

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17527

研究課題名（和文）コルチゾール産生腺腫の分子基盤の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular basis of cortisol-producing adenomas

研究代表者

樋口 誠一郎 (HIGUCHI, Seiichiro)

千葉大学・大学院医学研究院・特任助教

研究者番号：80802587

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）：cortisol-producing adenomas(CPA)というホルモン分泌腫瘍がどのように形成されるのか、そのメカニズムについては十分にわかっていない。本研究は、ヒト副腎皮質腫瘍組織を対象に、シングルセル解析による単一細胞レベルでの遺伝子変異/発現解析を行うことで、CPA腫瘍形成の分子病態およびジェノタイプ-フェノタイプ多様性の分子基盤を明らかにすることである。そのために臨床内分泌学的機能検査を含めた患者情報と組み合わせることで、CPAの細胞-組織(病理)-臨床データの統合的解析を推進する。この研究成果は、個別化医療を旨とした次世代型のCPAの診断分類構築の基盤となることが期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義として、希少疾患である副腎皮質系腫瘍の分子病態やCPA腫瘍形成の分子病態の解明が進み、特に、副腎の発生源と体細胞変異導入-腫瘍形成の関連を明らかにする意義がある。ヒト副腎組織を対象とするシングルセル解析はほとんどなされておらず、公共データベースとして学術的意義を持つ。特に、CPA腫瘍について腫瘍内組織レベル、単一細胞レベルの遺伝子変異/発現解析結果と、機能検査を含めた患者情報と結合されている臨床-基礎医学の統合的データベースは、多くの臨床医および医学研究者にとって有用となる。また、この研究成果は、個別化医療を目的とした次世代型のCPAの診断分類構築の礎にもなりえる。

研究成果の概要（英文）：The mechanisms underlying the formation of hormone-secreting tumors called cortisol-producing adenomas (CPAs) are poorly understood. This study aims to elucidate the molecular pathogenesis of CPA tumorigenesis and its molecular basis of genotype-phenotype diversity by single cell analysis of gene mutation/expression at the single cell level in human adrenocortical tumor tissue. To this, we will promote integrated analysis of cellular, histological, and clinical data of CPA by combining it with patient information, including clinical endocrinological function tests. The results of this research are expected to serve as a basis for the construction of next-generation diagnostic classification of CPA for personalized medicine.

研究分野：内分泌学

キーワード：副腎腫瘍 コルチゾール産生腺腫 遺伝子変異 クッシング症候群

## 1. 研究開始当初の背景

副腎腫瘍は、本法では健診で行われる CT などの画像検査機会が多い理由から、偶発的に発見され、日常診療での診断数が多いのが現状である。機能性副腎腫瘍の中ではコルチゾール産生腺腫 (Cortisol Producing Adenoma: CPA) が最も頻度が高く、表現型としては顕性クッシング症候群 (CS) と潜在性クッシング症候群 (SCS) に分類される。SCS から CS に移行することは比較的稀であり、6.6%(5年)程度と限定的であることが知られており、異なった疾患病態背景の存在が示唆されていたがそのメカニズムは不明であった。一方で、近年の NGS 解析の進歩により CPA の遺伝子変異が明らかにされてきた。具体的には、cAMP/PKA 経路の Protein kinase A の catalytic subunit (PRKACA) 遺伝子体細胞変異が CS の 52.3% に認められ、PRKACA 変異症例ではコルチゾール自律分泌が多いと報告がなされた。さらに、PRKACA 変異陰性 SCS の約半数で Wnt 経路の CTNNB1 遺伝子体細胞変異を 54% で認めるとの報告もなされている。そこで、研究代表者らはこれまでに約 130 例の CPA 臨床検体を用いて NGS 解析 (Whole Exome/Genome Seq (WES/WGS)、Targeted Capture seq (TCS)、RNA-seq、SNP array) と表現型解析 (臨床データ、病理学的解析) の統合解析を試行してきた。その結果、新規変異やゲノム構造異常も含めると、CPA は遺伝学的に PKA 変異群、GNAS 変異群、Wnt 変異群の 3 つの genetic subtype に排他的にカテゴライズされ、他の遺伝子変異は非常に希少であった。さらに、遺伝子発現及び臨床表現型も PKA 群と Wnt 群が大きく異なり、GNAS 群がそれらの中間のプロファイルに有意に分類されることがわかった。すなわち、CPA 形成には 3 群いずれかの変異が強く関与し、腫瘍形成の driver となっていること、同様な病態を来す CPA でも、3 群のいずれかに分類されることが明らかとなった。しかしながら、なぜ明確に排他的に分類されるのか、特に driver 変異からどのように CPA というホルモン分泌腫瘍が形成されるのか (腫瘍化のメカニズム) については十分にわかっていない。特に、既存の bulk 検体を用いた研究手法には限界があり、体細胞変異や CNV (copy number variation) などのジェノタイプだけでは、フェノタイプ多様性を説明できず、いまだ分子病態の全容は解明されていない。その大きな理由の 1 つに、腫瘍の内部構成は非常に heterogeneity に富み、腫瘍細胞だけでなく線維芽細胞、免疫細胞、血管内皮細胞など多くの間質組織かが含まれている点が挙げられる。つまり、これらをまとめてすり潰した平均化した情報だけでは、腫瘍の多様性がもたらす疾患病態の本質に近づくには限界があるという点であった。この問題を解決する手法のひとつとして、シングルセル解析が急速に発達してきた背景の中で、シングルセル解析との統合解析を通して副腎皮質腫瘍の新たな病態解明を行なった。

