

甲状腺腫瘍の遺伝子異常

多内分泌腫瘍 MEN 2A 型, 2B 型の
分子遺伝学的研究の動向

吉本勝彦*

The molecular genetics of multiple endocrine neoplasia type 2A and 2B

Katsuhiko Yoshimoto¹¹Otsuka Department of Clinical and Molecular Nutrition, School of
Medicine, The University of Tokushima

Summary

Multiple endocrine neoplasia (MEN) type 2A (MEN 2A) and type 2B (MEN 2B) are dominantly inherited with a predisposition to endocrine tumors. The responsible genes for MEN 2A and 2B have recently been localized to chromosome 10q 11.2 by genetic and physical mapping. The DNA segment encompasses the RET proto-oncogene. This is a receptor tyrosine kinase gene, which is expressed in medullary thyroid carcinoma and pheochromocytoma. Point mutations in the cysteine-rich domain of the RET were demonstrated in patients with MEN 2A. The cosegregation of these mutations and disease in MEN 2A families indicates that they possess a predisposition endocrine organs to develop into tumors. Biological assesment of the mutant forms in cell culture and transgenic mouse lines should provide further insight as to the role of the RET in the tumor development.

Key words : 10q 11.2, Loss of heterozygosity, Ret proto-oncogene, Mutation

はじめに

多内分泌腫瘍症(MEN)は、複数の内分泌腺に特定の組み合わせで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。本症は内分泌腫瘍の組み合わせにより、1型、2A型、2B型の3型に分類される。またMEN 2型の範疇に家族性甲状腺髄様癌を加えることがある。本稿ではMEN 2A型、MEN 2B型(3型ともいう)の原因遺伝子の探求と腫瘍における遺伝子異常について概説する。

I. MEN 2型の臨床像

1. MEN 2A型

MEN 2A型(Sipple症候群)では甲状腺髄様

癌(MTC)、褐色細胞腫、副甲状腺腫瘍が認められる。MTCから大量のカルシトニンが分泌されるが、特定の症状は示さず、血清カルシウムは正常である。多くは多発性結節性甲状腺腫として発見される。褐色細胞腫はほとんど両側の副腎内に発生し悪性のものは少ない。臨床症状はカテコールアミンの分泌過剰によるもので、散発例の場合と同様の症状を示す。褐色細胞腫の出現はMTCより5~10年ほど遅れることが多い。副甲状腺腫瘍は20%に認められるが、血清カルシウムは正常のものが多く、しばしばMTCの摘出時に発見される。またMEN 1型のような典型的な過形成は少なく、1~2腺の副甲状腺の腫大を示すことが多い。

本疾患はわが国においては人口100万人に5人の割合で存在するので、約600人の患者が存在すると考えられているが、1960年から1987年までに報告されている症例は55例¹⁾に過ぎ

* 徳島大学医学部・臨床分子栄養学

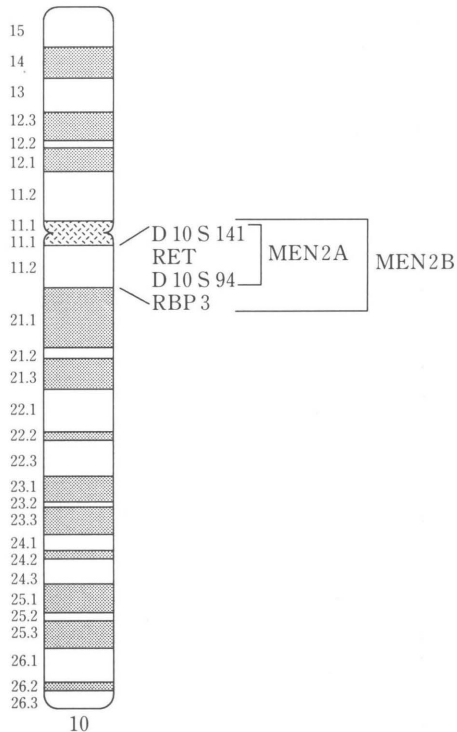


図 1 MEN 2A 型および MEN 2B 型の原因遺伝子座位

MEN 2A 型の原因遺伝子は D10S141 から D10S94 までの 0.55 cM の間に存在し、MEN 2B 型の原因遺伝子は D10S141 から RBP3 までの 4.15 cM の間に存在する。

ず、未報告の症例がかなり存在すると考えられる。

2. MEN 2B 型

MEN 2B 型は MTC、褐色細胞腫のほかに、口唇、舌などの粘膜神経腫、巨大結腸症、Marfan 様体型等の骨格異常を伴う。本症は MEN 2A 型よりも頻度が少なく、わが国においては 23 例の報告があるのみで、家族性発症が認められない散発例の発症が多い²⁾。この場合の MTC は MEN 2A 型よりも若年(多くは 10 歳代以下)に発生する。早期発見が重要で、小児の粘膜に神経腫を認めた場合には、MTC の有無を調べる必要がある。本症の予後に関しては、欧米の報告では予後不良とされてきたが、わが国では比較的予後は良好であることが明らかになっ

