

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04711

研究課題名(和文)アルドステロン合成細胞(APC)を探して：高血圧症臓器障害の新たな機序の解明

研究課題名(英文)Identification of aldosterone-producing cells: Explore the novel mechanism of the hypertension-induced organ damages

研究代表者

笹野 公伸 (SASANO, Hironobu)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：50187142

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 7,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究を通じて、非腫瘍性アルドステロン過剰症におけるアルドステロン合成細胞の局在パターンにより、びまん性に局在するDH(Diffuse hyperplasia of the zona glomerulosa)と結節状に限局性に局在するMN(MN: Multiple adrenocortical micronodules)の2病型に病理組織学的に分類できる事を証明した。また、正常副腎皮質におけるアルドステロン合成動態の加齢に伴う変化、および、アルドステロン過剰産生に關する体細胞遺伝子変異ステータスを初めて解明した。

研究成果の概要(英文)：In this present study, the novel histopathological classification of cross-sectional image negative non-neoplastic hyperaldosteronism has been proposed based on the distribution of aldosterone-producing cells. Furthermore, this is the first study to demonstrate that aldosterone-producing cell clusters (APC) frequently harbors aldosterone-driver gene somatic mutation and accumulate with age.

研究分野：副腎皮質細胞におけるステロイドホルモン合成の機能と形態との関係性

キーワード：アルドステロン CYP11B2 高血圧 原発性アルドステロン症 免疫組織化学 KCNJ5 副腎皮質球状層

1. 研究開始当初の背景

アルドステロンはヒト副腎皮質球状層で合成、分泌されるステロイドホルモンであり、体内での水電解質調節に関与している。原発性アルドステロン症(PA)は、アルドステロンの過剰分泌を伴う副腎皮質疾患であり、アルドステロン産生腺腫(APA)と特発性アルドステロン症(IHA)の2病型に大きく分類される。近年、画像診断の発達、及び、選択的副腎静脈サンプリング(AVS)等により、臨床的に発見されるPA患者数は飛躍的に多くなり、現在では本邦の全高血圧症患者の5-10%を占める。すなわち、ここ数年でPAは従来のような“rare disease”から“common disease”にその概念が大きく変革した。更に、PA患者は、アルドステロンの標的組織への直接作用から同等の血圧を示す本態性高血圧症患者に比し、心血管合併症の割合が有意に高い。以上より、PAの病態解明、早期診断、適切な治療方針の確立が臨床的に非常に重要な課題となってきている。このような背景から、本研究ではヒト副腎皮質でのアルドステロン過剰合成・分泌の病態機序を解明する目的で、以下のような研究計画を考案した。

2. 研究の目的

(1) 加齢/腫瘍化に伴うヒト副腎皮質でのアルドステロン合成動態の変化

副腎皮質細胞におけるアルドステロン合成には様々な酵素が関与している。この中でも特にアルドステロン合成の最終段階を触媒するCYP11B2が律速段階を担っている。しかし、このCYP11B2陽性細胞の分布、すなわち、アルドステロンの合成動態が正常副腎と副腎病変間でどのように異なるのかは不明のままである。また、アルドステロン合成の年齢に伴う変化は未解明である。以上より、第1の目的として、種々の年齢の正常ヒト副腎球状層におけるアルドステロン合成動態の加齢に伴う変化を検討する。

(2) 加齢/腫瘍化に伴うアルドステロン合成関連体細胞遺伝子変異の同定

近年、アルドステロン過剰産生に関する種々のイオンチャネル(*KCNJ5*, *ATP1A1*, *ATP2B3*, *CACNA1D*)の体細胞遺伝子変異が報告され、PAの病因との関係で大きな注目を集めている。これらの変異例ではいずれも腫瘍細胞内でのCa²⁺シグナル伝達系が亢進しCYP11B2の発現が誘導されアルドステロン過剰分泌が生じると提唱されている。これらの遺伝子変異ステータスは人種間によって差がある事が報告されてきているものの、本邦におけるPA症例、正常副腎ZGでの遺伝子変異ステータスに関する詳細な検討は未だなされていない。以上から、第2の目的として、これらの体細胞遺伝子変異ステータスと加齢に伴う変化を検討する。

