

## DNA メチル化による成長ホルモン (GH) 産生細胞腫瘍化機構の解析

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部分子薬理学分野 吉本勝彦  
徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部人体病理学分野 銭 志 栄  
徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部人体病理学分野 佐野壽昭  
虎の門病院脳神経外科 山田正三

### はじめに

GH産生腺腫の約40-50%に、Gs $\alpha$ の活性化変異であるgsp変異が認められる<sup>1)</sup>。しかし、残りの60%の腫瘍化に、どのような遺伝子異常が関与しているのかについては全く不明である。私たちはこれまでに下垂体腫瘍においては、他の悪性腫瘍と比べて、癌遺伝子や癌抑制遺伝子の遺伝子変異が低頻度であることを報告してきた<sup>2-4)</sup>。最近、DNAのメチル化が、癌抑制遺伝子の不活化の新たな機構として注目を集めている<sup>5)</sup>。本研究においてはGH産生腺腫におけるDNAメチル化によるretinoblastoma 1 (RB1) 遺伝子およびras association domain family 1 (RASSF1) 遺伝子の不活化機構を検討した。

### 研究方法

#### 1. RB1 遺伝子の異常

8例のGH産生腺腫および2例のGH・プロラクチン産生腺腫を含む29例の下垂体腺腫におけるRB1遺伝子の異常を解析した。

#### A. 免疫組織化学におけるpRbの発現の検討

ホルマリン固定パラフィン包埋標本について、モノクロナル抗RB抗体 (BD PharMingen社、クローンG3-245) を用いて免疫組織化学をおこなった。シグナルが核に局在した場合を陽性細胞とした。また、腺腫においてpRbのシグナルが全ての細胞に認められる場合および陽性細胞が不均一な分布を示す場合を、pRb発現陽性とした。また、腫瘍細胞の周囲に存在する血管内皮細胞などの正常細胞にはシグナルが認められるが、全ての腫瘍細胞にシグナルが認められない場合をpRb発現陰性と判定した。

#### B. RB1 遺伝子遺伝子の体細胞変異の解析

免疫組織化学的にpRb発現が陰性である腺腫において、RB1遺伝子が位置する13q

14 部位におけるヘテロ接合性の消失 (LOH) の解析、RB1 プローブ (Oncor 社) を用いた interphase fluorescence *in situ* hybridization (FISH) による RB1 遺伝子のコピー数の解析、RB1 遺伝子のプロモーターおよび全エクソンの塩基配列の解析を行った。塩基配列の決定は BigDye Terminator V3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems, 社) を用いて、ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により行った。それぞれのプライマーの塩基配列は既報に従った<sup>6)</sup>。

#### C. RB1 プロモーター領域のメチル化の解析

腫瘍から抽出したゲノム DNA を CpGenome DNA modification kit (Intergen 社) で処理した。処理済みゲノム DNA を鋳型にして、メチル化を認識するプライマー対および非メチル化を認識するプライマー対を用いて PCR を行った (メチル化感受性 PCR 法)。ヒトゲノム DNA を CpG メチラーゼでメチル化したものを陽性コントロールとして用いた。またバイサルファイトで処理済みゲノム DNA を鋳型とした PCR 産物をベクターにクローニングし、数個のクローンの塩基配列を決定することにより、RB1 遺伝子プロモーターの CpG アイランドのメチル化について検討した (バイサルファイト-塩基配列決定法)。それぞれのプライマーの塩基配列は既報に従った<sup>6)</sup>。

## 2. RASSF1 遺伝子の異常の解析

13 例の GH 産生腺腫および 1 例の GH・プロラクチン産生腺腫を含む 52 例の腺腫における RASSF1 遺伝子の異常の解析を行った。

#### A. RASSF1A 遺伝子プロモーター領域のメチル化の解析

4 例の正常下垂体および 52 例の腺腫より抽出したゲノム DNA を、バイサルファイトで処理後、メチル化感受性 PCR 法およびバイサルファイト-塩基配列決定法を用いて、メチル化の有無を検討した。それぞれの方法に用いたプライマーの塩基配列は既報に従った<sup>7)</sup>。