## 2. 研究の目的

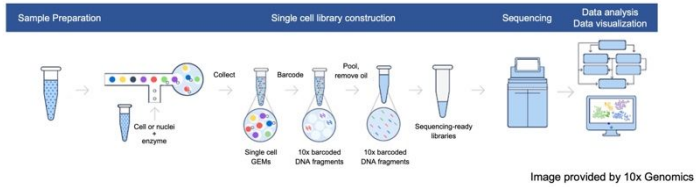
本研究の目的は、ヒト副腎皮質腫瘍組織を対象に、シングルセル解析による単一細胞レベルでの遺伝子変異/発現解析を行うことで、CPA 腫瘍形成の分子病態およびジェノタイプ-フェノタイプ多様性の分子基盤を明らかにすることである。そのために、機能検査を含めた患者情報と結合することで、CPA の細胞-組織(病理)-臨床データの統合的解析を推進する。この研究成果により、個別化医療を目的とした次世代型の CPA の診断分類構築の基盤となることを期待できる。

### 3. 研究の方法

2020年10月から2021年3月に当院泌尿器科で副腎腫瘍摘出術を施行され、病学的にコルチゾール産生腺腫(CPA)と診断されたクッシング症候群(CS)2例、サブクリニカルクッシング症候群5例(SCS)、原発性アルドステロン症(APA)5例を対象とした。

今回用いたシングルセル RNA sequence の手法の手順を図1に示す。10x Genomics が推奨するプロトコルに基づき、手術で摘出された副腎腫瘍、及びその付着

図1：シングルセル解析手順



正常部から別々にシングルセルを digestion した。死細胞を除去し、1検体あたり約20,000個の細胞集団を得る。その後、標識のための Barcode beads がついたゲルビーズを加えてエマルジョンを作成し、逆転写により cDNA を作成、RNA sequence を行った。数千個～数万個におよぶ細胞集団から、1細胞あたり数千～数万の遺伝子 profile を得ることができ、それらの情報に対して Seurat2 を用いて解析した。

### 4. 研究成果

図2に示すように、12症例で腫瘍部15万7,619個、付着正常部17万4,134個の細胞のRNA sequence を行うことができた。その遺伝子発現情報をもとに、23の細胞クラスターが同定された(図3)。また病理診断、腫瘍部・正常部ごとに見てみると、病理組織診断ごとに、クラスター分布パターンがかなり異なることが判明した。