(3) 日本人副腎皮質におけるアルドステロン過剰合成病変の頻度

PAの診断基準は満たさないが、血中レニン/アルドステロン値が境界領域の高血圧症患者が多く報告されるようになってきた。これらの患者では臓器障害の程度が有意に高く、高血圧自体に加えアルドステロンそのものの関与が想定されている。しかし、これらの症例におけるアルドステロン過剰産生に関する体細胞遺伝子変異ステータスは未解明である。更に、PAの中においても、APAでの体細胞遺伝子変異ステータスの既報告はあるものの、もう一方のPAの非腫瘍性病型であるIHAにおける体細胞遺伝子変異ステータスは全く未解明である。

以上より、第3の目的として非腫瘍性アルドステロン症およびアルドステロン関連高血圧症の症例に対するアルドステロン過剰産生に関する体細胞遺伝子変異ステータスの解明を行う。

(4) 上記(1)-(3)を検討後、PA症例におけるgenotypeとphenotypeとの比較検討を行う。

第4の目的として、APAおよびIHAにおいて、アルドステロン過剰産生に関する体細胞遺伝子変異ステータス(genotype)と臨床病理学的phenotypeとの関係性を考察する。

3. 研究の方法

(1) 種々の年齢の正常ヒト副腎球状層におけるアルドステロン合成動態の加齢に伴う変化の解析

剖検症例の収集：2001年から2010年の期間に東北大学病院で施行された剖検症例107症例において、以下の基準を満たす副腎組織を「正常副腎」と定義した。(年齢65歳未満、高血圧症もしくは高血圧症に伴う合併症の既往がない、降圧剤の内服なし、副腎腫瘍なし、3週間以上のステロイド治療歴がない)

連続切片の作製：上記の症例の副腎組織のホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて、以下の順で連続切片を作製した。

HE標本(4μm)

CYP11B1免疫組織化学標本(4μm)

CYP11B2免疫組織化学標本(4μm)

未染色標本(10μm)x8枚

CYP11B2免疫組織化学標本(4μm)

CYP17A1免疫組織化学標本(4μm)

HE標本(4μm)

体細胞遺伝子変異解析：上記のCYP11B2免疫組織化学標本を参照しながら、CYP11B2陽性の部分に相当する領域を未染色標本より実体顕微鏡下より単離し、アルドステロンないしはコルチゾール過剰産生に関する体細胞遺伝子変異(*KCNJ5*, *ATP1A1*, *ATP2B3*, *CACNA1D*, *CACNA1H*, *ARMC5*, *GNAS*, *CTNNB1*)を次世代シーケンスにより解析した。

APC(アルドステロン産生細胞集塊)と年齢との相関性の解析

(1) で作製した免疫組織化学標本よりCYP11B2陽性部分の面積、CYP11B2陽性細胞集塊(アルドステロン産生細胞集塊:APC)の数を算出し、年齢との相関性を統計的に解析した。

(2) IHA およびアルドステロン過剰合成病変におけるアルドステロン合成動態の解析

症例の収集: 2005年から2015年の期間に採取された副腎手術検体計25例において、以下の基準を満たす副腎組織を「非腫瘍性アルドステロン症」と定義した。(血清アルドステロン高値、血漿レニン活性低値を示す高血圧症、術後に血圧もしくは血清アルドステロンが改善、水平断層画像撮影法および組織学的にも副腎皮質由来の腫瘍性病変がない)

連続切片の作製、体細胞遺伝子変異解析:

(1) と同様の方法で連続切片を作製し、次世代シーケンスによるアルドステロン過剰産生に関連する体細胞遺伝子変異を解析した。

正常副腎組織とのCYP11B2陽性面積の比較

(2) で作製した免疫組織化学標本よりCYP11B2陽性部分の面積を算出し、正常副腎組織との面積の差を算出した。

(3) PA (APA) 症例におけるgenotypeと histological phenotypeとの比較検討

APA症例における体細胞遺伝子変異解析:

2010年から2014年の期間においてAPA35症例に対して、副腎腫瘍摘除術施行時に凍結組織片を採取した。これを用い、RNA抽出後、cDNAを合成、sanger sequence法によりKCNJ5遺伝子の体細胞変異の有無を解析した。

KCNJ5変異型および野生型APA症例に対する病理組織学的解析

APA腫瘍部分の代表切片よりHE標本、CYP11B2免疫組織化学標本作製し、自動解析装置を用いて、以下の項目に対する定量的な病理組織像の解析を行った。

腫瘍細胞と間質比、腫瘍細胞における核と細胞質比、腫瘍細胞の細胞質における淡明細胞と緻密細胞との比を算出した。また、CYP11B2のimmunoreactivityについても半定量的に解析を行った。

