

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21604

研究課題名(和文) 内分泌腫瘍の機能性・非機能性とは何か？

研究課題名(英文) What is the functionality and nonfunctionality of endocrine tumors?

研究代表者

小川 佳宏(Ogawa, Yoshihiro)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：70291424

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アルドステロン産生腫瘍(APA)、コルチゾール産生腫瘍(CPA)あるいは非機能性副腎皮質腫瘍と診断された症例を対象としてオミクス解析を実施した。組織中のステロイドミクス解析により、APAではCPAと比較すると低値ではあるが対照群と比較して有意なコルチゾールの上昇が認められた。ゲノム解析により、CPAではコルチゾール生合成の重要な経路であるPKAの活性化に関連する遺伝子群の体細胞変異が検出されたが、APAでは検出されず、異なる機序によるコルチゾール生合成機構が示唆された。機械学習を用いたクラスタリング解析により、副腎皮質腫瘍はステロイドミクスに基づいて複数のクラスターに分類された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果から、従来の判定基準による非機能性副腎皮質腫瘍が「脱・非機能性(=機能性化)」され、機械学習による臨床検体の網羅的解析と臨床情報の統合により、新たな副腎腫瘍学の創成されると思われる。機能性あるいは非機能性副腎皮質腫瘍のホルモン産生能と腫瘍内の細胞レベルの不均一性に関する解析により、「内分泌腫瘍の機能性・非機能性とは何か？」という根本的な問題を見直すことができ、内分泌腫瘍の機能性腫瘍の再分類・再定義につながる事が期待される。本研究の波及効果として、ホルモン産生能の有無が問われる他の内分泌腫瘍の機能性・非機能性の再定義・再分類により内分泌腫瘍学にパラダイムシフトをもたらさう。

研究成果の概要(英文)：In this study, we conducted multi-omics analysis with adrenal specimens from patients diagnosed with aldosterone-producing tumors (APA), cortisol-producing tumors (CPA), or nonfunctioning adrenocortical tumors. In tissue steroidomics analysis, we found a significant elevation of cortisol in APA relative to bona fide nonfunctioning tumors, albeit at a lower level relative to CPA. Genomics analysis detected several somatic mutations in a group of genes associated with activation of PKA, an important pathway in cortisol biosynthesis, in CPA, but not in APA, suggesting a different mechanism of cortisol synthesis between APA and CPA. Clustering analysis using machine learning classified adrenocortical tumors into multiple clusters based on the steroidomics data. This study provides clues to elucidate the molecular mechanisms underlying adrenocortical hormones in adrenal tumors, thus helping understand their functionality and non-functionality.

研究分野：内科学、内分泌代謝学、糖尿病学

キーワード：副腎皮質腫瘍 機能性 非機能性 ステロイドミクス解析 ゲノム解析 機械学習

## 1. 研究開始当初の背景

副腎皮質は形態的にも機能的にもユニークな3層構造を呈するが、正常組織の発生・分化の分子機構には不明の点が多く、副腎皮質腫瘍の発生起源の詳細は明らかではない。副腎皮質腫瘍の機能性はミネラルコルチコイド代謝産物であるアルドステロンあるいはグルココルチコイド代謝産物であるコルチゾールの過剰産生が認められる場合に「機能性」と判定され、いずれも過剰産生しない場合は「非機能性」と判定される。内分泌腫瘍はホルモン産生を考慮すべきユニークな腫瘍であり、ホルモンを産生する「機能性」とホルモンを産生しない「非機能性」に大別される。副腎皮質腫瘍の多くは良性腫瘍であるが、主に産生されるステロイドホルモンにより、ミネラルコルチコイド代謝産物であるアルドステロン（アルドステロン産生腫瘍：APA）あるいはグルココルチコイド代謝産物であるコルチゾール（コルチゾール産生腫瘍：CPA）の過剰産生が認められる場合に「機能性」と判定され、いずれの過剰産生も認められない場合には「非機能」と判定される。

近年の画像診断技術の進歩により副腎腫瘍の診断機会が増加しているが、約80%は良性の非機能性腫瘍であり、多くは経過観察あるいは放置されている。我々は既に、APAにおいてアルドステロン合成酵素の発現分布の不均一性とグルココルチコイド合成酵素の異所性発現、血液検体におけるステロイド代謝産物の多様性を見出し、副腎皮質腫瘍が細胞レベルでホルモン産生の不均一性（=機能的不均一性）を呈することを明らかにした。更に、機能的不均一性を呈するアルドステロン産生腫瘍では骨粗鬆症などの代謝疾患合併症の頻度が増加すること、これがアルドステロン以外のステロイドホルモンによることを明らかにした。

