

副 腎

孤発性褐色細胞腫における *RET* 遺伝子 チロシンキナーゼ部位の変異

田中知里*¹ 吉本勝彦*¹ 木村建彦*²
岩花弘之*¹ 宮内 昭*³ 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香川医科大学第二外科

はじめに

多発性内分泌腫瘍症 (multiple endocrine neoplasia, MEN) 2 A 型および MEN 2 B 型の原因遺伝子はいずれも連鎖解析によって第 10 染色体長

腕 (10 q 11.2) に存在する *RET* 遺伝子と強く連鎖し、これらの症例で胚細胞レベルでの変異が高頻度で認められることより、これらの疾患の原因遺伝子は *RET* 遺伝子であることが明らかにされた^{1,2)}。MEN 2 A 型および家族性甲状腺髄様癌

(familial medullary thyroid carcinoma, FMTC) においては *RET* 遺伝子のエクソン 10 および 11 内の Cys 残基 (コドン 609, 611, 618, 620, 634) に¹⁾, MEN 2 B 型ではエクソン 16 内のコドン 918

の Met 残基に²⁾アミノ酸置換を伴う変異が胚細胞レベルで認められ保因者の遺伝子診断に用いられようとしている (図 1).

また孤発性の甲状腺髄様癌 (MTC) において,

表 解析した症例のリスト

No.	年齢	性	病型	腫瘍	位置, サイズ, 重量	コドン 918 における変異	
						腫瘍	白血球
1.	32	M	MEN 2 A	褐色細胞腫	両側 右 (1.8×1.6×0.8cm) 左 (2.9×2.6×1.7cm)	-	-
2.	25	F	MEN 2 A	褐色細胞腫	両側 右 (8.2×7.1×5.8cm) 左 (0.5×0.4cm)	-	-
3.	33	F	MEN 2 A	褐色細胞腫	両側 右 (5.1×4.4×3.4cm) 左 (0.6×0.4cm)	-	-
4.	46	F	MEN 2 A	MTC 褐色細胞腫	両側 両側 右 (460g) 左 (20g)	-	nd
5.	42	F	MEN 2 A	MTC	両側	-	nd
6.	60	M	FMTC	MTC	両側	-	nd
7.	18	F	MEN 2 B	MTC 褐色細胞腫	両側 両側 右 (26.5g) 左 (12.5g)	+	+
8.	10	F	MEN 2 B	MTC	片側	+	+
9.	8	F	MEN 2 B	MTC	片側	+	+
10.	18	M	MEN 2 B	MTC	両側	+	+
11.	44	F	NF1	褐色細胞腫	左 (7×6×5cm)	-	nd
12.	19	F	NF1	褐色細胞腫	左 (5×4×3cm)	-	nd
13.	34	M	NF1	褐色細胞腫	左 (9×7.2×6.5cm)	-	nd
14.	41	F	孤発性	褐色細胞腫	右 (3×4cm)	+	-
15.	60	M	孤発性	褐色細胞腫	右 (6.5×5.3×3.7cm)	+	-
16.	45	F	孤発性	褐色細胞腫	右 (5×6 m)	+	-
17.	45	F	孤発性	褐色細胞腫 (悪性)	左 (5.3×5.0×4.7 cm)	+	-
18.	67	F	孤発性	褐色細胞腫 (悪性)	左 (3.2×2.8×1.8 cm) (副腎外)	+	-
19.	64	F	孤発性	褐色細胞腫	右 (68g)	-	-
20.	?	F	孤発性	褐色細胞腫	?	-	-
21.	50	M	孤発性	褐色細胞腫	右 (4.3×5.4 cm)	-	nd
22.	47	F	孤発性	褐色細胞腫	左 (7×3.5 cm, 50 g)	-	nd
23.	51	F	孤発性	褐色細胞腫	右 (4.3×5.4 cm)	-	nd
24.	53	F	孤発性	褐色細胞腫	左 (5×5 cm)	-	nd
25.	48	M	孤発性	褐色細胞腫	左 (3×3 cm)	-	nd
26.	69	F	孤発性	褐色細胞腫	左 (32.2 g)	-	nd
27.	70	F	孤発性	褐色細胞腫	右 (3×3 cm)	-	nd
28.	42	F	孤発性	褐色細胞腫	右 (?)	-	nd
29.	19	M	孤発性	褐色細胞腫	右 (?)	-	nd
30.	94	M	孤発性	MTC	右	-	nd
31.	36	F	孤発性	MTC	左	-	nd

