

令和元年6月19日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10650

研究課題名(和文) 体細胞変異に着目したアルドステロン産生細胞クラスターの病変進展メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of progression from aldosterone-producing cell cluster leading to aldosterone-producing adenoma

研究代表者

西本 紘嗣郎 (Nishimoto, Koshiro)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00365363

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々はアルドステロン(aldo)合成酵素(CYP11B2)を特異的に検出する免疫染色法に成功し、正常副腎皮質には従来から知られる球状層に加え、aldo産生細胞クラスター(APCCと新規命名)においてもaldo産生が行われることを報告していた。今回、(1)aldo産生腺腫(APA)に検出されたイオンチャネル・ポンプ遺伝子体細胞変異がAPCCにも検出されることからAPCCはAPAの発生母地あるいは原発性aldo症の病変となりうること、(2)APCCは50歳までは増加するがそれ以降は減少すること、(3)MALDIイメージング質量分析によりAPCCには高濃度のaldoが検出されることなどを報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高血圧患者の5-10%は、副腎から過剰なアルドステロン(aldo)が産生される原発性aldo症(PA)が原因であることが知られています。PAは主に、片側副腎に発生するアルドステロン産生腺腫(APA)、あるいは両側性PAに分類されます。前者は手術で治癒しますが、後者は生涯にわたる内服治療が必要となります。しかしAPAの発生原因や、両側性PAの病態は不明のままです。本研究では、APAの発生母地、および、両側性PAの病変となりうるアルドステロン産生細胞クラスター(APCC、2010年に新規命名)に主眼を置いて解析を行いました。APCC研究は、将来的にはPAの予防や治療法の開発につながると考えます。

研究成果の概要(英文)：We have previously reported immunohistochemistry for aldosterone (aldo) synthase (CYP11B2) discriminating from cortisol synthesizing enzyme (CYP11B1), and found that aldo is produced not only in the zona glomerulosa but also in aldo-producing cell clusters (APCCs, *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95,2296-305). In this study, we found that (1) APCCs harbor one of the mutations of ion-channel pump genes, which identified in aldo-producing adenomas (APAs), suggesting that APCCs are precursor of APA and autonomous aldo-producing lesions in bilateral primary aldosteronism patients (*PNAS* 2015;112,E4591-9), (2) numbers and areas per adrenal glands increase with age until 50 years old (*Int J Endocrinol* 2015;4834356) but decrease thereafter (*J Steroid Biochem Mol Biol* 2019;191,105361), and (3) aldo was detected in APCCs by matrix-assisted laser desorption ionization as a mass spectrometry imaging (*Hypertens* 2018;72,1345-54). APCCs may have a key role in autonomous aldo production in humans.

研究分野：医歯薬学

キーワード：アルドステロン アルドステロン産生腺腫 原発性アルドステロン症 アルドステロン合成酵素 アルドステロン産生細胞クラスター (APCC) 体細胞変異 イオンチャネル イオンポンプ (イオントランスポーター)

## 1. 研究開始当初の背景

申請者は、教科書に記載されている副腎球状層・束状層・網状層からなる層状構築 (図 1 左) に加え、被膜下アルドステロン合成細胞クラスター (aldosterone-producing cell clusters: APCCs と命名) を含む新たな斑(ふ)入り状組織構築を報告した (*J Clin Endocrinol Metab* 2010;95,2296-305, 業績 21 と 22 も参照)。これは、アルドステロン合成酵素(CYP11B2)をコルチゾール合成酵素(CYP11B1)と区別して検出できる抗体作製に成功したことにより成し遂げられた(CYP11B2 と CYP11B1 はアミノ酸配列が 93% 同一)。APCC を構成する細胞は形態学的には被膜下の球状層様細胞 (小型、球状配列) と内奥部の束状層様細胞 (大型、索状配列) である。そのため、CYP11B2 染色なしに APCC を識別することは不可能であった。研究開始当初われわれは、「APCC が自律的にアルドステロンを産生する病変となりうる」あるいは「APCC がアルドステロン産生腺腫に進展する」との仮説を持った。

