

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16173

研究課題名(和文)マイクロRNAによる原発性アルドステロン症の新規病型診断バイオマーカーの確立

研究課題名(英文)Significance of micro RNA for subtype classification in primary aldosteroinism

研究代表者

馬越 洋宜(Hironobu, Umakoshi)

九州大学・大学病院・特別教員

研究者番号：40741278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではアルドステロン産生腺腫(APA)を効果的に検出するために腫瘍由来エクソソームに着目し、エクソソームに内包される疾患特異的miRNAをターゲットとしたバイオマーカーを探索を目的とした。APA10例、副腎過形成10例を対象として、患者末梢血血漿サンプルよりエクソソーム抽出を行い、miRNAアレイにより両群で発現変動差異のあるmiRNAを探索し、APA群において発現低下から13種類、発現上昇から7種類のmiRNAを同定した。次いで発現変動の得られたmiRNAの標的遺伝子の探索およびPathway解析を行い、候補標的遺伝子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

原発性アルドステロン症(PA)はアルドステロンの自律性分泌を主徴とし、全高血圧の約5-10%を占める高頻度の内分泌性高血圧である。PA診断において手術で治癒が得られるアルドステロン産生腺腫をいかに効率良く診断するかがポイントである。APA診断法は約50年前に確立した副腎静脈サンプリングであるが、侵襲性、コスト・検査標準化の観点から、新規診断法の確立が喫緊の課題とされている。本研究課題による疾患特異的マイクロRNAの同定により、非侵襲的な新たな診断法確立の基盤となる知見を得た。

研究成果の概要(英文)：Aim of present study was to investigate exosome-derived microRNAs (miRNAs), which can be potential biomarkers to diagnosis aldosterone producing adenomas (APAs). We performed microarray in blood samples from patients with APAs and those with idiopathic hyperaldosteronism. Thirteen three miRNAs were up regulated and seven miRNAs were down regulated, respectively. We identified specific target genes by gene ontology analysis and pathway analysis.

研究分野：内分泌代謝

キーワード：副腎 高血圧 アルドステロン マイクロRNA ステロイド

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)は高血圧の中で約10%を占める、最も高頻度の二次性高血圧で、標的臓器障害を高率に発症することから、適切な診断と治療が必須である。治療方針決定の最大のポイントは、副腎摘出術で治癒する腺腫と薬物治療を継続する過形成の二つの病型を鑑別することで、その診断のゴールドスタンダードは副腎静脈サンプリングである。本検査はカテーテル検査により両側副腎静脈から血液を採取、アルドステロン値の左右の比較から病型・局在を決定する検査であるが、1) 侵襲的で患者の身体的・精神的負担が大である 2) 高度の技術が必要である 3) 実施可能施設が限定される 4) 検査実施・判定方法が標準化されていない 5) 医療費が高額であるなど様々な課題があり、頻度の高い高血圧の最終的な治療方針決定のための医療技術として、重大な懸案となっている。

申請者らは2014年から開始した副腎静脈サンプリングに関する多施設共同研究(WAVES-J研究)から、CT所見や生化学検査などによる病型予測法を発表してきたが、間接的所見であるため診断精度は不十分で、今後、成因・病態と直接的に関連した診断法の確立が喫緊の課題である。近年、鎖長の短い機能性の non-coding RNA である miRNA が血中に存在することが明らかにされ、miRNA プロファイルの解析から、疾患特異的な miRNA が血中バイオマーカーとして注目されている。特に、乳がんや消化器がんなど頻度の高い悪性腫瘍では、miRNA を用いた診断法の実用化が進められており、内分泌腫瘍でも海外では副腎がんと褐色細胞腫において、腫瘍由来の血中 miRNA の新たなバイオマーカーとしての可能性が注目されているが、PAでの取り組みはない。また、次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析によりアルドステロン産生腫瘍の病態解明が近年進んでおり腫瘍特異的な因子の同定が期待されているが、miRNA を対象とした診断法・病態解明についての研究は今まで行われていない。

