190　遺伝子変異に基づく重症副腎性高血圧症の個別化医療

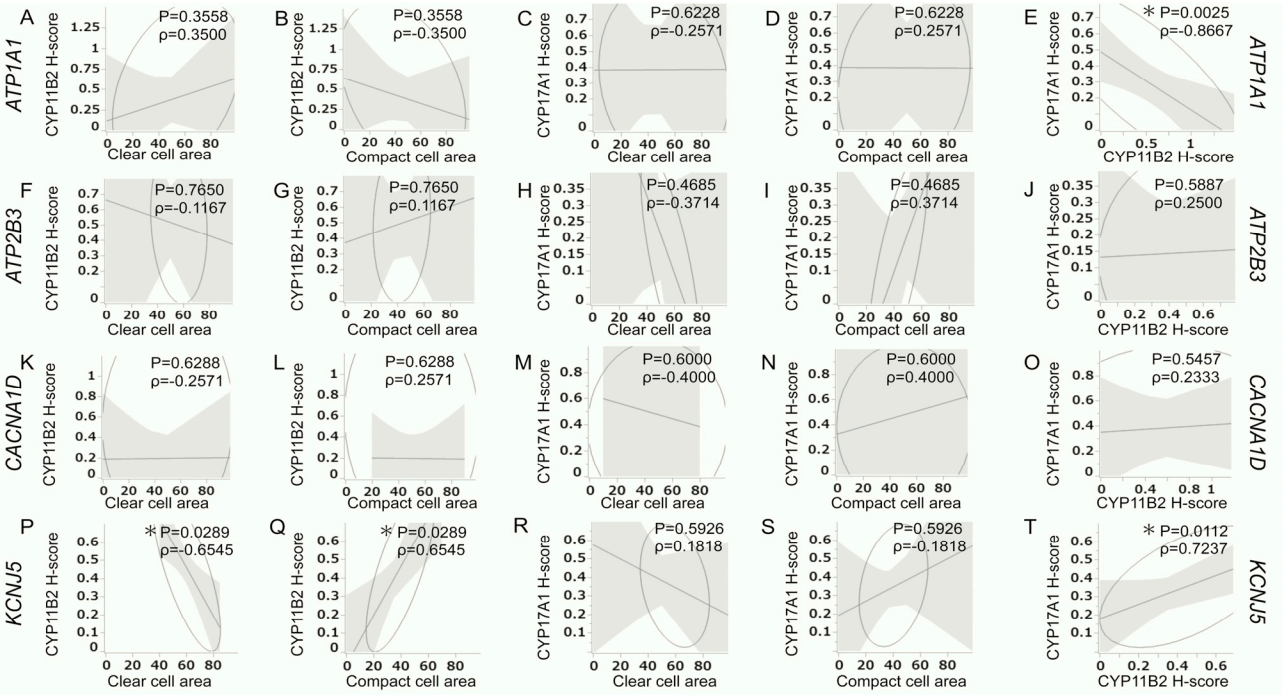
尾股　慧

【目的】原発性アルドステロン症（PA：primary aldosteronism）は、副腎アルドステロン過剰分泌によって重度の高血圧症状を伴う内分泌疾患で、国内では 400 万人が罹患すると推定され、虚血性心疾患、脳卒中、不整脈、腎臓病のリスクが高まり、生涯 QOL に重大な悪影響をもたらす。PA の病型は手術治療が推奨されるアルドステロン産生腺腫（APA：aldosterone-producing adenoma）が約 30%を占め、残り約 70%は薬物治療が推奨される。以前より APA については、約 7 割に *KCNJ5*、また約 1 割には *CACNA1D* や *ATP2B3* 等の、各イオンチャンネルにおける体細胞遺伝子変異が知られているが、これら体細胞変異別の病理学的特徴については詳細が明らかでないことが多い。本研究では PA 摘除標本を対象に APA における体細胞遺伝子変異を次世代シークエンサー（NGS）にて解析し、アルドステロン合成調節遺伝子に関わる体細胞変異の病理学的詳細を明らかにすることを目的とする。

【方法】PA 診断ガイドラインに基づいた診断によって摘出された APA 検体で NGS を実施した結果、体細胞変異が判明した合計 51 検体（内訳 *KCNJ5*：11 例、*ATP1A1*：14 例、*ATP2B3*：11 例、*CACNA1D*：15 例）を対象とし、腫瘍内の淡明細胞・緻密細胞の割合やステロイド合成酵素である CYP11B2 と CYP17A1 発現強度（H-score）を解析した。

