

## cAMP-protein kinase A シグナル異常による GH 細胞腫瘍化機構

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

虎の門病院内分泌センター間脳下垂体外科

### はじめに

孤発性 GH 腺腫の約 50% に、cAMP-protein kinase A (PKA) シグナルを亢進する *Gsα* 遺伝子 (*GNAS1*) の体細胞性活性化変異が認められることや、McCune-Albright 症候群における *GNAS1* モザイク変異や、Carney complex における Protein kinase A type I regulatory subunit *α* (*PRKARIA*) の胚細胞性不活化変異の関与から、GH 産生細胞の腫瘍化において cAMP-PKA シグナルの各段階での恒常的な活性化異常が想定される。PKA-cAMP シグナルの活性化異常を生じる上記以外の機序には、PKA の 2 種の触媒サブユニット (catalytic subunit *α* (*PRKACA*), 19p13.12; catalytic subunit *β* (*PRKACB*), 1p31.1) の変異による調節サブユニットからの脱制御や遺伝子増幅による過剰産生、*Gs* 型 G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) の常時活性化などが考えられる。最近、Cushing 症候群を示す副腎皮質腫瘍において *PRKACA* の p.L206R の活性化変異が認められた<sup>1), 2)</sup>。また、早期発症型小児巨人症症例において Xq26.3 領域の胚細胞性重複が認められること、さらに孤発性 GH 産生腺腫において、本領域に位置し *Gs* 型 GPCR と想定される *GPR101* に p.E308D 体細胞活性化変異が認められることが報告された<sup>3)</sup>。

本研究においては、孤発性 GH 産生腺腫における cAMP-PKA シグナル異常を引き起こす *PRKACA*、*PRKACB*、*GPR101* の活性化変異の関与を明らかにすることを目的とする。

### 研究方法

#### 1. 孤発性 GH 産生腺腫における *PRKACA*、*PRKACB*、*GPR101*、*GNAS1* の変異解析

孤発性 GH 産生腺腫の凍結腫瘍組織から、ゲノム DNA を常法により抽出した。*PRKACA* および *PRKACB* のコドン 206、*GPR101* のコドン 308、*GNAS1* のコドン 201 および 227 の体細胞変異の有無を直接塩基配列決定法により解析した。PCR 増幅に用いた各遺伝子のプライマーは、*PRKACA* のコドン 206 の変異解析に forward: 5'-GTTTCTGACGGCTGGACTG-3' および reverse: 5'-AGTCCACGGCCTTGTTGTTGTAG-3'、*PRKACB* のコドン 206 の変異解析に forward: 5'-AAACTTTCAACGTAGGTGCAAT-3' および reverse: 5'-CAAAAGTCCATAGGGATGCATGT-3'、*GPR101* のコドン 308 変異解析に forward: 5'-TGCCCTTCATCGTCATTCCA-3' および reverse: 5'-GGTTGCTGTTGCTGTTACGA-3'、*GNAS1* のコドン 201 変異解析に、forward: 5'-GGCAATTATTACTGTTTCGGTTGGC-3' および reverse: 5'-GACTGGGGTGAATGTCAAGAAACC-3'、コドン 227 変異解析に forward: 5'-TTCTTGACATTCACCCCAGTCC-3' および reverse: 5'-CTAACAACACAGAAGCAAAGCG-3'、*GPR101* のコドン 308 変異解析に forward:

5'-TGCCCTTCATCGTCATTCCA-3' および reverse: 5'-GGTTGCTGTTGCTGTTACGA-3' をそれぞれ用いた。各 PCR 産物を直接塩基配列決定法により解析した。

## 2. GH 産生腺腫における *PRKACA* および *GPR101* の遺伝子増幅の有無

*GPR101* のゲノムコピー数の検討は、TaqMan Copy Number Assays (Applied Biosystems) (*GPR101*, Hs01730605\_cn) で検討した。対照遺伝子として *ALB* (4q13.3)、*TERT* (5p15.3)、*RNASE1* (14q11.2) の3種の遺伝子を用いた。また、孤発性 GH 産生腺腫のみならず、家族性に発症した GH 産生腺腫についても検討した。*PRKACA* に関してはエクソン 1、8、10 の3か所においてプライマーセットを設定し、ゲノム DNA を鋳型として定量的 PCR を行った。

## 結果

### 1. *PRKACA* および *PRKACB* のコドン 206 の体細胞変異の検討

*PRKACA* について 43 例、*PRKACB* については 33 例の孤発性 GH 産生腺腫における変異の有無を検討したが、コドン 206 および他の箇所に変異を認めなかった。

### 2. *GPR101* の p.E308D 体細胞変異の検討

孤発性 GH 産生腺腫 39 例において、*GPR101* のコドン 308 および他の箇所に変異を認めなかった。

### 3. *GNASI* のコドン 201 および 227 の体細胞変異の検討

孤発性 GH 産生腺腫 40 例において、p.R201C (6 例)、p.Q227R (1 例)、p.Q227L (1 例) の 8 例 (20%) に *GNASI* の活性化変異を認めた。

### 4. *PRKACA* のゲノムコピー数の検討

11 例の孤発性 GH 産生腺腫を対象に、*PRKACA* の異なる領域の 3 か所について定量的 PCR を行い、コピー数を検討した。抽出済みのゲノム DNA を鋳型として用いた影響か、解析部位によって結果のばらつきが生じた。しかしながら、3 か所すべての解析箇所ゲノム数の増加を示した腺腫は認められなかった。