KCNJ5変異型および野生型APA症例における超微形態学的解析

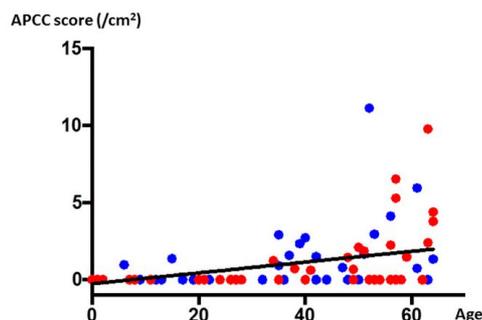
(3) と同様に副腎腫瘍摘除術施行時に組織片を採取し、グルタルアルデヒド固定後、エポン包埋樹脂を作製した。これらの試料に対し、透過型電子顕微鏡を用いてグリッド内に観察される細胞内のミトコンドリア、脂肪滴の数や面積について、定量的に解析した。

4. 研究成果

(1) APC と加齢との関係

副腎皮質面積に対する APC の個数は有意に正の相関を示した(図1, P=0.0001, r=0.50)。

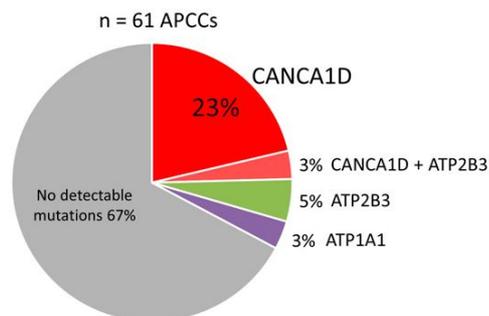
【アルドステロン産生細胞集塊の数と加齢との関連性】



(2) 正常副腎 APC におけるアルドステロン過剰産生に関連する体細胞遺伝子変異ステータス

解析した107例の副腎組織中、61個のAPCが観察された。正常副腎APCでは16個/61個(26%)でCACNA1D、5個/61個(8%)でATP2B3、2個/61個(3%)でATP1A1の体細胞遺伝子変異が検出された。一方で、KCNJ5の遺伝子変異は検出されなかった(図2)。

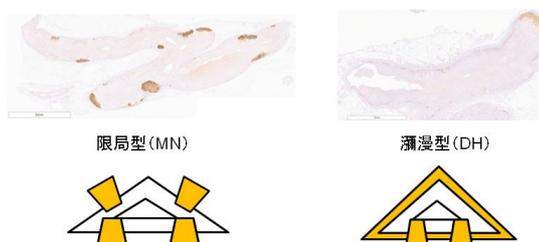
【正常副腎APCにおける体細胞遺伝子変異ステータス】



(3) 非腫瘍性アルドステロン症に CYP11B2 の分布に基づいた 2 病型

(2) で収集した計25例の非腫瘍性アルドステロン症はCYP11B2の免疫組織化学にもとづきよるCYP11B2陽性細胞の分布に基づき、大きく「限局型(MN)」と「びまん型(DH)」の2亜型に分類された(図3)。

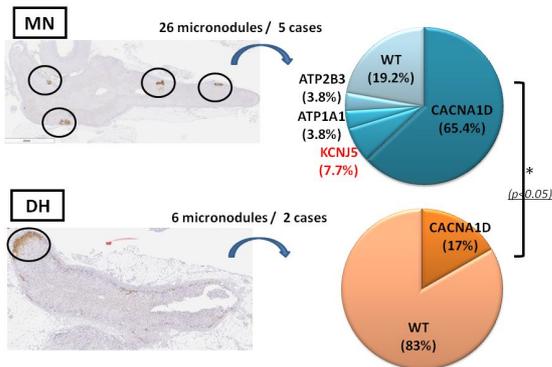
【非腫瘍性アルドステロン症の2病型】



(4) 非腫瘍性アルドステロン症 2 病型 (MN, DH) におけるアルドステロン過剰産生に関連する体細胞遺伝子変異ステータス

計 7 症例 (MN:5 症例、DH:2 症例) について、(1)・、(2)・ で記したように APC の部分を単離し体細胞遺伝子変異を解析したところ、解析した 7 例の副腎組織中、32 個の APC が観察された。MN の APC では 17 個/26 個 (65%) で *CACNA1D*、1 個/26 個 (4%) で *ATP1A1*、1 個/26 個 (4%) で *ATP2B3*、2 個/26 個 (8%) で *KCNJ5* の体細胞遺伝子変異が検出された。一方で、DH の APC では 1 個/6 個 (17%) でのみ *CACNA1D* の体細胞遺伝子変異が検出された (図 4)。