【結果】*KCNJ5* と *ATP2B3* 群では淡明細胞が緻密細胞に対して有意にその割合が多かったが、*ATP1A1* と *CACNA1D* 群では淡明細胞と緻密細胞の分布動態に有意差は一切認められなかった。また、*KCNJ5* 群で CYP11B2 と CYP17A1 の H-score は正相関を示したが、*ATP1A1* 群では逆に有意な負の相関を認めた。APA で最もその頻度が高い *KCNJ5* 遺伝子変異はその他の *ATP1A1*・*ATP2B3*・*CACNA1D* の群と比較して異なる病理学的特徴を呈することが示された。

各副腎皮質腺腫体細胞変異（APA）における細胞成分とステロイド生成酵素の相関



190. 遺伝子変異に基づく重症副腎性高血圧症の個別化医療

尾股　慧

東北大学病院 腎・高血圧・内分泌科

Key words：副腎皮質，原発性アルドステロン症，アルドステロン，体細胞遺伝子変異，高血圧

緒　言

原発性アルドステロン症（PA：primary aldosteronism）は、副腎アルドステロン（昇圧ホルモン）過剰分泌によって重度の高血圧症状を伴う内分泌疾患で、国内では 400 万人が罹患すると推定される［1］。PA の多くは若年ー壮年期に発症、合併症として、虚血性心疾患、脳卒中、不整脈、腎臓病のリスクが高まり、生涯 QOL に重大な悪影響をもたらす。例えば、心筋梗塞のリスクは通常の高血圧に比べ 6 倍、平均寿命は概ね 3 年短縮する［2］。PA の病型は、手術治療が第一選択となるかならないかで分類されており、手術治療が推奨される片側副腎性のアルドステロン産生腺腫（APA：aldosterone-producing adenoma）が約 30%を占め、残り約 70%は薬物治療が推奨される両側副腎性の特発性アルドステロン症（IHA：idiopathic hyperaldosteronism）が占める。以前より片側性 APA については、約 7 割に *KCNJ5*、また約 1 割には *CACNA1D* や *ATP2B3* の、各イオンチャンネルにおける体細胞遺伝子変異が知られていた［3］。APA の多くは片側副腎のみが原因で、外科手術に耐えうる状態に限り、病側の片側副腎の全摘除で根治可能である。しかし一部の片側性 APA ではその強い病勢により、既に心血管合併症を併発し、外科手術のリスクが高いことから薬物療法が選択される症例もある。加えて、APA が両側副腎に発生した両側性 APA 症例も経験されるが、両側性 APA は PA の中でも最も病勢が強い病型のため、手術不能例となることも多い。このように、手術治療が基本となる APA 症例ではあるが、APA 症例においても手術治療が選択できない症例もあり、有効な薬物療法の開発も喫緊のテーマとなっている。一方、PA の大半を占める IHA は、副腎内に明瞭な腫瘍が認められず、遺伝子変異の様相も全く不明だったことから、IHA が初めて報告された 1960 年代以来、手術不可能な APA と同様に薬物療法が行われてきた［1］。そこで、筆者らは IHA の病態を解明すべく、著しい二次性高血圧症や低カリウム血症など、薬物制御が困難な IHA のため例外的に手術摘除された副腎組織を詳細に検証した結果、直径 1 mm 以下の微小腫瘍（アルドステロン産生細胞集塊、APCC：aldosterone-producing cell clusters）が異常集積していることを発見した［4］。さらに APCC では、APA において頻度が少ないイオンチャンネルである *CACNA1D* 変異が高頻度であることを明らかにした［4］。これは微小な APCC 組織を単離した上で、次世代シークエンス（NGS：next-generation sequencing）を適用する新技術により IHA で発生した APCC における、特有の体細胞変異が見出されたことで、アルドステロン調節遺伝子変異のメカニズムの一端が解明されたものである。これまでの PA に対する薬物療法は IHA と APA の異なる病態で区別される事も無く、共にミネラルコルチコイド受容体拮抗薬（MRA）が使用されてきた。そもそも MRA 療法とはアルドステロン受容体に拮抗する対症療法であり、個々の症例の個別化医療とは言えず、降圧効果が不充分であることも散見される。女性化乳房などの課題が併発し易い過剰アルドステロン生成の原因である、副腎腺腫の体細胞変異に着目したアプローチが求められている。APCC における *CACNA1D* の体細胞遺伝子変異の発見により、この変異で過剰に亢進するアルドステロン合成を、既存の降圧薬（カルシウム拮抗薬：CCB）によって正常化できるとする課題解決に向けての新たな知見に繋がった IHA 薬物療法の新たなアプローチとして、従来の MRA に加え、CCB を併用する新規治療法の確立が期待されている。APA における副腎内活動性腺腫から IHA の微小腫瘍までのバリエーションに対する病理学的特徴、特に細胞内遺伝子変異の解明は、多くの PA 患者を救済するための喫緊の課題である。

