

下垂体腫瘍の分子生物学

下垂体腺腫におけるヘテロ接合性の消失 および p 16 遺伝子変異の解析

吉本勝彦*¹ 田中知里*¹ 木村建彦*² 岩花弘之*¹
山田正三*⁴ 佐野壽昭*³ 斎藤史郎*² 板倉光夫*¹

*¹ 徳島大学医学部臨床分子栄養学

*² 同 第一内科

*³ 同 第一病理

*⁴ 虎の門病院脳神経外科

はじめに

下垂体の腫瘍化に Gs α 遺伝子変異の関与が、また浸潤化に H-ras 遺伝子や PKC 遺伝子の変異、あるいは第 13 染色体長腕 (13q) におけるヘテロ接合性の消失 (LOH) の関与が報告されているが、腫瘍化の分子機構の詳細は明らかでない。

下垂体腫瘍は家族性発症が認められない孤発性腺腫がほとんどを占め、遺伝性を示す多発性内分泌腫瘍症 1 型 (MEN 1) に伴う下垂体腫瘍は全体の約 1% 程度を占めるにすぎない¹⁾。MEN 1 型原因遺伝子は第 11 染色体長腕 (11q13) に位

置し²⁾、MEN 1 型患者の下垂体、副甲状腺、および膵内分泌腫瘍に、原因遺伝子部位を含む第 11 染色体の LOH が確認されている^{3,4)}。MEN 1 型原因遺伝子は癌抑制遺伝子として作用していると考えられているが、まだ単離されていない。

これまでに孤発性の副甲状腺や膵内分泌腫瘍の約 1/3 において第 11 染色体の LOH が認められ、MEN 1 型原因遺伝子あるいは、その近傍に位置する他の癌抑制遺伝子の不活化が腫瘍化に関与している可能性が示唆されている。これまでに孤発性下垂体腫瘍に関しては、サザン法を用いた解析により 2/26 個 (8%)⁵⁾ および 16/88 個 (18%)⁶⁾ の頻度で第 11 染色体の LOH が認められている。

p16はサイクリン依存性キナーゼ (CDK) 4 と結合し、CDK 4が有するキナーゼ活性の阻害物質の遺伝子として単離された。ついで9p21の領域においてヒト癌細胞株で高頻度に欠失している遺伝子が単離され、その遺伝子はp16と同一の遺伝子であることが明らかにされた。当初、p16の遺伝子異常は細胞株に比し、手術材料では頻度が低いと考えられていた。その後、変異が高頻度に認められる腫瘍が報告され、本遺伝子は癌抑制遺伝子の1つとして再注目されている⁷⁾。

そこで孤発性下垂体腺腫における第11染色体のLOHを、MEN1型原因遺伝子が存在する11q13領域と他の腫瘍で異常が高頻度に認められる9p21-22領域に焦点を当て白血球と比較することにより、それぞれの領域に位置する複数のマイクロサテライトマーカーにより検討した。またp16遺伝子の異常の有無をPCR-SSCP法により検討した。

1. 対象および方法

1) 対象

手術により得られた孤発性下垂体腺腫31個 (GH産生腺腫10個、GH/PRL産生腺腫2個、PRL産生腺腫6個、TSH産生腺腫2個、ACTH産生腺腫1個、非機能性腺腫10個) および家族性下垂体性巨人症を示した兄弟におけるGH産生腺腫2個の計33個の腫瘍について解析した。

2) 方法

腫瘍組織および患者白血球よりDNAを抽出し、第11染色体長腕13領域 (11q13) に位置する10種のマイクロサテライトマーカー (セントロメア側-D11S480, D11S457, D11S449, PYGM, D11S1783, D11S913, D11S1889, D11S987, D11S534, D11S527-テロメア側)、および第9染色体短腕21-22領域 (9p21-22) に位置する8種のマイクロサテライトマーカー (テロメア側-D9S156, D9S157, D9S162, IFNA, D9S126, D9S265, D9S259, D9S169-セントロメア側) を用い、腫瘍

