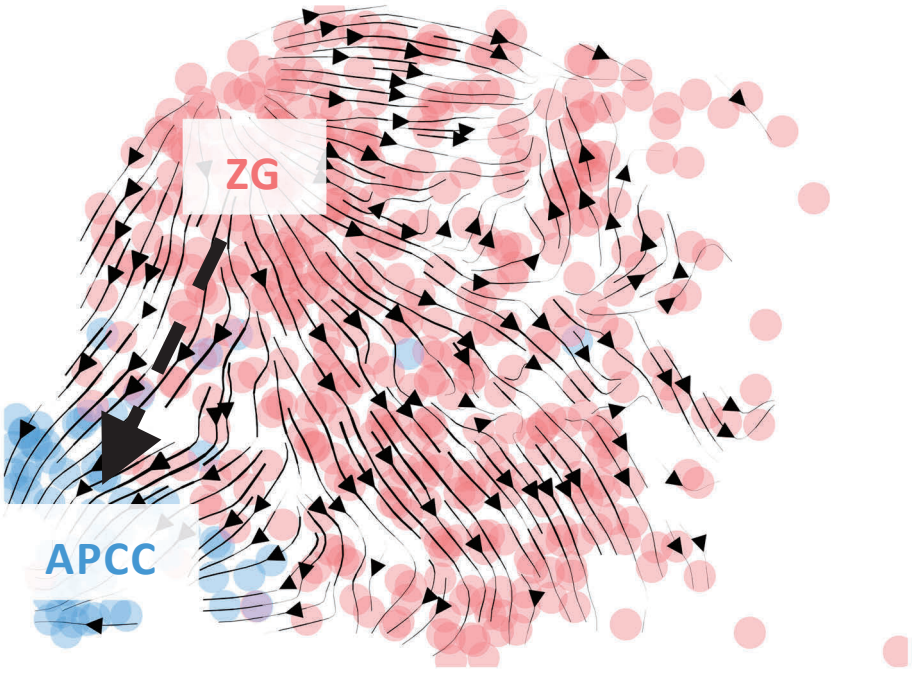
181　副腎内分泌細胞の可塑性に着目した腫瘍発生機構の解明	馬越　洋宜

【目的】副腎皮質は、球状層（ZG）、束状層（ZF）、および網状層から構成される。アルドステロン生合成酵素（CYP11B2）の発現が高いアルドステロン産生細胞クラスター（APCC）は、成人の副腎で一般的に見られ、アルドステロン産生腺腫（APA）でも検出される体細胞変異を有している。原発性アルドステロン症は、主にAPAや特発性高アルドステロン症（IHA）によって引き起こされる。我々は、APCCがIHAを引き起こし、APAの前駆体であると推定しているが、APCCの遺伝子発現特性や特にその発生については明らかでない。本研究では、APCCのトランスクリプトームを単一細胞レベルで解析し、発生の軌跡を推察することで、APAの腫瘍化機構を明らかにすることを目的とした。
【方法】2名の成人から副腎サンプルを取得し、シングルセルRNAシーケンシング（scRNA-seq）を実施した。
【結果】2,928個の副腎細胞のscRNA-seqデータを取得し、教師なしクラスタリングとマーカー遺伝子の発現に基づいて1,765個の副腎皮質細胞を同定した。副腎皮質細胞は6つのクラスターに分類され、そのうち3つのクラスター（923細胞）はAPCC/ZG細胞で構成されていた。さらにサブクラスタリングにより、APCC/ZG細胞は3つのクラスター（クラスターC1、C2、C3）に分類され、最終的にAPCCクラスター（C3）とZGクラスター（C1）が確認された。クラスターC2は、ZGからZFへの遷移細胞と考えられた。RNA速度解析により、ZGクラスター-C1からAPCCクラスター-C3への発生方向が推定された。さらに、scRNA-seqにより、多くのCYP11B2陽性細胞が、コルチゾールの生産には必須だがアルドステロン産生には必須でないCYP11B1およびCYP17A1陽性であることが明らかとなり、ZGが可塑性を有することが示唆された。本結果はAPCCの遺伝子発現特性を1細胞単位で明らかにし、一部のZG細胞がAPCCへと変化することが示された。

