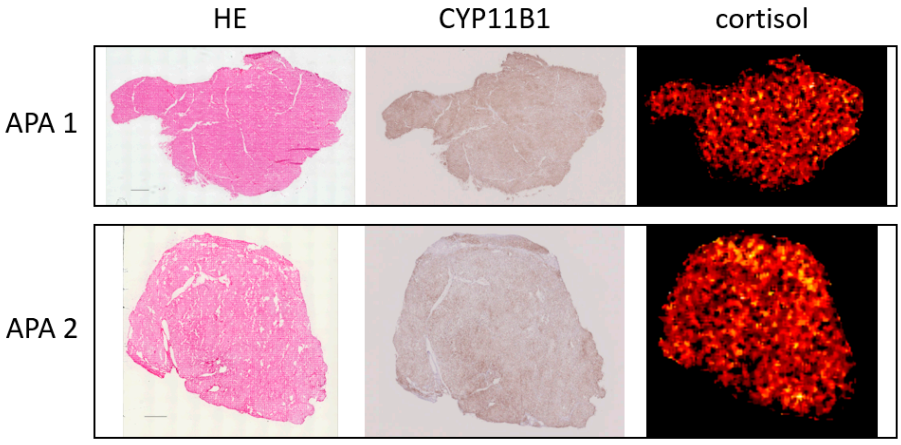
173　メタボロミクスを用いた副腎皮質腫瘍の代謝特性の解明	馬越　洋宜

【目的】副腎皮質腫瘍はステロイド最終産物の産生量に基づきアルドステロン産生腫瘍、コルチゾール産生腫瘍などの機能性腫瘍と“非機能性”腫瘍に分類され、治療適応は原則的に機能性の有無に基づき決定される。画像診断技術の進歩に伴い、副腎腫瘍が偶発的に診断される機会が増加し、約８割が非機能性腫瘍と診断される。近年、従来の診断法では非機能性と診断される副腎腫瘍においても、高率に代謝障害を生じることが報告されたが、成因は不明であり代謝合併症の抑制のために病態の解明・診療の精緻化が求められている。個別化医療への取り組みとして、代謝産物を包括的に測定するメタボロミクスが様々な疾患で行われはじめている。副腎領域では、ステロイドホルモンやその前駆体も含めたステロイドプロファイリングによりミネラルコルチコイド過剰病態である原発性アルドステロン症でグルココルチコイド中間代謝産物の過剰が示され、機能性副腎腫瘍における代謝特性の多様性が明らかになりつつある。本研究では副腎皮質腫瘍を対象として液体クロマトグラフィータンデム質量分析（LC/MS/MS）を用いた、ステロイドプロファイリングを行う。並行して腫瘍組織の統合解析を行い副腎皮質腫瘍における代謝特性の成因を解明する。

【方法】臨床診断において、アルドステロン産生腫瘍、コルチゾール産生腫瘍、非機能性副腎皮質腫瘍および非副腎皮質腫瘍と診断された例の腫瘍組織を対象として、免疫組織染色、LC/MS/MS に基づくメタボローム解析、ゲノム解析、トランスクリプトーム解析（RNA-seq 法）、イメージング質量顕微鏡によるオミクス解析を行った。

【結果】アルドステロン産生腫瘍、顕性コルチゾール産生腫瘍、不顕性コルチゾール産生腫瘍、非機能性副腎腫瘍を対象として、LC/MS/MS を用いて組織中のアルドステロン、コルチゾールの定量を行った。アルドステロンについては、アルドステロン産生腫瘍においてのみ有意な上昇がみられたが、コルチゾールにおいては、アルドステロン産生腫瘍は不顕性コルチゾール産生腫瘍と同定度のコルチゾール過剰分泌がみられた。アルドステロン産生腫瘍における、腫瘍内コルチゾール合成の局在を評価する目的で、代謝産物の可視化法として、イメージング質量顕微鏡を用いた解析を行った。免疫組織学染色のコルチゾール合成酵素（CYP11B1）の局在と一致して、コルチゾール合成が腫瘍内で均一的に行われることを同定した。次にアルドステロン産生腫瘍およびコルチゾール分泌が緩徐である、不顕性コルチゾール産生腫瘍を対象として、RNA-seq を施行した。315 遺伝子に発現変動が確認され、予想通り APA においてアルドステロン合成に関連するパスウェイがエンリッチされた。一方で、steroid metabolic process パスウェイもエンリッチされていたが、コルチゾール合成に関連する遺伝子発現は両腫瘍において差異は検出されなかった。

