

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461387

研究課題名(和文) 構成的アルドステロン産生に着目した副腎皮質リモデリングの分子機構

研究課題名(英文) Adrenocortical remodeling develops autonomous production of aldosterone

研究代表者

向井 邦晃 (MUKAI, KUNIAKI)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・専任講師

研究者番号：80229913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：アルドステロンは、体液量保持に不可欠な役割を持つステロイドホルモンとして副腎皮質で合成される。ヒト副腎からの過剰なアルドステロン産生は、原発性アルドステロン症を起こす。本研究では、副腎皮質に過剰アルドステロン産生病変が形成される過程に着目して、アルドステロン産生部位と体細胞変異の解析を行った。その結果、近年研究代表者らがヒト正常副腎皮質に発見した自律的アルドステロン産生細胞クラスターは、思春期以降に生じること、それらの一部はイオンチャネル・ポンプ遺伝子の体細胞変異を伴って腺腫形成へ至る移行性病変へ変化することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Aldosterone is secreted from adrenal cortex in mammals and has an essential role for homeostasis of body fluid volume. Formation of excessive aldosterone-producing lesions such as adrenal adenomas causes primary aldosteronism in humans. This study focused on pathogenesis of primary aldosteronism and examined excessive aldosterone-producing lesions from patients by using histochemical methods and gene mutation analyses. The results suggested that an aldosterone-producing cell-cluster, which we previously discovered in normal human adrenal cortex, could develop to a transitional lesion further growing to an adenoma. Somatic mutations of a group of ion channel/pump genes were likely to play key roles for development from an aldosterone-producing cell-cluster to an adenoma through such a transitional lesion.

研究分野：生化学

キーワード：アルドステロン ステロイドホルモン 副腎

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 副腎皮質の細胞層構築の形成・維持と破綻

器官・組織の機能に関する分子レベルの理解が進む一方で、器官・組織の形成と維持、さらに破綻に関わる分子・細胞レベルの理解は十分ではない。

正常副腎皮質では、被膜に並行して機能分化した細胞層である球状層、束状層、網状層が形成され、これらと直角にクローナルな細胞が被膜下から内奥方向へ配列する。近年マウスにおいて正常副腎皮質の層形成・維持は、被膜細胞の実質前駆細胞への分化、さらに実質細胞への分化と内奥方向への移動によることが示され、層状機能分化の大筋が判明した。

一方、ヒトのアルドステロン産生腺腫 APA 症例の半数程度に、イオンチャネル・ポンプ遺伝子 4 種のいずれかに体細胞変異が報告された。これらの変異は形質膜イオン輸送体の機能欠損をもたらし、アンギオテンシン II 刺激が持続した状態を起こす。細胞を用いた実験より、アルドステロン産生が自律性になることが示された。

これらの研究は、正常組織と腺腫に関する重要な成果であるが、正常組織の層形成・維持から逸脱し、腺腫に至る過程については不明の点が多い。

### (2) 新しいアルドステロン産生様式

従来、ヒト正常副腎皮質の層状機能分化構築は、組織化学的方法では明確に示されていなかった。研究代表者は、球状層の特異的マーカーであるアルドステロン合成酵素 (CYP11B2) と束・網状層の特異的マーカーであるコルチゾールの合成酵素 (CYP11B1) の免疫組織化学法の確立により、正常副腎皮質の層状構築だけでなく、アルドステロン産生腺腫 APA、コルチゾール産生腺腫をそれぞれの最も特異的なマーカー分子の局在によって同定した。この検出方法は、腫瘍の機能的評価を行える点において従来の方法に比べ格段に信頼性の高い方法であることから、副腎腫瘍の病理学的確定診断法となった。

予想外なことに、既知のアルドステロン産生様式だけでなく、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。APCC の CYP11B2 発現は、球状層の CYP11B2 陽性細胞と異なっていた。すなわち、APCC 構成細胞は全て CYP11B2 強陽性であるのに対して、球状層ではアンギオテンシン II 刺激等に応答している細胞のみが点在状に CYP11B2 陽性細胞である。研究代表者は、APCC を正常副腎皮質の構築・維持の制御からの逸脱した細胞集団と捉え、これを対象として研究することにより、細胞機能と組織構築、さらにそれらの破綻に関する分子機構を解明できると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究は、組織における細胞機能と組織構築の統御、そこからの逸脱に関わる分子機構の解明により、正常組織の形成・維持から病態に至る分子基盤の理解を目指す。研究代表者らは、ヒトの正常及び非腫瘍部副腎には、自律的にアルドステロンを産生する細胞集塊 APCC が生じることを示した。本研究では、これを正常組織からの逸脱と考え、APCC を対象に、副腎皮質の機能分化細胞層の形成・維持、破綻に関わる分子機構を解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