図2. 解析対象とscRNAseqにおける有効細胞数

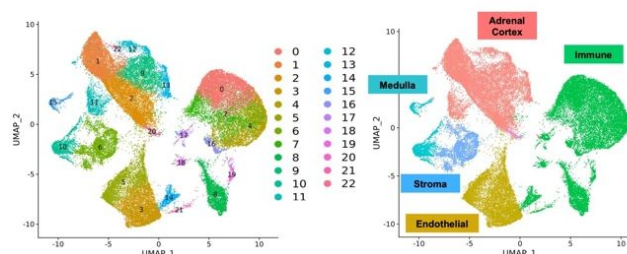
病理診断	Age	Sex	Urinary cortisol (µg/dl)	1mg DST (µg/mL)	ARR (PAC/PRA)	腫瘍径 (mm)	single cell解析 有効細胞数	
							腫瘍部	付着正常部
CS	60	F	66.5	3.3	15.1	41	28582	20478
	20	F	108	16.2	674	25	415	23003
	63	M	34.1	6.7	1840	40	17659	23200 / 2526
SCS	53	F	76.8	3.1	306.5	23	12117	
	57	M	72.8	2.3	356.7	55	11676	10684
	70	M	82.8	2.3	134	37	14786	11329
	53	F	67.6	13.7	58.5	42	11469	4447
APA	38	F	no data	0.4	2100	26	1404	1921
	71	M	49	1.49	2285	11	691	1277
	26	F	52.1	0.7	3700	19	2879	4195 / 4325
	55	F	52.2	2.0	2850	17	40513	39832 / 28725
	38	M	43.6	no data	2015	30	15428	26917
						計	157619	174134

そこで、次に各クラスターのアノテーションを行った。分類された23のクラスターがどのような細胞集団であるのかについて、細胞マーカーを用いて特定した。具体的には、ID3 や FOXD3 の陽性細胞が副腎髄質、COL1A1 や

PDGFRA 陽性細胞が間質系の細胞、CD45 としてよく知られたタンパク質をコードする PTPRC 陽性が免疫細胞、PECAM1 や KDR 陽性が血管内皮であると同定した。そして、これらの細胞を除去することで残りのクラスターが NR5A1、STAR 陽性であり、副腎皮質系の細胞と特定することができた。また、腫瘍部における各細胞集団の割合を見てみると、腫瘍部であっても腫瘍コンテンツは35%程度にとどまることが分かった。つまり、腫瘍を構成する細胞は、多種多様な非腫瘍細胞も含めて組織を構築していることが確認できた。

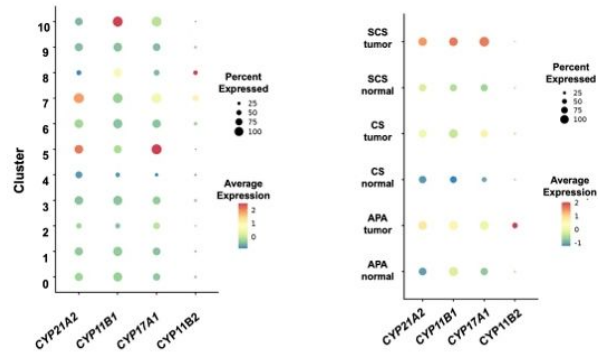
次に、副腎皮質細胞と同定された細胞群を対象に、サブクラスター解析を行った。その結果、11のサブクラスターに分類することができた。病理診断分類ごとに、正常部・腫瘍部に分けて各サブクラスターに占める割合を比較した。すると、副腎皮質系のサブクラスター5、10はSCS腫瘍部が多くを占めるのに対し、副腎皮質系のサブクラスター7、8はAPA腫瘍部が多く、病理診断ごとに遺伝子発現パターン

図3. scRNAseqのクラスター分類と特定



ンが異なることが分かった。そこで、これらの副腎皮質系サブクラスターにおける機能的違いを明らかにするために、ステロイド生合成に関わる遺伝子発現の違いを検討した。ステロイド生合成に重要な CYP21A2、CYP17A1、CYP11B1、CYP11B2 に関して、副腎皮質細胞におけるサブクラスターごと、および病理診断ごとの発現の違いについて検討した(図 4)。先ほどのサブクラスター解析で SCS 腫瘍部が多くを占めていたサブクラスター5、10 ではコルチゾール産生のキーマンである CYP17A1 の発現が高く、病理分類ごとに見ても、SCS 腫瘍部でステロイド合成関連遺伝子の発現が高かった。一方、アルドステロン産生に重要な CYP11B2 の発現に関しては、APA 腫瘍部が大部分を占めていたサブクラスター7、8、および APA 腫瘍部で発現が多いことが示された。