? ; 不明, nd ; 未検討

約 30 % にコドン 918 の変異が認められること、コドン 918 に変異を有さない MTC においてエクソン 13 内のコドン 768 の変異が 40 % に認められるが、エクソン 10, 11 における変異は非常に稀であることが報告されている²⁻⁵⁾。褐色細胞腫に関しては、エクソン 10, 11, 16 における変異は非常に低頻度であることが報告されている²⁻⁵⁾ (図 1)。そこで孤発性の褐色細胞腫および MEN 2 A 型, 2 B 型, 神経線維腫症 I 型 (neurofibromatosis I, NF1) に伴う褐色細胞腫および MTC について, *RET* 遺伝子のコドン 918 における変異の有無について検討した。

対象および方法

孤発性の褐色細胞腫 16 個, 孤発性 MTC 2 個, MEN 2 A 型 5 症例における 2 個の MTC および 4 個の褐色細胞腫, MEN 2 B 型 4 症例⁶⁾における 4 個の MTC および 1 個の褐色細胞腫, NF1 に伴う褐色細胞腫 3 個, 家族性 MTC における MTC 1 個 (表)⁷⁾を対象とした。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 を描出し, コドン 918 部分を含む *RET* 遺伝子のエクソン 16 部分を PCR にて増幅した。コドン 918 が ATG から ACG に変異することにより制限酵素 *Fok* I 認識部位が消失することを利用して, PCR 産物の *Fok* I 処理によるスクリーニングを行った。これで陽性とみなしたものについ

て PCR 産物の直接塩基配列決定あるいは複数個のクローン化したプラスミドの塩基配列決定により, 変異を同定した。

結 果

MEN 2 B 型の白血球, MTC, 褐色細胞腫いずれにおいてもコドン 918 における Met (ATG) から Thr (ACG) への変異を認めた。白血球, 腫瘍ともに野生型の *RET* 対立遺伝子が認められ, 変異はヘテロ接合性を示した。また孤発性の褐色細胞腫 16 個のうち 5 個にヘテロ接合性を示す変異を認めた。これらの患者白血球では変異は認められず, 腫瘍特異的であった (表)⁷⁾。図 2 に孤発性褐色細胞腫に認められた変異の例を示す。しかし MEN 2 A 型, NF1, FMTC に伴う褐色細胞腫, MTC および 2 個の孤発性 MTC の腫瘍では変異を認めなかった。

考 察

MEN 2 A 型および MEN 2 B 型の原因遺伝子は *RET* 遺伝子であり, MEN 2 A 型においては細胞外の Cys に富む領域の Cys 残基に, また MEN 2 B 型では細胞内のチロシキナーゼ部分に, それぞれ胚細胞レベルでヘテロの状態に変異が認められる。ヘテロの変異が優性形質としてトランスフォーメーションさせる理由として, これらの変異を有する *RET* 遺伝子を NIH 3T3 細胞に導入す

