

論文内容要旨

Calneuron 1 Increased Ca^{2+} in the Endoplasmic Reticulum and
Aldosterone Production in Aldosterone-Producing Adenoma

(カルシウム結合タンパク Calneuron 1 は
小胞体 Ca^{2+} 増幅を介しアルドステロン産生腺腫における
アルドステロン合成を促進する)

Hypertension, in press.

主指導教員：服部 登 教授
(医歯薬保健学研究科 分子内科学)
副指導教員：浅野 知一郎 教授
(医歯薬保健学研究科 医化学)
副指導教員：米田 真康 講師
(広島大学病院 内分泌・糖尿病内科)

小武家 和博

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

【背景】 原発性アルドステロン症(PA)は、心血管疾患の合併率が著しく高い重要な疾患である。近年、PAのうちアルドステロン産生腺腫(APA)にて *KCNJ5*、*ATP1A1*、*ATP2B3*、*CACNA1D* の遺伝子変異が同定され、細胞内 Ca^{2+} シグナルの活性化により、アルドステロン合成酵素(CYP11B2)の発現を促進することが明らかとなった。そこで、アルドステロン自律・過剰合成時の細胞内 Ca^{2+} シグナル伝達を調節する鍵分子を同定し、その因子を制御することでPAの治療標的因子を同定できると考えた。APAや非機能性副腎皮質腺腫(NF)の腫瘍標本を用いた網羅的遺伝子発現解析から、calneuron 1をコードする *CALN1*がCYP11B2と最も強い関連を示すことを見出したが、calneuron 1の副腎皮質での発現やアルドステロン合成への関与は全く明らかでなかった。そこで、「calneuron 1はアルドステロン過剰合成時の Ca^{2+} シグナル鍵分子であり、アルドステロン合成を調節する」と仮説を立て、calneuron 1を介したアルドステロン合成制御機構を解明することを目的とした。

【方法】 当院で副腎摘出術を実施したAPA (n=24) とNF (n=6) の腫瘍検体を対象に、網羅的遺伝子発現解析を行い、qPCRはAPA (n=48) とNF (n=13)を対象とした。細胞内 Ca^{2+} 伝達に関わる構造(EF-hand)をもつ155分子をNCBIウェブサイトから抽出した。副腎皮質癌細胞株(HAC15)への遺伝子調節はレンチウイルスを用いた。

【結果】

1. APAにおける *CALN1* と CYP11B2 発現の関連

EF-handをもつ155分子から、CYP11B2発現と最も関連する *CALN1*を同定した。*CALN1* mRNA発現はAPAではNFと比較して4.4倍に増加しており ($P<0.001$)、CYP11B2の発現との間に正相関がみられた ($r=0.310$, $P<0.05$)。APAをgenotypeにより、wild type群 (n=16)、*KCNJ5*群 (n=27)、*ATP1A1*群 (n=5)に分類したが、*CALN1*発現量の差は認めなかった。免疫組織化学では、APAにおけるCYP11B2とcalneuron 1の発現部位は一致し、NFでは両者の発現はみられず、副腎皮質球状帯にのみcalneuron 1の発現を認めた。

2. アンジオテンシン II (A-II) による *CALN1* 発現調節

A-II (10nM)刺激下のHAC15で、*CALN1*発現は1.7倍に増加した ($P<0.05$)。低濃度食塩で飼育したラットから摘出した副腎標本の免疫組織化学で、CYP11B2とcalneuron 1の強発現を認めた。

3. HAC15における *CALN1* 発現調節

*CALN1*を過剰発現させると、CYP11B2 mRNA発現量は5.8倍に増加し ($P<0.001$)、上清中のアルドステロン濃度は11.2倍に増加した ($P<0.01$)。 *CALN1*発現を抑制すると、baselineでは変化はみられなかったが、A-II刺激後のアルドステロン合成は抑制された ($P<0.05$)。

4. HAC15のAPAモデルにおける *CALN1* 発現調節

*KCNJ5*T158Aを導入したところ、*CALN1* mRNAは1.4倍に増加した ($P<0.05$)。この細胞株で *CALN1*をノックダウンしたところ、アルドステロン合成はbaselineの70%に低下した ($P<0.01$)。

5. calneuron 1の細胞内局在と細胞内カルシウム量

N末端側にGFPを融合したcalneuron 1と、細胞構造標識試薬 CellLight ER-RFPあるいはGolgi-RFPを導入した。GFP融合calneuron 1の発現パターンは、小胞体と一致した。次に、小胞体

内 Ca^{2+} 濃度指示薬となる R-CEPIA1er を用いると、*CALN1* を導入した HAC15 において、小胞体 Ca^{2+} 濃度は有意に高値であった。この HAC15 において ER への Ca^{2+} 取り込みを担う SERCA を阻害する TMB-8 を添加すると、*calneuron1* により増幅されたアルドステロン合成は低下した。

【考察とまとめ】

APA や A-II 依存性アルドステロン過剰症において、小胞体における *calneuron 1* の発現増加および Ca^{2+} 貯蔵増加を示し、*CALN1* 発現調節により、アルドステロン合成が制御されることを示した。正常副腎皮質球状帯においても *calneuron 1* は発現するが、A-II 非刺激下ではアルドステロン合成に影響しなかった。アルドステロン過剰合成時に *calneuron 1* の発現は増加するため、*calneuron 1* の抑制または阻害は、APA やレニン依存性高アルドステロン血症におけるアルドステロン合成制御の治療標的分子になる可能性がある。