## 2. 研究の目的

我々の予備検討により、副腎皮腫瘍は単一ホルモン産生細胞により構成されるのではなく、ホルモン非産生細胞や細胞起源の異なるホルモン産生細胞を含む「機能的不均一性」が示唆される。以上の背景を踏まえて、本研究ではヒト副腎皮質腫瘍の組織検体の網羅的解析と臨床情報を機械学習により統合して副腎皮質腫瘍の機能性・非機能性の再定義を試み、「内分泌腫瘍の機能性とは何か？」という根本的な問いにチャレンジする。

## 3. 研究の方法

本研究目的の達成のために、正常副腎皮質組織および副腎腫瘍組織における統合オミクス解析、液体クロマトグラフィータンデム分析法（LC/MS/MS）による血液・組織検体のメタボローム解析、機械学習を用いた臨床所見と機能的不均一性に基づく臨床診断予測モデル構築を実施した。本研究では、(1)機能性副腎皮質腫瘍における統合オミクス解析と(2)機械学習を用いた機能性副腎皮質腫瘍の診断・治療予測モデルの確立の2つに分けて検討した。

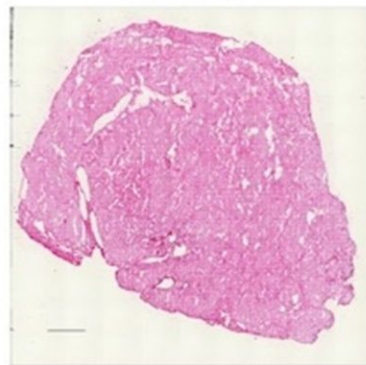
機能性副腎皮質腫瘍における統合オミクス解析では、機能性副腎皮質腫瘍および非機能性副腎皮質腫瘍を対象として、Target Capture法を用いた副腎腫瘍関連遺伝子変異の網羅的検出、RNA-seq法を用いたトランスクリプトーム解析を施行した。LC/MS/MS解析では、機能性副腎皮質腫瘍および非機能性副腎皮質腫瘍を対象としてステロイド代謝産物を測定した。更に、イメージング質量顕微鏡によるステロイド産生細胞の局在を明らかにし、可視化を試みた。

機械学習を用いた機能性副腎皮質腫瘍の診断・治療予測モデルの確立では、72種類の網羅的ステロイド測定法（ステロイドミクス）を独自に構築し、機能性副腎皮質腫瘍および非機能性副腎皮質腫瘍を対象として血液検体によるステロイドプロファイリングを施行した。機械学習による解析では、「教師あり学習」であるランダムフォレストとLightGBMのアルゴリズムを用いた機能性副腎皮質腫瘍の診断予測モデルあるいは治療予後説明モデルを構築した。更に、「教師なし学習」であるk-meansのアルゴリズムを用いたクラスタリングにより、網羅的ステロイドミクス解析の結果を踏まえて副腎皮質腫瘍の新たな診断分類の構築を試みた。

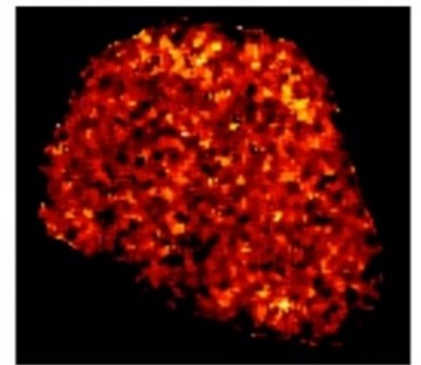
#### 4. 研究成果

##### (1) 機能性副腎皮質腫瘍における統合オミクス解析

免疫組織染色では、アルドステロン合成酵素の発現は APA にのみ検出されたが、コルチゾール合成酵素は APA、CPA、非機能性副腎皮質腫瘍のいずれにおいても認められた。トランスクリプトーム解析では、それぞれの副腎皮質腫瘍は特徴的な遺伝子発現形式を認めた (Front. Endocrinol. 13: 808331, 2022)。コルチゾール合成関連遺伝子の発現は全ての腫瘍において認められた。組織メタボローム解析では、従来、コルチゾールは合成されていないと考えられていたアルドステロン産生腫瘍においてコルチゾールの存在が検出された。コルチゾール合成の局在評価目的のためのイメージング質量顕微鏡においても、機能的なコルチゾール合成細胞の可視化に成功した (図 1)。Target Capture 法に基づくゲノム解析では、コルチゾール産生腫瘍において、コルチゾール生合成の重要な経路である cAMP-protein kinase A (PKA) を活性化すると考えられる PRKACA あるいは GNAS 遺伝子の体細胞変異が検出されたが、アルドステロン産生腫瘍においては、cAMP-PKA 経路に関連する遺伝子変異は検出されず、細胞内カルシウムシグナルの亢進に関連する KCNJ5 遺伝子の体細胞変異が検出された。以上より、機能性副腎皮質腫瘍であるコルチゾール産生腫瘍とアルドステロン産生腫瘍におけるコルチゾール合成機構は異なることが示唆された。