イメージング質量顕微鏡を用いたアルドステロン産生腫瘍におけるステロイド合成の可視化



173. メタボロミクスを用いた副腎皮質腫瘍の代謝特性の解明

馬越　洋宜

九州大学病院 内分泌代謝・糖尿病内科

Key words：副腎皮質腫瘍，ステロイド，メタボロミクス，アルドステロン，コルチゾール

緒　言

内分泌腫瘍はホルモン産生能を考慮すべきユニークな腫瘍であり、ホルモンを産生する「機能性」とホルモンを産生しない「非機能性」に大別される。代表的な内分泌臓器である副腎は皮質と髄質より構成され、副腎皮質は形態的にも機能的にもユニークな 3 層構造（球状層：ミネラルコルチコイド、束状層：グルココルチコイド、網状層：副腎アンドロゲン）を呈する。副腎皮質腫瘍の多くは良性腫瘍であり、ステロイドホルモン（ミネラルコルチコイド代謝産物であるアルドステロン（アルドステロン産生腫瘍）あるいはグルココルチコイド代謝産物であるコルチゾール（コルチゾール産生腫瘍））の過剰産生の場合には「機能性」と判定され、いずれも過剰産生しない場合は「非機能性」と判定される。

副腎皮質腫瘍の「機能性」獲得の大部分は体細胞遺伝子変異によることが知られており、例えばアルドステロン産生腫瘍とコルチゾール産生腫瘍において、細胞内カルシウム濃度上昇と細胞内 cAMP 濃度上昇に関連する遺伝子変異が報告されており［1〜2］、この 2 つは細胞機能の観点から全く異なる疾患概念として理解されている。一方、血中メタボローム解析により、アルドステロン産生腫瘍ではミネラルコルチコイド代謝産物に加えて、グルココルチコイド代謝産物の増加が確認され、異なる合成経路のステロイドホルモンの同時過剰産生による血中ステロイド代謝特性の多様性が示唆されている［3］。我々の研究室では既に、トランスクリプトーム解析により、アルドステロン産生腫瘍の組織検体においてグルココルチコイド合成酵素の遺伝子発現とステロイド代謝産物が増加すること、特に、グルココルチコイド過剰産生が代謝障害と関連することを見出し、副腎皮質腫瘍におけるステロイド生合成の不均一性の臨床的意義を明らかにしている［4］。近年、画像診断技術の進歩により副腎腫瘍の診断機会が増加しているが、約 80%は良性の NFA であり、多くは経過観察あるいは放置されている。しかしながら、「非機能性」と判定された副腎皮質腫瘍において従来の臨床診断法では検出できなかったステロイドホルモン産生と糖尿病などの代謝障害の関連が指摘されつつあるが［5］、副腎皮質腫瘍における代謝特性の多様性の成因は組織学的には明らかにされていない。

本研究では副腎皮質腫瘍を対象として液体クロマトグラフィータンデム質量分析（LC/MS/MS）によるメタボロミクスを基盤とした、腫瘍組織の統合解析から副腎皮質腫瘍における代謝特性の多様性の成因を明らかにする。

方法および結果

1. 組織メタボロミクスに基づくステロイド代謝産物の評価

アルドステロン産生腫瘍、顕性コルチゾール産生腫瘍、不顕性コルチゾール産生腫（MACE）、非機能性副腎腫瘍を対象として、LC/MS/MS を用いて組織中のアルドステロン、コルチゾールの定量を行った。組織中アルドステロン濃度においては、アルドステロン産生腫瘍において有意な上昇がみられたが、一部のコルチゾール産生腫瘍においても、アルドステロンの微量な産生を示唆する所見が得られた。ついで、組織中コルチゾール濃度においては、顕性コルチゾール産生腫瘍において有意な上昇がみられたがアルドステロン産生腫瘍は MACE と同定度のコルチゾールの過剰な産生を示唆する所見がみられた。以上の結果より、副腎皮質腫瘍は単一の機能性細胞集団により構成されるのではなく、細胞起源の異なるホルモン産生細胞やホルモン非産生細胞により構成される細胞集団の「機能的不均一性」を呈する

ことを想定し、イメージング質量顕微鏡を用いたステロイド合成細胞の可視化を行った。

2. イメージング質量顕微鏡に基づくステロイド代謝産物の可視化

アルドステロン産生腫瘍およびコルチゾール産生腫瘍における、腫瘍内コルチゾールおよびアルドステロン合成細胞の局在を評価する目的で、イメージング質量顕微鏡を用いた解析を行った。コルチゾールにおいては、コルチゾール産生腫瘍およびアルドステロン産生腫瘍において、腫瘍内で比較的均一に産生が行われており、免疫組織学染色のコルチゾール合成の最終律速酵素（CYP11B1）の局在と一致していた（図 1）。

