

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17493

研究課題名（和文）代謝特性に着目したアルドステロン産生腺腫の病態解明と新規診断法の確立

研究課題名（英文）Elucidation of the pathogenesis of aldosterone producing adenomas focusing on metabolic characteristics and establishment of a new diagnostic method

研究代表者

馬越 洋宜 (Umakoshi, Hironobu)

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の代謝特性に着目し、血液のメタボローム解析と組織の統合オミクス解析を用いて多様性の成因となる病態の解明および臨床的意義を明らかにすることを目的とした。免疫組織染色、RNA-seq解析、メタボローム解析、イメージング質量顕微鏡解析により腫瘍内において不均一なステロイド合成が確認され、代謝特性における機能的不均一性が示唆された。機械学習を用いたアルドステロン産生腺腫の診断予測モデルの確立を行い、ついで説明モデルを構築し、アルドステロン産生腺腫患者の術後予後の可視化を行なった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルドステロン産生腺腫における代謝特性の多様性に関する病態解明がなされておらず、臨床的意義も十分に確立していないため、医学応用が進んでいなかった。そのため、本研究で行なったメタボローム解析と腫瘍組織の統合解析からアルドステロン産生腺腫の成因解明の進歩が得られた。さらに、機械学習に基づく診断モデルの構築により臨床医学応用への基盤となる成果が得られた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on the metabolic characteristics of aldosterone producing adenomas and aimed to elucidate the pathogenesis underlying the diversity and its clinical significance using metabolomic analysis of blood and integrated omics analysis of tissue. Immunohistochemistry, RNA-seq, metabolomics, and imaging mass microscopy analysis confirmed heterogeneous steroid synthesis within the tumor, suggesting functional heterogeneity in metabolic properties. We established a predictive model for aldosterone producing adenoma diagnosis using machine learning, and then built an explanatory model to visualize the postoperative prognosis of patients with aldosterone producing adenomas.

研究分野：内分泌代謝

キーワード：アルドステロン 原発性アルドステロン症 副腎 高血圧 シングルセル解析 RNA-seq 次世代シーケンサー メタボローム解析

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アルドステロン産生腺腫(Aldosterone producing adenoma: APA)はアルドステロンの過剰に伴う高血圧を主徴とする副腎腫瘍であり、高血圧の約5%を占める原発性アルドステロン症の成因のうちの1つである。APAは他の成因である副腎過形成とは重症度および治療法(APA:手術 副腎過形成:薬物)が大きく異なり、手術により根治が可能であるため適切な診断、治療が必須である。近年、次世代シーケンサーを用いた解析によりイオンチャネルに関わる複数の体細胞遺伝子変異が同定されAPAにおける成因の多様性が示された。従来、APAはアルドステロンのみを産生する均一な腫瘍であると考えられてきたが、申請者の研究室では最近、RNA-seq解析によりAPAの一部にコルチゾール生合成の主要な代謝酵素の発現を見出した。さらに申請者は免疫組織染色を用いて、APAにおけるホルモン産生の不均一性を示し、APAは多様な代謝特性を有することを明らかにした。

APAはカテーテル検査である副腎静脈サンプリングに基づいて診断されるが、検査の侵襲性と医療コストの観点から、簡便な診断法の確立が望まれている。申請者は生化学検査(血清カリウム値・血漿アルドステロン濃度)・画像検査によるAPA診断方法を報告したが(*J Clin Endocrinol Metab.* 103:900-908, 2018, *Clin Endocrinol (Oxf).* 88:645-65, 2018)、いずれもAPAに特異的な診断法ではないため従来の副腎静脈サンプリングの代替となる診断精度は得られておらず、新たな技術を用いた診断法の確立が期待されている。

2. 研究の目的

本研究では、液体クロマトグラフィータンデム質量分析法(LC/MS/MS)を用いたメタボローム解析によりAPAの代謝産物の多様性を明らかにし、次世代シーケンサーによる腫瘍検体の統合オミクス解析によって多様性をきたす分子機構の病態を解明する。ついで、医学応用として機械学習を用いて、APAを代謝特性に基づき新たに分類し、応募者が報告してきた従来の検査所見も統合することにより、代謝特性に着目したAPAの新規診断法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