た²⁾。

3. 家族性甲状腺髄様癌(FMTC)

本症は familial MTC without associated endocrinopathies, MTC without pheochromocytoma あるいは MTC-only と呼ばれ、遺伝子座位名は MTC1 で表される。すなわち褐色細胞腫、副甲状腺腫瘍を伴わず、MTC のみが優性遺伝の形式で発症する疾患である。MEN 2A 型に比べ MTC の発症は遅く、死因となることは少ないとされている。

II. 連鎖解析による原因遺伝子のマッピング

1987 年に MEN 2A 型の原因遺伝子は RBP3 (retinol binding protein 3, 10p11.2~q11.2) に連鎖すること、すなわち第 10 染色体動原体近傍に存在することが報告された^{3,4)}。その後 RET (proto-ret 遺伝子, 10q11.2) とも連鎖することが明らかとなった⁵⁾。また MEN 2B 型⁶⁾ および MTC1⁷⁾ の原因遺伝子も、MEN 2A 型と同様、第 10 染色体動原体近傍に存在することが明らかとなった。

その後の研究により、MEN 2A 型の原因遺伝子は 10q11.2 に位置する D10S141 (動原体側) から D10S94 (テロメア側) 間の 0.55 センチモルガン(cM) (480 kb) に存在し、この間に RET が存在すること、また MEN 2B 型では D10S141 から、さらに D10S94 よりテロメア側の RBP3 までの 4.15 cM 間に存在することが明らかにされた(図 1)^{8,9)}。この間に位置し、MTC および褐色細胞腫において発現が認められている *ret* 遺伝子¹⁰⁾ が、その原因遺伝子の候補の一つとして考えられている。

III. 腫瘍における遺伝子異常

網膜芽細胞腫や MEN 1 型関連腫瘍では原因遺伝子の変異あるいは欠失が高頻度に認められ、germ-line で認められる原因遺伝子の異常に加え、対立遺伝子上の両方の原因遺伝子の機能消失により腫瘍化するという Knudson の 2 ヒット説に一致すると考えられている。

しかし MEN 2A 型、2B 型の MTC および褐色細胞腫では、原因遺伝子が存在する第 10 染色



図2 *ret* 遺伝子産物の構造ならびに MEN 2A型, FMTC 症例に認められる変異

エクソン 10 に存在するコドン 609, 611, 618, 620 およびエクソン 11 に存在するコドン 634 のシステイン残基が他のアミノ酸への置換が germ-line レベルで認められる。エクソンおよびコドン番号は Takahashi らの報告(Oncogene 4 : 805-806, 1989, BBRC 196 : 1288-1295, 1993)に基づく。

体動原体付近の loss of heterozygosity (LOH) の頻度は予想外に低いことが明らかとなった。現在までに 100 個以上の腫瘍(MTC, 褐色細胞腫)について検討されているが、わずかに 4 例に LOH を認めるのみである。われわれは MEN 2A 型 2 症例, MEN 2B 型 4 症例, FMTC 1 症例に発生した MTC および褐色細胞腫における LOH の有無について検討したが、MEN 2A 型 1 症例における褐色細胞腫および MEN 2B 型 1 症例および FMTC 1 症例における MTC での第 1 染色体短腕の LOH を認めたのみで、いずれの腫瘍においても第 10 染色体の LOH は認められなかった^{2,11-13}。むしろ MTC では第 1 染色体短腕, 褐色細胞腫では第 1 染色体短腕および第 22 染色体長腕での LOH が高頻度で報告されており、これらの染色体上の未知の遺伝子の関与も想定される。そのほか第 3 染色体, 第 11 染色体短腕, 第 13 染色体長腕, 第 17 染色体短腕の LOH が報告されているが、いずれも高頻度ではない¹⁴。

これらのことより、MEN 2A 型あるいは MEN 2B 型は網膜芽細胞腫などのように腫瘍抑制遺伝子の両対立遺伝子の不活化により腫瘍化するのではなく、germ-line レベルでの一方の対立遺伝子の不活化により甲状腺 C 細胞や副腎髄質細胞の過形成を生じる可能性が高い。もしこれらの過形成がポリクローナルでなくモノクロー

ナルな増殖をしているならば、Knudson の 2 ヒット説に適合するが、まだこの点に関する検討はなされていない。

われわれは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 p53 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^{15,16}。また Gsa 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が、いずれの変異も認められなかった¹⁷。