原発性アルドステロン症患者から摘出された副腎組織、および、正常副腎組織から作製されたホルマリン固定パラフィン包埋標本を試料とした。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するため、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った。スライドガラス上へ薄切された副腎から組織を掻き取り、DNA を調製した。アルドステロン産生腺腫 APA において報告されたイオンチャネル・ポンプ遺伝子 4 種の体細胞変異と変異近傍の配列について、次世代シーケンサーにより変異解析を行った。正常副腎に検出された APCC の計測には、免疫組織化学染色により得られた画像について ImageJ 1.50e ソフトウェアを用いた。本研究は、慶應義塾大学医学部倫理委員会の承認のもとに、臨床研究に関する倫理指針等を遵守して実施された。

## 4. 研究成果

(1) 近年アルドステロン産生腺腫 (APA) にイオンチャネル・ポンプ遺伝子 4 種の体細胞変異が報告され、アルドステロン産生の自律性に関与することが示された。APCC は正常副腎皮質において構成的にアルドステロンを産生することが推定される細胞集塊であることから、研究代表者は APCC が高い増殖能を獲得することにより APA へ進展することを想定した。

原発性アルドステロン症により摘出されたが、明らかな腺腫が認められない副腎に対してアルドステロン合成酵素 CYP11B2 の免疫組織化学を行ったところ、APCC 様部位と微小 APA 様部位から構成される病変が検出された。これらの病変の形態及び性状から、仮称として「APCC から APA への移行病変 (possible APCC-to-APA transitional lesion, pAATL)」と呼び、体細胞変異の解析対象とした。複数の pAATL における APCC 様部位と微小 APA 様部位からそれぞれ組織を掻き取り DNA を調製した。イオンチャネル・ポンプ遺伝子 4 種について APA に検出された既知の体細胞変異近傍を次世代シーケンサーにより解析した。

図 1 に示すように、一部の pAATL では、APCC

部位と微小APA部位に同一変異が検出された。この結果は、APCC様部位と微小APA様部位が同一細胞から生じたことを示唆する。他のpAATLでは、APCC部位には変異は検出されなかったが、その内奥の微小APA部位には既知の変異が検出された。この結果は、APCCの一部に体細胞変異が生じて微小APA形成に関与することを示唆する。これらの結果は、APCCからpAATLを経てAPAが生じる仮説を支持する。

上記の結果から、APCC形成と体細胞変異は、正常副腎皮質の細胞層形成・維持からの逸脱に関わる分子機構の一端を示す。

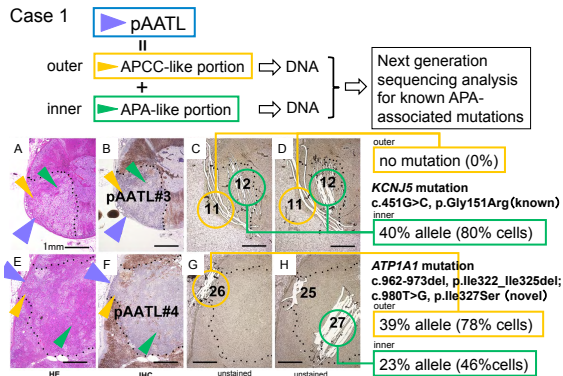


図1 APCCからAPAへの移行性病変の検出と体細胞変異の解析 CYP11B2 および-B1 の二重染色によりAPCC様部位と微小APA様部位から構成される病変が検出された。これらを「APCCからAPAへの移行性病変」(possible APCC-to-APA transitional lesion, pAATL)と名づけて、体細胞変異の解析対象とした。pAATL3とpAATL4のAPCC様部位と微小APA様部位からそれぞれ組織を掻き取りDNAを調製し、イオンチャンネル・ポンプ遺伝子4種についてAPAに検出された既知の体細胞変異近傍を次世代シーケンサーにより解析した。A, E 一般組織化学染色、B, F 二重免疫組織化学染色、C, D, G, H 未染色切片からのDNA調製部位。スケールバーは1mmを示す。