研究目的の達成のために、臨床検体を用いた網羅的解析に関する研究と機械学習を用いた統合解析に関する研究を行う。

APAのトランスクリプトーム解析とメタボローム解析により遺伝子発現と代謝産物の関連を検討する。次世代シーケンシングによるターゲット解析により、既知のAPA関連体細胞遺伝子変異を同定する。ターゲットシーケンスで既知の体細胞遺伝子変異が確認されない場合は、エクソーム解析により未知の体細胞遺伝子変異の同定を試みる。特に特徴的な代謝特性を示すAPAでは通常の腫瘍間解析に加えて同一腫瘍内での解析も行う。以上の統合オミクス解析によりAPAの代謝特性の多様性の病態を解明する

「教師なし機械学習(unsupervised learning)」によるクラスター解析により、メタボローム解析、統合オミクス解析の結果に基づきAPAの新しい概念を踏まえて再分類を試みる。同時に「教師あり機械学習(supervised learning)」により網羅的解析により得られる情報と臨床情報を統合し、APAの新規診断法を確立する。

4. 研究成果

APAの腫瘍組織を対象として、免疫組織染色、液体クロマトグラフィー質量分析法(LC/MS/MS法)を用いたメタボローム解析、トランスクリプトーム解析、イメージング質量顕微鏡によるオミクス解析を実施した。APA、コルチゾール産生腺腫(CPA)、非副腎皮質腫瘍を対象として、LC/MS/MSを用いて組織中のアルドステロン、コルチゾールの定量を行なった。アルドステロンについては、APAにおいてのみ有意な上昇がみられたが、コルチゾールにおいては、興味深いことに一部のAPAではコルチゾール産生腫瘍と同程度のコルチゾール過剰分泌がみられた。次にAPAにおける、腫瘍内コルチゾール生合成の局在を評価する目的で、イメージング質量顕微鏡を用いた解析を行なったところ、コルチゾール合成が腫瘍内で不均一に行われることを細胞集団のレベルで同定した。細胞レベルでの評価のため、蛍光免疫組織染色を追加したところ一部のAPAにおいてアルドステロン産生細胞とコルチゾール産生細胞が排他的に存在することが示唆された。RNA-seq解析ではAPAにおいてコルチゾール合成に関連する遺伝子群の発現が確認され、教師なし学習ではAPAとCPAでは異なるステロイド代謝特性を示した(*Front Endocrinol (Lausanne).* 3:13:80833, 2022)。ゲノム解析については、副腎皮質腫瘍に関連する約30遺伝子を網羅的に評価可能な疾患遺伝子パネルを構築し、ターゲットシーケンスを行なった。既存の変異が確認されないAPAについては現在追加解析を進めている。

ついで、APAの代謝特性を解明するためヒト副腎組織のシングルセルRNA-seq解析を行なった。教師なし学習であるクラスタリング解析を用いて、副腎皮質3層の構成細胞において3層特異的な遺伝子群を同定した。さらに、APAの前駆病変であるAldosterone producing cellに相当する細胞集団ではアルドステロン合成酵素(CYP11B2)やMC2R(ACTH受容体)の発現増加を