【非腫瘍性アルドステロン症の2病型における体細胞遺伝子変異ステータス】

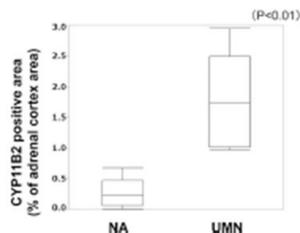


(5) 非腫瘍性アルドステロン症と正常副腎における CYP11B2 面積の相違

非腫瘍性アルドステロン症の限局型の病型である MN と正常副腎における CYP11B2 陽性細胞の分布は非常に類似しており、病理組織学的差異 (病的な過形成性変化の意義) が問題になる。そこで、両者の相違を検討したところ、副腎皮質に対する CYP11B2 陽性細胞の面積の割合は MN の方が有意に高く ($P < 0.05$)、1% をカットオフとして、両者を区別する事ができた (図 5)。

【MNと正常副腎とのCYP11B2免疫の差異】

NA Case No.	CYP11B2 positive area (%)	UMN Case No.	CYP11B2 positive area (%)
1	0.38	25	0.97
2	0.41	24	2.95
3	0.08	19	1.73
4	0.68	21	1.06
5	0.08	22	2.04
6	0.01		



(6) KCNJ5変異型および野生型APA症例の定量的病理組織学的解析

*KCNJ5*変異型APAでは*KCNJ5*野生型APAに比較して、形態学的にN/C比が低く、大型の淡明細胞より構成されていた。一方でCYP11B2のimmunoreactivityについては有意差がなかった (図 6)。

【*KCNJ5*変異型および野生型APA症例の定量的病理組織学的解析】

【Quantitative histological analysis】

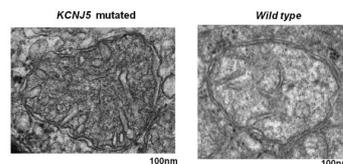
	<i>KCNJ5</i> mutated (n=18)	<i>KCNJ5</i> wild (n=17)	P value
Parenchyme [%]	86.50 (82.43~89.62)	83.88 (77.99~88.70)	0.3221
Mesenchyme [%]	13.50 (10.38~17.58)	16.12 (11.30~22.01)	0.3221
Nuclear [%]	6.83 (5.07~8.77)	13.82 (11.44~18.99)	<0.0001*
Cytoplasm [%]	79.47 (72.55~82.84)	69.13 (65.85~73.32)	0.0027*
N/C ratio	0.09 (0.06~0.12)	0.21 (0.16~0.31)	<0.0001*
Nuclear size [μm^2]	46.84 (36.52~60.00)	53.46 (49.08~79.14)	0.1497
Cell size [μm^2]	448.3 (387.2~615.1)	335.2 (241.0~513.3)	0.0158*
Clear cell component / Cytoplasm [%]	71.76 (64.17~80.42)	53.00 (36.54~65.13)	0.0041*
Compact cell component / Cytoplasm [%]	28.25 (19.58~35.84)	47.00 (34.87~63.46)	0.0041*
CYP11B2 positive area / Cytoplasm [%]	30.70 (21.07~34.61)	14.02 (9.43~36.59)	0.1058
CYP11B2 H-score (Cytoplasm) [imm μm^2]	0.427 (0.28~0.47)	0.181 (0.12~0.53)	0.0989
Area of adjacent ZG /cortex [%]	13.27 (10.59~16.73)	9.43 (7.74~15.26)	0.2427

(7) KCNJ5変異型および野生型APA症例の定量的超微形態学的解析

*KCNJ5*変異型APAでは*KCNJ5*野生型APAに比較して、単位面積当たりの脂肪滴数が少ない。一方で、ミトコンドリア1個当たりのサイズは小型であり、単位面積当たりのミトコンドリア数は有意に多かった。また、クリステは非常に発達していた (図 7)。