RNA velocity 解析



181. 副腎内分泌細胞の可塑性に着目した腫瘍発生機構の解明

馬越　洋宜

九州大学病院 内分泌代謝・糖尿病内科

Key words：副腎，アルドステロン，内分泌，副腎皮質腫瘍，高血圧

緒　言

副腎皮質は組織学的および機能的に異なる 3 つの層（球状層：ZG、束状層：ZF、網状層：ZR）で構成され、それぞれアルドステロン、グルココルチコイド、副腎アンドロゲンを産生し、ZG は主にアンジオテンシンⅡ、カリウム、ACTH によって調節される。原発性アルドステロン症（PA）は二次性高血圧の最も一般的な形態であり、有病率は高血圧患者の 5%から 20%である。PA はアルドステロン産生腺腫（APA）と両側性 PA（IHA）に分類され、前者は主に片側副腎摘出術で治癒するが、後者は生涯にわたるミネラルコルチコイド受容体拮抗薬による治療が主である。病態生理を明らかにすることで、次世代の治療法の開発が期待される。

先行研究により、アルドステロン生成細胞クラスター（APCC）が正常および IHA の副腎皮質組織に存在し、さらに一部の APA と APCC は類似の特性を持つことが示された［1〜3］。そのため、一部の APCC が APA の前駆体であることが示唆されているが、ヒトの副腎皮質細胞の分化機構については未解明である。

シングルセル RNA シーケンス（scRNA-seq）技術の進歩により、複雑で不均一な組織のトランスクリプトーム解析と細胞の発生軌跡推定が可能になった。本研究では、scRNA-seq を用いてヒト副腎の ZG および APCC 細胞のトランスクリプトーム特性を 1 細胞単位で明らかにし、副腎皮質細胞の発生軌跡を解析することを目的とする。scRNA-seq により、多くの CYP11B2 陽性細胞が、コルチゾールの生産には必須だがアルドステロン産生には必須でない CYP11B1 および CYP17A1 陽性であることが明らかとなり、ZG が可塑性を有することが示唆された。本結果は APCC の遺伝子発現特性を 1 細胞単位で明らかにし、一部の ZG 細胞が APCC へと変化することが示された。これにより、PA およびその関連疾患の病因解明や診断・治療への臨床応用が促進されることが期待される［4］。

方　法

成人ヒト副腎サンプルを 2 例収集し、scRNA-seq と免疫染色を行った。サンプル 1 と 2 は、それぞれ 62 歳男性の腎細胞癌と 29 歳男性の褐色細胞腫の患者から得られた。診断は臨床データ、画像特徴、術後の病理組織学的データに基づいて行われた。

免疫組織化学では、副腎のホルマリン固定パラフィン包埋標本から連続切片を脱パラフィンし、Dako autostainer universal system を用いて染色を行った。副腎細胞の分散と凍結では、副腎は摘出後すぐに氷冷した DMEM 中に入れ、副腎髄質を取り出した後、細胞ペレットを−80℃で凍結した。

蛍光活性化セルソーティング（FACS）を実施し、細胞を 1×10^6/mL の濃度で PBS に再懸濁させ、抗体を用いて染色した。CD31、CD24、CD45 抗体と Fixable Viability Dye は、それぞれ内皮細胞、副腎髄質細胞、リンパ球、死細胞の標識に使用された。CD56 抗体は、APCC（24）を含む副腎皮質下細胞の標識に使用した。副腎皮質細胞濃縮のため、BD FACSAria Ⅱを用いてソーティングした

選別された細胞懸濁液は遠心分離により濃縮され、Chromium controller と Chromium Single Cell 3′ Reagent Kits v3.1 を用いて、scRNA-seq のライブラリーを調製した。ライブラリーのペアエンドシーケンスは、

NovaSeq6000（Illumina）を用いて実施した。

結　果

1.　APCC の同定

2 名の成人男性から採取された副腎皮質細胞のうち 2928 個の高品質な細胞に対して scRNA-seq を実施した CYP11B2 陽性細胞が 407 個含まれていた。UMAP の可視化を実施し、教師なしクラスタリングにより、これらの細胞は 11 のクラスターに分けられた。副腎皮質細胞が最も多く（60.3%を占める）を占め、これは FACS を用いた副腎皮質細胞の濃縮が機能していることが示唆された。副腎皮質細胞では、1,256 個の遺伝子が 1.19 倍以上（>logFC 0.25）、調整 P 値＜0.01 で発現が上昇した。これらの遺伝子のうち、CYP17A1、HSD3B2、CYP21A2 などのステロイド生成遺伝子も高度に発現しており、このクラスターが副腎皮質細胞を含むことが裏付けられた。また、組織化学染色および免疫組織化学染色を用いて、試料 1 および試料 2 におけるアルドステロン産生部分の存在を確認し、APCC には CYP11B1 陽性細胞や CYP17A1 陽性細胞が一部含まれていることが明らかになった。