#### B. 半定量的 RT-PCR 法による RASSF1A mRNA の解析

4 例の正常下垂体および 52 例の腺腫より抽出した RNA を用いて、RT-PCR を行い、RASSF1A mRNA 量を半定量した。プライマーの塩基配列は既報に従った<sup>7)</sup>。内部コントロールとして、グリセアルデヒド-3-リン酸 脱水素酵素 (GAPDH) を用いた。PCR 産物をアガロース電気泳動にて分離後、エチジウム ブロマイドにて染色した。それぞれの mRNA レベルは NIH image にて定量を行い、RASSF1A mRNA と GAPDH

mRNA の比 (RASSF1A mRNA/GAPDH mRNA) として表示した。

## 結果

### 1. RB1 遺伝子の解析

#### A. 免疫組織化学的解析

GH 産生腺腫を含む 28 例の腺腫において、免疫組織化学的に pRb の発現が認められた。1 例のプロラクチノーマにおいては、発現が認められなかった。

#### B. RB1 遺伝子遺伝子の体細胞変異の解析

免疫組織化学的に pRb が陰性を示すプロラクチノーマにおいては、13q14 部位における LOH を認めるものの、interphase FISH により 2 つの RB1 遺伝子のコピー数を保持していることを明らかにした。また RB1 遺伝子のプロモーターおよび全エクソンの塩基配列の解析を行ったが、変異、挿入、欠失などの変化は認められなかった。

#### C. RB1 プロモーター領域のメチル化の解析

メチル化感受性 PCR においては、CpG のメチル化を検出するプライマーでは増幅せず、非メチル化を検出するプライマーでのみ、PCR 産物が得られた。また、バイサルファイト-塩基配列決定法においても、プロモーター領域における CpG 部位にはメチル化は認められなかった。

### 2. RASSF1A 遺伝子の解析

#### A. RASSF1A 遺伝子プロモーター領域のメチル化

メチル化感受性 PCR においては、52 例の下垂体腺腫のうち、20 例 (38%) に CpG のメチル化を認めた (表 1、図 1)。このうち GH 産生腺腫においては、13 例中 7 例 (54%) にメチル化を認めた。1 例の GH・プロラクチン産生腺腫においては、メチル化を認めなかった。一部の腺腫において、メチル化感受性 PCR の結果とバイサルファイト-塩基配列決定法の結果を比較検討したところ、2 つの方法の結果は一致していることを見いだした。また 4 例の正常下垂体においては、いずれも CpG のメチル化を認めなかった。

#### B. RASSF1A mRNA の解析

4 例の正常下垂体および HeLa 細胞においては、RASSF1A 遺伝子の発現が認められ、RASSF1A mRNA/GAPDH mRNA の平均値は 0.75 であった。そこで RASSF1A

mRNA/GAPDH mRNA が0.38以下を示す腺腫を RASSF1A の発現低下とした。その結果、52例中22例(42%)に発現消失あるいは発現低下を認めた(表1)。CpGのメチル化を認めない32例中28例では、RASSF1A mRNA レベルは正常であった。一方、RASSF1A mRNA が全く認められない腺腫においては、11例全てにCpGのメチル化を認めた。また発現低下を示した11例のうち、7例(64%)にメチル化を認めた。

## 考察

RB1 遺伝子の異常は、多くの腫瘍の発生に関与している。浸潤性を示す下垂体腺腫においては、RB1 遺伝子が位置する13q14領域のLOHが高頻度に認められるが、免疫組織化学的にはpRbは検出されることより、RB1 遺伝子自体の異常ではなくRB1 遺伝子近傍の腫瘍抑制遺伝子の存在の可能性が示唆されている。また、Simpsonらは45例の下垂体腺腫のうち10例(22%)に免疫組織学的にpRbの発現を認めないこと、45例中4例にプロモーターのメチル化を認めると報告している<sup>8)</sup>。今回の検討では、下垂体腺腫におけるpRbの発現消失は28例中1例(プロラクチノーマ)のみであることを示した。このプロラクチノーマにおいては、13q14領域のLOHを認めるが、interphase FISHにてRB1 遺伝子を2コピー認めたことから、有糸分裂時に組み換えにより1つのRB1 対立遺伝子が重複した可能性が示唆された。また、プロモーター部位、全エクソンおよびエクソン・イントロン境界部位に変異、挿入、欠失などの異常を伴わないため、プロモーター部位のCpGのメチル化を検討したが、メチル化は認められなかった。このため、現時点では、本腺腫におけるpRb発現消失の機構は不明である。

RASSF1A 遺伝子は3p21.3領域に位置する癌抑制遺伝子である。最近、多くの腫瘍でRASSF1A 遺伝子プロモーター領域のメチル化による遺伝子サイレンシングが報告されているが<sup>9)</sup>、下垂体腺腫における解析はなされていなかった。現時点では、利用可能な抗RASSF1A抗体がないため、下垂体腺腫における蛋白レベルでの解析は行えなかった。RT-PCR法によるRASSF1A mRNA レベルの解析では、42%の腺腫に発現消失あるいは低下を認めた。しかも、全く発現が認められない腺腫では、どの腺腫もプロモーターのCpG部位のメチル化を認めた。このことから、RASSF1Aのメチル化によるサイレンシングが、下垂体の腫瘍化に関与していることが示唆された。