【*KCNJ5*変異型および野生型APA症例の定量的超微形態学的解析】

	<i>KCNJ5</i> (n=14 cells)	Wild type (n=15 cells)	P value
Av. area of lipid [nm^2]	3096.2 (2352.2~3913.3)	2462.9 (1927.4~2876.9)	0.0887
No. of lipid [nm^2]	1.25E-04 (1.07E-04~1.56E-04)	1.74E-04 (1.54E-04~2.32E-04)	0.0447*
Area of lipid / cytoplasm [%]	38.1 (34.1~42.3)	55.8 (31.2~60.2)	0.1378
Av. area of mitochondria [nm^2]	249.6 (201.6~267.0)	366.6 (329.3~406.9)	0.0002*
No. of mitochondria [nm^2]	3.32E-04 (2.41E-04~4.00E-04)	1.17E-04 (7.59E-05~2.49E-04)	0.0035*
Area of mitochondria / cytoplasm [%]	7.97 (5.00~9.08)	4.40 (3.11~7.97)	0.0887



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 118 件)

1. Yamazaki Y, Omata K, Tezuka Y, Ono Y, Morimoto R, Adachi Y, Ise K, Nakamura Y, Gomez-Sanchez CE, Shibahara Y, Kitamoto T, Nishikawa T, Ito S, Satoh F, Sasano H. Tumor cell subtypes based on the intracellular hormonal activity in *KCNJ5* mutated

- aldosterone-producing adenoma. Hypertension. 査読有 2018 (in press)
- Mete O, Asa SL, Giordano TJ, Papotti M, Sasano H, Volante M. Immunohistochemical Biomarkers of Adrenal Cortical Neoplasms. *Endocr Pathol*. 査読有 2018 (in press) , DOI:10.1007/s12022-018-9525-8
 - Moon JY, McNamara KM, Lee JJ, Chung BC, Sasano H, Choi MH. Improved detectability of sex steroids from frozen sections of breast cancer tissue using GCtriple quadrupole-MS. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 査読有 vol. 178, 2017 pp. 185-192, DOI: 10.1016/j.jsbmb.2017.12.012.
 - Omata K, Anand SK, Hovelson DH, Liu CJ, Yamazaki Y, Nakamura Y, Ito S, Satoh F, Sasano H, Rainey WE, Tomlins SA. Aldosterone-Producing Cell Clusters Frequently Harbor Somatic Mutations and Accumulate With Age in Normal Adrenals. *J Endocr Soc*. 査読有 vol. 1, No. 7, 2017 pp. 787-799, DOI: 10.1210/js.2017-00134.
 - Omata K, Yamazaki Y, Nakamura Y, Anand SK, Barletta JA, Sasano H, Rainey WE, Tomlins SA, Vaidya A. Genetic and Histopathologic Intertumor Heterogeneity in Primary Aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab*. 査読有 vol. 102, No. 6, 2017 pp. 1792-1796, DOI: 10.1210/jc.2016-4007
 - Yamazaki Y, Nakamura Y, Omata K, Ise K, Tezuka Y, Ono Y, Morimoto R, Nozawa Y, Gomez-Sanchez CE, Tomlins SA, Rainey WE, Ito S, Satoh F, Sasano H. Histopathological classification of cross-sectional image negative hyperaldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab*. 査読有 vol. 102, No. 4, 2017 pp. 1182-1192, DOI: 10.1210/jc.2016-2986.
 - Kim SH, Moon JY, Sasano H, Choi MH, Park MJ. Body fat mass is associated with ratio of steroid metabolites reflecting 17,20-lyase activity in prepubertal girls. *J Clin Endocrinol Metab*. 査読有 vol. 101, No. 12, 2016 pp. 4653-4660, DOI: 10.1210/jc.2016-2515
 - Ito K, Miki Y, Suzuki T, McNamara KM, Sasano H. In situ androgen and estrogen biosynthesis in endometrial cancer: focus on androgen actions and intratumoral production. *Endocr Relat Cancer*. 23(7):R323-335. 2016
 - Kubota-Nakayama F, Nakamura Y, Konosu-Fukaya S, Azmahani A, Ise K, Yamazaki Y, Kitawaki Y, Felizola SJ, Ono Y, Omata K, Morimoto R, Iwama N, Satoh F, Sasano H. Expression of steroidogenic enzymes and their transcription factors in cortisol-producing adrenocortical adenomas : immunohistochemical analysis and quantitative real-time polymerase chain reaction studies. *Hum Pathol*. 査読有 vol. 54, 2016 pp.165-173, DOI:10.1016/j.humpath.2016.03.016.
 - Yamazaki Y, Nakamura Y, Shibahara Y, Konosu-Fukaya S, Sato N, Kubota F, Oki Y, Baba S, Midorikawa S, Morimoto R, Satoh F, Sasano H. Comparison of the methods for measuring the Ki-67 labeling index in adrenocortical carcinoma: manual versus digital image analysis. *Hum Pathol*. 査読有 vol. 53, 2016 pp.41-50, DOI:10.1016/j.humpath.2015.10.017
 - Nakamura Y, Kitada M, Satoh F, Maekawa T, Morimoto R, Yamazaki Y, Ise K, Gomez-Sanchez CE, Ito S, Arai Y, Dezawa M, Sasano H. Intratumoral heterogeneity of steroidogenesis in aldosterone-producing adenoma revealed by intensive double- and triple-immunostaining for CYP11B2/B1 and CYP17. *Mol Cell Endocrinol*. 査読有 vol. 422, 2016 pp. 57-63, DOI: 10.1016/j.mce.2015.11.014.
 - Iwakura Y, Ito S, Morimoto R, Kudo M, Ono Y, Nezu M, Takase K, Seiji K, Ishidoya S, Arai Y, Funamizu Y, Miki T, Nakamura Y, Sasano H, Satoh F. Renal Resistive Index Predicts Postoperative Blood Pressure Outcome in Primary Aldosteronism. *Hypertension*. 査読有 vol. 67, No. 3, 2016 pp. 654-660, DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05924.
 - Rizner TL, Sasano H, Choi MH, Odermatt A, Adamski J. Recommendations for description and validation for antibodies for research use. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 査読有 vol. 156 , No. , 2016 pp. 40-42, DOI: 10.1016/j.jsbmb.2015.11.021
 - Nakamura Y, Yamazaki Y, Konosu-Fukaya S, Ise K, Satoh F, Sasano H. Aldosterone biosynthesis in the human adrenal cortex and associated disorders. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 査読有 vol. 153, 2015 pp. 57-62, DOI: 10.1016/j.jsbmb.2015.05.008
 - Felizola SJ, Katsu K, Ise K, Nakamura Y, Arai Y, Satoh F, Sasano H. Pre-B Lymphocyte Protein 3 (VPREB3) Expression