このような背景から本研究により PA の治療方針決定に役立つ血中バイオマーカーを開発する事により、副腎静脈サンプリングの適応の適正化が可能となり、患者の QOL の向上に貢献すると共に、高血圧診療水準の質的向上と医療費軽減に貢献しうる。

2. 研究の目的

本研究は原発性アルドステロン症(PA)の病型診断バイオマーカーとなる血中 miRNA を探索、臨床的意義を確立する。研究期間内にステップワイズで以下の点を明らかにする。

(1) 網羅的解析による候補 miRNA の探索

次世代シーケンサーを用いた多検体同時 RNA シーケンスによる網羅的解析により候補 miRNA を探索する。

(2) 定量的評価による候補 miRNA の絞り込み

網羅的探索により得られた各候補 miRNA 量を定量化し、PA の二つの病型間(腺腫、過形成)での比較を行い、病型鑑別に最も有用な miRNA を絞り込む。

(3) PA コホートにおける診断精度の検証

前向き PA コホートを用いて候補 miRNA の診断精度を検証すると共に、各種検査データ(CT、生化学検査)による診断能との比較から臨床的意義を確立する。

3. 研究の方法

1) 対象患者

2015年1月以降、2017年12月までの間に京都医療センターあるいは共同研究施設を受診し、診断された原発性アルドステロン症(PA)の患者であり、本研究に同意した患者を対象とする。

性別は不問とし、受診時年齢が 20 歳以上 90 歳未満の者を対象とする。研究代表者または担当医師が不相当と判断した者は除外する。

2) 目標症例数

PA 約 10 例(腺腫 5 例、過形成 5 例):網羅的解析

PA 約 50 例(腺腫 25 例、過形成 25 例):選択的定量評価

PA 約 50 例 (腺腫 25 例、過形成 25 例):PA コホートをを用いた検証

3) 診療情報

診療録から、a. 基本情報、b. 一般検査所見(血算・生化学・尿一般など)、c. 内分泌検査所見、d. 画像検査所見、e. 治療内容と治療効果を収集する。診療情報は匿名化し、Excel 媒体で鍵のかかる場所に保存する。

4) 生体試料

血中 miRNA 解析のため、血液サンプル(血漿約 10cc)を収集する。

5) 解析方法 次世代シーケンサーを用いた多検体同時 RNA シーケンスを行う (GeneChipmiRNA4.0Array を用いた解析を外注で委託)。血中エクソソーム内 RNA の解読と定量を同時に解析処理する。 先ず、原発性アルドステロン症(腺腫例)の腫瘍側副腎静脈血と非腫瘍側副腎静脈血を対象として miRNA の網羅的解析を行い、両者で存在様式の異なる候補 miRNA を探索、次いで過形成例の末梢静脈血漿と副腎静脈血漿とを比較し、候補 miRNA を選択する。

【研究計画】

初年度に続き追加の血液検体の収集を継続する。初年度に得られた候補 miRNA を対象として定量的評価(約 50 例)を行い、miRNA の病型診断能を評価する。次いで得られた miRNA の診断精度を前向き PA コホート(約 50 例)を用いて検証する。

【研究方法】

1) 定量的評価による候補の絞り込み

TaqManTM miRNA assay キットを用いカスタムデザインされた市販のプライマー・プローブセットを用いた RealtimeRT-PCR により、網羅的探索により得られた、各候補 miRNA 量を定量化し、原発性アルドステロン症の異なる病型間の比較を行う。PA の病型診断における候補 miRNA の診断精度を、ROC 解析での AUC から評価し、各候補 miRNA の AUC を比較し最も有用な miRNA を明らかにする