以上の結果より、GH産生腺腫においては、RB1 遺伝子の遺伝子異常やメチル化によるサイレンシングは稀であること、また癌抑制遺伝子であるRASSF1Aのメチル化による発現消失あるいは低下が高頻度で認められることから、RASSF1AはGH産生細胞の腫瘍化に関与していることが示唆される。

## 文献

1. Yamasaki H, Mizusawa N, Nagahiro S, Yamada S, Sano T, Itakura M, Yoshimoto K: GH-Secreting Pituitary Adenomas Infrequently Contain Inactivating Mutations of PRKARIA and LOH of 17q23-24. Clin. Endocrinol, 58:464-470, 2003
2. Yoshimoto K, Iwahana H, Fukuda A, Sano T, Saito S, Itakura M: Role of p53 Gene Mutations for Endocrine Tumorigenesis: Mutation Detection by Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism. Cancer Res, 52(18): 5061-5064, 1992
3. Yoshimoto K, Iwahana H, Fukuda A, Sano T, Katsuragi M, Kinoshita M, Saito S, Itakura M: Ras Mutations in Endocrine Tumors: Mutation Detection by PCR-SSCP. Jpn J Cancer Res, 83: 1057-1062, 1992
4. Tanaka C, Kimura T, Yang P, Moritani M, Yamaoka T, Yamada S, Sano T, Yoshimoto K, Itakura M: Analysis of loss of heterozygosity on chromosome 11 and infrequent inactivation of the MEN1 gene in sporadic pituitary adenomas. J Clin Endocrinol Metab, 83, 2631-2634, 1998
5. Herman JG, Baylin SB: Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. N Engl J Med 349: 2042-2054, 2003
6. Honda S, Tanaka-Kosugi C, Yamada S, Sano T, Matsumoto T, Itakura M, Yoshimoto K: Human pituitary adenomas infrequently contain inactivation of retinoblastoma 1 gene and activation of cyclin dependent kinase 4 gene. Endocrine J 50: 309-318, 2003
7. Burbee DG, Forgacs E, Zochbauer-Muller S, Shivakumar L, Fong K, Gao B, Randle D, Kondo M, Virmani A, Bader S, Sekido Y, Latif F, Milchgrub S, Toyooka S, Gazdar AF, Lerman MI, Zabarovsky E, White M, Minna JD: Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression. J Natl Cancer Inst 93: 691-699, 2001
8. Simpson DJ, Hibberts NA, McNicol AM, Clayton RN, Farrell WE: Loss of pRb expression in pituitary adenomas is associated with methylation of the *RBI* CpG island. Cancer Res 60: 1211-1216, 2000

9. Dammann R, Li C, Yoon JH, Chin PL, Bates S, Pfeifer GP: Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat Genet* 25: 315-319, 2000

表1. 下垂体腺腫における RASSF1A プロモーター部位のメチル化と遺伝子発現との関連

RASSF1A 発現	症例数	RASSF1A メチル化		<i>P</i> <0.0001
		+	-	
-	11	11 (100%)	0	
±	11	7 (64%)	4 (36%)	
+	30	2 (7%)	28 (93%)	

±: 腺腫における RASSF1A mRNA レベルが正常下垂体に比べて優位に低下している。

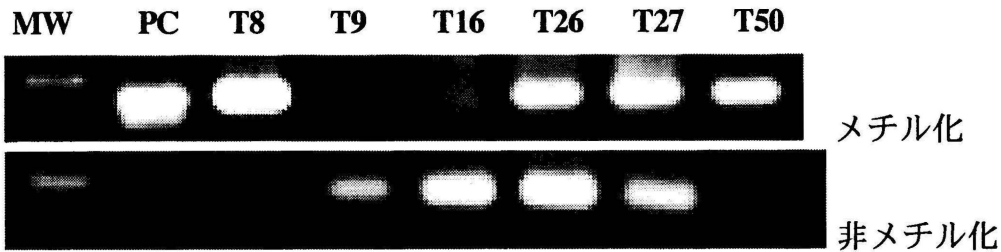


図1 RASSF1A 遺伝子プロモーター部位のメチル化感受性 PCR

上段は CpG がメチル化されている場合に増幅するプライマーを、下段は非メチル化されている場合に増幅するプライマーを用いた。MW はサイズマーカーを、PC はメチル化の陽性コントロールを、T8 - T50 は下垂体腺腫を示す。