in the Adrenal Cortex: Precedent for non-Immunological Roles in Normal and Neoplastic Human Tissues. 査読有 vol. 26, No. 2, 2015 pp. 119-128, DOI:10.1007/s12022-015-9366-7.

16. Konosu-Fukaya S, Nakamura Y, Satoh F, Felizola SJ, Maekawa T, Ono Y, Morimoto R, Ise K, Takeda KI, Katsu K, Fujishima F, Kasajima A, Watanabe M, Arai Y, Gomez-Sanchez EP, Gomez-Sanchez CE, Doi M, Okamura H, Sasano H. 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms in human aldosterone-producing adenoma. Mol Cell Endocrinol. 査読有 vol. 408, 2015 pp. 205-212, DOI: 10.1016/j.mce.2014.10.008.

[学会発表](計 121 件)

1. Hironobu Sasano. Dissecting the Molecular Pathways of Primary Aldosteronism. ENDO2016, April 1-4, Boston Convention and Exhibition Center(USA), 2016
2. Hironobu Sasano. NOVEL CLASSIFICATION OF NEOPLASTIC AND NON-NEOPLASTIC PRIMARY ALDOSTERONISM. 41st International Aldosterone Conference, March 30-31, Boston(USA), 2016
3. Hironobu Sasano. Update on adrenal cortical tumours. The 9th Asia Pacific IAP Congress: APIAP 2015, June4-7 Brisbane(Australia), 2015
4. Hironobu Sasano. Dissecting hormone production and secretion in primary aldosteronism. 2015 Seoul International Congress of Endocrinology and Metabolism in conjunction with - 34th Annual Meeting of Korean Endocrine Society, April 30-May 3 Seoul(Korea), 2015

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

笹野 公伸 (SASANO, Hironobu)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：50187142

(2)連携研究者

中村 保宏 (NAKAMURA, Yasuhiro)
東北医科薬科大学・医学部・教授
研究者番号：80396499

荒井 陽一 (ARAI, Yoichi)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：50193058
佐藤 文俊 (SATO, Fumitoshi)
東北大学・医学系研究科・特任教授
研究者番号：70343051

森本 玲 (MORIMOTO, Ryo)
東北大学・大学病院・講師
研究者番号：30547394

(3)研究協力者

William E Rainey
Celso E Gomez-Sanchez
小野 克彦 (ONO, Katsuhiko)
伊勢 和恵 (ISE, Kazue)
山崎 有人 (YAMAZAKI, Yuto)