

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09890

研究課題名(和文)体細胞モザイシズムを呈する原発性アルドステロン症の病変・病型形成機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms for development of culprit lesions in primary aldosteronism that exhibits somatic mosaicism

研究代表者

向井 邦晃 (Mukai, Kuniaki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：80229913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本課題は、アルドステロン産生病変を遺伝子変異による組織モザイクと捉え、副腎皮質が正常構造・機能から逸脱して、原発性アルドステロン症の病変形成に至る分子基盤の理解を目的とした。アルドステロン産生腺腫に体細胞変異として検出される変異を先天的に持った若年性原発性アルドステロン症の症例について、腫瘍部および非腫瘍部の遺伝子解析をおこなった結果、腫瘍部にセカンドヒットと推定される体細胞変異を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年アルドステロン産生腺腫にイオンチャネル・ポンプ遺伝子群の体細胞変異が報告され病変形成への関与が示された。しかし、これらの遺伝子変異が腫瘍形成にどのように関与するのか不明であった。本研究では、ファーストヒットである変異を先天的に持った副腎にセカンドヒットとして体細胞変異が生じることにより腫瘍化することが示唆された。本成果は原発性アルドステロン症の病変形成機構の一端を示す。

研究成果の概要(英文)： This study aims at understanding the molecular basis for formation of culprit lesions of primary aldosteronism, which exhibits somatic mosaicism developed from a normal adrenal. Using a tumor-bearing adrenal, which was excised from a primary aldosteronism patient carrying a germline mutation of KCNJ5, an additional mutation was identified from the tumor portion but not from the nontumor portions. The result suggests that the secondary mutation caused the rapid growth of the tumor.

研究分野：内分泌学

キーワード：アルドステロン ステロイドホルモン 副腎

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

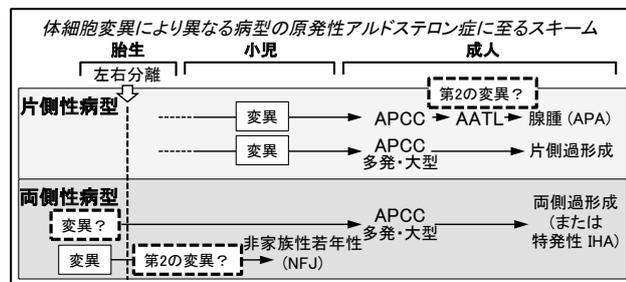
### 1. 研究開始当初の背景

正常副腎皮質は、被膜に並行して機能分化した球状層、束状層、網状層から構成され、これらと直角に同一系譜の細胞が被膜下から内奥方向へ配列する。この正常な組織構築の破綻として知られるのが、腺腫形成や過形成によるアルドステロン産生過剰を特徴とする原発性アルドステロン症の病態である。

原発性アルドステロン症については 2011 年以降、ヒトのアルドステロン産生腺腫 (APA) 症例の大半において、APA 部に特定のイオンチャネル・ポンプ遺伝子群の体細胞変異が生じていることが示されてきた (Choi 2011, Science 331:768 他)。変異によりアルドステロン産生が自律的になる。これらの研究は、正常組織と APA に関する重要な成果であるが、正常組織の破綻から原発性アルドステロン症の発症過程の詳細は不明であった。その原因は従来ヒトのアルドステロン産生細胞の組織化学的検出法が未確立であったためである。

研究代表者らは 2010 年にヒト CYP11B2 と CYP11B1 の免疫組織化学法を確立した。その結果、正常副腎皮質の層状機能構築を視覚化し、アルドステロン産生腺腫 APA、コルチゾール産生腺腫の病理学的確定診断法を提供した (Nishimoto 2010, JCEM 95:2296)。さらに予想外に正常及び非腫瘍部副腎の被膜下に CYP11B2 強陽性の細胞集塊 Aldosterone-producing cell-cluster (APCC) を発見した。研究代表者らは、APCC が APA の発生母地である可能性を考えた。実際、APCC が APA と同様な変異を持つことが判明した (Nishimoto 2015, PNAS 112:E4591)。研究代表者らは、片側性過形成によるアルドステロン過剰産生を示した副腎に、APCC から APA への進展を示唆する病変を検出した。変異解析と病変内分布の結果は、これらの病変が APCC から APA への移行病変 (AATL) であることを支持した (Nishimoto 2016, JCEM 101:6)。

研究代表者らが発見した APCC と、他グループによるイオンチャネル・イオンポンプ遺伝子群の変異が、過剰 ALDO 産生病変の形成に関わる。研究代表者は正常から原発性アルドステロン症への進展を体細胞変異が関与する組織リモデリングと捉え、「片側性病型 (APA と片側性過形成) は、発生上の左右分離以降の副腎皮質 (前駆) 細胞に生じる変異に起因する。両側性病型 (非家族性若年性型と両側過形成)



