

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 3 年 6 月 6 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17992

研究課題名（和文）アルドステロン産生細胞クラスターの成因と食塩感受性高血圧における意義の解明

研究課題名（英文）Analysis of relationship between APCC formation and salt-sensitive hypertension

研究代表者

三石 木綿子（Mitsuishi, Yuko）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：60468486

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）：アルドステロン産生細胞クラスター（APCC）は、加齢とともに増加することが報告されているが、原発性アルドステロン症などの高血圧性病態を呈する機能性副腎腫瘍におけるプロフィールおよびその成因については、未だ十分に解明されていない。本研究では、当院で手術治療を受けた副腎腫瘍64例を対象に、病理標本におけるAPCCのサイズおよび数を定量し、ホルモン値を含めた各種パラメーターとの関連性について評価を行った。アルドステロン産生腺腫および褐色細胞腫におけるAPCC形成は生理的制御下にある一方、特発性アルドステロン症におけるAPCCは、病的な形成過程を経てその病態形成に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

APCCは、2010年から唱えられるようになった副腎皮質球状層の新しい構造的な概念であり、これが生理的なホルモン動態に関与しているのか、何らかの病的意義があるのかは、未だに結論が出ていない。原発性アルドステロン症や褐色細胞腫（二次性アルドステロン症）など複数の機能性副腎腫瘍を比較して、APCCの意義および成因について検討した研究・報告はこれまでになく、標本数が豊富な当院のアドバンテージを活かして、本検討を行った。本研究結果から、病態によってAPCCの意義が異なることが明らかになり、今後の高血圧性疾患の病態解明および新規治療アプローチの開発につながる成果であったと考えている。

研究成果の概要（英文）：It has been reported that aldosterone producing cell cluster (APCC) develops with aging, but little is known about biological significance and determinants of APCC formation in hypertensive functional adrenal tumor such as primary aldosteronism. We conducted quantification of APCC size and count on pathological samples of 64 adrenal tumors in our hospital and analyzed correlation of APCC profiles and several parameters including hormone levels. Our findings suggest that APCC forms under physiological control in the subjects of aldosterone producing adenoma and pheochromocytoma while APCC is involved in abnormal secretion of aldosterone in the subjects of idiopathic hyperaldosteronism.

研究分野：内分泌学

キーワード：アルドステロン 高血圧 副腎腫瘍

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

1．研究開始当初の背景

本邦における高血圧患者は、約 4000 万人に昇り、脳卒中、心不全、冠動脈疾患など、健康長寿を阻む疾患群の最も大きなリスク因子の 1 つとなっている。高血圧患者の多くは食塩感受性であり、食塩と血圧上昇を密接に結びつける因子として、アルドステロンが注目されている。アルドステロンは副腎皮質球状層から分泌されるホルモンの 1 つであり、腎臓のみならず腸管においても作用し、体内に Na 貯留をもたらすことで血圧上昇に寄与することを、我々の研究グループが報告している（Nakamura et al. J Am Heart Assoc, 2018）。アルドステロンは、通常レニンによる分泌調節を受け、過剰な食塩摂取下では、レニン分泌が抑制されるため、アルドステロンも低下し、血圧上昇を防ぐネガティブフィードバック機構の制御下にある。食塩感受性高血圧患者では、このネガティブフィードバック機構が破綻し、過剰な食塩摂取下でもアルドステロンの十分な抑制が見られないことがその機序として想定され、何らかのアルドステロンの自律性分泌機構が存在することが示唆される。原発性アルドステロン症（primary aldosteronism、以下 PA と略す）は、アルドステロンの自律性過剰分泌を来す代表疾患である。

近年、PA の病理診断において、アルドステロン合成酵素である CYP11B2 の特異的染色の技術が確立し、その組織染色を用いて副腎組織における CYP11B2 発現部位すなわちアルドステロン産生部位の分布が正確に把握できるようになった。大変興味深いことに、成人の副腎皮質球状層は、従来考えられていたような全周性にアルドステロンを産生しているのは稀で、多くは島状に分布する領域でのみアルドステロン産生していることが明らかとなった。そのクラスターとして存在する島状の領域をアルドステロン産生細胞クラスター（aldosterone-producing cell cluster、以下 APCC と略す）と命名し、副腎皮質球状層における新しい構造的な概念として、本学医化学教室より提唱している（Nishimoto et al. J Clin Endocrinol Metab, 2010）。その後、APCC は加齢とともに増加することも明らかとなったが（Nishimoto et al. Int J Endocrinol, 2016）この APCC 形成の高血圧への関与については、未だ十分に検討されておらず、その病的意義も不明である。さらに、APCC 形成の成因・規定因子は何か、加齢以外に形成に関わる因子は存在するのかという問いも依然未解明である。