本研究では PA 摘除標本を対象に APA における体細胞遺伝子変異を NGS にて解析し、アルドステロン合成調節遺伝子に関わる体細胞変異の病理学的詳細を明らかにすることを目的とする。APA 体細胞変異別の解析によって従来の

MRA に加えて、アルドステロン過剰合成の核心にアプローチする根本的薬物療法の確立を目指すこれまでの薬物療法の課題である副反応を抑えながら、手術治療と同等にアルドステロン自律産生を抑える臨床上の重大な意義を持つ高血圧合併症を防ぎ、健康寿命を伸展させる新たな PA 療法への展開が期待される。

方　法

1. 対象検体抽出

米国内分泌学会の PA 診断ガイドライン[1]に基づいた診断によって摘出された APA 検体に NGS を実施した結果、体細胞変異が判明した合計 51 検体（内訳 *KCNJ5*：11 例、*ATP1A1*：14 例、*ATP2B3*：11 例、*CACNA1D*：15 例）を対象とした。

2. 検体処理と免疫組織学的染色

10%ホルマリン固定パラフィン包埋組織標本から薄切し、最大径の腫瘍領域全体を含むものをヘマトキシリンおよびエオシン（H&E）染色で組織学的評価を行った（図 1）。すべての腫瘍は、Weiss の基準［1，5］に従って病理学的に APA と診断された。更にアルドステロン最終合成酵素である CYP11B2 の抗体とコルチゾール合成に強く関与する CYP17A1 による免疫染色を実施し、APA の組織病理学的診断を実施した。

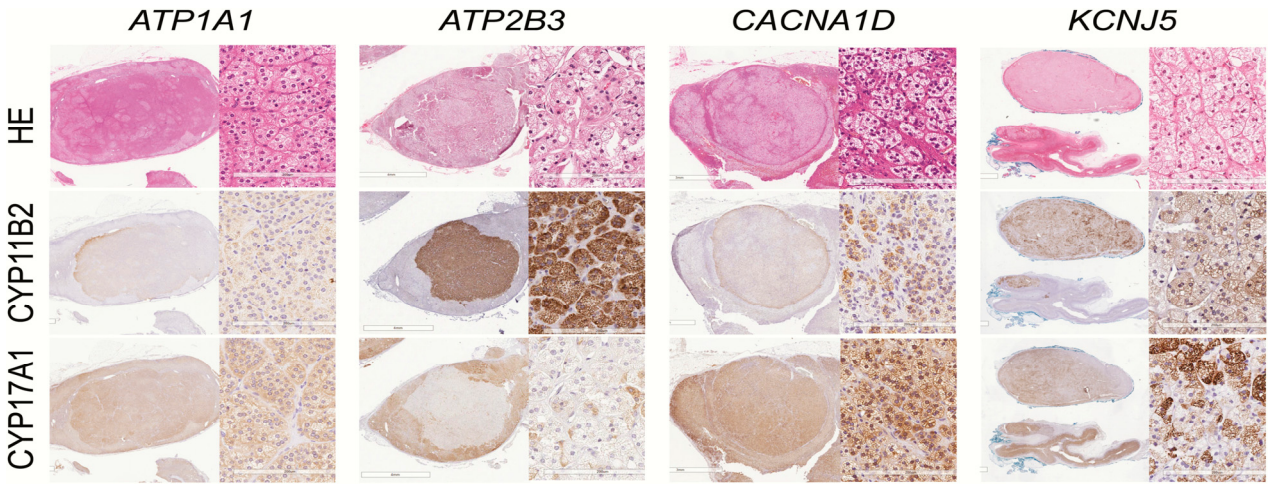


図 1. 体細胞変異別のアルドステロン産生副腎皮質腺腫（APA）の代表的切片
ATP1A1、*ATP2B3*、*CACNA1D*、*KCNJ5* 変異各アルドステロン産生副腎皮質腺腫に対してのヘマトキシリンエオシン（H&E）染色、CYP11B2 抗体と CYP17A1 抗体を使用した免疫染色。スケールバー：4 mm（弱拡大）と 200 μm（強拡大）。