IV. *ret* 遺伝子の germ-line における点突然変異

1. *ret* 遺伝子およびその産物の特徴

ret 遺伝子は T 細胞性リンパ腫 DNA を NIH/3T3 細胞にトランスフェクトして得られたトランスフォーマントから、活性型の癌遺伝子として単離された¹⁸。*ret* 遺伝子は約 25%の甲状腺乳頭癌で再編成による活性化が報告され、発癌に関与していると考えられている。*ret* 遺伝子は N 末端側にシグナル配列が存在し、細胞外領域にはカドヘリンとホモロジーを有する領域やシステイン残基に非常に富んでいる部位が存在する。細胞内領域にはチロシンキナーゼ活性を有すると考えられる領域が存在し、受容体型

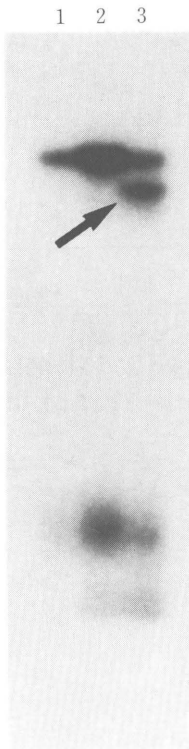


図3 PCR-SSCP法による *ret* 遺伝子変異のスクリーニング

エクソン 10 部分を PCR で増幅後、SSCP 法にて解析した。レーン 1, 2, 3 は、それぞれ正常白血球、孤発性 MTC、FMTC 症例の MTC を示す。レーン 3 では矢印で示す移動度の異なるバンドが認められる。

チロシンキナーゼとしての特徴を有している(図 2)。したがって細胞増殖因子など何らかのリガンドが *ret* 遺伝子産物受容体に結合すると、受容体が活性化されて生理機能を発揮すると考えられる。しかしリガンドはまだ同定されておらず、*ret* 遺伝子産物の生体内における機能は明らかになっていない。また本遺伝子は Hirschsprung 病とも連鎖していることが報告されている¹⁹⁾。

2. MEN 2A 型および MTC1 症例における *ret* 遺伝子の変異

これまでにパルスフィールドゲル電気泳動等を用いたサザン法により検討されたが、*ret* 遺伝子領域に染色体転座、欠失、再編成などの大

きな異常は認められなかった。最近 Mulligan ら²⁰⁾ により、MEN 2A 型の 23 家系のうち 20 家系において、*ret* 遺伝子の変異が germ-line レベルで認められ、本遺伝子が MEN 2A 型の原因遺伝子である可能性が極めて高くなってきた。腫瘍において正常型と変異型両方の *ret* 遺伝子が発現していることが明らかにされた。この結果より *ret* 遺伝子は通常の癌抑制遺伝子の性格を有さず、dominant あるいは dominant negative の機構で作用している可能性が高い。しかし 10 例の MEN 2B 患者においては、変異は認められなかったと報告している。

また Donis-Keller ら²¹⁾ は、11 例の MEN 2A 型、17 例の MEN 2B 型、5 例の MTC1 症例のゲノム DNA について、*ret* 遺伝子の変異を SSCP 法にて検討し、7 例の MEN 2A 型および 4 例の MTC1 症例に変異を認めたが、MEN 2B 型では検討した範囲において変異を検出し得なかった。Mulligan らと同じエクソン 10 および 11 内のコドン 611, 618, 620, 634 のシステイン残基の他のアミノ酸への置換を認めている。同様の変異はわが国の症例においても確認されている(高橋雅英, 私信, 木村建彦, 私信)(図 2, 3)。この結果 *ret* 遺伝子産物の構造に変化をきたし、リガンドとの結合に影響を与えるものと考えられる。これらの変異が腫瘍化にどのように関与するのか、細胞レベルあるいはトランスジェニックマウスの系を用いて検討する必要がある。また興味あることに 1 例の孤発性の MTC においてもシステイン残基を含む 6 塩基対の欠失が認められ、*ret* 遺伝子が孤発性の MTC の腫瘍化に関与していることが示唆される。

MEN 2A 型および MEN 2B 型の原因遺伝子が全く同一の座位を占めるのか否か明らかではないが、これらの同一遺伝子の変異部位の違いが両型の臨床像の差となるのか、あるいは MEN 2B 型は、MEN 2A 型原因遺伝子の変異に加え近傍の遺伝子の変異を伴っていることなどが考えられる。

おわりに

上記の成績および腫瘍発生年齢を考慮にいれ

ると、第10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と考えられる。germ-lineにおける変異が存在するにも関わらず組織特異的に腫瘍が発生する点、各臓器における浸透率の差異、腫瘍発生時期の差異、褐色細胞腫は良性であるのに対しMTCは悪性で早期にリンパ節転移を示す点について、それぞれ関与する遺伝子の異常が想定され、今後の解析が必要である。