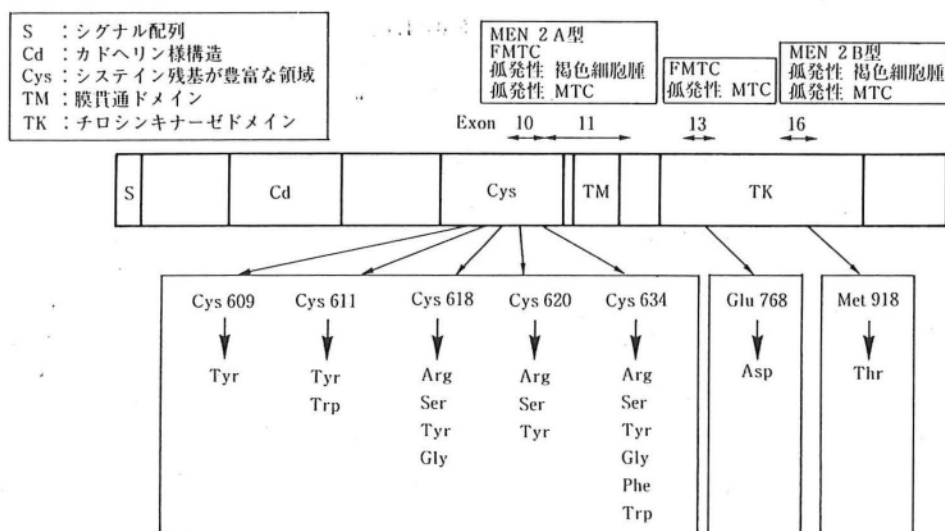


図 1 *RET* 蛋白の構造と MEN 2 A 型, FMTC, MEN 2 B 型および孤発性腫瘍に検出された変異

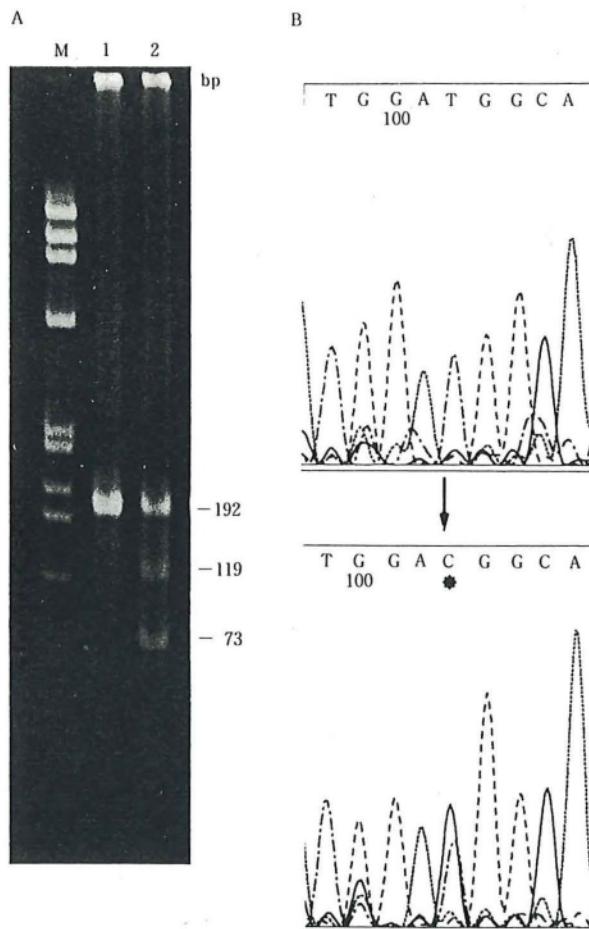


図2 孤発性褐色細胞種に認められた *RET* 遺伝子コドン918の変異
 A: PCR-RFLP 法による *RET* 遺伝子変異の検出
 コドン918での Met(ATG)から Thr(ACG)への変異により, 制限酵素 *FokI* 認識部位が消失する. PCR 産物を *FokI* 処理すると, 切断された 119 bp と 73 bp(野生型)のバンドと切断されなかった192 bp(変異型)のバンドを生じる.
 M, サイズマーカー; 1, *FokI* 未処理; 2, *FokI* 処理
 B; PCR 産物の直接塩基配列決定
 上段, 野生型の塩基配列, 下段, 腫瘍における *RET* 遺伝子の配列. コドン 918の第2塩基に T と C の両者のシグナル(*)が認められ, 変異がヘテロ接合性であることを示す.