2.　副腎皮質細胞のクラスタリング

副腎皮質細胞のクラスター化を行い、それらがアルドステロン産生細胞やコルチゾール生成細胞などの特定の機能を持つことが示された。具体的には、教師なしクラスタリングを行い、副腎皮質細胞を 6 つのクラスターに再分類した。そのうち、クラスターB6 にはアルドステロン産生細胞の特性を示す CYP11B2 が有意に発現上昇していた。また、クラスターB4 はコルチゾール生成細胞に富むという仮説が支持された。さらに、クラスターB5 は主に ZR 細胞からなることが示唆された（図 1）。軌跡解析の結果、クラスターB1/B3 に多く含まれる非誘導または弱い誘導の ZG 細胞は、クラスターB6、ZF、ZR へ分化すると考えられた。これらの結果は、副腎皮質細胞が複数の機能を持ち、それらがクラスター化されていることを示唆している。

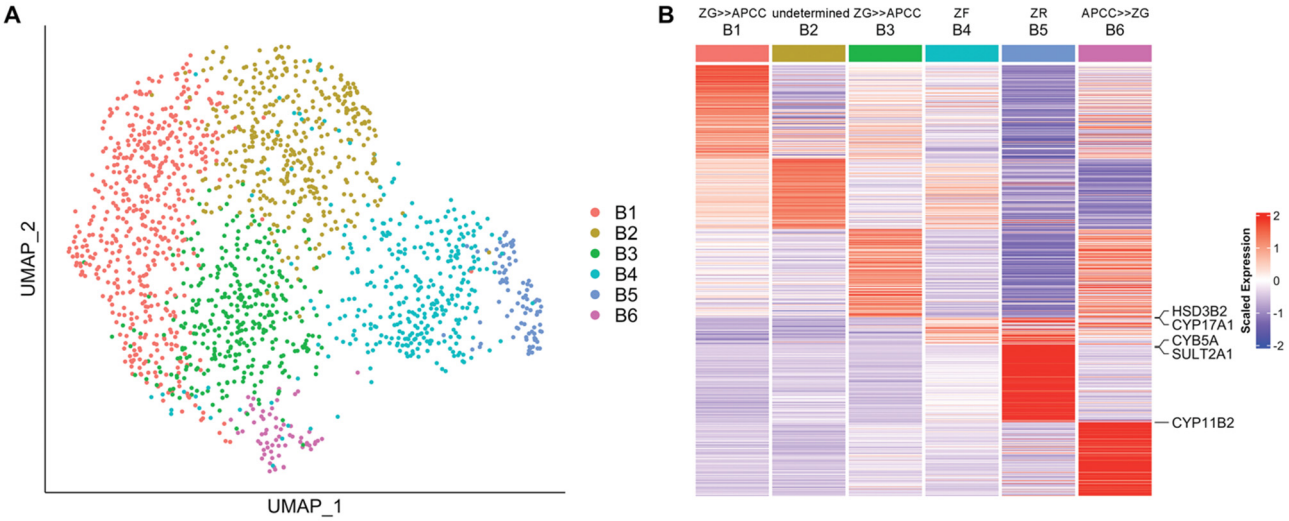


図 1.　副腎皮質細胞のクラスタリング

A）　副腎皮質細胞クラスターを示す UMAP プロット。点：単一細胞。色：クラスター。

B）　各副腎皮質細胞クラスターにおける DEGs の平均発現量を示すヒートマップ。列は各クラスター、行は個々の遺伝子。表示されている遺伝子名は、細胞種の同定に使用した遺伝子。発現レベルは、遺伝子ごとに対数正規化したカウント数。平均発現レベルは z－scored。

3. APCC および ZG から ZF への移行細胞の同定

副腎皮質の APCC 細胞や ZG 細胞、および ZG から ZF への移行期の細胞を同定するために、細胞クラスタリングや遺伝子発現解析を行った。その結果、クラスターB1、B3、B6 には、ZG 細胞と APCC 細胞が含まれており、ZG から ZF への移行期の細胞も含まれることが推測された。さらに、細胞クラスターを再分類して、APCC-cluster C3、ZG-cluster C1、および ZG→ZF-cluster C2 に分類された細胞の遺伝子発現変化を解析し、それぞれのクラスターに特有の遺伝子発現パターンが明らかになった。特に、APCC-cluster C3 では、ステロイド生成に関する遺伝子が高度にアップレギュレートされており、ZG から APCC への分化に関与していることが示唆された。さらに、RNA velocity 解析から、一部の ZG 細胞が APCC にリモデリングすることが示唆され、ZG から APCC への分化の過程が解明された（図 2）。