は、左右分離以前に生じる変異に起因する」というスキームを描いた。ここで、腺腫の形成が既知の変異だけでは説明できず、腺腫形成には第 2 の変異を含む未知の要因が想定された。

### 2. 研究の目的

本研究は、副腎皮質が正常構造・機能から逸脱して、原発性アルドステロン症の種々の病変・病型形成に至る分子基盤の全体像を理解することを目指す。近年アルドステロン産生腺腫症例にイオンチャネル・ポンプ遺伝子群の体細胞変異が判明し、病変形成への関与が示された。一方研究代表者らは正常副腎に自律的アルドステロン産生細胞集塊 APCC を発見して、これが片側過形成病型に関与すること、「移行性病変 AATL」を検出してアルドステロン産生腺腫へ至るスキームを示した。しかし、腫瘍形成及び両側過形成の詳細は不明であるので病態全貌の解明には至っていない。本課題の目的は、過剰アルドステロン産生病変を、個体発生過程に生じる体細胞変異による組織モザイクと捉え、セカンドヒットを含む腫瘍形成、さらに両側過形成の病変形成の分子機序を示すことである。

### 3. 研究の方法

若年性・両側性の原発性アルドステロン症患者の 1 例は、幼少期に原発性アルドステロン症と診断され、左副腎の肥大が認められたため思春期に左副腎が摘出された。その後も血漿アルドステロン値が高いままで、成人後に右副腎に 2 個の腫瘍が検出された。一方の腫瘍の増殖が顕著であったため右副腎の摘出が行われた。術後、合成副腎皮質ステロイド剤の補充のもとで血漿アルドステロン値は正常となった。本研究の主な解析は 2 度目の手術で摘出された右副腎を用いて行われた。本研究におけるヒトサンプルの扱いは、臨床研究に関する倫理指針等を遵守して倫理委員会の承認のもとに実施された。

ヒト副腎組織からホルマリン固定パラフィン包埋標本が作製され、これを試料としてアルドステロン合成酵素 CYP11B2 の他、コルチゾールの合成酵素 CYP11B1 などのステロイド合成酵素の免疫組織化学染色を行い、アルドステロン産生細胞および過剰アルドステロン産生病変を検出した。副腎の非腫瘍部と腫瘍部、血液から調製した DNA に関する全エクソーム解析を次世代シーケンサーにより解析を行った。KCNJ5 遺伝子の部分塩基配列は Sanger 法により解析した。切片を用いて質量分析イメージングを行った。凍結組織から調製した総 RNA を用いてマイクロアレイによりトランスクリプトーム解析を行った。

50 歳以上で様々な病気により亡くなった患者（原発性アルドステロン症患者は含まれない）の副腎における CYP11B2 染色部位の計測は、パラフィン包埋標本を用いて、陽性球状層の厚さおよび APCC のサイズ・数について、CYP11B2 免疫組織化学染色により得られた画像上で ImageJ ソフトウェアを用いて実施した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 若年性・両側性の原発性アルドステロン症：*de novo* 変異による家族性 3 型

若年性・両側性の原発性アルドステロン症の 1 例では、最初の手術で左副腎が摘出され、2 度目の手術で残された右副腎が摘出された。右副腎は、2 個の肉眼的な腫瘍（大と小）と複数の結節が認められた。本症例は *KCNJ5* 遺伝子の変異を原因とする家族性原発性アルドステロン症 3 型が疑われたため、副腎から複数の非腫瘍部、腫瘍大、腫瘍小、さらに血液と毛髪から DNA が調製された。*KCNJ5* 遺伝子の配列解析により、いずれの組織からも変異が検出された。一方で両親の血液から調製された DNA には当該変異が検出されなかった。以上から、家族性原発性アルドステロン症 3 型であるが、両親の一方の生殖細胞に生じた変異による *de novo* 変異により患者本人から発症する家族性原発性アルドステロン症 3 型であり、日本国内では初の報告例となることが判明した。

2 個の腫瘍は、病理学的所見と Weiss スコア等から副腎皮質癌でなく、腺腫の診断であった。両者とも CYP11B2 陽性であったことからアルドステロン産生腺腫と判明した。非腫瘍部の副腎皮質は不規則な細胞の配列を持ち、多くの CYP11B2 陽性細胞が検出された。最初の手術で摘出された左副腎も不規則な細胞の配列、多数の CYP11B2 陽性細胞を示した。