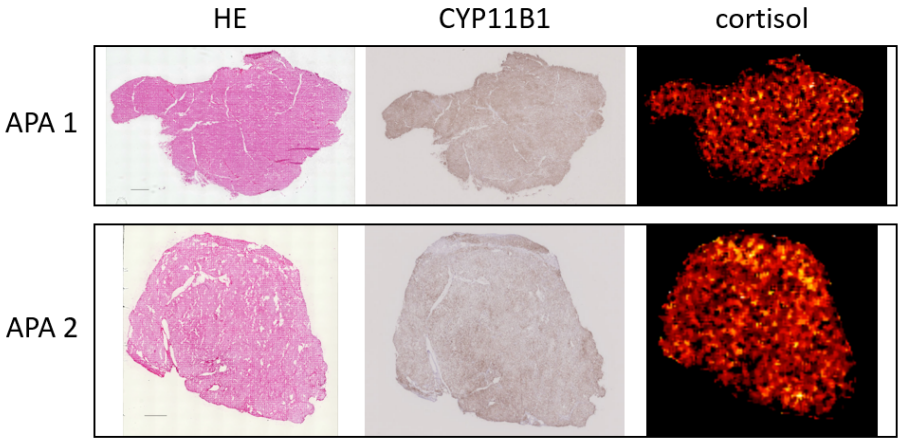


図 1. アルドステロン産生腫瘍においてコルチゾール合成は均一に行われる
アルドステロン産生腫瘍におけるイメージング質量顕微鏡および免疫組織染色。
アルドステロン産生腫瘍：APA、コルチゾール合成酵素：CYP11B1。スケールバー：600 μm。

次に、アルドステロンにおいては、アルドステロン産生腫瘍においては腫瘍内で比較的均一に産生が行われていたが、一部のコルチゾール産生腫瘍においても、不均一にアルドステロン合成が行われていた（図 2）。以上の結果より、副腎皮質腫瘍のステロイド産生における機能的不均一性の成因を解明するために、トランスクリプトーム解析を実施した。

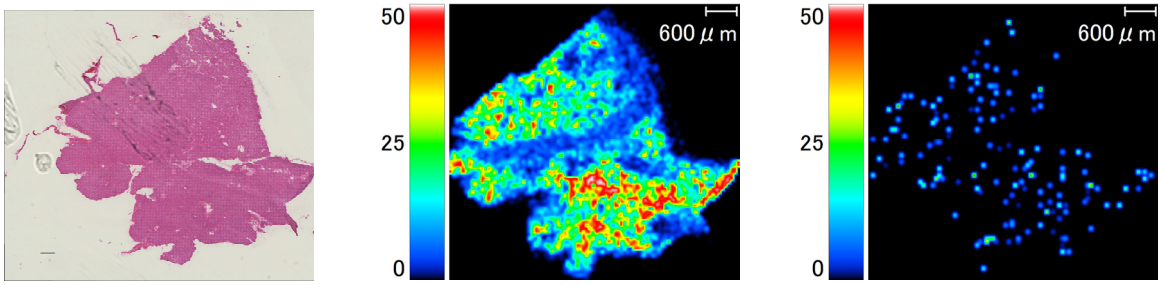


図 2. コルチゾール産生腫瘍においてアルドステロン合成は不均一に行われる
アルドステロン産生腫瘍におけるイメージング質量顕微鏡。スケールバー：600 μm。
左図：HE染色、中央図：コルチゾール、右図：アルドステロン

3. トランスクリプトーム解析にステロイド代謝系遺伝子の評価

副腎皮質腫瘍における、ステロイドアルドステロン産生腫瘍およびコルチゾール分泌が緩徐である、不顕性コルチゾール産生腫瘍を対象として、RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を施行した。合計で 315 遺伝子に発現変動が確認され、アルドステロン産生腫瘍においては、アルドステロン合成に関連するパスウェイがエンリッチされた（図 3）。一方で、steroid metabolic process パスウェイ（27 遺伝子）において発現変動が確認されていたが、コルチゾール合成に関連する主な遺伝子（CYP11B1）は両腫瘍において差異は検出されなかった（図 3）。