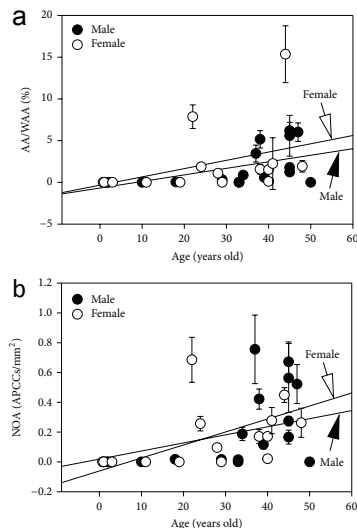


図2 正常副腎(0-50歳)に生じるAPCCの面積と数 (a)APCCの面積割合 (APCC area (AA) per whole adrenal area, (WAA)), (b)APCC形成頻度 (NOA, number of APCC)

(2) 上述のようにAPCCは正常組織と過剰アルドステロン産生を結び付ける組織構造で

あることが示された。これまで正常副腎にAPCCがどのように形成されるのかについて情報が無いことから、小児から成人の正常副腎(剖検例)についてAPCCの検出を行い、年齢とAPCC形成の関係を検討した。

解析の結果、小児の副腎では層状機能分化が認められ、APCCは検出されなかった。また、思春期以降にAPCCが検出され、成人ではAPCCの数と総面積が年齢と共に増加することが判明した(図2)。加齢に伴うAPCCの形成の増加・増大は、原発性アルドステロン症の発症時期の大多数が中高年であることと一致した。

(3) 稀な非家族性若年性の原発性アルドステロン症の1例について解析を行った(図3と図4)。

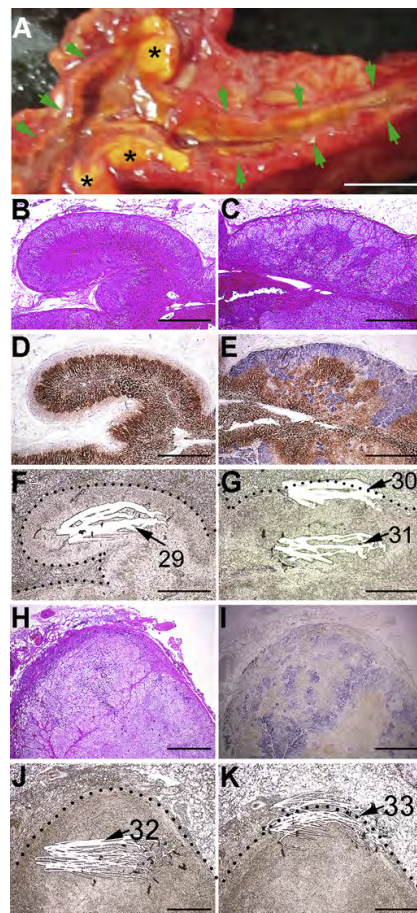


図3 非家族性若年性原発性アルドステロン症の1例肉眼的(A)、一般組織化学的(B, C, H)、および、免疫組織化学像(D, E, I)、および、未染色切片からのDNA調製部位(F, G, J, K内の矢)。Aの(\*)と矢は、それぞれ腺腫と正常部を示す。スケールバーは5mm(A)、1mm(B-K)を示す。

両側副腎(片側は部分切除)とも過剰アルドステロン産生病変として非APA部位とAPA部位を持っていた。これらの病変部位には次世代シーケンサーによる解析により、両側とも同一の体細胞変異(KCNJ5 c.451G>A)が検出された。両側のアルドステロン過剰産生部位に同一の体細胞変異が検出されたことは、副腎皮質の発生過程を考慮したとき、中胚葉

形成期までに体細胞変異が生じ、その変異を持つ子孫細胞が左右副腎に分配されたことを示唆する。腫瘍部にはこの変異に加えて腫瘍形成を起こす要因が加わった可能性がある。また、副腎皮質を含む中胚葉由来組織の一部は、単一体細胞変異に関する組織モザイクであることを示唆する。