次に、組織中のアルドステロンの局在を質量分析イメージングにより検出した。アルドステロンは、非腫瘍部の被膜下に主に検出され、腫瘍部にはほとんど検出されなかった。これは、CYP11B2 が非腫瘍部の全体、腫瘍部に広く局在したことは一致しない結果であった。18-oxo コルチゾールの局在はアルドステロンと一致した。本症例の非腫瘍部・腫瘍部の *CYP11B2* mRNA レベルは、他の症例 (n=16) の APA と同レベルで高い発現ことが確認され、CYP11B2 免疫染色のシグナルと矛盾はなかった。*KCNJ5* は正常副腎皮質では被膜下に局在するのに対して、本症例では変異 *KCNJ5* 遺伝子が非腫瘍部の全体と腫瘍部に発現し、CYP11B2 も誘導した。

副腎の非腫瘍部と腫瘍部、血液から調製した DNA に関する全エクソーム解析を行った結果、いずれの DNA にも上述 *KCNJ5* 遺伝子 p. G151R 変異が検出された。腫瘍部に  $\beta$ -カテニン遺伝子 (*CTNNB1*) の変異が検出され、非腫瘍部と血液 DNA には検出されなかった。この変異が腫瘍を急速に成長させたい。非腫瘍部と腫瘍部から調製した RNA を用いたマイクロアレイ解析により細胞増殖関連遺伝子の mRNA レベルが増加していた。アルドステロン合成経路に関与するステロイド合成酵素群の mRNA レベルについては、非腫瘍部と腫瘍部で差異が認められなかった。アルドステロンが非腫瘍部の被膜下に検出され、非腫瘍部の内奥部と腫瘍に検出されなかったという結果は、合成経路を構成する遺伝子の発現調節によるのではなく、他のメカニズム、例えば基質の供給系あるいは生成物の運搬系による制御、が機能している可能性がある。

本研究では、ファーストヒットである *KCNJ5* 変異を持つ副腎を用いたことにより、腫大化が顕著な腫瘍部を用いて *CTNNB1* 遺伝子変異が検出された。これが腫瘍化のセカンドヒットであることが示唆された。本研究からは次の疑問が提示された。腫瘍部と非腫瘍部でステロイド合成酵素群の mRNA レベルは同等であるが、アルドステロン合成能は腫瘍部で低く、非腫瘍部被膜下で高いことは予想外の結果である。アルドステロン合成制御には未知のメカニズムが関わっていることが示唆された。

##### (2) 正常副腎におけるアルドステロン合成酵素の発現と病死時の年齢の逆相関

APCC の多発および大型化が過剰アルドステロン産生を起こすことから、PA を来していないヒトの病死時における APCC 形成の程度（頻度とサイズ）と死亡年齢の相関を解析した。近年研究代表者らは、小児から 50 歳までで様々な病気による死亡時年齢と APCC 形成との間には正の相関があることを見出していた。本研究では 50 歳以上で病死したヒトの副腎サンプルを用いて APCC 形成との相関を解析した。その結果、長命者では APCC 形成を含めて ALDO 産生能が低いことが判明した。この結果は血中 ALDO 濃度が低いヒトは結果的に長命となることを示している。

