

## マイクロサテライト解析による多発性内分泌腫瘍症 1 型 (MEN 1) 腫瘍における第 11 染色体欠失の検出

吉本勝彦\*<sup>1</sup> 岩花弘之\*<sup>1</sup> 佐野壽昭\*<sup>2</sup> 板倉光夫\*<sup>1</sup>

\*<sup>1</sup>徳島大学医学部臨床分子栄養学

\*<sup>2</sup>同 第一病理

### はじめに

多発性内分泌腫瘍症 1 型 (MEN 1) は、下垂体、副甲状腺、および睪に腫瘍性病変を生じる疾患で、しばしば家族性に発症し、その場合は常染色体優性遺伝の形式をとる<sup>1)</sup>。

1988 年 Larsson らにより、MEN 1 型の原因遺伝子が連鎖分析により第 11 染色体 (11 q 12-13) に位置すること、MEN 1 型患者のインスリノーマに、第 11 染色体上の Restriction Fragment Length Polymorphism を示すプローブを用いて、遺伝子の欠失の指標となるヘテロ接合性の消失 (LOH) が第 11 染色体全体にわたって認められることが報告された<sup>2)</sup>。このことより、MEN 1 型の原因遺伝子は網膜芽細胞腫遺伝子 (RB) と同様に腫瘍抑制遺伝子としての性格を有していることが示唆された。

その後、我々をはじめ世界の数グループにより、下垂体腫瘍、副甲状腺過形成、および睪内分泌腫瘍に原因遺伝子部位を含む第 11 染色体の LOH が確認された<sup>3,4)</sup>。

MEN の特徴の一つは特定の組み合わせの内分泌腺に腫瘍性病変を生じることである。したがって、同一症例から得られた複数の内分泌腺の腫瘍組織について、さらにまた同じ内分泌腺に発生した複数の腫瘍について共通の遺伝子異常が存在するか否かを検討することが必要である。しかし同一症例から複数の内分泌腺の腫瘍組織が得られる機会は少ない。現在までに同一患者で 2 つの内分泌腺の腫瘍に共通した LOH は、副甲状腺と睪内分泌腫瘍の組み合わせで 3 症例、副甲状腺と下

垂体腺腫の我々の 1 症例<sup>4)</sup>の計 4 症例で認められているが、3 つの内分泌腺の腫瘍に共通した LOH については報告がなかった。そこでマイクロサテライト解析により 3 つの内分泌腺の腫瘍に共通した LOH の有無について検討した。

### MEN 1 症例

**症例 1** 43 歳、男性。1980～1983 年にかけて 3 度の副甲状腺腫瘍摘除術を受けた。1989 年、異所性 GHRH 症候群と診断され、睪における GHRH 産生腫瘍およびグルカゴン、PP 産生腫瘍摘除術を受けた<sup>5)</sup>。術後、血漿 GHRH レベルは正常化し、血漿 GH レベルも一時低下した。その後血漿 GHRH レベルは正常にもかかわらず、血漿 GH レベルは 7～20 ng/ml と徐々に上昇した。また下垂体腫瘍自体も徐々に増大傾向を示したため、1992 年 11 月下垂体腫瘍摘除が施行された。術後より血漿 GH レベルは正常化した。術前には診断不可能であった 2 種の腺腫 (GH 産生腺腫、非機能性腺腫) の存在が組織学的に確認された。

**症例 2** 38 歳、女性。1979 年、インスリノーマの診断のもと、睪体尾部切除術を受け複数の腫瘍の存在が確認された。その後低血糖発作は消失している。1990 年、副甲状腺腫瘍摘除術および GH、プロラクチン産生下垂体腺腫摘出術を受けた<sup>4,6)</sup>。術後、血漿 GH、プロラクチンが軽度高値を示すため、プロモクリプチン投与が行われている。

**症例 3** 59 歳、女性。娘 (症例 2) が MEN 1 の発端者であったため、家族調査を施行したところ、副甲状腺腫瘍およびプロラクチノーマの存在

が確認された<sup>4)</sup>。1990年、副甲状腺腫瘍摘除術を受けているが、プロラクチノーマに対してはプロモクリプチン投与が行われている。

**方法** 表1に示す腫瘍(凍結組織およびパラフィン包埋組織)および患者白血球よりDNAを抽出し、第11染色体長腕に位置する4種のマイクロサテライトマーカーを用い、腫瘍におけるLOHの有無について検討した。蛍光標識プライマーを用いてマイクロサテライトマーカーをPCRで増幅後、DNA自動シーケンサーおよびGENESCAN 672ソフトウェア(ABI社)によって、

電気泳動および増幅DNA断片の解析を行った。

**結果**

症例1:下垂体腺腫、副甲状腺過形成、GHRH産生腺内分沁腫瘍においては第11染色体の広範な領域にわたるLOHが認められたが、グルカゴン、PP産生腺内分沁腫瘍においてはPYGM座位のみの限局したLOHが認められた(図、表2)。また本法を用いて症例1の2個の下垂体腺腫についても、パラフィン包埋試料よりそれぞれの部位を切りだしDNAを抽出して解析したところ、両