HE染色

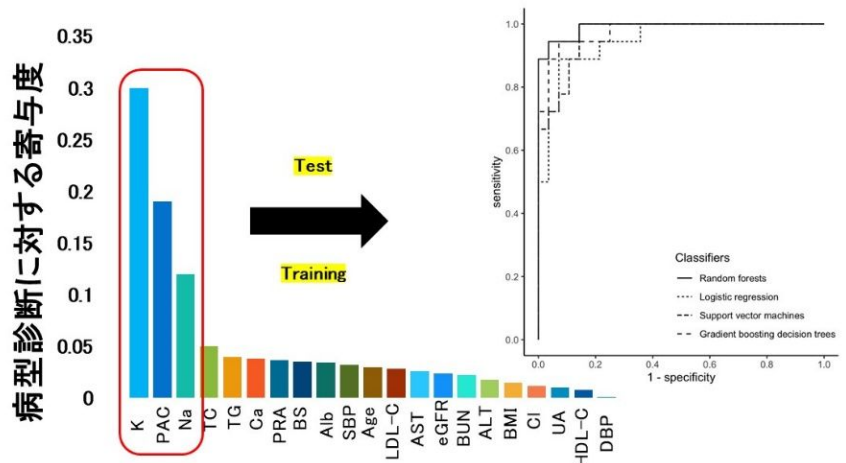


コルチゾールイメージング

(図1)イメージング質量顕微鏡による可視化

##### (2) 機械学習を用いた機能性副腎皮質腫瘍の診断・治療予測モデルの確立

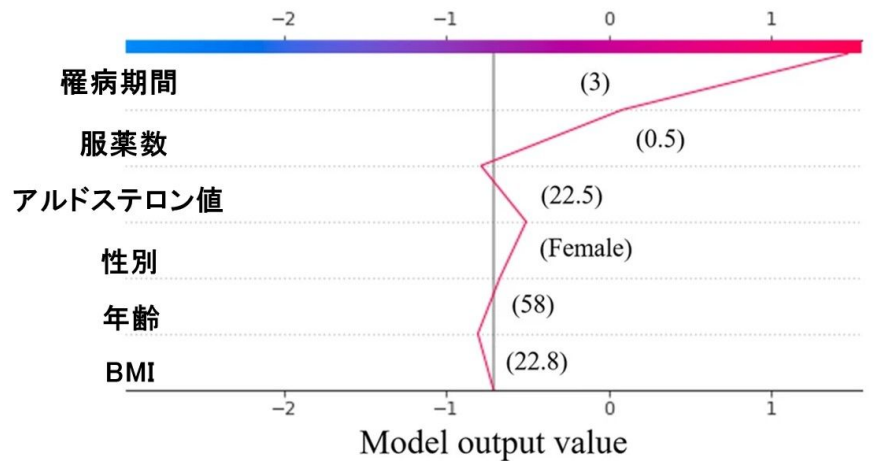
機能性副腎皮質腫瘍のうち APA は鑑別診断が特に重要であるため、機械学習を用いた診断予測モデルの構築を試みた。「教師あり学習」の1つであるランダムフォレストモデルにより、かかりつけ医レベルで測定可能な 18 種類の検査項目において、血中ナトリウム、カリウム、アルドステロンの 3 項目のみで APA を高率 (精度 89%) に診断可能なモデルの開発に成功した (Sci. Rep. 11: e9140, 2021) (図 2)。機械学習を用いた本予測モデルは、既存の診断予測モデルと比較して、汎用性が高く精度も担保されていた。現在、上記のモデルに網羅的ステロイドミクス解析によるステロイドプロファイリングを併用することにより、機能的不均一性を加味した臨床診断法の確立を検討中である。



(図2)機械学習によるAPA診断予測モデルの確立

機械学習の医学応用においては、ブラックボックスとされるモデルを可視化する説明可能な AI が必要とされている。機能性副腎皮質腫瘍のうち APA は患者別の治療効果が大き