## 2. 研究の目的

上述の仮説を検証すること。

## 3. 研究の方法

多彩なヒト副腎サンプルを用いて、CYP11B2 染色、遺伝子変異解析、MALDI イメージング解析などを行った。

## 4. 研究成果

### APCC における APA 関連変異の検出 (業績 14, 20)

我々は、ヒト副腎の FFPE 切片から、微小な APCC とその周囲の束状層の組織を回収し、それらから微量な DNA を抽出して、次世代シーケンサーによる APA 関連変異の解析を行った。その結果、APCC には APA に報告された遺伝子変異である *ATP1A1*, *ATP2B3* および *CACNA1D* が検出された一方、APCC 周囲の束状層組織からは検出されなかった。興味深いことに、APA におけるもっとも頻度が高い *KCNJ5* 変異は APCC には検出されなかった。これらの結果は、APCC が APA の発生母地であることを示唆するが、*KCNJ5* 変異は APCC の形成には関与しないと考えられた。

### APCC から APA への移行を示唆する病変 (業績 11, 16, 19)

APCC が APA の発生母地であるという仮説が正しい場合、APCC から APA への移行を示唆する病変が検出されるのかもしれない。片側 PA の診断で副腎摘除術が行われたが病理学的に腺腫が明らかでなかった副腎組織の CYP11B2 免疫染色を行った。その結果、一部の副腎組織において、副腎被膜直下は APCC 様であるが、その内奥は APA である PA 病変が検出された。APCC 様部位と APA 様部位から別々に DNA を抽出して次世代シーケンサーによる遺伝子変異解析の結果は、これらの PA 病変が APCC から APA への移行病変として矛盾がなかった。なお、大きい pAATL には *KCNJ5* 変異が検出された。これらの病変を possible APCC-to-APA transitional lesions (pAATLs) として報告した。

### アルドステロン産生組織の加齢 (業績 2, 17)

「加齢に伴い APA 関連変異が蓄積して APCC が発生するのか」という新たな問いが生じた。われわれは、0 歳から 50 歳で病理解剖を行った症例の副腎組織に CYP11B2 染色を行った。結果、思春期以前の副腎組織は従来から知られる 3 層構造を呈していた。すなわち、CYP11B2 陽性の球状層と CYP11B1 陽性の束状層から構成されていた。ある若年症例では球状層の肥厚を認め、このような症例では死亡直前にレニン・アンジオテンシン系が更新していたと推測された。思春期を過ぎたヒト副腎は年齢とともに切片面積当たりの APCC 面積や APCC の個数が増加した。これは APCC が加齢に伴うリモデリング組織であることを示唆する。一方、APCC は 50 歳以降減少することも判明した。

### *KCNJ5* 体細胞モザイク変異症例 – 非家族性若年性 PA (業績 7, 10, 23)

「*KCNJ5* 変異は APCC の腫瘍化に関与するのか」、この疑問点を考えるうえでわれわれは興味深い症例を経験した。この症例は若年発症かつ重症の PA であった。本症例に、左右の副腎静脈の上流の支脈から血液を取り分ける新しい副腎静脈サンプリング法 (超選択的副腎静脈サンプリング: ssAVS) を施行して、比較的アルドステロン産生が低い部位を同定して、その部位以外の副腎摘出、すなわち片側の副腎全摘術および反対側の副腎部分切除術を施行した。摘出副腎を病理学的に解析したところ、著明な CYP11B2 陽性の過形成部

位（一部は腫瘍化）と正常副腎がモザイクとなっていた。過形成部位と正常部位を別々に遺伝子変異解析したところ、過形成部位では *KCNJ5* 変異が検出された一方、正常部位では変異が検出されなかった。このような組織像と遺伝子変異は左右の副腎で同様であり、本症例は左右副腎に分化するより前の胎生期細胞に *KCNJ5* 遺伝子変異が生じ、遺伝子変異の無い胎生期細胞と遺伝子モザイク (genetic mosaicism) を生じたと推定された。このような症例はこれまでに報告が無く、非家族性若年性 PA の 1 例として報告した。さらに、本症例より *KCNJ5* 変異は、副腎皮質の腫瘍化に関与することが示唆された。