ると細胞はトランスフォームすること, 2A型の変異はリガンドが結合しない場合には本来2量体構造をとらない *RET* 蛋白の2量体化を促進させチロシンキナーゼを活性化させること, 2B型の変異は2量体化させないがチロシンキナーゼの基質特異性を変化させると同時にチロシンキナーゼを活性化させることなどより, それぞれ, 異なる機序によりチロシンキナーゼが活性化されることが明らかにされている⁸⁾.

我々は我が国のMEN 2A型, FMTc, MEN 2B

型症例において, 欧米症例で認められる変異と同一の変異が存在するのを見だし, これらの疾患の原因に人種差がないことを明らかにした^{7,9)}. これらの変異が副腎髄質細胞や甲状腺C細胞に過形成を生じ, おそらく染色体1pあるいは22qに存在する他の腫瘍抑制遺伝子の変異により腫瘍が発生すると考えられる.

孤発性の腫瘍に関しては, それぞれコドン 630と634のCys残基が消失する6bpの欠失が孤発性MTCで認められることが報告されている^{4,9)}.

また Eng らは 13 例の孤発性 MTC にはエクソン 10, 11 内の Cys 残基に変異を認めないが, 12 例の孤発性褐色細胞腫のうち 2 例のみにコドン 620 の変異が存在することを報告した⁵⁾. このように孤発性の MTC, 褐色細胞腫ともに細胞外の Cys に富む領域における変異は低頻度であることが明らかにされている. 一方, チロシンキナーゼ部分については, Hofstra らは 18 症例の孤発性 MTC の腫瘍 DNA を解析したところ 6 例でコドン 918 の変異を同定したが, それらの患者白血球 DNA での変異の有無については報告されていない²⁾. しかし 5 例の孤発性の褐色細胞腫で *RET* 遺伝子のコドン 918 の変異は認められなかったと報告している. また Eng らは 13 例の孤発性 MTC のうち 5 例と, 12 例の孤発性褐色細胞腫のうち 1 例で同じコドン 918 の変異を見いだした⁵⁾. 今回, 我々は孤発性の褐色細胞腫で 16 例のうち 5 個 (31%) に *RET* 遺伝子コドン 918 の変異を同定した⁷⁾. その変異はいずれも患者白血球では認められず, 腫瘍特異的であった. 変異を

有する症例と有さない症例間で, 年齢, 性, 腫瘍のサイズなどの差異は認められなかった.

孤発性の褐色細胞腫においてコドン 918 に MEN 2 B 型症例と同じ変異を腫瘍特異的に認めた. これらの結果から, *RET* 遺伝子のチロシンキナーゼ領域における変異は, MEN 2 B 型の原因遺伝子としてだけでなく孤発性褐色細胞腫の腫瘍化に関与していることが示唆された.

文 献

- 1) Mulligan, L., et al.: *Nature*, 363 : 458, 1993.
- 2) Hofstra, R. M. W., et al.: *Nature*, 367 : 375, 1994.
- 3) Eng, C., et al.: *Oncogene*, 10 : 509, 1995.
- 4) Donic-Keller, H., et al.: *Hum. Mol. Genet.*, 2 : 851, 1993.
- 5) Eng, C., et al.: *Hum. Mol. Genet.*, 3 : 237, 1994.
- 6) Yoshimoto, K., et al.: *Endocrine J.*, 40 : 649, 1993.
- 7) Yoshimoto, K., et al.: *Endocrine J.*, 42 : 265, 1995.
- 8) Santro, M., et al.: *Science*, 267 : 381, 1995.
- 9) Kimura, T., et al.: *Endocrine J.*, 42 (4), 1995 in press.