3. 病理組織学的評価デジタルイメージによる病理学的評価

既報［6］に従い H&E 染色スライドをデジタルスキャンし、ソフトウェアを用いて腫瘍細胞と間質領域を定量的に解析した。細胞質はさらに「淡明細胞」と「緻密細胞」に分類して解析した。更に、CYP11B2 および CYP17A1 免疫組織化学染色スライドをデジタル解析し、H-score を用いて免疫反応強度を定量評価した。

結　果

1. 体細胞遺伝子変異別の組織学的特徴

腫瘍領域と間質領域の割合は、異なる体細胞変異遺伝子型 APA 間で有意差はなかった。*ATP1A1* 変異 APA の核領域の割合は、*ATP2B3* 変異 APA よりも有意に高かった（P＝0.0376）。*CACNA1D* 変異 APA は ATP2B3 変異 APA よりも核／細胞質比が有意に高かった（P＝0.0295）が、細胞質の割合は体細胞変異遺伝子型間で有意差がなかった（図 2）。KCNJ5 変異 APA では、淡明細胞の割合が緻密細胞の割合よりも有意に高かった（P＝0.0022）が、*ATP2B3* 変異 APA では有意に高くはなかった（P＝0.0696）（図 3）。*ATP1A1* および *CACNA1D* 変異 APA は両方とも顕著な組織学的腫瘍内不均一性を示したが、淡明細胞と緻密細胞の割合と APA の特定の変異遺伝子型の間に有意な相関はなかった。

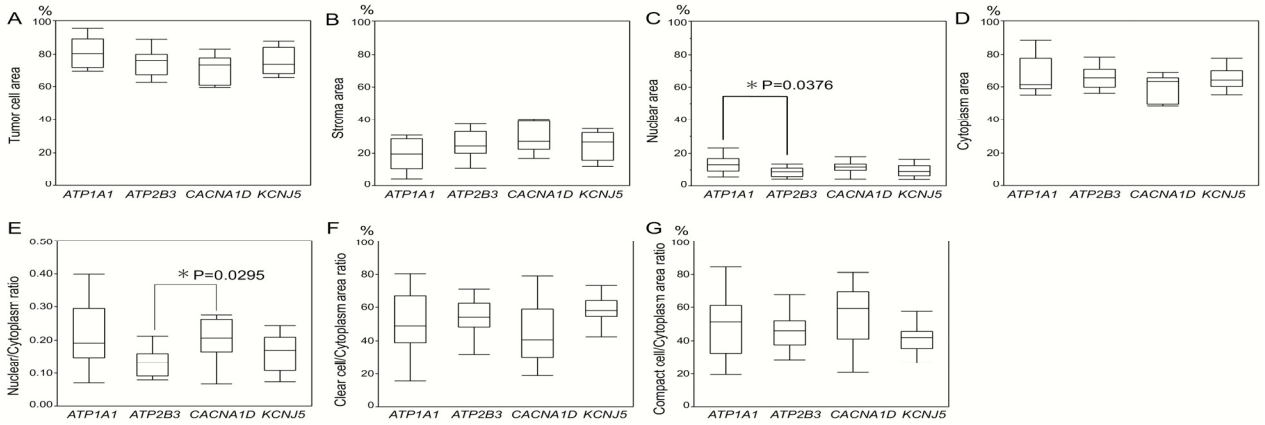


図 2. 体細胞変異別のアルドステロン産生副腎皮質腺腫（APA）の組織学的特徴の比較
核面積の割合は、*ATP1A1* 変異 APA の方が *ATP2B3* 変異 APA よりも有意に高かった（*ATP1A1*：13.3%（9.3～16.8%）対 *ATP2B3*：8.8%（6.1～12.0%）、P＜0.05）。核対細胞質比は、*CACNA1D* 変異 APA の方が *ATP2B3* 変異 APA よりも有意に高かった［0.20 （0.17～0.26）対 0.13（0.09～0.16）、P＜0.05］。統計は Kruskal-Wallis 検定、有意水準 P＜0.05。