APCC については、近年、別の角度から興味深い報告がなされている。2011 年に、PA の腫瘍部に高頻度に見られる KCNJ5 遺伝子変異の報告（Choi et al. Science, 2011）がなされて以来、次世代シーケンサー（NGS）を用いた解析を通じて、CACNA1D や ATP2B3 など複数の PA 関連の遺伝子変異が報告されているが、一部の APCC においても同様の遺伝子変異を認めることが報告された（Omata et al. J Endocr Soc, 2017）。PA 関連の遺伝子変異の一部は、食塩摂取量との関連が疫学的に示唆されている（Lenzini et al. J Clin Endocrinol Metab, 2015）。

2．研究の目的

本研究では、様々なホルモン動態を呈する副腎腫瘍の病理組織を用いて、APCC 形成とホルモン異常および高血圧病態との関連性を検討・考察し、APCC 形成を規定する因子および高血圧発症における APCC の意義を明らかにすることを目的とする。

本研究を通じて、APCC 形成の新たな規定因子が同定され、また生理的・病的意義も明らかになった場合は、今後の食塩感受性高血圧発症の機序およびその制御機構への介入治療の可能性をもたらしてくれることが期待される。

3．研究の方法

（1）病理組織標本の免疫組織化学染色

当院で手術摘出した副腎腫瘍の病理組織標本を用い、各症例において複数枚の腫瘍部を含む組織標本を抽出し、CYP11B1 及び CYP11B2 に対する特異抗体を用いて免疫組織化学染色を行う。前者は茶色、後者は赤色で発色される（右図）。CYP11B2 陽性部位（赤色）がアルドステロン産生部位として同定される。

（2）APCC の特定

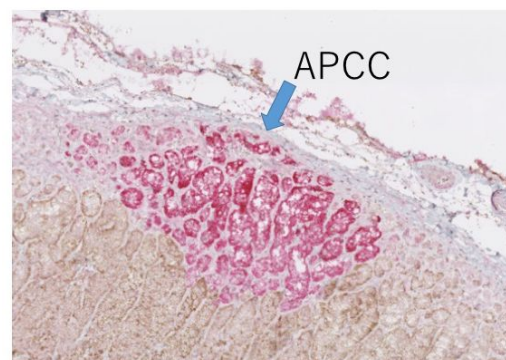
これらの染色後標本をバーチャルスライドスキャナー Nanozoomer-XR で画像ファイル化し、専用ソフト Image Pro にて画像解析（染色部位の定量化）を行う。下記の基準を満たすものを APCC と定義し、その数及びサイズの定量化を行う。

< APCC の定義 >

- ・ CYP11B2 染色陽性（赤色）
- ・ 正常副腎皮質球状層（被膜と連続性がある CYP11B1 陰性領域）に位置する
- ・ 非腫瘍部である

（3）APCC に関する解析

収集した APCC の情報と臨床情報の関連性につき、統計解析を行う。2 群間の有意差検定は各パラメーターが正規性を示す場合は t 検定を用いて、また正規性を示さない場合はノンパラメトリック検定（Mann-Whitney U 検定）を用いて行う。3 群間の比較は、ANOVA の後、Bonferroni