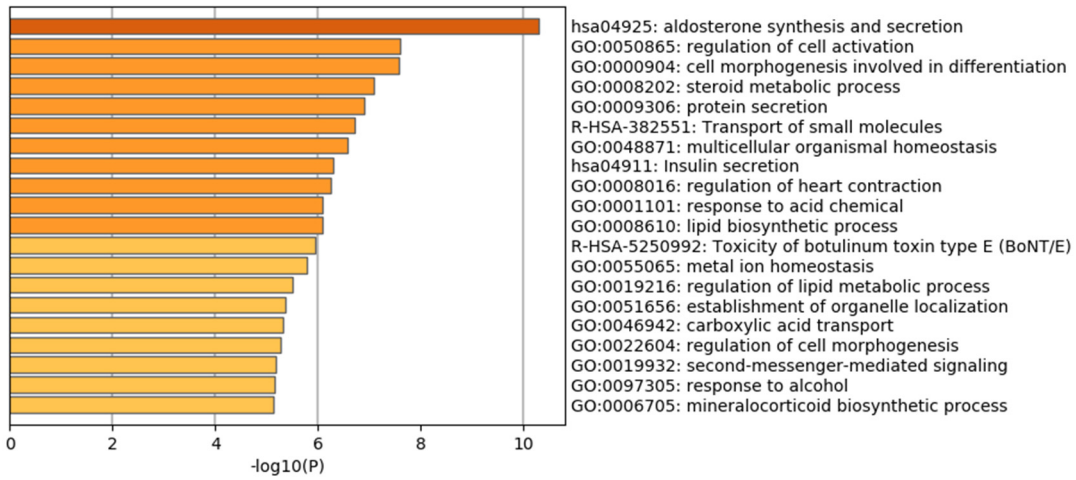


図 3. アルドステロン産生腫瘍と不顕性コルチゾール産生腫瘍における RNA-seq
合計で315遺伝子に発現変動が確認され、アルドステロン産生腫瘍においては、アルドステロン合成に関連するパスウェイがエンリッチされた。

考　察

従来、アルドステロン産生腫瘍はコルチゾール産生を伴わない腫瘍と考えられていたが、本研究により、組織中のコルチゾール合成は不顕性コルチゾール産生腫瘍と同程度行われていることが明らかになった。さらに、一部のコルチゾール産生腫瘍においても、アルドステロン産生を示唆する所見が得られ、副腎皮質腫瘍細胞における機能的不均一性が示唆された。一方で遺伝子発現解析においては、両腫瘍間でステロイド代謝関連 27 遺伝子に差異が確認されたが、コルチゾール合成の最終経路である CYP11B1 は両腫瘍間で差が確認されず、コルチゾール合成中間代謝産物の経路における差異が示唆された。更なる研究の進展として、網羅的な組織中ステロイド産物測定技術の開発を進めており、遺伝子発現変動が得られたステロイド代謝産物を中心として、副腎皮質腫瘍の代謝特性の多様性の解明を進めている。

共同研究者

本研究の共同研究者は、九州大学大学院医学研究院臨床検査学研究室の瀬戸山大樹である。

文　献

1) Choi M, Scholl U, Yue P et al., K+ channel mutations in adrenal aldosterone-producing adenomas and hereditary hypertension. Science. 2011 Feb 11;331(6018):768-72. PMID: 21311022 DOI: 10.1126/science.1198785.

2) Sato Y, Maekawa S, Ishii R et al., Recurrent somatic mutations underlie corticotropin-independent Cushing's syndrome. Science. 2014 May 23;344(6186):917-20. PMID: 24855271 DOI: 10.1126/science.1252328.

3) Arlt W, Lang K, Sitch A et al., Steroid metabolome analysis reveals prevalent glucocorticoid excess in primary aldosteronism, JCI Insight. 2017 Apr 20;2(8):e93136. PMID: 28422753 DOI: 10.1172/jci.insight.93136.

4) Yokomoto-Umakoshi M, Sakamoto R, Umakoshi H et al., Unilateral primary aldosteronism as an independent risk factor for vertebral fracture. Clin Endocrinol (Oxf). 2020 Mar;92(3):206-213. Epub 2020 Jan 19. PMID: 31868939 DOI: 10.1111/cen.14145.

5) Lopez D, Luque-Fernandez M, Steele A, Adler G, Turchin A, Vaidya A. Nonfunctional" Adrenal Tumors and the Risk for Incident Diabetes and Cardiovascular Outcomes: A Cohort Study. Ann Intern Med. 2016 Oct 18;165(8):533-542. Epub 2016 Aug 2. PMID: 27479926 DOI: 10.7326/M16-0547.