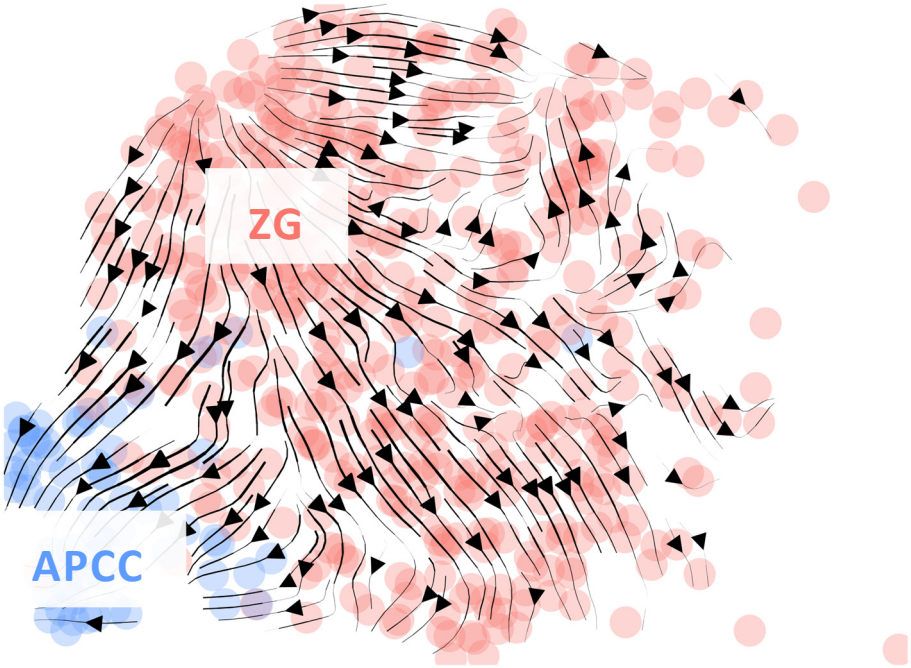


図 2. RNA velocity 解析

考　察

本研究では、ヒト成人副腎の scRNA-seq を実施し、副腎皮質細胞の遺伝子発現プロファイルから、APCC、ZG、ZF、ZR、および新規 ZG-ZF 移行帯のクラスターを同定した。さらに、APCC 細胞が ZG 細胞から発生することを推論し、副腎皮質における免疫細胞の存在を明らかにした。さらに APCC クラスターにおいて、アップレギュレートされた遺伝子は、APCC が APA の前駆体であるという我々の仮説を補強するものであった。また、FACS を用いた副腎皮質細胞の濃縮により、より詳細な解析が可能となった。これらの結果は、副腎皮質細胞の分化や疾患の病態生理の解明に貢献するものと考えられる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、埼玉医科大学大学国際医療センター泌尿器腫瘍科の西本紘嗣郎博士である。

文　献

1) 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. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Aug 18;112(33): E4591-9. Epub 2015 Aug 3. PMID: 26240369 DOI: 10.1073/pnas.1505529112.

2) Nishimoto K, 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. J Clin Endocrinol Metab. 2016 Jan;101(1):6-9. Epub 2015 Nov 18. PMID: 26580238 DOI: 10.1210/jc.2015-3285.

3) Nishimoto K, Umakoshi H, Seki T, Yasuda M, Araki R, Otsuki M, Katabami T, Shibata H, Ogawa Y, Wada N, Sone M, Okamura S, Izawa S, Miyauchi S, Yoshimoto T, Tsuiki M, Naruse M; JRAS Study Group. Diverse pathological lesions of primary aldosteronism and their clinical significance. Hypertens Res. 2021 May;44(5):498-507. Epub 2021 Jan 12. PMID: 33437027 DOI: 10.1038/s41440-020-00579-w.

4) Iwahashi N*, Umakoshi H*, Seki T, Gomez-Sanchez CE, Mukai K, Suematsu M, Umezawa Y, Oya M, Kosaka T, Seki M, Suzuki Y, Horiuchi Y, Ogawa Y, Nishimoto K. Characterization of Aldosterone-producing Cell Cluster (APCC) at Single-cell Resolution. J Clin Endocrinol Metab. 2022 Aug 18;107(9):2439-2448. PMID: 35796577 DOI: doi: 10.1210/clinem/dgac394. 107(9):2439-2448 (* equal to 1st author).