#### ssAVS による PA 病変の推定 (業績 12)

前述の *KCNJ5* 体細胞モザイク変異症例で示されたように、ssAVS は PA 病変を推定するのに有用な方法である。われわれは ssAVS の instruction video を作成し、さらに ssAVS と CYP11B2 染色像との整合性について議論を行った。

#### APCC, pAATL, APA におけるステロイドの in situ 検出 (業績 1, 3, 4, 18)

これまで APCC や pAATL に CYP11B2 という酵素が検出されることを報告したが、実際に同部位にアルドステロンが検出されるのかは証明されていなかった。MALDI イメージングにより APCC にアルドステロンが検出される一方、コルチゾールは検出されないことを報告した。他に APCC, pAATL, APA におけるその他のステロイドの局在を明らかにした。

#### その他

APCC におけるメチル化に関する研究 (業績 5)、新規 LC-MS による血漿アルドステロン測定法の開発 (業績 6)、アルドステロン産生副腎皮質癌におけるステロイド合成酵素の局在 (業績 8)、小児発症 APA の報告 (業績 9)、コルチゾール産生病変におけるメチル化に関する研究 (業績 13)、新規マウス抗ヒト CYP11B2 抗体の作製 (業績 15)、などの報告を行った。さらに、日本医療研究開発機構研究費 (難治性疾患実用化研究事業)「重症型原発性アルドステロン症の診療の質向上に資するエビデンス構築 (JPAS)」における分担研究の成果として、「原発性アルドステロン症患者から副腎静脈サンプリングが不要な片側性アルドステロン産生腺腫を抽出する方法の開発」を行い、埼玉医科大学から特許出願を行った (論文投稿中)。

### 5. 主な発表論文等(17-35)

#### 〔雑誌論文〕(計 22 件)

1. Takeo E, Sugiura Y, Uemura T, Nishimoto K, Yasuda M, Sugiyama E, Ohtsuki S, Higashi T, Nishikawa T, Suematsu M, Fukusaki E, Shimma S. Tandem mass spectrometry imaging reveals distinct accumulation patterns of steroid structural isomers in human adrenal glands. *Anal Chem* 2019; (in press, 査読あり)
2. Hayashi T, Zhang Z, Al-Eyd G, Sasaki A, Yasuda M, Oyama M, Gomez-Sanchez CE, Asakura H, Seki T, Mukai K, Nishimoto K (corresponding author). Expression of aldosterone synthase CYP11B2 was inversely correlated with longevity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2019; 191:105361 (査読あり)
3. Zhang Z, Sugiura Y, Mune T, Nishiyama M, Terada Y, Mukai K, Nishimoto K (corresponding author). Immunohistochemistry for aldosterone synthase CYP11B2 and matrix-assisted laser desorption ionization imaging mass spectrometry for in-situ aldosterone detection. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2019; 28:105-112 (査読あり)
4. Sugiura Y, Takeo E, Shimma S, Yokota M, Higashi T, Seki T, Mizuno Y, Oya M, Kosaka T, Omura M, Nishikawa T, Suematsu M, Nishimoto K (corresponding author). Aldosterone and 18-Oxocortisol Coaccumulation in Aldosterone-Producing Lesions. *Hypertension* 2018; 72:1345-1354 (査読あり)
5. Kometani M, Yoneda T, Aono D, Karashima S, Demura M, Nishimoto K, Yamagishi M, Takeda Y. Impact of aldosterone-producing cell clusters on diagnostic discrepancies in primary aldosteronism. *Oncotarget* 2018; 9:26007-26018 (査読あり)
6. Higashi T, Akaishi M, Yokota M, Suzuki T, Ogawa S, Sugiura Y, Nishikawa T, Nishimoto K, Suematsu M. A method for determination of aldosterone in adrenal tributary venous serum by derivatization using Girard P reagent isotopologues followed by LC/ESI-MS/MS. *Journal of*

chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences 2018; 1092:106-113 (査読あり)