図4. ステロイド生合成に関わる遺伝子発現



これまでにコルチゾール産生腫瘍に関する知見として、PRKACA、Wnt、GNAS 変異などがコルチゾール産生能や腫瘍サイズなどの臨床フェノタイプに関連することが明らかにされていたが、その詳細な分子生物学的機序は解明されていない。今回、CS、SCS の特性を知るために、APA 症例を比較対照としてシングルセル解析を行い、その臨床表現系との統合解析を実施した。病理分類、正常部・腫瘍部に関わらず、今回用いたすべての摘出副腎検体から得られた細胞をクラスター分類すると 23 のクラスターに分類することができた。ここから細胞マーカーを指標に、間質、髄質、血管内皮、免疫細胞を同定し、これらを除去することで、副腎皮質系細胞のみを抽出することができた。さらに、副腎皮質系細胞のみに着目したサブクラスター解析では、サブクラスターごとの特性として、SCS 腫瘍細胞が多くを占めるもの、APA 腫瘍部が多くを占めるものなどが存在し、CYP11B1 や CYP17A1 の発現パターンも異なることを示すことができた。しかしながら、今回の検討の実験的限界や問題点も明らかになった。例えば、検討に用いた症例は 15 例しかなく、なかでも CS 症例がわずか 2 例と少ないことから、患者自身の特性や実験の batch effect を完全に区別することができなかった。また、CS の 1 症例では図 1 に示したように腫瘍部の有効細胞数が非常に少ない。この原因は不明であるが、エマルジョン形成不全によるものと考えている。今回の検討では腫瘍細胞の遺伝子発現パターンに関する CS/SCS と APA の比較検討のみにとどまっており、CS/SCS での転写因子解析や cell-cell interaction 解析は行っていない。また、遺伝子発現パターンと年齢、性別、ステロイド合成能などの臨床情報との関連検討も今後実施して、データとエビデンスを積み重ねていく必要があると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 藤井 陽一, 樋口 誠一郎, 佐藤 悠佑, 白石 友一, 宮野 悟, 久米 春喜, 市川 智彦, 岩間 厚志, 田中 知明, 小川 誠司	4. 巻 -
2. 論文標題 コルチゾール産生腺種におけるCTNNB1の新規構造異常と分子分類(Novel structural variants in CTNNB1 and molecular classification cortisol-producing adenoma)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本癌学会総会記事81回	6. 最初と最後の頁 E-3031
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 -
1. 著者名 河野 聡美, 藤本 真徳, 河野 貴史, 樋口 誠一郎, 橋本 直子, 佐久間 一基, 永野 秀和, 田中 知明	4. 巻 98
2. 論文標題 シングルセル解析から捉えた副腎性クッシング症候群の分子病態	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本内分泌学会雑誌 98(Suppl.Update)	6. 最初と最後の頁 42-45
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 -
1. 著者名 橋本 直子, 河野 聡美, 河野 貴史, 樋口 誠一郎, 佐久間 一基, 永野 秀和, 島津 章, 田中 知明	4. 巻 98
2. 論文標題 クッシング症候群3例におけるオシロドロスタットの有用性の検討	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本内分泌学会雑誌 98(Suppl.Update)	6. 最初と最後の頁 59-61
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 -
1. 著者名 中山 哲俊, 横山 真隆, 永野 秀和, 山形 一行, 橋本 直子, 村田 和貴, 樋口 誠一郎, 清野 透, 田中 知明	4. 巻 98
2. 論文標題 Single Cell RNA-seq解析を用いた変異p53"Gain of Function"によるメバロン酸合成経路を介したがん悪性化機構の解明	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本内分泌学会雑誌	6. 最初と最後の頁 295-295
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 -

