

頭蓋咽頭腫の腫瘍化機構の解析

吉本勝彦、岩田武男、水澤典子
 徳島大学大学院医歯薬学研究部分子薬理学分野
 山田正三、西岡 宏
 虎の門病院内分泌センター間脳下垂体外科
 井下尚子
 虎の門病院病理部

はじめに

頭蓋咽頭腫は、胎生期の頭蓋咽頭管内の遺残上皮が腫瘍化した良性腫瘍である。全年齢層にわたって発症するが、約 20%は 15 歳未満に発生し、視神経、下垂体、視床下部、第 3 脳室などの圧迫症状が主体を示し、成長ホルモン分泌不全性低身長症などの原因となる。

頭蓋咽頭腫は主に「エナメル上皮腫型」と「扁平上皮乳頭型」の 2 つのタイプに分類される。まれに「線毛化頭蓋咽頭腫（頭蓋咽頭腫とラトケ嚢胞の移行型）」が認められる。「エナメル上皮腫型」は小児に多く、術後に再発しやすい。一方、「扁平上皮乳頭型」では発症年齢が比較的高い。遺伝子変異に関しては、「エナメル上皮腫型」では β -カテニン（CTNNB1）の活性化変異¹⁾ および「扁平上皮乳頭型」では BRAF の活性化変異²⁾ が明らかにされた。

本研究は、頭蓋咽頭腫の各タイプにおける遺伝子変異を検討することにより、腫瘍化機構の解明および治療法への応用を目的とする。

研究方法

1. 「エナメル上皮腫型」、「扁平上皮乳頭型」、および「線毛化頭蓋咽頭腫」の遺伝子変異解析

「エナメル上皮腫型」26 例、「扁平上皮乳頭型」10 例、および「線毛化頭蓋咽頭腫」3 例の凍結腫瘍組織からゲノム DNA を常法により抽出した。CTNNB1 遺伝子エクソン 3 および BRAF 遺伝子のエクソン 15 内のコドン 600 の変異について直接塩基配列決定法により検討した。CTNNB1 変異検出用プライマーの塩基配列：センス 5'-ctgcagcatcttcattccaa-3' およびアンチセンス 5'-tgatttttgaataactgggaac-3'（増幅サイズ 612 bp）、BRAF 変異検出用プライマーの塩基配列：センス 5'-tactgaattgggctctgct-3' およびアンチセンス 5'-tgctcagttcagggattgcac-3'（増幅サイズ 801 bp）。増幅された PCR 産物を ExoSAP-IT（USB Corporation, Cleveland, OH, USA）で処理後、ABI 3500xL sequencing analyzer（Applied Biosystem, Foster City, CA, USA）により塩基配列を決定した。

2. Competitive Allele-Specific TaqMan® PCR (castPCR) による BRAF 変異検出

間質成分や別のタイプの腫瘍細胞の混入割合度が高い腫瘍においては、直接塩基配列決定法では特定の変異を検出できない可能性がある。高感度で 1% 程度の変異アレルを検出可能とされている castPCR（商品名、TaqMan® Mutation Detection、BRAFc.1799T>A/p.V600E 検出用、Applied

Biosystem) の添付プロトコールに従い、直接塩基配列決定法で変異陰性だった腫瘍ゲノム DNA の変異解析を行った。

結果

1. CTNNB1 および BRAF 変異の直接塩基配列決定法による解析

頭蓋咽頭腫 39 例からゲノム DNA を抽出し、直接塩基配列決定法により CTNNB1 のエクソン 3 部分および BRAF 遺伝子コドン 600 について変異の有無を検討した。「エナメル上皮腫型」26 例中 4 例に 3 種の CTNNB1 活性型変異 (p.T41A、p.T41I、p.S33F)、「扁平上皮乳頭型」10 例中 9 例に BRAF p.V600E 活性型変異を認めたが、「線毛化頭蓋咽頭腫」3 例においては CTNNB1、BRAF 遺伝子のいずれにおいても既報の変異を検出しなかった。

2. castPCR による BRAF V600E 変異検出

直接塩基配列決定法で変異陰性であった「エナメル上皮腫型」と「扁平上皮乳頭型」が混在している腫瘍 9 例のうち 1 例において、castPCR により BRAF 変異を検出した。この腫瘍では、100 アレルに対して 1 アレルの割合で変異 (V600E) を認めた。このことは腫瘍組織の 2% の細胞が BRAF V600E 変異を有していることを示す。

考察

頭蓋咽頭腫は 5 - 14 歳の小児期と 50 歳代に発症のピークを持つ。小児では成長障害症状が、腫瘍の全摘出後には下垂体視床下部障害症状が出現する特徴を有する。

「エナメル上皮腫型」では 2001 年に CTNNB1 遺伝子に¹⁾、「扁平上皮乳頭型」では 2014 年に BRAF 遺伝子に²⁾、それぞれのドライバー変異が見いだされた。CTNNB1 のエクソン 3 にはセリン / スレオニン残基に富む部分があり、この部位の GSK-3 β や CK1 によるリン酸化が β -カテニンタンパク分解に重要である。これらのリン酸化部位に変異を生じた β -カテニンタンパクは安定化され、核に移行して細胞増殖に関連する遺伝子転写を促進する。BRAF の V600E 変異はメラノーマや甲状腺乳頭癌など多くの腫瘍で認められる。この変異により BRAF のキナーゼ活性が促進し、その結果 mitogen-activated protein kinase 経路の恒常的活性化が細胞増殖を引き起こす。そのため BRAF キナーゼの阻害剤であるベムラフェニブがメラノーマに有効とされ、実際に患者に投与され始めている。