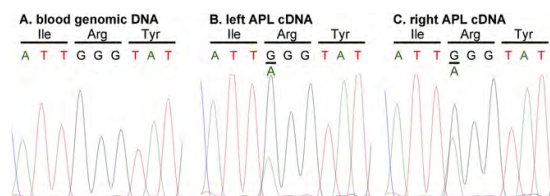


図4 非家族性若年性原発性アルドステロン症の1例の *KCNJ5* 遺伝子についてのサンガー法による塩基配列解析 患者血液のゲノム DNA (A)、および、患者副腎の病変の RNA から調製した cDNA (B 左副腎、C 右副腎) について、*KCNJ5* の Arg151 部位に対応する塩基配列をサンガー法で決定した。APL, aldosterone-producing lesion.

## 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 14 件)

- ① Uchida, T., Nishimoto, K., Fukumura, Y., Asahina, M., Goto, H., Kawano, Y., Shimizu, F., Tsujimura, A., Seki, T., Mukai, K., Kabe, Y., Suematsu, M., Gomez-Sanchez, C.E., Yao, T., Horie, S., Watada, H. (2017) Disorganized steroidogenesis in adrenocortical carcinoma, a case study. *Endocr. Pathol.* 28(1), 27-35. 査読有、DOI: 10.1007/s12022-016-9441-8
- ② Nishimoto, K., Koga, M., Seki, T., Oki, K., Gomez-Sanchez, E.P., Gomez-Sanchez, C.E., Naruse, M., Sakaguchi, T., Morita, S., Kosaka, T., Oya, M., Ogishima, T., Yasuda, M., Suematsu, M., Kabe, T., Omura, M., Nishikawa, T., Mukai, K. (2017) Immunohistochemistry of aldosterone synthase leads the way to the pathogenesis of primary aldosteronism. *Mol. Cell. Endocrinol.* 441, 124-133. 査読有、DOI: 10.1016/j.mce.2016.10.014
- ③ Tamura, A., Nishimoto, K., Seki, T., Matsuzawa, Y., Saito, J., Omura, M., Gomez-Sanchez, C.E., 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. (2017) Somatic *KCNJ5* mutation occurring early in adrenal development may cause a novel form of juvenile primary aldosteronism. *Mol. Cell. Endocrinol.* 441, 134-139. 査

読有、DOI: 10.1016/j.mce.2016.07.031

- ④ Nishimoto, K., Seki, T., Hayashi, Y., Mikami, S., Al-Eyd, G., Nakagawa, K., Morita, S., Kosaka, T., Oya, M., Mitani, F., Suematsu, M., Kabe, T., Mukai, K. (2016) Human adrenocortical remodeling leading to aldosterone-producing cell cluster generation. *Int. J. Endocrinol.* 2016: 7834356. Epub 2016 Sep 18. 査読有、DOI: 10.1155/2016/7834356
- ⑤ Naccache, A., Louiset, E., Duparc, C., Laquerrière, A., Patrier, S., Renouf, S., Gomez-Sanchez C.E., Mukai, K., Lefebvre, H., Castanet, M. (2016) Temporal and spatial distribution of mast cells and steroidogenic enzymes in the human fetal adrenal. *Mol. Cell. Endocrinol.* 434, 69-80. 査読有、DOI: 10.1016/j.mce.2016.06.015
- ⑥ Imamichi, Y., Yuhki, K.-I., Orisaka, M., Kitano, T., Mukai, K., Ushikubi, F., Taniguchi, T., Umezawa, A., Miyamoto, K., Yazawa, T. (2016) 11-ketotestosterone is a major androgen produced in human gonads. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 101(10), 3582-3591. 査読有、DOI: 10.1210/jc.2016-2311
- ⑦ Abe, T., Naruse, M., Young Jr. W. F., Kobashi, N., Doi, Y., Izawa, A., Akama, K., Okumura, Y., Ikenaga, M., Kimura, H., Saji, H., Mukai, K., Matsumoto, H. (2016) A novel CYP11B2-specific positron emission tomography imaging agent for detection of aldosterone-producing adenomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 101(3), 1008-1015. 査読有、DOI: 10.1210/jc.2015-3431
- ⑧ Nishimoto, K., Seki, T., Kurihara, I., Yokota, K., Omura, M., Nishikawa, T., Shibata, H., Kosaka, T., Oya, M., Suematsu, M., Mukai, K. (2016) Case report: Nodule development from subcapsular aldosterone-producing cell clusters causes hyperaldosteronism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 101(1), 6-9. 査読有、DOI: 10.1210/jc.2015-3285
- ⑨ 向井 邦晃、西本紘嗣郎 (2016) CYP11B2 免疫染色がひらく原発性アルドステロン症発症機構の解明 最新医学, 71(5), 935-940. 査読無、<http://www.saishin-igaku.co.jp/>
- ⑩ Goupil, R., Wolley, M., Ungerer, J.,