表1 第11染色体のヘテロ接合性の消失について検討した腫瘍

腫瘍番号	腫瘍組織	手術時期	組織の保存法
症例 1			
1	下垂体腺腫	1992	凍結組織
1-S	GH産生腺腫		パラフィン包埋組織
1-N	非機能性腺腫		パラフィン包埋組織
2	副甲状腺過形成	1980	パラフィン包埋組織
3	腺内分沁腫瘍 (GHRH産生)	1989	凍結組織
4	腺内分沁腫瘍 (glucagon, PP産生)	1989	凍結組織
症例 2			
5	下垂体腺腫	1990	凍結組織
6	副甲状腺過形成 右上	1990	凍結組織
7	副甲状腺過形成 左下	1990	凍結組織
8	腺内分沁腫瘍 (somatostatin産生)	1979	パラフィン包埋組織
9	腺内分沁腫瘍 (非機能性)	1979	パラフィン包埋組織
10	腺内分沁腫瘍 (somatostatin産生)	1979	パラフィン包埋組織
症例 3 (症例2の母親)			
11	副甲状腺過形成 右	1990	凍結組織
12	副甲状腺過形成 左	1990	凍結組織

GHRH, growth hormone-releasing hormone; PP, pancreatic polypeptide

表2 マイクロサテライトマーカーを用いたMEN1関連腫瘍におけるヘテロ接合性消失の検討

座位	染色体位置	腫瘍番号											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PYGM	11q12-q13.2	○	○	○	○	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
D11S534	11q13	○	—	○	●	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
D11S527	11q13.5	○	○	○	●	○	○	○	○	○	○	●	○
CD3D	11q23	○	—	○	—	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI

○;ヘテロ接合性消失, ●;ヘテロ接合性の保持, —;未検討, NI;ホモ接合性のため情報が得られない

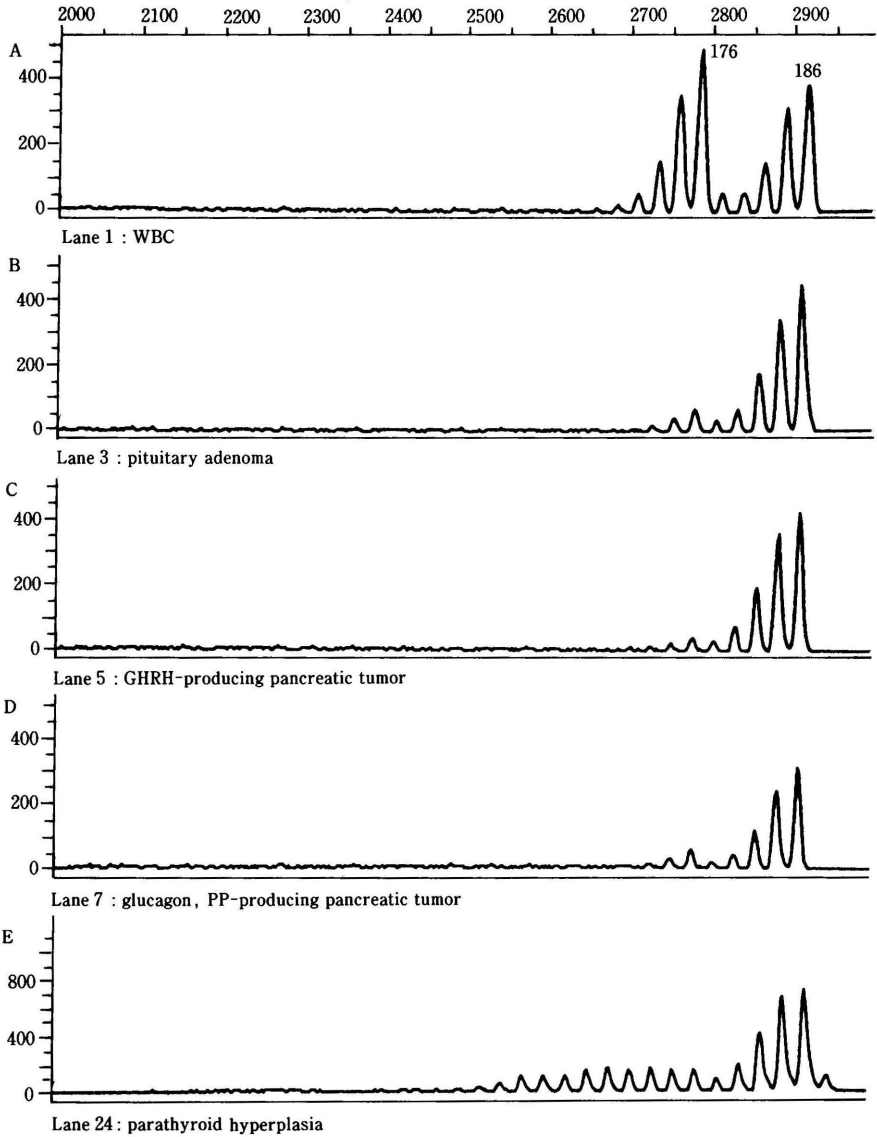


図 DNA自動シーケンサーによるPYGM座位のマイクロサテライト解析

2種のプライマーのうち一方を蛍光で標識し、PCRで増幅後、電気泳動を行い結果をコンピューターにて解析する。Aは症例1の白血球、Bは下垂体腺腫、C、Dは膵内分泌腫瘍、Eは副甲状腺腫瘍の結果を示す。縦軸は蛍光強度を、横軸は泳動開始時からのスキャン数を示す。Aでは186 bpと176 bpの2つのサイズの対立遺伝子が存在しヘテロ接合性を示すが、B-Eでは176 bpのサイズを示す対立遺伝子が欠失していることを示す。

腺腫ともMEN 1型原因遺伝子と連鎖しているPYGM座位(11q12-13.2)にLOHが確認された。

症例2：下垂体腺腫、2個の副甲状腺過形成、3個の膵内分泌腫瘍にD11S527座位におけるLOHを認めた(表2)。腫瘍において欠失した対立遺伝子は健康な父親由来のものであり、残存し、

かつ微小な変化が存在すると考えられる対立遺伝子は、母親である症例3より由来していることが明らかとなった。

症例3：2個の副甲状腺過形成のうち、1個の副甲状腺過形成においてD11S527座位におけるLOHを認めた(表2)。

## 考 察

サザン法は腫瘍組織から高分子量 DNA を抽出する必要があり、かつ用いる DNA 量が 5~10  $\mu\text{g}$  必要であるため、パラフィン包埋試料の解析には適さない。しかし PCR によるマイクロサテライト分析によって、パラフィン包埋試料を解析に用いることが可能となった。しかもマイクロサテライトは主に 2 塩基の繰り返し数の差による多型を示すため、ヘテロ接合性を示す割合が高い。蛍光標識によるマイクロサテライト解析は PCR 産物のサイズの同定がコンピュータープログラムにより簡便かつ正確に行えること、また定量性に優れているため、主要なピークとアーティファクトを明確に区別でき、しかも LOH 検出の際にしばしば問題となる正常組織由来のシグナルも、ピーク面積を比較することにより区別可能となった。

これらの結果より、同一症例における 3 内分泌腺腫瘍に共通した第 11 染色体の LOH、および同一内分泌腺内の複数個の腫瘍における共通した LOH が確認され、3 つの内分泌腺の腫瘍化は、MEN 1 遺伝子の機能消失を共通の基盤として発生することが示唆された。

また他の癌遺伝子あるいは癌抑制遺伝子として、H-, K-, N-ras 遺伝子のエクソン 1, 2, および p 53 遺伝子のエクソン 5~10 について PCR-SSCP 法により変異の有無をスクリーニングしたが、それぞれの腫瘍には変異は検出されなかった<sup>7,8)</sup>。また Gs  $\alpha$  遺伝子のコドン 201 と 227 の変異を PCR-PIRA (Primer-Introduced Restriction Analysis) 法でスクリーニングしたところ、症例 2 の GH・プロラクチン産生下垂体腺腫にの

みコドン 201 の変異が認められた<sup>9)</sup>。この結果は PCR-直接塩基配列決定法による検討においても確認されている<sup>6)</sup>。

上記の成績から第 11 染色体上の原因遺伝子以外に、さらに複数個の遺伝子変化によって、それぞれの腫瘍が形成されることが考えられる。組織特異性や悪性度についても関与する遺伝子の異常が想定され、今後の解析が必要がある。

## 最 後 に

MEN 1 型の原因遺伝子は、まさに単離されようとしている段階にある。この原因遺伝子が単離されれば、その機能および遺伝子の変異と臨床像との関連、および MEN 1 型における腫瘍の発生機序が解明され、さらには孤発性の腫瘍の発生機序の解明に貢献するものと期待される。

## 文 献

- 1) 吉本勝彦, 斎藤史郎: 日内分泌会誌, 67: 764, 1991.
- 2) Larsson, C., et al.: Nature, 332: 85, 1988.
- 3) Yoshimoto, K., et al.: Cancer Res., 49: 2716, 1989.
- 4) Yoshimoto, K., et al.: Jpn. J. Cancer Res., 82: 886, 1991.
- 5) Yamasaki, R., et al.: Endocrinol. Japon, 35: 97, 1988.
- 6) Hosoi, E., et al.: Endocrinol. Japon, 39: 319, 1992.
- 7) Yoshimoto, K., et al.: Jpn. J. Cancer Res., 83: 1057, 1992.
- 8) Yoshimoto, K., et al.: Cancer Res., 52: 5061, 1992.
- 9) Yoshimoto, K., et al.: Cancer, 72: 1386, 1993.