「エナメル上皮腫型」での CTNNB1 変異 (S33、S37、T41、S45 部位) の検出頻度 (約 60%、16% から 100% にわたる) 頻度の報告に大きな差異があるが、理由は明らかにされていない^{1), 3)-8)}。一方、「扁平上皮乳頭型」における BRAF 変異は、3 グループにより 81% - 100% と高頻度に検出されることが報告されている^{1), 8), 9)}。このうち英国のグループは「エナメル上皮腫型」の一部に CTNNB1 および BRAF 変異が共存することを報告しているが、その腫瘍化における意義は不明である⁸⁾。これまでに「線毛化頭蓋咽頭腫」での変異についての報告はなく、別の遺伝子変化が腫瘍化に関与している可能性がある。

本研究において、「エナメル上皮腫型」で検出した CTNNB1 変異が 15% と低頻度であるのは、間

質成分が多い腫瘍において、変異検出感度の優れない直接塩基配列法を用いたため変異を見逃している可能性がある。直接塩基配列法では20-30%の変異対立遺伝子までしか検出できない。今後、「エナメル上皮腫型」での β -カテニンの免疫組織化学を実施し、 β -カテニン核陽性と直接塩基配列法による結果を対比する必要がある。また、レーザーマイクロダイセクション法により腫瘍部分のみを採取して解析すれば検出感度が向上する可能性がある。 β -カテニン核陰性症例および「線毛化頭蓋咽頭腫」では別の遺伝子変異が関与している可能性がある。

以上、頭蓋咽頭腫におけるCTNNB1変異およびBRAF変異の有無を検討した。「扁平上皮乳頭型」においては、BRAF V600E変異を90%に認めたが、「エナメル上皮腫型」で β -カテニン変異は15%であった。「線毛化頭蓋咽頭腫」では、 β -カテニン変異およびBRAF V600E変異いずれも検出されなかった。

文献

1. Sekine S, Shibata T, Kokubu A, Morishita Y, Noguchi M, Nakanishi Y, Sakamoto M, Hirohashi S. Craniopharyngiomas of adamantinomatous type harbor β -catenin gene mutations. *Am J Pathol.* 2002;161:1997-2001.
2. Brastianos PK, Taylor-Weiner A, Manley PE, Jones RT, Dias-Santagata D, Thorner AR, Lawrence MS, Rodriguez FJ, Bernardo LA, Schubert L, Sunkavalli A, Shillingford N, Calicchio ML, Lidov HG, Taha H, Martinez-Lage M, Santi M, Storm PB, Lee JY, Palmer JN, Adappa ND, Scott RM, Dunn IF, Laws ER Jr, Stewart C, Ligon KL, Hoang MP, Van Hummelen P, Hahn WC, Louis DN, Resnick AC, Kieran MW, Getz G, Santagata S. Exome sequencing identifies BRAF mutations in papillary craniopharyngiomas. *Nat Genet.* 2014;46:161-165.
3. Campanini ML, Colli LM, Paixao BM, Cabral TP, Amaral FC, Machado HR, Neder LS, Saggioro F, Moreira AC, Antonini SR, de Castro M. CTNNB1 gene mutations, pituitary transcription factors, and microRNA expression involvement in the pathogenesis of adamantinomatous craniopharyngiomas. *Horm Cancer.* 2010;1:187-196.
4. Hölsken A, Kreutzer J, Hofmann BM, Hans V, Oppel F, Buchfelder M, Fahlbusch R, Blümcke I, Buslei R. Target gene activation of the Wnt signaling pathway in nuclear β -catenin accumulating cells of adamantinomatous craniopharyngiomas. *Brain Pathol.* 2009;19:357-364.
5. Oikonomou E, Barreto DC, Soares B, De Marco L, Buchfelder M, Adams EF. β -catenin mutations in craniopharyngiomas and pituitary adenomas. *J Neurooncol.* 2005;73:205-209.
6. Buslei R, Nolde M, Hofmann B, Meissner S, Eyupoglu IY, Siebzehnrübl F, Hahnen E, Kreutzer J, Fahlbusch R. Common mutations of β -catenin in adamantinomatous craniopharyngiomas but not in other tumours originating from the sellar region. *Acta Neuropathol.* 2005;109:589-597.

7. Kato K, Nakatani Y, Kanno H, Inayama Y, Ijiri R, Nagahara N, Miyake T, Tanaka M, Ito Y, Aida N, Tachibana K, Sekido K, Tanaka Y. Possible linkage between specific histological structures and aberrant reactivation of the Wnt pathway in adamantinomatous craniopharyngioma. *J Pathol.* 2004;203:814-821.
8. Larkin SJ , Preda V, Karavitaki N, Grossman A, Ansorge O. BRAF V600E mutations are characteristic for papillary craniopharyngioma and may coexist with CTNNB1-mutated adamantinomatous craniopharyngioma. *Acta Neuropathol.* 2014;127:927-929.
9. Schweizer L, Capper D, Hölsken A, Fahlbusch R, Flitsch J, Buchfelder M, Herold-Mende C, von Deimling A, Buslei R. BRAF V600E analysis for the differentiation of papillary Craniopharyngiomas and Rathke's Cleft Cysts. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2014 Nov 30.