本研究では、生殖細胞変異としてファーストヒットである *KCNJ5* 変異を持つ症例を解析したことにより、成長が顕著な副腎腫瘍部を用いて *CTNNB1* 遺伝子変異が検出された。これが腫瘍化のセカンドヒットであることが示唆された。本研究からは次の疑問が提示された。腫瘍部と非腫瘍部でステロイド合成酵素群の mRNA レベルは同等であるが、アルドステロン合成能は腫瘍部で低く、非腫瘍部被膜下で高いことは予想外の結果である。アルドステロン合成制御には合成経路を構成する酵素遺伝子の発現調節以外の未知のメカニズムが関わっている可能性があり、今後課題となった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hayashi, T., Zhen, Z., Al-Eyd, G., Sasaki, A., Yasuda, M., Oyama, M., Gomez-Sanchez, C., Asakura, H., Seki, T., Mukai, K., Nishimoto, K.	4. 巻 191
2. 論文標題 Expression of aldosterone synthase CYP11B2 was inversely correlated with longevity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Steroid Biochem. Mol. Biol.	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） 10.1016/j.jsbmb.2019.04.010	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 Ashikari, D., Tawara, S, Sato, K., Mochida, J, Masuda, S., Mukai, K., Turcu, A., Nishimoto, K., Yamaguchi, K., Takahashi S.	4. 巻 2
2. 論文標題 Ectopic adrenal adenoma causing gross hematuria: Steroidogenic enzyme profiling and literature review	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 IJU Case Reports	6. 最初と最後の頁 158-161
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/iju5.12068	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 該当する
1. 著者名 Zhang, Z., Sugiura, Y., Mune, T., Nishiyama, M., Terada, Y., Mukai, K., Nishimoto, K.	4. 巻 28
2. 論文標題 Immunohistochemistry for aldosterone synthase CYP11B2 and matrix-assisted laser desorption ionization imaging mass spectrometry for in-situ aldosterone detection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Opinion in Nephrology and Hypertension	6. 最初と最後の頁 105-112
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MNH.0000000000000487	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 向井邦晃	4. 巻 72
2. 論文標題 ステロイドホルモン合成の基礎とその制御	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 臨床泌尿器科	6. 最初と最後の頁 410-415
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 Kometani, M., Yoneda, T., Demura, M., Koide, H., Nishimoto, K., Mukai, K., Gomez-Sanchez, C.E., Akagi, T., Yokota, T., Horike, S.I., Karashima, S., Miyamori, I., Yamagishi, M., Takeda, Y.	4. 巻 7
2. 論文標題 Cortisol overproduction results from DNA methylation of CYP11B1 in hypercortisolemia	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	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/s41598-017-11435-2	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 該当する
1. 著者名 Uchida, N., Amano, N., Yamaoka, Y., Uematsu, A., Sekine, Y., Suzuki, M., Watanabe, J., Nishimoto, K., Mukai, K., Fukuzawa, R., Hasegawa, T., Ishii, T.	4. 巻 1
2. 論文標題 A novel case of somatic KCNJ5 mutation in pediatric-onset aldosterone-producing adenoma	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J. Endocr. Soc.	6. 最初と最後の頁 1056-1061
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/js.2017-00210	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 西本紘嗣郎、林 泰樹、北村陽典、内田 厚、向井邦晃	4. 巻 24
2. 論文標題 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	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 血圧	6. 最初と最後の頁 861-968
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 Tanaka, T., Aoyagi, C., Mukai, K., Nishimoto, K., Kodama, S., Yanase, T.	4. 巻 161
2. 論文標題 Extension of survival in bilaterally adrenalectomized mice by implantation of SF-1/Ad4BP-induced steroidogenic cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 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) 10.1210/endo/bqaa007	査読の有無 有
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 Sato, M., Sugiyama, K., Maeda, N., Fujiki, J., Ieko, T., Kawamura, Y., Iwano, H., Mukai, K, Yokota, H.	4. 巻 201
2. 論文標題 Local biosynthesis of corticosterone in rat skeletal muscle	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Steroid Biochem. Mol. Biol.	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) 10.1016/j.jsbmb.2020.105693	査読の有無 有
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6件 (うち招待講演 1件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 林 泰樹、Zhen Zhang、Ghaith Al-Eyd、佐々木惇、安田政実、小山政史、Celso E. Gomez-Sanchez、朝倉博孝、関 次男、向井邦晃、西本紘嗣郎
2. 発表標題 アルドステロン合成酵素CYP11B2の発現は長命と逆相関する
3. 学会等名 第31回日本内分泌外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 向井邦晃、西本紘嗣郎、荻島正
2. 発表標題 アルドステロン産生細胞クラスターの形成と進展
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 van de Wiel E.C.J., Kusters B., Veltien A., Mann R., Mukai K., Deinum J., Langenhuijsen J.H.
2. 発表標題 New perioperative imaging techniques, immunohistochemistry and genetic analysis to investigate the feasibility of laparoscopic partial adrenalectomy in primary aldosteronism
3. 学会等名 The 36th World Congress of EndoUrology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hayashi, T., Zhen, Z., Aleyd, G., Sasaki, A., Yasuda, M., Oyama, M., Gomez-Sanchez, C., Asakura, H., Seki, T., Mukai, K., Nishimoto, K.
2. 発表標題 Senescence associated decrease of aldosterone-producing cell cluster and incidental aldosterone-producing adenoma
3. 学会等名 The 18th Conference on Adrenal Cortex (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hayashi, T., Zhang, Z., Al-Eyd, G., Sasaki, A., Yasuda, M., Oyama, M., Gomez-Sanchez, C.E., Asakura, H., Seki, T., Mukai, K., Nishimoto, K.
2. 発表標題 APCC Regresses and Incidental APA Appears with Senescence
3. 学会等名 The 100th Endocrine Society Annual Meeting (ENDO 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 van de Wiel, E.C.J., van Bonzel, L.G., Deinum, J., Mukai, K., Kusters, B., Langenhuijsen, J.H.
2. 発表標題 Structural changes in the zona glomerulosa of normal aging adrenals
3. 学会等名 The 35th Annual European Association of Urology Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 向井 邦晃 (総編集 南学 正臣 部門編集 伊藤 裕、下村伊一郎)	4. 発行年 2019年
2. 出版社 中山書店	5. 総ページ数 3672
3. 書名 内科学書 改訂第9版 vol.5 内分泌疾患 代謝・栄養疾患	

〔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
研究 分 担 者	西本 紘嗣郎  (Nishimoto Koshiro)  (00365363)	埼玉医科大学・医学部・准教授     (32409)	