組織における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自動シークエンサーおよびGENESCAN 672ソフトウェア (Perkin-Elmer社) によって、電気泳動および増幅DNA断片の解析を行った。ヘテロ接合性を示したマーカーのうち、腫瘍組織において消失したアレルの患者白血球DNAに対する相対的蛍光強度が、50%以下を示したものをLOHと判定した。

p16遺伝子の変異に関しては、エクソン1, 2 (3つに分割)、3について、PCR-SSCP法にてスクリーニングを行い、塩基置換を決定した。

2. 結果

1) 腫瘍におけるLOHの検討

31個の孤発性下垂体腺腫のうち、4個の腺腫に11q13領域のLOHを認めた。症例12においてはD11S480からD11S527にわたる広範な領域にLOHが存在すると考えられた。一方、症例9および13では1種のマーカーに限局してLOHが認められた。症例8では2種のマーカー (D11S480, D11S913) にLOHを認めるが、その間に存在するマーカー (PYGM) にはLOHが認められなかった (表1)。

家族性下垂体性巨人症を示したGH産生腺腫においては、兄の腺腫および弟の腺腫ではD11

表1 下垂体腺腫における11q13領域のLOH

座位	症例			
	8	9	12	13
D11S480	LOH	ni	LOH	ni
D11S457	ni	R	ni	ni
D11S449	ni	R	LOH	R
PYGM	R	R	LOH	LOH
D11S1783	ni	ni	ni	ni
D11S913	LOH	ni	ni	R
D11S1889	ni	R	LOH	R
D11S987	ni	LOH	LOH	R
D11S534	R	R	LOH	ni
D11S527	R	R	LOH	R

LOH, ヘテロ接合性の消失; R, ヘテロ接合性の保持; ni, ホモ接合性のため情報が得られない。

S 457 から D 11 S 527 にわたる領域に LOH が認められた (本特集, 山田正三らの項を参照)。

9 p 22 領域については, 2 例に LOH を認めた。しかし, 症例 1 (GH 産生腺腫) は D 9 S 156 のみに, また症例 19 (TSH 産生腺腫) は IFNA のみに LOH が限局して認められた (表 2)。

2) p 16 遺伝子の変異の検討

p 16 遺伝子の解析では, エクソン 1, 2, 3 はともに増幅され, いずれの腫瘍においてもホモ接合性欠失 (homozygous deletion) は認められなかった。PCR-SSCP 解析において 3 種類の塩基置換を認めたが, この変異は患者白血球にも認められ, 多型性を示す変化と考えられる (表 3)。しかし腫瘍に特異的な遺伝子変化は認められなかった。

3) マイクロサテライト不安定性の検討

検討したマイクロサテライトマーカーについて

表 2 下垂体腺腫における 9 p 21-22 領域の LOH

座位	症例	
	1	19
D 9 S 156 (9 p 22) [2 cM]	LOH	R
D 9 S 157 (9 p 22) [2 cM]	R	ni
D 9 S 162 (9 p 22) [4 cM]	ni	ni
IFNA (9 p 22) [4 cM]	R	LOH
p 16 遺伝子座位		
D 9 S 126 (9 p 21) [0 cM]	ni	R
D 9 S 265 (9 p 21) [5 cM]	R	R
D 9 S 259 (9 p 21) [2 cM]	ni	ni
D 9 S 169 (9 p 21)	R	R

LOH, ヘテロ接合性の消失; R, ヘテロ接合性の保持; ni, ホモ接合性のため情報が得られない, 鉤括弧内の数字はマーカー間の距離を示す。

は, いずれも白血球と腫瘍 DNA での PCR 産物のサイズに差は認められなかった。

3. 考 察

マイクロサテライトはゲノム上に散在する 2-4 塩基対の反復配列で, 反復回数に関する多型性が著しい特徴を有し, ヒトゲノム上に約数万カ所存在することが知られている。マイクロサテライト解析では, ミスマッチ修復系遺伝子の異常を間接的に表現するマイクロサテライト不安定性⁹⁾と癌抑制遺伝子の不活化を示唆する LOH という異なった遺伝子異常の存在を同時に, 迅速に, しかも微量の DNA からの解析が可能である。