7. **西本紘嗣郎**, 林泰樹, 中川健, 大家基嗣. 【原発性アルドステロン症 Update】アルドステロン合成酵素の免疫染色、超選択的副腎静脈サンプリング、および次世代シーケンサー解析により判明した新規原発性アルドステロン(PA)の病型 若年性非遺伝性PA. 日本内分泌・甲状腺外科学会雑誌 2018; 35:13-17 (査読なし)
8. Uchida T, **Nishimoto K (corresponding author)**, Fukumura Y, Asahina M, Goto H, Kawano Y, Shimizu F, Tsujimura A, Seki T, **Mukai K**, Kabe Y, Suematsu M, Gomez-Sanchez CE, Yao T, Horie S, Watada H. Disorganized Steroidogenesis in Adrenocortical Carcinoma, a Case Study. *Endocr Pathol* 2017; 28:27-35 (査読あり)
9. Uchida N, Amano N, Yamaoka Y, Uematsu A, Sekine Y, Suzuki M, Watanabe J, **Nishimoto K**, **Mukai K**, Fukuzawa R, Hasegawa T, Ishii T. A Novel Case of Somatic KCNJ5 Mutation in Pediatric-Onset Aldosterone-Producing Adenoma. *Journal of the Endocrine Society* 2017; 1:1056-1061 (査読あり)
10. Tamura A, **Nishimoto K (corresponding author)**, Seki T, Matsuzawa Y, Saito J, Omura M, Gomez-Sanchez CE, Makita K, Matsui S, Moriya N, Inoue A, Nagata M, Sasano H, Nakamura Y, Yamazaki Y, Kabe Y, **Mukai K**, **Kosaka T**, Oya M, Suematsu S, Nishikawa T. Somatic KCNJ5 mutation occurring early in adrenal development may cause a novel form of juvenile primary aldosteronism. *Molecular and cellular endocrinology* 2017; 441:134-139 (査読あり)
11. **Nishimoto K (corresponding author)**, Koga M, Seki T, **Oki K**, Gomez-Sanchez EP, Gomez-Sanchez CE, Naruse M, Sakaguchi T, Morita S, **Kosaka T**, Oya M, Ogishima T, Yasuda M, Suematsu M, Kabe Y, Omura M, Nishikawa T, **Mukai K**. Immunohistochemistry of aldosterone synthase leads the way to the pathogenesis of primary aldosteronism. *Molecular and cellular endocrinology* 2017; 441:124-133 (査読あり)
12. Makita K, **Nishimoto K (corresponding author)**, Kiriyama-Kitamoto K, Karashima S, Seki T, Yasuda M, Matsui S, Omura M, Nishikawa T. A Novel Method: Super-selective Adrenal Venous Sampling. *Journal of visualized experiments : JoVE* 2017; (査読あり)
13. Kometani M, Yoneda T, Demura M, Koide H, **Nishimoto K**, **Mukai K**, Gomez-Sanchez CE, Akagi T, Yokota T, Horike SI, Karashima S, Miyamori I, Yamagishi M, Takeda Y. Cortisol overproduction results from DNA methylation of CYP11B1 in hypercortisolemia. *Sci Rep* 2017; 7:11205 (査読あり)
14. **西本紘嗣郎**. 新規アルドステロン(Aldo)産生細胞塊の体細胞変異解析. 医科学応用研究財団研究報告 2017; 34:416-419 (査読なし)
15. **西本紘嗣郎**, 林泰樹, 北村陽典, 内田厚, 向井邦晃. 【原発性アルドステロン症診療の進歩】原発性アルドステロン症の診療におけるアルドステロン合成酵素免疫染色法の意義. *血圧* 2017; 24:861-868 (査読なし)
16. **Nishimoto K (corresponding author)**, Seki T, Kurihara I, Yokota K, Omura M, Nishikawa T, Shibata H, **Kosaka T**, Oya M, Suematsu M, **Mukai K**. Case Report: Nodule Development From Subcapsular Aldosterone-Producing Cell Clusters Causes Hyperaldosteronism. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2016; 101:6-9 (査読あり)
17. **Nishimoto K (corresponding author)**, Seki T, Hayashi Y, Mikami S, Al-Eyd G, Nakagawa K, Morita S, **Kosaka T**, Oya M, Mitani F, Suematsu M, Kabe Y, **Mukai K**. Human Adrenocortical Remodeling Leading to Aldosterone-Producing Cell Cluster Generation. *Int J Endocrinol* 2016; 2016:7834356 (査読あり)
18. 杉浦悠毅, 東達也, 新聞秀一, **西本紘嗣郎**, 末松誠. 質量分析による低分子ホルモンの検出【第1回】 イメージング質量分析によるステロイドホルモンの分布可視化. *実験医学* 2016; 34:3048-3054 (査読なし)
19. 笹井伸哉, **西本紘嗣郎**. アルドステロン合成酵素免疫染色と次世代シーケンサーの組み合わせによるアルドステロン産生腺腫発生母地の解明. *共済医報* 2016; 65:188-193 (査読なし)