2. 体細胞遺伝子変異別の CYP11B2 および CYP17A1 免疫組織学的解析

CYP11B2 免疫反応性（CYP11B2 H-score/mm²）は、*ATP1A1*、*ATP2B3*、*CACNA1D*、および *KCNJ5* 変異 APA 間で有意差はなかった。しかし、CYP17A1 免疫反応性（CYP17A1 H-score/mm²）は、*KCNJ5* では *ATP2B3* 変異 APA よりも有意に高く（P＝0.0057）、*CACNA1D* では *ATP2B3* 変異 APA よりも有意に高かった（P＝0.0184）（図 3）。*KCNJ5* 変異 APA では、CYP11B2 免疫反応性（CYP11B2 H-score/mm²）は、淡明細胞成分の割合と有意に逆相関（P＝0.00289、ρ＝−0.6545）したが、緻密細胞の割合とは正相関（P＝0.00289、ρ＝0.6545）した。体細胞変異に関係なく、*ATP1A1*、*ATP2B3*、*CACNA1D* 変異 APA における CYP11B2 免疫反応性と明瞭/緻密細胞成分との間には有意な相関を認めなかった。また、APA における明瞭/緻密細胞成分の割合と CYP17A1 免疫反応性（CYP17A1 H-score/mm²）との間にも有意な相関を認めなかった。CYP11B2 と CYP17A1 は *KCNJ5* 変異 APA では有意に正の相関を認めたが（P＝0.0112、ρ＝0.7237）、*ATP1A1* 変異 APA では逆相関を認めた（P＝0.0025、ρ＝−0.8667）。*ATP2B3* 変異 APA と *CACNA1D* 変異 APA において、CYP11B2 と CYP17A1 の免疫反応性の間には有意な相関は認めなかった（図 4）。

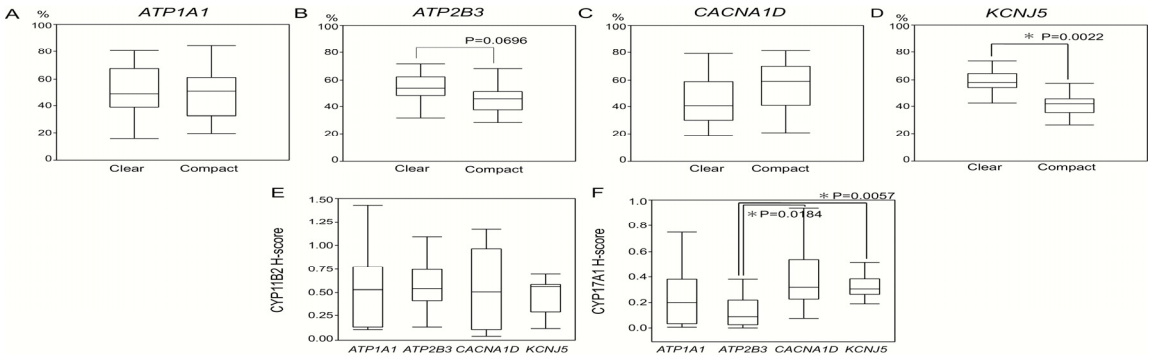


図 3. 体細胞変異別の APA の淡明細胞および緻密細胞比率（A-D）と CYP11B2 および CYP17A1 H-score（E-F）の比較

ATP2B3 変異 APA では、淡明細胞が緻密細胞成分よりも豊富になる傾向であった［54.3%（48.2～62.4%）、45.7%（[37.6～51.8%）、P=0.0696］。*KCNJ5* 変異 APA では、淡明明細が緻密細胞よりも有意に高かった［9.8%（54.4%～64.6%）、40.2%（35.4%～45.6%）、P=0.0022］。CYP17A 免疫反応性は *KCNJ5* と *ATP2B3* 変異 APA 間（P=0.0057）、および *ATP2B3* と *CACNA1D* 変異 APA 間（P=0.0184）で有意に差があった。統計は Kruskal-Wallis 検定、有意水準 P<0.05。