### 5. 成人発症型の家族性 GH 産生腺腫における *GPR101* のコピー数の検討

成人発症型の家族性 GH 産生腺腫 7 例において、*GPR101* 領域のゲノムコピー数の増加は認められなかった。

## 考察

ACTH 非依存性クッシング症候群において、*PRKACA* 遺伝子の体細胞変異が約半数に認められている<sup>1), 2)</sup>。また両側性副腎過形成症例において、*PRKACA* を含む第 19 染色体領域のゲノム DNA に胚細胞性の重複が報告された<sup>4), 5)</sup>。また Carney complex を示す 1 症例において、*PRKACB* 領域の胚細胞性の DNA 増幅 (3 倍) が認められている<sup>6)</sup>。以上の報告から、cAMP-PKA シグナル異常が腫瘍化に関与する GH 産生腺腫において、これらの遺伝子の体細胞性変異やコピー数の増幅が関与しうるか、またこれらの遺伝子変化と *GNASI* 変異が共存するか検討した。

PKA の 2 つの触媒サブユニット、*PRKACA* と *PRKACB* のいずれも調節サブユニットとの結合部位の体細胞変異を認めなかった。この結果は英国の報告とも一致した<sup>7)</sup>。また、*PRKACA* 領域の

明らかな遺伝子増幅は認められなかった。また、*GNASI* 変異は 20% の GH 産生腺腫に認められた。

早期発症型小児巨人症 13 例の検体で、Xq26.3 領域の微小重複が報告された<sup>3)</sup>。このうち 4 例は 2 家系の患者であり、9 例は孤発症例であった。同部位に存在する遺伝子のうち、G 蛋白質共役型受容体をコードする *GPR101* のみが患者の下垂体腫瘍で過剰発現し、孤発性 GH 産生腺腫の一部に *GPR101* の体細胞変異 (p.E308D) が認められている。しかしながら、我々が検討した範囲においては孤発性 GH 産生腺腫に *GPR101* の体細胞変異は認めなかった。さらに、他の報告<sup>8),9)</sup>においても変異は認められないことより、孤発性 GH 産生腺腫の腫瘍化に *GPR101* 変異は関与していない可能性が高い。

以上の結果から、孤発性 GH 産生腺腫の腫瘍化において、cAMP-PKA シグナル異常が関与するのは *GNASI* 変異のみと考えられた (図 1)。

一方、成人発症型の家族性 GH 産生腺腫における *GPR101* のゲノムコピー数の増加を認めなかったことより、このゲノムコピー数の増加は 5 歳以下発症の小児巨人症に限定される可能性が高い。早期発症型小児巨人症においては、一部に GH 細胞の過形成 (12.5%) あるいは過形成と GH 産生腺腫が共存している腫瘍 (12.5%) が認められる<sup>10)</sup>。Carney complex や *GNASI* のモザイク性活性化変異を有する McCune-Albright 症候群の下垂体腫瘍においても GH 細胞過形成が共存することから、早期発症型小児巨人症は Carney complex、McCune-Albright 症候群と同様に、cAMP-PKA シグナル異常を介して発症する可能性があり、今後の検討が必要である。

## 文献

1. Beuschlein F et al. Constitutive activation of PKA catalytic subunit in adrenal Cushing's syndrome. *N Engl J Med* 370:1019-1028, 2014.
2. Sato Y et al. Recurrent somatic mutations underlie corticotropin-independent Cushing's syndrome. *Science* 344:917-920, 2014.
3. Trivellin G et al. Gigantism and acromegaly due to Xq26 microduplications and *GPR101* mutation. *N Engl J Med* 371:2363-2374, 2014.
4. Carney JA et al. Germline *PRKACA* amplification leads to Cushing syndrome caused by 3 adrenocortical pathologic phenotypes. *Hum Pathol* 46:40-49, 2015.
5. Lodish MB et al. Germline *PRKACA* amplification causes variable phenotypes that may depend on the extent of the genomic defect: molecular mechanisms and clinical presentations. *Eur J Endocrinol* 172:803-811, 2015.
6. Forlino A et al. *PRKACB* and Carney complex. *N Engl J Med* 370:1065-1067, 2014.
7. Larkin SJ et al. Sequence analysis of the catalytic subunit of PKA in somatotroph adenomas. *Eur J Endocrinol* 171:705-710, 2014.
8. Ferrau F et al. Analysis of *GPR101* and *AIP* genes mutations in acromegaly: a multicentric study. *Endocrine*. 2016 Jan 27. [Epub ahead of print]

9. Lecoq AL et al. Very low frequency of germline GPR101 genetic variation and no biallelic defects with AIP in a large cohort of patients with sporadic pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol* 174:523-530, 2016.
10. Beckers A et al. X-linked acrogigantism syndrome: clinical profile and therapeutic responses. *Endocr Relat Cancer* 22:353-367, 2015.
11. Boikos SA, Stratakis CA. Pituitary pathology in patients with Carney Complex: growth-hormone producing hyperplasia or tumors and their association with other abnormalities. *Pituitary* 9:203-209, 2006.
12. Vortmeyer AO et al. Somatic GNAS mutation causes widespread and diffuse pituitary disease in acromegalic patients with McCune-Albright syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 97:2404-2413, 2012.
13. Vasilev V et al. McCune-Albright syndrome: a detailed pathological and genetic analysis of disease effects in an adult patient. *J Clin Endocrinol Metab* 99:E2029-2038, 2014.

図1 GH産生細胞におけるcAMP-protein kinase Aシグナル異常による腫瘍化機構

