya Ohno, Masayasu Yoneda, Nobuoki Kohno The clinical and pathological characteristics of aldosterone producing adenoma with ATP1A1 mutation
3	2014年5月24日 ～26日	第3回臨床高血圧フォーラム <u>沖 健司</u> , 小武家 和博, 一町 澄宜, 岸本 瑠衣, 松本 武史, 光波 直也, 大久保 博史, 前田 修作, 大野 晴也, 米田 真康, 河野 修興 原発性アルドステロン症の一次スクリーニングにおけるアルドステロン絶対値の有効性
4	2014年4月24日 ～26日	第87回日本内分泌学会学術総会 <u>沖 健司</u> , Elise P Gomez-Sanchez, Celso E Gomez-Sanchez 副腎皮質細胞の増殖およびアルドステロン合成における YPEL4 の役割
5	2014年4月24日 ～26日	第87回日本内分泌学会学術総会 小武家 和博, 志和 亜華, <u>沖 健司</u> , 米田 真康, 粟屋 智一, 中西 修平, 河野 修興 CYP11B2 抗体を用いたアルドステロン産生腺腫の免疫組織化学による検討
6	2014年4月24日 ～26日	第87回日本内分泌学会学術総会 一町 澄宜, <u>沖 健司</u> , 小武家 和博, 長野 学, 毛利 麻衣子, 志和 麻実, 岸本 瑠衣, 久保田 益亘, 大久保 博史, 前田 修作, 大野 晴也, 米田 真康, 中西 修平, 河野 修興 ATP1A1 体細胞変異を有するアルドステロン産生腺腫の臨床的および病理学的検討
3. 投稿、発表予定		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1	投稿中	Gonadotropin-releasing hormone receptor mediates aldosterone production in aldosterone-producing adenoma Rui Kishimoto, Kenji Oki, Masayasu Yoneda, Haruya Ohno, Kazuhiro Kobuke, Kiyotaka Itcho, Celso E, Gomez-Sanchez, Nobuoki Kohno
2	投稿中	Hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity influences the progression of chronic kidney disease in diabetic patients Takako Asao, Kenji Oki, Masayasu Yoneda, Junko Tanaka, Nobuoki Kohno