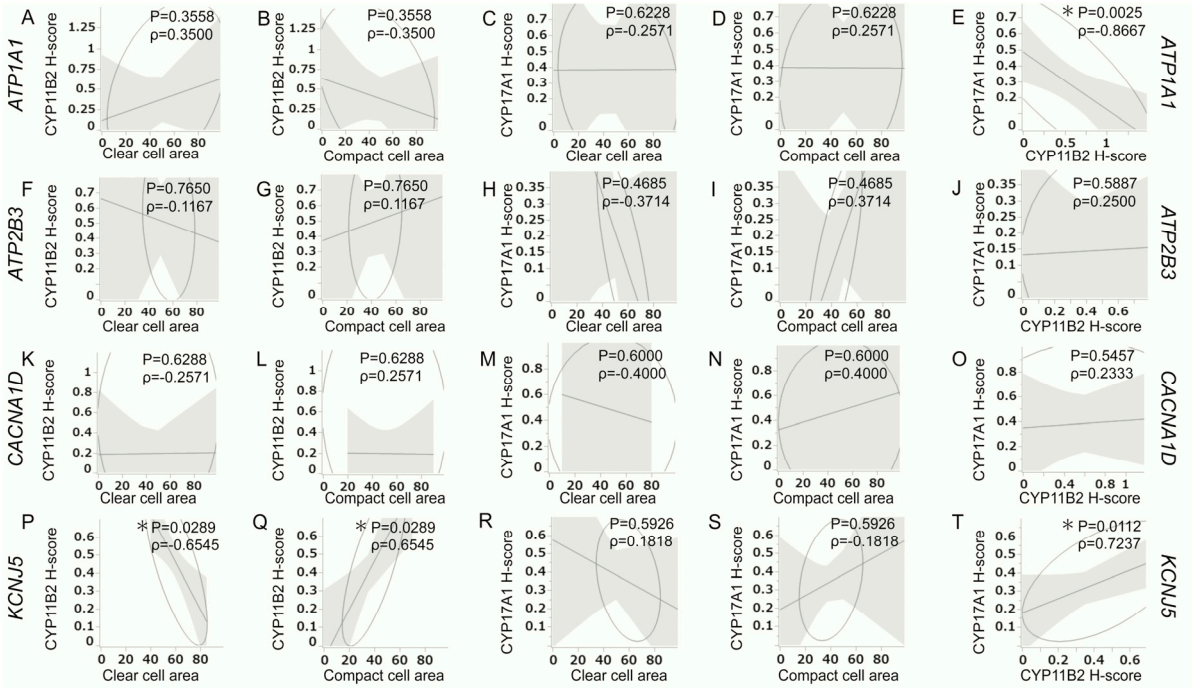


図 4. *ATP1A1*（A–E）、*ATP2B3*（F–J）、*CACNA1D*（K–O）、*KCNJ5*（P–T）体細胞変異 APA における細胞成分とステロイド生成酵素の相関

CYP11B2 と CYP17A1 は両方とも *ATP1A1* 変異 APA で有意な逆相関を示した（P=0.0025、ρ=−0.8667）。CYP11B2 H-score と *KCNJ5* 変異 APA の淡明細胞域の割合とも有意な逆相関を示し（P=0.0289、ρ=−0.6545）、CYP11B2 H-score は *KCNJ5* 変異 APA の緻密細胞領域の割合と有意な正相関を示した（P=0.0289、ρ=0.6545）。CYP11B2 と CYP17A1 H-score は *KCNJ5* 変異 APA で有意な相関を示した（P=0.0112、ρ=0.7237）。統計は Spearman の順位相関検定、有意水準 P<0.05。

