

アルドステロン合成の翻訳後調節機構解明と創薬標的因子の同定

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(PA)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ネル(Kir3.4)をコードする*KCNJ5*の体細胞変異が同定され、APA全体の約90%に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遺伝子の体細胞変異が同定される^{1,2)}。我々は、これらの遺伝子変異が、APAにおいてアルドステロン合成を促進する分子機序や腫瘍増殖機構を報告してきた³⁻⁵⁾。さらに、我々は、APAのアルドステロン合成律速酵素は、ミトコンドリアに局在するアルドステロン合成酵素(CYP11B2)であり、この酵素のタンパクへの翻訳は小胞体中存在する calmegin により促進されることを報告した⁴⁾。APAにおけるCYP11B2の翻訳律速因子や翻訳調節のアルドステロン合成細胞内分子機構は全く解っていない。

【目的】

「CYP11B2 特異的翻訳制御によりアルドステロン合成を抑制できる」と仮説し、翻訳調節によるアルドステロン合成機構を解明することを目的とし、原発性アルドステロン症や高血圧の病態解析や治療法開発に繋げたいと考える。

【方法】

アルドステロンを合成する副腎皮質癌細胞株(HAC15)にAPAの原因遺伝子である*KCNJ5*変異を導入し、PAモデル細胞株を樹立した。その細胞株に、Actinomycin DやCycloheximidを用いて、転写や翻訳を調節し、上清中のアルドステロン濃度をELISA法で測定し、qPCR法でCYP11B2遺伝子発現量を測定した。

HAC15にアルドステロン合成促進薬であるアンギオテンシンIIを投与し、CYP11B2タンパクをWestern blotting法により測定した。

【結果】

① PAモデル細胞株における転写または翻訳抑制によるアルドステロン合成

PAモデル細胞株を用いて、転写抑制下でも上清のアルドステロン濃度(対照細胞株の2.5倍)やCYP11B2発現量(対照細胞株の5.2倍)は有意に高く、一方で、同様の実験系に、Cycloheximidを用いた翻訳抑制下では、アルドステロン合成やCYP11B2タンパク発現は完全に抑制された。CYP11B2発現量を核と細胞質に分けて抽出したところ、細胞質内に1.5倍多く存在しており、細胞質内CYP11B2が翻訳に利用されていると考えられる。

② アンギオテンシンIIによるアルドステロン早期分泌

アンギオテンシンII刺激5分後には、CYP11B2蛋白発現が、刺激10分後には、細胞上清のアルドステロン濃度が有意に上昇した。この刺激内でCYP11B2mRNA発現量に変化なく、CYP11B2の翻訳調節によりアルドステロン合成が促進されることが示唆された。

③ PAモデル細胞株細胞質蛋白とCYP11B2 RNAの結合

Ribo Trap Kit (MBL社)を用いて、T7プロモーターを付加したCYP11B2 cDNAを試験管内で転写し、BrUで標識した

CYP11B2 RNA を作製した。BrU 標識 CYP11B2 と PA モデル細胞株の細胞質抽出液の共培養を行い、複数の CYP11B2 RNA 結合蛋白が存在することを SDS-PAGE で確認した。

【考 察】

本研究で、アルドステロン合成酵素である CYP11B2 RNA に複数の結合蛋白が存在すること、転写抑制下でも CYP11B2 蛋白発現がみられること、アルドステロン合成刺激 5 分後に CYP11B2 蛋白発現は上昇することを示した。

この度の研究で、CYP11B2 RNA に結合するいくつかのタンパクを同定したが、これらのタンパクの発現を調節した機能解析が今後必要である。また、タンパクは高次構造の決定も重要であり、小胞体におけるタンパク高次構造の調節機構化の解明も必要である。

PA は片側性に腫瘍を認める APA においては手術加療により治癒するが、両側 APA は手術により副腎不全に至り、手術することができない。また、アルドステロンを合成する副腎皮質球状帯の過形成により PA に至る特発性アルドステロン症においても、手術加療は適応外である。両側 APA や特発性副腎アルドステロン症においては、アルドステロンの受容体である電解質コルチコイド受容体遮断薬を用いて治療しているが、その効果は限定的である。アルドステロン合成を制御する薬剤の開発の多くは CYP11B2 を標的としているが、CYP11B2 はコルチゾールを合成する CYP11B1 とタンパク構造が酷似しており、CYP11B2 阻害薬の開発は困難を極めている。アルドステロンを合成する翻訳因子の同定は、PA 治療薬・診断薬の開発に結び付く。さらには、アルドステロンは心血管疾患・腎疾患をもたらすため、アルドステロン合成阻害薬の開発は心血管疾患や慢性腎臓病に対しての治療薬にもつながる可能性がある。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本邦における高血圧患者は 4300 万人、PA 患者は 200~400 万人程度と推測され、著しく頻度の高い疾患である。本研究を基盤に、PA や高血圧の治療薬につながる可能性がある。さらに、アルドステロンは心血管や腎臓などに直接臓器障害をもたらすため、心血管疾患や慢性腎臓病に対しての治療薬にもつながる可能性がある。PA の診断は著しく煩雑であり、複数回の内分泌検査、アルドステロン過剰部位の局在診断目的で CT や副腎静脈サンプリングなどを必要とし、複数回の外来受診や入院診療を行うことが不可欠である。さらに、片側病変であれば、高血圧の改善や心血管疾患の発症予防目的で片側副腎摘出術を要する。PA で特異的にアルドステロンを調節する新規分子標的治療薬は、原発性アルドステロン症の診断や治療の適応となり、本症の複雑な診断や手術を省略でき、全世界で大幅な医療費の削減および検査に対する患者負担の軽減にもつながる。

【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. Itcho K, Oki K, Ohno H, Yoneda M. Update on Genetics of Primary Aldosteronism. *Biomedicines*. 2021 Apr 10;9(4):409.
3. Kobuke K, Oki K, Gomez-Sanchez CE, Gomez-Sanchez EP, Ohno H, Itcho K, Yoshii Yoko, Yoneda M, Hattori, N. Calneuron 1 Increased Ca²⁺ in the Endoplasmic Reticulum and Aldosterone Production in Aldosterone-Producing Adenoma. *Hypertension*. 71(1):125-133, 2018.
4. Itcho K, Oki K, Gomez-Sanchez CE, Gomez-Sanchez EP, Ohno H, Kobuke K, Nagano G, Yoshii Y, Baba R, Hattori N, Yoneda M. Endoplasmic Reticulum Chaperone Calmegin Is Upregulated in Aldosterone-Producing Adenoma and Associates With Aldosterone Production. *Hypertension*. 75(2):492-499, 2020
5. Kobuke K, Oki K, Gomez-Sanchez CE, Gomez-Sanchez EP, Itcho K, Ohno H, Nagano G, Yoshii Y, Baba R, Kodama T, Arihiro K, Hattori N, Yoneda M. ATP1A1 Mutant in Aldosterone-Producing Adenoma Leads to Cell Proliferation. *Int J Mol Sci*. 2021 Oct 12;22(20):10981.