追記 脱稿後、MEN 2B型症例においても *ret* 遺伝子のチロシンキナーゼ領域内のコドン 664に変異が認められること、また同じ変異が孤発生のMTCにおいても認められることが報告された。(Nature 367: 375-376, 1994)

最後に本稿を校閲して頂いた板倉光夫教授に感謝致します。

文 献

- 1) 斎藤史郎ほか：多発性内分泌腫瘍症とその遺伝子異常。内分泌学の進歩。Vol. 7. p. 164-176. トブコ出版, 1989.
- 2) Yoshimoto, K. et al. : Relatively good prognosis of multiple endocrine neoplasia type 2B in Japanese: Review of cases in Japan and analysis of genetic changes in tumors. *Endocrine J.* **40** : 649-657, 1993.
- 3) Mathew, C. G. P. et al. : A linked genetic marker for multiple endocrine neoplasia type 2A on chromosome 10. *Nature* **328** : 527-528, 1987.
- 4) Simpson, N. E. et al. : Assignment of multiple endocrine neoplasia type 2A to chromosome 10 by linkage. *Nature* **328** : 528-530, 1987.
- 5) Yamamoto, M. et al. : Tight linkage of the *ret* proto-oncogene with the multiple endocrine neoplasia type 2A locus. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **21** : 149-152, 1991.
- 6) Norum, R. A. et al. : Linkage of the multiple endocrine neoplasia type 2B gene (MEN 2B) to chromosome 10 markers linked to MEN2A. *Genomics* **8** : 313-317, 1990.
- 7) Laimore, T. C. et al. : Familial medullary thyroid carcinoma and multiple endocrine neoplasia type 2B maps to the same region of chromosome 10 as multiple endocrine neoplasia type 2A. *Genomics* **9** : 181-192, 1991.
- 8) Gardner, E. et al. : Genetic linkage studies map the multiple endocrine neoplasia type 2 loci to a small interval on chromosome 10q 11.2. *Hum. Mol. Genet.* **2** : 241-246, 1993.
- 9) Mole, S. E. et al. : Localization of the gene for multiple endocrine neoplasia type 2A to a 480 kb region in chromosome band 10q 11.2. *Hum. Mol. Genet.* **2** : 247-252, 1993.
- 10) Santro, M. et al. : The *ret* proto-oncogene is consistently expressed in human pheochromocytoma and thyroid medullary carcinomas. *Oncogene* **5** : 1595-1598, 1998.
- 11) Kubo, K. et al. : Loss of heterozygosity on chromosome 1p in thyroid adenoma and medullary carcinoma, but not in papillary carcinoma. *Jpn. J. Cancer Res.* **82** : 1097-1103, 1991.
- 12) 長宅芳男ほか：MEN 2A (Sipple 症候群)の1例。腫瘍と感染 **4** : 83-89, 1991.
- 13) Yamamoto, S. et al. : A kindred of multiple endocrine neoplasia type 2B. *Endocrinol. Japon.* **39** : 25-30, 1992.
- 14) Mulligan, L. M. et al. : Genetic events in tumour initiation and progression in multiple endocrine neoplasia type 2. *Genes, Chromosomes and Cancer* **6** : 166-177, 1993.
- 15) Yoshimoto, K. et al. : Ras mutations in endocrine tumors: Mutation detection by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism. *Jpn. J. Cancer Res.* **83** : 1057-1062, 1992.
- 16) Yoshimoto, K. et al. : Role of p53 mutations in endocrine tumorigenesis: Mutation detection by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism. *Cancer Res.* **52** : 5061-5064, 1992.
- 17) Yoshimoto, K. et al. : Rare mutations of the Gs alpha subunit mutations in endocrine tumors: Mutation detection by polymerase chain reaction-primer-introduced restriction analysis. *Cancer* **72** : 1386-1393, 1993.
- 18) Takahashi, M. et al. : Cloning and expression of the *ret* proto-oncogene encoding a tyrosine kinase with two potential transmembrane domains. *Oncogene* **3** :

- 571-578, 1988.
- 19) Luo, Y. et al. : Close linkage with the RET proto-oncogene and boundaries of the deletion mutations in autosomal dominant Hirschsprung disease. *Hum. Mol. Genet.* **2** : 1803-1808, 1993.
- 20) Mulligan, L. M. et al. : Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature* **363** : 458-460, 1993.
- 21) Donis-Keller, H. et al. : Mutations in the RET proto-oncogene are associated with MEN 2A and FMTC. *Hum. Mol. Genet.* **2** : 851-856, 1993.