く異なるため、治療予後説明モデルを構築した。「教師あり学習」の1つである LightGBM を用いて、治療効果因子の寄与度を患者別に可視化する説明可能な AI 予測モデルを開発した (Sci. Rep. 12: e5781, 2022) (図3)。血液検体におけるステロイド中間代謝産物を含む網羅的ステロイドミクス解析では、APA と CPA において複数のステロイド代謝産物の相違が検出された。現在、上述の説明モデルに網羅的ステロイドミクス解析の結果を統合し、疾患特異的バイオマーカーの検討を進めている。機械学習を用いたクラスタリング解析により、網羅的ステロイドミクス解析の結果を踏まえて副腎皮質腫瘍は複数のクラスターに新たに分類することができた。より多くの症例数を集積して本研究成果の外的妥当性を検証し、副腎皮質腫瘍の新規診断分類を確立する予定である。



(図3) 機械学習によるAPA治療予後説明モデルの確立

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 8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., the Q-AND-A study group, 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) なし	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10件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小川佳宏
2. 発表標題 副腎疾患の最前線
3. 学会等名 第118回日本内科学会講演会（東京）（WEB開催）（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 兼子大輝、馬越洋宜、緒方大聖、和田典男、岩橋徳英、福元多鶴、馬越真希、中野結衣、松田やよい、宮澤 崇、坂本竜一、小川佳宏
2. 発表標題 機械学習を用いた一般血液検査による原発性アルドステロン症のサブタイプ診断予測
3. 学会等名 第118回日本内科学会総会（福岡）（WEB開催）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 兼子大輝、馬越洋宜、和田典男、一城貴政、渡邊哲博、緒方大聖、馬越真希、松田やよい、坂本 竜一、小川佳宏
2. 発表標題 機械学習を用いた原発性アルドステロン症の術後高血圧治癒予測
3. 学会等名 第21回日本内分泌学会九州支部学術集会（大分）（WEB開催）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩橋 徳英、馬越 洋宜、堀内 大、関 真秀、小川佳宏、西本 紘嗣郎
2. 発表標題 Single cell RNA sequencingを用いたアルドステロン産生細胞クラスターの同定
3. 学会等名 第21回日本内分泌学会九州支部学術集会（大分）（WEB開催）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 緒方大聖、馬越洋宜、福元多鶴、岩橋徳英、兼子大輝、寺田英李子、馬越真希、松田やよい、坂本竜一、小川 佳宏
2. 発表標題 アルドステロン産生腺腫における腫瘍内コルチゾール合成
3. 学会等名 第21回日本内分泌学会九州支部学術集会（大分）（WEB開催）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 兼子大輝、馬越洋宜、緒方大聖、和田典男、一城貴政、坂本昌平、渡邊哲博、馬越真希、松田やよい、坂本竜一、小川佳宏
2. 発表標題 機械学習を用いた原発性アルドステロン症の術後高血圧治癒予測
3. 学会等名 第31回日本内分泌学会臨床内分泌代謝Update（大阪）（WEB開催）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 勝原俊亮、馬越真希、馬越洋宜、松田やよい、岩橋徳英、兼子大輝、緒方大聖、福元多鶴、寺田英李子、坂本竜一、小川佳宏
2. 発表標題 コルチゾールのサルコペニアへの影響：メンデルランダム化研究
3. 学会等名 第31回日本内分泌学会臨床内分泌代謝Update（大阪）（WEB開催）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩橋徳英、馬越洋宜、堀内 大、関 真秀、小川 佳宏、西本 紘嗣郎
2. 発表標題 Single cell RNA sequencing を用いたアルドステロン産生細胞クラスターの同定
3. 学会等名 第29回日本ステロイドホルモン学会学術集会（千葉）（WEB開催）
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 兼子大輝 馬越洋宜、緒方大聖、和田典男、一城貴政、坂本昌平、渡邊哲博、馬越真希、松田やよい、坂本竜一、小川佳宏
2. 発表標題 機械学習を用いた原発性アルドステロン症の術後高血圧治癒予測
3. 学会等名 第29回日本ステロイドホルモン学会学術集会（千葉）（WEB開催）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 勝原俊亮、馬越真希、馬越洋宜、松田やよい、岩橋徳英、兼子大輝、緒方大聖、福元多鶴、寺田英李子、坂本竜一、小川佳宏
2. 発表標題 コルチゾールのサルコペニアへの影響：メンデルランダム化研究
3. 学会等名 第29回日本ステロイドホルモン学会学術集会（千葉）（WEB開催）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州大学大学院医学研究院病態制御内科学（第三内科） <a href="http://www.intmed3.med.kyushu-u.ac.jp/">http://www.intmed3.med.kyushu-u.ac.jp/</a>  九州大学プレスリリース 人工知能による原発性アルドステロン症の病型予測モデルを開発～手術で治癒可能な高血圧症の早期発見に向けて～ <a href="https://www.kyushu-u.ac.jp/ja/researches/view/598">https://www.kyushu-u.ac.jp/ja/researches/view/598</a>
--

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