20. **Nishimoto K**, Tomlins SA, Kuick R, Cani AK, Giordano TJ, Hovelson DH, Liu CJ, Sanjanwala AR, Edwards MA, Gomez-Sanchez CE, Nanba K, Rainey WE. Aldosterone-stimulating somatic gene mutations are common in normal adrenal glands. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2015; 112:E4591-4599 (査読あり)
21. **西本紘嗣郎**, 北村陽典, 中川健, 関次男, 小坂威雄, 大家基嗣, 笹井伸哉, 向井邦晃. 【副腎腫瘍の診断と治療の update】アルドステロン合成酵素の免疫組織化学による新しい副腎組織病理学. 日本内分泌・甲状腺外科学会雑誌 2015; 32:230-233 (査読なし)
22. **西本紘嗣郎**, 北村陽典, 中川健, 関次男, 小坂威雄, 大家基嗣, 向井邦晃. アルドステロン合成酵素の免疫組織化学による新しい副腎組織病理学. 内分泌外科学会雑誌 2015; (査読なし)
23. **西本紘嗣郎**, 田村愛. 【副腎ホルモン産生異常に関するゲノム・エピゲノム研究】アルドステロン合成酵素の免疫組織化学染色法により判明した原発性アルドステロン症の病理学的病型. ホルモンと臨床 2015; 63:391-395 (査読なし)

#### 【学会発表】(計 0 件)

多数あるが記載せず

#### 【図書】(計 1 件) (36)

1. **西本紘嗣郎**, 安田政実, 向井邦晃. アルドステロン合成酵素の免疫染色による PA の病理学的確定診断法から病態解明へ. 原発性アルドステロン症診療マニュアル 改訂第 3 版 2017:151-156.

#### 【産業財産権】

○出願状況 (計 1 件)

名称：原発性アルドステロン症患者から副腎静脈サンプリングが不要な片側性アルドステロン産生腺腫を抽出する方法の開発

発明者：西本紘嗣郎

権利者：西本紘嗣郎

番号：特願 2019-89266

出願年：2019 年

国内外の別：国内

#### 6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：小坂 威雄

ローマ字氏名：KOSAKA, Takeo

所属研究機関名：慶應義塾大学

部局名：医学部 (信濃町)

職名：講師

研究者番号 (8 桁): 30445407

研究分担者氏名：沖 健司

ローマ字氏名：OKI, Kenji

所属研究機関名：広島大学

部局名：病院 (医)

職名：講師

研究者番号 (8 桁): 30638995

研究分担者氏名：向井 邦晃

ローマ字氏名：MUKAI, Kuniaki

所属研究機関名：慶應義塾大学

部局名：医学部 (信濃町)

職名：講師

研究者番号 (8 桁): 80229913