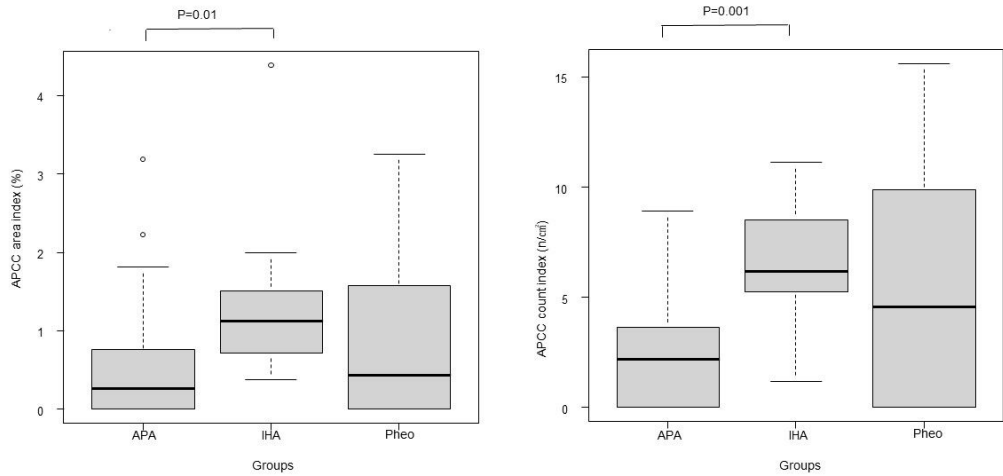
検定を用いて行う。また、連続変数における 2 つのパラメーター間の相関は、正規性を示す場合は Pearson 検定を用いて、正規性を示さない場合は Spearman 検定を用いて検討する。カテゴリー変数における 2 つのパラメーター間の相関は、カイ 2 乗検定を用いて検討する。いずれの検定においても、 $P<0.05$ を有意とする。

4. 研究成果

PA は、片側副腎のみからアルドステロンが過剰分泌されるアルドステロン産生腺腫 (aldosterone producing adenoma、以下 APA と略す) と両側副腎からアルドステロンが過剰分泌される特発性アルドステロン症 (idiopathic hyperaldosteronism、以下 IHA と略す) の 2 つの病型に大別される。IHA は通常、手術適応とはならないが、副腎腫瘍を合併した場合は手術の対象となることがある。本検討では、当院にて手術加療を受けた副腎腫瘍 64 例を対象として上記の解析を行った。内訳は、APA 38 例、IHA 11 例、褐色細胞腫 (pheochromocytoma、以下 Pheo と略す) 15 例であった。APCC の特性については、APCC 面積指数および APCC カウント指数を用いて評価した。画像解析ソフト Image Pro を用いて、APCC 面積および個数を客観的に算定し、それぞれを副腎皮質面積で除した値を APCC 面積指数、APCC カウント指数とした。

結果を示す。下図のとおり、APCC 面積指数、APCC カウント指数ともに、APA 群では IHA 群に比して有意に低値であった。Pheo 群では、いずれの指数とも IHA 群と APA 群の中間的な値を示し、どちらの群とも有意差は認めなかった。

図 Boxplot of APCC area index and count index for adrenal tumor groups



続いて、各群における APCC 形成の規定因子を明らかにするため、APCC 両指数と各種パラメーターとの相関関係の検討を行った。下表に結果の一部を示す。

Pheo 群においては、APCC 面積指数、APCC カウント指数いずれも、年齢と強い正の相関が

表 Correlation between APCC area index and each parameter

	APA (n=38)		IHA (n=11)		Pheo (n=15)	
parameter	rho	p value	rho	p value	rho	p value
Age	0.26	0.12	-0.57	0.15	0.82	<0.002
診断時PAC	-0.09	0.67	0.79	0.003	0.86	<0.001
術直前PAC*	0.24	0.15	0.11	0.75	0.72	0.002
ARC	0.08	0.63	0.44	0.20	-0.41	0.13
ACTH	-0.24	0.17	-0.21	0.57	0.43	0.11
serum K	-0.03	0.83	0.58	0.11	-0.15	0.59

* このPAC値は、MR拮抗薬内服下のPAC

認められた。また両指数は、血漿アルドステロン濃度 (plasma aldosterone concentration、以下 PAC と略す) と強い正の相関が認められた。このことから、Pheo に代表される二次性アルドステロン症の病態においては、APCC がアルドステロン分泌の主たる産生源であると考えられた。