マイクロサテライトマーカーを用いた検討により, 孤発性下垂体腺腫のうち 4/31 個 (13%) に 11 q 13 領域の LOH の存在を認めた。この頻度はサザン法による従来の結果とほぼ一致している。しかし Boggild らは 11 q 13 領域の 5 個のサザン解析用マーカー (D 11 S 149, PYGM, D 11 S 97, D 11 S 146, INT 2) にて検討したところ, 16 個の腺腫ともに 11 q 13 領域の広い範囲で LOH が存在することを報告しているが, 我々の検討では広範囲に LOH が認められるのは症例 12 のわずか 1 例のみであった。マイクロサテライト解析では, ほぼ定量性が認められる 25~30 サイクルの PCR を行っており, 腫瘍組織に混入している正常組織由来の DNA が過剰に増幅し, LOH の存在が見逃されている可能性は低いと考えられる。複数のマイクロサテライトマーカーを用いたこのような詳細な検討にもかかわらず, 孤発性下垂体腺腫においては, 孤発性の副甲状腺腫瘍や膵内分泌腫瘍ほど LOH の頻度は高くないことが明らかにされた。

p 16 遺伝子の欠失および変異は, 食道癌, 乳

表 3 下垂体腺腫に認められた p 16 遺伝子の塩基置換

症例	エクソン	コドン	塩基置換	アミノ酸置換
28	2	66	CAC→CGC	His→Arg
		135	GGG→GGA	Gly→Gly
1, 12, 31	3	塩基番号 580	C→T	非翻訳領域

癌、腎癌、膵癌、胆道癌、脳腫瘍など多くの悪性腫瘍で高頻度に検出されている。我々が検討した33個の下垂体腺腫では、9p21-22領域の欠失の頻度は低く、またp16遺伝子変異は認められないことより、下垂体腺腫におけるp16遺伝子異常は稀であることが明らかとなった。最近、膀胱癌や大腸癌などではp16遺伝子の不活化に5' CpG領域のメチル化が関与しているとの報告がある。今後、下垂体腺腫においてもp16遺伝子のmRNA、蛋白の発現レベルの検討が必要である。

腫瘍の発生過程においては、多種の遺伝子異常の蓄積が認められているが、その原因として遺伝子全般の不安定化が関与することが想定されている。遺伝子の不安定性は、染色体に広く分布するマイクロサテライト配列の異常として捉えることが可能である。しかし下垂体腫瘍においてはマイクロサテライト不安定性を指標とした明らかなミスマッチ修復系遺伝子の異常は認められなかった。

最 後 に

一部の孤発性下垂体腺腫にMEN1型の原因遺

伝子が存在する11q13領域のLOHが認められた。今後、MEN1型原因遺伝子が単離されれば、さらに同遺伝子と孤発性下垂体腫瘍との関連が解明されるものと期待される。また下垂体の腫瘍化にはp16遺伝子の異常やミスマッチ修復系遺伝子の異常の関与は少ないと考えられる。

文 献

- 1) 吉本勝彦, 他: 日内分泌会誌, 67: 764, 1991.
- 2) Larsson, C., et al.: Nature, 332: 85, 1988.
- 3) Yoshimoto, K., et al.: Jpn. J. Cancer Res., 82: 886, 1991.
- 4) Shintani, Y., et al.: Endocrine J., 42: 331, 1995.
- 5) Bystrom, C., et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 1968, 1990.
- 6) Boggild, M. D., et al.: J. Clin. Endocrinol. Metab., 78: 387, 1994.
- 7) Kamb, A.: Trend in Genet., 11: 136, 1995.
- 8) Thibodeau, S. N., et al.: Science, 260: 816, 1993.