2) PA コホートにおける診断精度の検証

前向き PA コホートから定量的評価により選択された miRNA の診断精度を生化学検査や CT 検査の病型診断についての AUC と比較し miRNA のバイオマーカーとしての有用性を検証する。次いで CT 検査、生化学検査と miRNA を組み合わせた PA 病型予測スコアを確立する。

4. 研究成果

APA10 例、副腎過形成 10 例を対象として、患者末梢血血漿サンプルより ExoRNeasy Plasma kit を用いてエクソソーム抽出を行い、miRNA アレイにより両群での発現変動差異のある miRNA を探索した。アレイ解析から、APA 群において発現低下が 13 種類、発現上昇が 7 種類の miRNA を同定した。マイクロアレイを用いた APA と副腎過形成で差異を示した、miRNA の標的遺伝子の探索および Pathway 解析を行った。候補標的遺伝子については、アルドステロン合成に関連し APA 組織での発現上昇の報告されている HSB3D2 やミネラルコルチコイド受容体をコードする NR3C2、副腎皮質腫瘍の成因である CTNNB1 遺伝子が変動のみられた miRNA の候補遺伝子として抽出された。Pathway 解析では細胞膜に関わる因子群で有意な変動がみられた。上記結果は APA の腫瘍特

性に合致した結果であると考えられた。副腎皮質腫瘍の疾患コホートを構築した上で、臨床検体の追加収集を行い、結果の検証研究を行なった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 Umakoshi Hironobu, Ogasawara Tatsuki, Takeda Yoshiyu et al.	4. 巻 88
2. 論文標題 Accuracy of adrenal computed tomography in predicting the unilateral subtype in young patients with hypokalaemia and elevation of aldosterone in primary aldosteronism	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Endocrinology	6. 最初と最後の頁 645 ~ 651
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） DOI: 10.1111/cen.13582	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 Umakoshi Hironobu, Tsuiki Mika, Yokomoto-Umakoshi Maki et al.	4. 巻 2
2. 論文標題 Correlation Between Lateralization Index of Adrenal Venous Sampling and Standardized Outcome in Primary Aldosteronism	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of the Endocrine Society	6. 最初と最後の頁 893 ~ 902
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1210/js.2018-00055	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 馬越洋宜	4. 巻 44
2. 論文標題 原発性アルドステロン症における 新規病型診断法の確立	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 245-246
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 馬越 洋宜, 立木 美香, 武田 仁勇, 栗原 勲, 和田 典男, 方波見 卓行, 曾根 正勝, 成瀬 光栄
2. 発表標題 原発性アルドステロン症の診断における新たなエビデンス 多施設共同研究による原発性アルドステロン症の副腎静脈サンプリングにおける新たなエビデンスの創出
3. 学会等名 第91回日本内分泌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 馬越 洋宜, 西本 紘嗣郎, 方波見 卓行, 柴田 洋孝, 和田 典男, 坂本 竜一, 小川 佳宏, 立木 美香, 成瀬 光栄,
2. 発表標題 原発性アルドステロン症におけるAPCCsの臨床的意義
3. 学会等名 第28回臨床内分泌代謝 Update
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 馬越 洋宜, 西本 紘嗣郎, 方波見 卓行, 柴田 洋孝, 和田 典男, 坂本 竜一, 山本 浩一, 曾根 正勝, 立木 美香, 成瀬 光栄
2. 発表標題 原発性アルドステロン症におけるAldosterone Producing Cell Clustersの意義
3. 学会等名 第41回日本高血圧学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 馬越 洋宜, 西本 紘嗣郎, 方波見 卓行, 柴田 洋孝, 和田 典男, 坂本 竜一, 小川 佳宏, 山本 浩一, 曾根 正勝, 立木 美香, 成瀬 光栄
2. 発表標題 原発性アルドステロン症におけるAldosterone Producing Cell Clustersの臨床的意義
3. 学会等名 第22回日本臨床内分泌病理学会学術総会
4. 発表年 2018年

〔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
---------------------------	-----------------------	----