1. 著者名 Deguchi-Horiuchi H, Koide H, Sakuma I, Gao Y, Higuchi S, Nagano H, Hashimoto N, Horiguchi, K, Iwadate Y, Inoshita N, Yokote K, Tanaka. T.	4. 巻 68
2. 論文標題 Two cases of symptomatic secondary hypophysitis due to Rathke 's cleft cysts treated with glucocorticoids: long-term follow-up	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Endocrine Journal,	6. 最初と最後の頁 269-279
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1507/endoerj.EJ20-0361	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 Nagano H, Kono T, Saiga A, Kubota Y, Fujimoto M, Felizola S, Ishiwata K, Tamura A, Higuchi S, Sakuma I, Suzuki S, Koide H, Takeshita N, Sakamoto S, Yokote K, Nakamura Y, Ichikawa T, Uno Takashi, and Tanaka.	4. 巻 105
2. 論文標題 Aldosterone Reduction Rate After Saline Infusion Test May Be A Novel Prediction In Patients With Primary Aldosteronism.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Clin Endocrinol Metab	6. 最初と最後の頁 e319-e327
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/clinem/dgz092.	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 Yoshida T, Nakayama A, Tamura A, Higuchi S, Sakuma I, Nagano H, Saulo J.A. Felizola, Takemoto M, Tatsuno I, Koide H, Yokote K, Tanaka T.	4. 巻 105
2. 論文標題 A case of Hashimoto 's thyroiditis with multiple drug resistance and high expression of efflux transporters.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Clin Endocrinol Metab	6. 最初と最後の頁 dgz073
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/clinem/dgz073	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 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 中山 哲俊, 横山 真隆, 永野 秀和, 山形 一行, 橋本 直子, 村田 和貴, 樋口 誠一郎, 清野 透, 田中 知明
2. 発表標題 Single Cell RNA-seq解析を用いた変異p53"Gain of Function"によるメバロン酸合成経路を介したがん悪性化機構の解明
3. 学会等名 第95回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤井 陽一, 樋口 誠一郎, 佐藤 悠佑, 白石 友一, 宮野 悟, 久米 春喜, 市川 智彦, 岩間 厚志, 田中 知明, 小川 誠司
2. 発表標題 コルチゾール産生腺種におけるCTNNB1の新規構造異常と分子分類(Novel structural variants in CTNNB1 and molecular classification cortisol-producing adenoma)
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤井陽一, 樋口誠一郎, 佐藤悠佑, 白石友一, 坂本信一, 川合剛人, 牧島秀樹, 宮野悟, 久米春喜, 市川智彦, 田中知明, 小川誠司
2. 発表標題 コルチゾール産生腺腫におけるCTNNB1の新規構造異常と変異に基づく分子分類
3. 学会等名 第109回 日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河野聡美, 村田和貴, 藤本真徳, 中山哲俊, 樋口誠一郎, 橋本直子, 佐久間一基, 永野秀和, 田中知明
2. 発表標題 シングルセル解析から捉えた副腎性クッシング症候群の分子病態
3. 学会等名 第31回臨床内分泌代謝Update
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橋本直子, 河野聡美, 河野貴史, 樋口誠一郎, 佐久間一基, 永野秀和, 田中知明
2. 発表標題 クッシング症候群5例におけるオシドロスタットの有用性の検討
3. 学会等名 第31回臨床内分泌代謝Update
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 樋口誠一郎, 吉井聡美, 高 躍, 姚 躍, 永野秀和, 橋本直子, 中山哲俊, 西村 基, 山形一行, 横山真隆, 柴田貴久, 伴 俊明, 藤井陽一, 小川誠司, 田中知明
2. 発表標題 genetic subtypingに基づくコルチゾール産生腺腫の遺伝子発現・病理所見の包括的解析
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中山哲俊, 横山真隆, 永野秀和, 樋口誠一郎, 橋本直子, 山形一行, 村田和貴, 清野 透, 田中知明
2. 発表標題 3次元培養を用いた変異p53のSREBP依存的コレステロール合成経路を介した乳がん悪性化形質に対する作用機構
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高 躍, 村田和貴, 堀口健太郎, 永野秀和, 橋本直子, 中山哲俊, 樋口誠一郎, 山形一行, 横山真隆, 岩立康男, 田中知明
2. 発表標題 Multi-Omicsから見た機能性下垂体腺腫の転写ネットワークの役割
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橋本直子, 藤本真徳, 樋口誠一郎, 永野秀和, 小出尚史, 横手幸太郎, 田中知明
2. 発表標題 褐色細胞腫に合併した糖代謝異常の病態解析
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 樋口 誠一郎, 高 躍, 姚 躍, 大和 梓, 橋本 直子, 永野 秀和, 中山 哲俊, 西村 基, 山形 一行, 横山 真隆, 藤井 陽一, 小川 誠司, 田中 知明
2. 発表標題 コルチゾール産生腺腫における新規PRKACA変異同定と機能解析
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高 躍, 永野 秀和, 堀口 健太郎, 橋本 直子, 中山 哲俊, 樋口 誠一郎, 山形 一行, 横山 真隆, 岩立 康男, 田中 知明
2. 発表標題 マルチオミクス解析から捉える下垂体腺腫の特徴
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 橋本 直子, 大和 梓, 樋口 誠一郎, 永野 秀和, 小出 尚史, 柴田 貴久, 伴 俊明, 内田 大学, 横手 幸太郎, 田中 知明
2. 発表標題 実地臨床における2型糖尿病患者に対するルセオグリフロジンの効果の検討
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020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

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
---------	---------