見出した。

APA の新規診断法を構築する目的で「教師あり学習」であるランダムフォレスト法を用いた診断予測モデルの構築を行なった。日常臨床で使用可能な特徴量を用いたモデルの作成を行い、最終的にナトリウム、カリウム、アルドステロンの 3 種類のみで従来の診断モデルと同等以上の精度を達成した (**Sci. Rep.** 11: e9140, 2021)。ついで、従来ブラックボックスとされていた機械学習において、説明可能な AI (XAI) の解釈手法を用いることで APA の術後予後予測モデルの可視化を行なった (**Sci Rep.** 12:5781, 2022)。メタボローム解析については、網羅性を高めるために実験系の改良を重ね、中間代謝産物も含め約 70 種類の代謝産物を測定可能な実験系であるステロイドミクス解析を確立した。ステロイドミクスと機械学習を用いた予測モデルの構築を現在進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Yokomoto-Umakoshi Maki, Umakoshi Hironobu, Miyazawa Takashi, Ogata Masatoshi, Sakamoto Ryuichi, Ogawa Yoshihiro	4. 巻 143
2. 論文標題 Investigating the causal effect of fibroblast growth factor 23 on osteoporosis and cardiometabolic disorders: A Mendelian randomization study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 115777 ~ 115777
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2020.115777	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 Fukumoto Tazuru, Umakoshi Hironobu, Ogata Masatoshi, Yokomoto-Umakoshi Maki, Matsuda Yayoi, Motoya Misato, Nagata Hiromi, Nakano Yui, Iwahashi Norifusa, Kaneko Hiroki, Wada Norio, Miyazawa Takashi, Sakamoto Ryuichi, Ogawa Yoshihiro	4. 巻 106
2. 論文標題 Significance of Discordant Results Between Confirmatory Tests in Diagnosis of Primary Aldosteronism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism	6. 最初と最後の頁 e866 ~ e874
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/clinem/dgaa812	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 Ogata Masatoshi, Umakoshi Hironobu, Fukumoto Tazuru, Matsuda Yayoi, Yokomoto Umakoshi Maki, Nagata Hiromi, Wada Norio, Miyazawa Takashi, Sakamoto Ryuichi, Ogawa Yoshihiro, the Q AND A Study Group	4. 巻 94
2. 論文標題 Significance of aldosterone gradient within left adrenal vein in diagnosing unilateral subtype of primary aldosteronism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Endocrinology	6. 最初と最後の頁 24 ~ 33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cen.14320	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 Yokomoto-Umakoshi Maki, Umakoshi Hironobu, Sakamoto Ryuichi, Fukumoto Tazuru, Ogata Masatoshi, Nakano Yui, Iwahashi Norifusa, Kaneko Hiroki, Mizoguchi Noriko, Hattori Akiko, Miyazawa Takashi, Matsuda Yayoi, Kawate Hisaya, Ogawa Yoshihiro	4. 巻 142
2. 論文標題 Role of deteriorated bone quality in the development of osteoporosis in pheochromocytoma and paraganglioma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 115607 ~ 115607
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2020.115607	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 Yokomoto-Umakoshi M., Umakoshi H., Ogata M., Fukumoto T., Matsuda Y., Miyazawa T., Sakamoto R., Ogawa Y.	4. 巻 31
2. 論文標題 Coexistence of osteoporosis and atherosclerosis in pheochromocytoma: new insights into its long-term management	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Osteoporosis International	6. 最初と最後の頁 2151 ~ 2160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00198-020-05527-5	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 Yokomoto-Umakoshi Maki, Umakoshi Hironobu, Fukumoto Tazuru, Matsuda Yayoi, Nagata Hiromi, Ogata Masatoshi, Kawate Hisaya, Miyazawa Takashi, Sakamoto Ryuichi, Ogawa Yoshihiro	4. 巻 133
2. 論文標題 Pheochromocytoma and paraganglioma: An emerging cause of secondary osteoporosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 115221 ~ 115221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2020.115221	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 Yokomoto Umakoshi Maki, Sakamoto Ryuichi, Umakoshi Hironobu, Matsuda Yayoi, Nagata Hiromi, Fukumoto Tazuru, Ogata Masatoshi, Ogawa Yoshihiro, the Q AND A study group	4. 巻 92
2. 論文標題 Unilateral primary aldosteronism as an independent risk factor for vertebral fracture	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Endocrinology	6. 最初と最後の頁 206 ~ 213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cen.14145	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 Kaneko Hiroki, Umakoshi Hironobu, Ogata Masatoshi, Wada Norio, Iwahashi Norifusa, Fukumoto Tazuru, Yokomoto-Umakoshi Maki, Nakano Yui, Matsuda Yayoi, Miyazawa Takashi, Sakamoto Ryuichi, Ogawa Yoshihiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Machine Learning-Based Models for Prediction of Subtype Diagnosis of Primary 1 Aldosteronism Using Blood Test	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-88712-8	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 Nishimoto Koshiro, JRAS Study Group, Umakoshi Hironobu, Seki Tsugio, Yasuda Masanori, Araki Ryuichiro, Otsuki Michio, Katabami Takuyuki, Shibata Hirotaka, Ogawa Yoshihiro, Wada Norio, Sone Masakatsu, Okamura Shintaro, Izawa Shoichiro, Miyauchi Shozo, Yoshimoto Takanobu, Tsuiki Mika, Naruse Mitsuhide	4. 巻 -
2. 論文標題 Diverse pathological lesions of primary aldosteronism and their clinical significance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hypertension Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41440-020-00579-w	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 Kaneko Hiroki, Umakoshi Hironobu, Ishihara Yuki, Nanba Kazutaka, Tsuiki Mika, Kusakabe Toru, Satoh-Asahara Noriko, Yasoda Akihiro, Tagami Tetsuya	4. 巻 4
2. 論文標題 Reassessment of Urinary Aldosterone Measurement After Saline Infusion in Primary Aldosteronism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the Endocrine Society	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/jendso/bvaa100	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 Yokomoto-Umakoshi Maki, Umakoshi Hironobu, Iwashashi Norifusa, Matsuda Yayoi, Kaneko Hiroki, Ogata Masatoshi, Fukumoto Tazuru, Terada Eriko, Nakano Yui, Sakamoto Ryuichi, Ogawa Yoshihiro	4. 巻 106
2. 論文標題 Protective Role of DHEAS in Age-related Changes in Bone Mass and Fracture Risk	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism	6. 最初と最後の頁 e4580 ~ e4592
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/clinem/dgab459	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 -