IHA 群では、APCC 面積指数と診断時 PAC との間に強い正の相関が認められた一方、術直前 PAC とは相関関係を認めなかった。PA の病態では、一般に診断後手術までの期間、ミネラルコルチコイド受容体 (mineralocorticoid receptor、以下 MR と略す) 拮抗薬が投与される。MR 拮抗薬が投与されると、アルドステロン分泌に対するネガティブフィードバックが解除され、アルドステロン分泌は上昇する傾向を示す。術直前 PAC は MR 拮抗薬内服下の PAC 値であり、この値との相関はないことから、IHA における APCC は、MR 拮抗薬投与後のダイナミックなアルドステロン分泌は反映しておらず、IHA の本来の病勢との関連が強いことが示唆された。Pheo 群とは対照的に、IHA 群では APCC と年齢の間に相関関係は認めなかった。このことは、Pheo 群の APCC は生理的な形成過程を経ているのに対し、IHA 群の APCC は病的な形成過程を経ている可能性を示唆するものと考えられた。

APA 群では、APCC と PAC 値の間に相関関係は認めず、APA の腫瘍部面積と PAC が関連していた。APA 群で APCC 面積指数および APCC カウント指数が低下していた結果と合わせて考えると、APA 群では、腫瘍部からアルドステロン過剰によるネガティブフィードバックを反映して、APCC が縮小していると考えられた。

APCC 形成に影響を与える因子として、血漿レニン濃度 (active renin concentration、以下 ARC)、ACTH、K 値に関する検討も行ったが、いずれも APCC 面積指数・APCC カウント指数と有意な相関関係は認められなかった。上述の分析からは、Pheo 群および APA 群の APCC は、生理的な副腎皮質球状層機能を反映していることが予想されたが、主たるアルドステロン分泌調節因子である ARC との強い相関はなかった。ACTH や K 値も、アルドステロン分泌の調節因子であるため、複合的な影響により、相関関係が消失したと考えられた。

以上の結果を総合的に解釈すると、IHA 群における APCC のみ、他の群の APCC と異なり、病的な動態を反映していることが示唆され、APCC の個数および面積が IHA の病勢を決定している主たる因子であると考察できる。IHA 群における APCC が、なぜ病的な動態を呈するかについては明らかにできていないが、PA 関連遺伝子の変異など分子病態機序が背景にあると推測される。本研究は、そのことの病理組織学的裏付けを示すことができたと考えている。異なる機能性副腎腫瘍の APCC プロファイルについて解析した研究は、国内外でも本研究が初めてであり、本研究成果を海外に向けて発信し、APCC 形成および IHA 発症機序のさらなる探求、新規治療介入への糸口の解明につなげていきたい。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1．発表者名 大島洋一、栗原勲、横田健一、小林佐紀子、武田彩乃、三石木綿子、宮下和季、伊藤裕
2．発表標題 FDG-PET-CTにおける両側副腎の集積亢進を契機に原発性アルドステロン症の診断に至った一例
3．学会等名 日本高血圧学会
4．発表年 2019年

1．発表者名 上妻崇英、栗原勲、小林佐紀子、横田健一、武田彩乃、三石木綿子、乃村元子、高畑尚、宮下和季、武田利和、大家基嗣、亀山香織、伊藤裕
2．発表標題 増大する副腎嚢胞に対して副腎部分切除術を行った1例
3．学会等名 日本内分泌学会雑誌
4．発表年 2019年

1．発表者名 乃村元子、栗原勲、小林佐紀子、横田健一、宮下和季、武田彩乃、三石木綿子、高畑尚、南悠季子、齋藤洸平、上妻崇英、中塚誠之、武田利和、伊藤裕
2．発表標題 原発性アルドステロン症の副腎部分切除術選択における区域別副腎静脈サンプリングの有用性
3．学会等名 日本高血圧学会臨床高血圧フォーラム
4．発表年 2019年

1．発表者名 安田 格、栗原 勲、宮下 和季、小林 佐紀子、横田 健一、三石 木綿子、川合 未来、伊藤 智章、吉本 憲史、安田 麻里絵、武田 利和、伊藤 裕
2．発表標題 薬物治療下で心肥大と心機能低下の進行を認めたアルドステロン産生腺腫の1例
3．学会等名 第30回臨床内分泌代謝update
4．発表年 2020年

1. 発表者名 大島 洋一, 栗原 勲, 伊藤 智章, 横田 健一, 小林 佐紀子, 武田 彩乃, 三石 木綿子, 宮下 和季, 伊藤 裕
2. 発表標題 アルドステロン過剰産生を反映すると考えられたFDG-PET両側副腎集積亢進の一例
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
---------	---------