

シングルセル解析を基盤にした細胞間情報伝達を介したアルドステロン合成機構の解明

沖 健司

広島大学大学院 分子内科学

【研究の背景】

原発性アルドステロン症は、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、APA の 30-60%に内向き整流性カリウムチャンネル(Kir3.4)をコードする *KCNJ5* の体細胞変異が同定される¹⁾。我々は、*KCNJ5* の遺伝子変異が、APA においてアルドステロン合成を促進する分子機序を報告した²⁾。変異型 Kir3.4 は、細胞内に K⁺を流入し、細胞膜の脱分極、電位依存性カルシウムチャンネルを開き、細胞内カルシウムシグナル伝達を活性化することで、アルドステロン合成の律速酵素である CYP11B2 の転写を誘導し、アルドステロン合成が促進される。しかし、*KCNJ5* 変異をもつ APA において CYP11B2 は斑状に染色され、*KCNJ5* 変異による CYP11B2 発現量は個々の細胞において、異なっていると考えられる³⁾。*KCNJ5*変異によるアルドステロン合成機構を明確にするために、個々の細胞における CYP11B2 を含めた、網羅的遺伝子発現解析が必要と考える。

【目 的】

シングルセル解析を用いて、個々の細胞レベルにおける *KCNJ5* 変異と *CYP11B2* 発現量を明らかにし、アルドステロン合成の細胞内分子機構を解明することを最終目的とし、本研究において、適切なシングルセルを得るための条件検討を行うことを目的とした。

【方 法】

APA 摘出直後に、APA の一部を collagenase 溶液(HBSS buffer+0.1% Collagenase type II+0.1% DNase I+2% FBS +5mM CaCl₂+1mM MgCl₂)に加え、細かく破碎した。37°Cのシェーキングインキュベーター内で、30 分間培養した。100 μm のセルストレイナーに通した後、300G で 5 分間遠心し、細胞を回収した。

生細胞を得るためにフローサイトメリーを利用した。上記細胞を解凍し、PBS+1% DNase I 溶液 1ml に溶解し、最終的に細胞数が 2×10⁶~2×10⁷/ml になるように溶解した。DAPI を加えた上で、35 μm のセルストレイナーを通過した細胞をフローサイトメリーに利用した。

【結 果】

手術で摘出した APA を単一細胞に破碎し、生細胞比率を算出すると、約 30%であった。有効なシングルセル解析を行うために、生細胞比率を増やす必要があり、フローサイトメリーによる生細胞の回収を行った。

フローサイトメリーにより、細胞径が小さいもの、DAPI が適切に発現しているものを取り出すことにより、1,000 個以上の生細胞のみを回収することができた。

生細胞に APA の適切な細胞が含まれているか確認するため、APA と非機能性副腎皮質腫瘍の単一細胞を用いて遺伝子発現解析をおこなった。APA に特異的に発現する *CYP11B2* を両者で比較したところ、APA において、500 倍以上の *CYP11B2* 発現量を認め、適切な APA 標本が抽出できていると判断した。

【考 察】

適切な単一細胞解析を行うにあたり、限られた細胞数のみの解析になるため、生細胞比率をあげることが重要である。collagenase 溶液を用いて単一細胞を抽出した場合、生細胞数が限られていた。しかし、フローサイトメトリーで生細胞を回収することにより、生細胞のみを抽出することができた。

次に、回収した細胞に、一定の頻度で、線維芽細胞等が含まれるため、APA 組織であることを確認することが重要である。APA 検体の対照として、アルドステロンを産生しない非機能性副腎皮質腫瘍の検体から単一細胞を得た。アルドステロン合成に必須であり、またアルドステロン合成の律速酵素である *CYP11B2* を両者で比較検討したところ、APA 組織と非機能性副腎皮質腺腫組織から通常の方法で mRNA 抽出して比較検討した際によりも、*CYP11B2* が高いレベルで APA 由来の単一細胞群に発現していることがわかった。つまり、APA 組織の細胞を適切に採取できていると考えた。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

APA の単一細胞を用いた解析から、アルドステロン合成に関わる詳細な遺伝子発現解析を行うことが可能と考える。アルドステロン合成の分子機構を明確にすることにより、アルドステロン制御に関わる因子や経路が明らかになり、創薬の標的因子を同定できると考える。

【参考・引用文献】

1. Gomez-Sanchez CE, Oki K. Minireview: Potassium channels and aldosterone dysregulation: Is primary aldosteronism a potassium channelopathy? *Endocrinology*. 2014;155:47-55.
2. Oki K, Plonczynski MW, Luis Lam M, Gomez-Sanchez EP, Gomez-Sanchez CE. Potassium channel mutant *kcnj5* t158a expression in *hac-15* cells increases aldosterone synthesis. *Endocrinology*. 2012;153:1774-1782.
3. Nanba K, Chen AX, Omata K, Vinco M, Giordano TJ, Else T, Hammer GD, Tomlins SA, Rainey WE. Molecular heterogeneity in aldosterone-producing adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;jc20153239.