考　察

本研究の結果、*KCNJ5* 変異 APA では淡明細胞が優勢であり、その他の *ATP1A1*、*ATP2B3*、*CACNA1D* 変異 APA とは腫瘍内形態学的不均一性が顕著であった。*ATP2B3* 変異 APA は *ATP1A1* 変異 APA よりも核が比較的小さく、*CACNA1D* 変異 APA よりも核と細胞質の比が低いことから、*ATP2B3* 変異 APA は他の遺伝子型の APA よりも核が小さいが、脂肪滴を含む細胞質が比較的豊富であることが示され、異なる変異 APA 間のこれらの組織学的差異の機能的意義を探ることが重要であると考えられる。CYP11B2 免疫反応性は、*KCNJ5*、*ATP1A1*、*ATP2B3*、および *CACNA1D* 変異 APA 間で有意差が無かったことは、異なる体細胞変異を持つ APA 間で腫瘍内アルドステロン合成に関して有意差がない可能性が示唆される。しかし、腫瘍細胞における CYP17A1 免疫反応性は、*CACNA1D* および *KCNJ5* 変異 APA よりも ATP2B3 変異 APA の方が確かに有意に低く、*ATP2B3* 変異 APA が *KCNJ5* および *CACNA1D* 変異 APA よりもコルチゾールおよびアルドステロン合成能力が比較的低い可能性があることを示しているものの、これらの生物学的意義を決定づけるには、コルチゾールや他のミネラルコルチコイドの共分泌や、18-オキソコルチゾールなどのハイブリッドステロイドの分泌の分析を含む更なる研究が必要である。また、*ATP2B3* 変異 APA は相対的に明細胞優位の組織学的所見を示したが、腫瘍細胞における CYP11B2 と CYP17A は正の相関を示さなかった。*ATP1A1* 変異 APA は、腫瘍内形態学的不均一性がより顕著であるにもかかわらず、他の遺伝子型よりも腫瘍細胞が緻密または好酸球性が強い特徴があった。特に興味深いのは、腫瘍細胞における CYP11B2 と CYP17A1 が *ATP1A1* 変異 APA で逆相関を示したことである。これらの知見は、*ATP1A1* および *ATP2B3* 変異 APA が *KCNJ5* 変異 APA よりもより秩序だった分化を呈している可能性がある。

本研究により APA で最もその頻度が高い *KCNJ5* 遺伝子変異はその他の *ATP1A1*、*ATP2B3*、*CACNA1D* の群と比較して異なる病理学的特徴を呈することが示された一方、アルドステロン過剰産生を行う APA におけるアルドステロン過剰合成に対しての根本的薬物療法の確立が期待されるが、本研究で明らかになった個々の体細胞変異型とその臨床的表現型との相関メカニズムをより明らかにすることが必要であり、更なる研究が待たれる。

共同研究者

本研究の共同研究者は、東北大学大学院歯学研究科歯内歯周治療学分野の石幡浩志助教である。

文　献

1) Funder JW, Carey RM, Mantero F, Murad MH, Reincke M, Shibata H, Stowasser M, Young WF Jr. The Management of Primary Aldosteronism: Case Detection, Diagnosis, and Treatment: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. J Clin Endocrinol Metab. 2016 May;101(5):1889-916. doi: 10.1210/jc.2015-4061. Epub 2016 Mar 2. PMID: 26934393.

2) Milliez P, Girerd X, Plouin PF, Blacher J, Safar ME, Mourad JJ. Evidence for an increased rate of cardiovascular events in patients with primary aldosteronism. J Am Coll Cardiol. 2005 Apr 19;45(8):1243-8. doi: 10.1016/j.jacc.2005.01.015. PMID: 15837256.

3) Nanba K, Yamazaki Y, Bick N, Onodera K, Tezuka Y, Omata K, Ono Y, Blinder AR, Tomlins SA, Rainey WE, Satoh F, Sasano H. Prevalence of Somatic Mutations in Aldosterone-Producing Adenomas in Japanese Patients. J Clin Endocrinol Metab. 2020 Nov 1;105(11):e4066–73. doi: 10.1210/clinem/dgaa595. PMID: 32844168.

4) Omata K, Satoh F, Morimoto R, Ito S, Yamazaki Y, Nakamura Y, Anand SK, Guo Z, Stowasser M, Sasano H, Tomlins SA, Rainey WE. Cellular and Genetic Causes of Idiopathic Hyperaldosteronism. Hypertension. 2018 Oct;72(4):874-880. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.11086. PMID: 30354720.

5) Weiss LM. Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors. Am J Surg Pathol. 1984 Mar;8(3):163-9. doi: 10.1097/00000478-198403000-00001. PMID: 6703192.
6) Yamazaki Y, Omata K, Tezuka Y, Ono Y, Morimoto R, Adachi Y, Ise K, Nakamura Y, Gomez-Sanchez CE, Shibahara Y, Kitamoto T, Nishikawa T, Ito S, Satoh F, Sasano H. Tumor Cell Subtypes Based on the Intracellular Hormonal Activity in KCNJ5-Mutated Aldosterone-Producing Adenoma. Hypertension. 2018 Sep;72(3):632-640. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.10907. PMID: 30354756.