McWhinney, B., Mukai, K., Naruse, M., Gordon, R.D., Stowasser, M. (2015) Use of plasma metanephrine to aid adrenal venous sampling in combined aldosterone and cortisol over-secretion. *Endocrinology, Diabetes and Metabolism Case Rep.* EDM150075 (2015年11月). 査読有、DOI: 10.1530/EDM-15-0075

- ⑪ Murakami, M., Yoshimoto, T., Minami, I., Bouchi, R., Tsuchiya, K., Hashimoto, K., Izumiyama, H., Fujii, Y., Endo, T., Akashi, T., Nishimoto, K., Mukai, K., Kihara, K., Ogawa, Y. (2015) A Novel Somatic Deletion Mutation of ATP2B3 in Aldosterone-Producing Adenoma. *Endocr. Pathol.* 26(4), 328-333 (2015年12月). 査読有、DOI: 10.1007/s12022-015-9400-9
- ⑫ Volpe, C., Hamberger, B., Höög, A., Mukai, K., Calissendorff, J., Wahrenberg, H., Zedenius, J., Thorén M. (2015) Primary aldosteronism: functional histopathology and long-term follow-up after unilateral adrenalectomy. *Clin. Endocrinol.* (Oxf) 82(5), 639-647 (2015年5月). 査読有、DOI: 10.1111/cen.12645
- ⑬ Duparc, C., Moreau L., Dzib, J.F., Boyer, H.G., Tetsi Nomigni, M., Boutelet, I., Boulkroun, S., Mukai, K., Benecke, A.G., Amar, L., Gobet, F., Meatchi, T., Plouin, P.F., Zennaro, M.C., Louiset, E., Lefebvre, H. (2015) Mast cell hyperplasia is associated with aldosterone hypersecretion in a subset of aldosterone-producing adenomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 100(4), E550-60 (2015年4月). 査読有、DOI: 10.1210/jc.2014-3660
- ⑭ 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 (2015) 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・甲状腺外科学会誌* 32(4), 230-233. 査読無、DOI: 10.11226/jaesjsts.32.4\_230

[学会発表] (計 14 件)

- ① 西本紘嗣郎, 小山政史, 安田政実, 西川哲男, 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 第 24 回日本ステロイドホルモン学会 シンポジウム、ホルトホール大分 (大分県・大分市)、2016 年 12 月 3 日
- ② 樋口明弘、山崎岳、向井邦晃、荻島正、