1. 著者名 Ishihara Yuki, Umakoshi Hironobu, Kaneko Hiroki, Nanba Kazutaka, Tsuiki Mika, Kusakabe Toru, Satoh-Asahara Noriko, Yasoda Akihiro, Tagami Tetsuya	4. 巻 69
2. 論文標題 Prediction of long-term biochemical cure in patients with unilateral primary hyperaldosteronism treated surgically based on the early post-operative plasma aldosterone value	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 407 ~ 415
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1507/endocrj.EJ21-0430	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 -

1. 著者名 Katsuhara Shunsuke, Yokomoto-Umakoshi Maki, Umakoshi Hironobu, Matsuda Yayoi, Iwahashi Norifusa, Kaneko Hiroki, Ogata Masatoshi, Fukumoto Tazuru, Terada Eriko, Sakamoto Ryuichi, Ogawa Yoshihiro	4. 巻 107
2. 論文標題 Impact of Cortisol on Reduction in Muscle Strength and Mass: A Mendelian Randomization Study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism	6. 最初と最後の頁 e1477 ~ e1487
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/clinem/dgab862	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 -

1. 著者名 Iwahashi Norifusa, Umakoshi Hironobu, Ogata Masatoshi, Fukumoto Tazuru, Kaneko Hiroki, Terada Eriko, Katsuhara Shunsuke, Uchida Naohiro, Sasaki Katsuhiko, Yokomoto-Umakoshi Maki, Matsuda Yayoi, Sakamoto Ryuichi, Ogawa Yoshihiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Whole Transcriptome Profiling of Adrenocortical Tumors Using Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Samples	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fendo.2022.808331	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 -

1. 著者名 Kaneko Hiroki, Umakoshi Hironobu, Ogata Masatoshi, Wada Norio, Ichijo Takamasa, Sakamoto Shohei, Watanabe Tetsuhiro, Ishihara Yuki, Tagami Tetsuya, Iwahashi Norifusa, Fukumoto Tazuru, Terada Eriko, Katsuhara Shunsuke, Yokomoto-Umakoshi Maki, Matsuda Yayoi, Sakamoto Ryuichi, Ogawa Yoshihiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Machine learning-based models for predicting clinical outcomes after surgery in unilateral primary aldosteronism	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-09706-8	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0件

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------