前田尚之、横田博 涙腺における局所ステロイドの生理機能 第 89 回日本生化学学会大会、仙台国際センター(宮城県・仙台市)、2016 年 9 月 25 日

- ③ Mukai, K. Novel adrenocortical zonation visualized by CYP11B2 immunohistochemistry opens up primary aldosteronism. Hypertension Summit 2016, グランヴィア京都(京都府・京都市)、2016 年 5 月 31 日
- ④ 西本紘嗣郎、関次男、栗原勲、横田健一、大村昌夫、西川哲男、柴田洋孝、小坂威雄、大家基嗣、末松誠、向井邦晃 アルドステロン(ALDO)産生細胞クラスターから ALDO 産生腺腫への移行を示唆する新規 ALDO 過剰産生病変の同定とその体細胞遺伝子変異解析、第 104 回泌尿器科学会総会、仙台国際センター (宮城県・仙台市)、2016 年 4 月 23 日
- ⑤ Koga, M., Nishimoto, K., Seki, T., Mukai, K., Suematsu, M., Kosaka, T., Oya, M., Makita, K., Matsui, S., Tsurutani, Y., Matsuzawa, Y., Saito, J., Omura, M., Nishikawa, T. Possible involvement of a novel intermediate lesion between APCC and APA in primary hyperaldosteronism patient. The 27th Conference on the Adrenal Cortex, ボストン (米国)、2016 年 3 月
- ⑥ Abe, T., Naruse, M., Young Jr. W. F., Kobashi, N., Doi, Y., Izawa, A., Akama, K., Okumura, Y., Ikenaga, M., Kimura, H., Saji, H., Mukai, K., Matsumoto, H. A novel CYP11B2-specific imaging agent for detection of unilateral subtypes of primary aldosteronism. The 41st International Aldosterone Conference 2016, ボストン (米国)、2016 年 3 月
- ⑦ 西本紘嗣郎、関次男、栗原勲、横田健一、大村昌夫、西川哲男、柴田洋孝、小坂威雄、大家基嗣、末松誠、向井邦晃 アルドステロン産生細胞クラスターからアルドステロン産生腺腫への移行を示唆する新規病変の同定とその体細胞遺伝子変異解析、第 3 回 PA・Aldosterone 関連疾患研究会、フクラシア東京ステーション (東京都・千代田区)、2016 年 2 月 6 日
- ⑧ 米谷充弘、出村昌史、米田隆、堀家慎一、小出寛、西本紘嗣郎、向井邦晃、武田仁勇 コルチゾール合成酵素遺伝子 CYP11B1 のエピジェネシス、第 23 回日本ステロイドホルモン学会、倉敷市芸文館 (岡山県・倉敷市)、2016 年 1 月 15 日

⑨ 向井邦晃、荻島正、樋口明弘、西本紘嗣郎 ヒト副腎皮質の構成的アルドステロン産生細胞クラスターに生じる体細胞変異の解析 BMB2015[第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会] ワークショップ「既成概念を超えるステロイド」、オーガナイザー：荻島正、向井邦晃 神戸国際会議場（兵庫県・神戸市）、2015 年 12 月 4 日

⑩ 樋口明弘、山崎岳、向井邦晃、荻島正、前田尚之、横田博、坪田一男 涙腺における局所ステロイドの生理機能 BMB2015[第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会] ワークショップ「既成概念を超えるステロイド」、オーガナイザー：荻島正、向井邦晃 神戸国際会議場（兵庫県・神戸市）、2015 年 12 月 4 日

⑪ 西本紘嗣郎、小坂威雄、大家基嗣、向井邦晃 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によるアルドステロン産生腺腫の発生母地の解明、第 27 回内分泌外科学会総会、コラッセふくしま（福島県・福島市）、2015 年 5 月 28 日

⑫ 河野結衣、内田豊義、清水史孝、朝比奈未紀、西本紘嗣郎、向井邦晃、八尾隆史、堀江重郎、綿田裕孝、原発性アルドステロン症及びサブクリニカルクッシング症候群を呈する副腎皮質癌の 1 例、第 88 回日本内分泌学会学術集会、東京、ホテルニューオータニ東京（東京都・千代田区）、2015 年 4 月 23 日

⑬ 樋口明弘、山崎岳、向井邦晃、荻島正、前田尚之、横田博、坪田一男 涙腺における局所ステロイドの生理機能、第 87 回日本生化学会、国立京都国際会館（京都府・京都市）、2014 年 10 月 18 日

⑭ 荻島正、堤かおり、中村祐貴、前田尚之、向井邦晃、樋口明弘  $\beta$  細胞ストレスに応答する睪島ノンシステムミックステロイド合成、第 87 回日本生化学会、国立京都国際会館（京都府・京都市）、2014 年 10 月 17 日

[図書] (計 1 件)

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、成瀬光栄、平田結喜緒、田辺晶代 編、2017 年）、p. 151-156、診断と治療社

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

向井 邦晃 (MUKAI Kuniaki)  
慶應義塾大学・医学部・専任講師  
研究者番号：80229913

### (2) 研究分担者

樋口 明弘 (HIGUCHI Akihiro)  
大分大学・全学研究推進機構・講師  
研究者番号：20383755

荻島 正 (OGISHIMA Tadashi)  
九州大学・理学研究院・准教授  
研究者番号：70177153