

cAMP 産生異常による成長ホルモン(GH)産生細胞腫瘍化機構の解析

徳島大学歯学部歯科薬理学 吉本勝彦

徳島大学医学部脳神経外科 山崎弘幸

虎の門病院脳神経外科 山田正三

はじめに

下垂体腺腫の原因として、GH 産生腺腫における $Gs\alpha$ 遺伝子の活性化変異が約 40% に認められることが報告されている¹⁾。また、多発性内分泌腫瘍症 1 型の原因遺伝子である MEN1 遺伝子の異常は散発性下垂体腺腫においては低頻度であることから²⁾、残りの 60% の GH 産生腺腫の腫瘍化に、どのような遺伝子異常が関与しているのかについては、全く不明である。

最近、GH 産生腺腫を部分症として生じる Carney complex の原因遺伝子の一つが 17q22-24 に位置する cAMP dependent protein kinase A の regulatory subunit 1 (PRKAR1A) 遺伝子であり³⁻⁵⁾、もう一方の原因遺伝子座が 2p16 に位置することが明らかにされた⁶⁾。PRKAR1A に関しては、2 つの対立遺伝子がともに不活化される結果、恒常的に cAMP が産生され、腫瘍化に至ると考えられる (図 1)。

本研究においては散発性 GH 産生腺腫の腫瘍化における PRKAR1 遺伝子異常および 2p16 領域のヘテロ接合性の消失 (LOH) の有無について検討するとともに、 $Gs\alpha$ 遺伝子変異の有無を検討する。

研究方法

遺伝性が認められない 32 例の GH 産生腺腫および採血が可能であった 28 例の血液を用いて検討した。腫瘍および血液よりゲノム DNA を抽出した。

1. G α 遺伝子変異の解析

G α 遺伝子のコドン 201 を含むエクソン 8 とコドン 227 を含むエクソン 9 に対して、それぞれプライマーを設定し、PCR 産物の塩基配列をダイレクトシーケンス法にて決定した。

2. PRKAR1A 遺伝子変異の解析

PRKAR1A は 12 エクソンよりなるが、全エクソンに対してプライマーを設定し、ダイレクトシーケンス法にて塩基配列を決定した。

3. 17q22-24 領域における LOH の解析

血液が得られた 25 症例について PRKAR1A 遺伝子周辺の 4 種のマイクロサテライトマーカー (D17S942, D17S807, D17S795, D17S789) および PRKAR1A 遺伝子内に位置する 2 個の一塩基多型を用いて、腫瘍における LOH の有無を検討した。既報のごとく、5' 末端に蛍光標識したプライマーを用いて PCR を行い、PCR 産物を DNA シーケンサーにて泳動し、結果を GenScan を用いて解析した⁷⁾。

4. 2p16 領域における LOH の解析

17q22-24 領域の解析と同様に、4 種のマイクロサテライトマーカー (D2S1352, D2S123, D2S2251, D2S378) について解析した。

結果

1. G α 遺伝子変異の解析

G α 遺伝子変異は GH 産生腺腫 32 例中 17 例 (53%) に認められ (表 1)、欧米の頻度と大きく異なることを確認した。しかも、G α 遺伝子変異陽性の腺腫は、外部からの GHRH 投与による GH 分泌刺激反応が低下していることを見いだした (data not shown)。

2. PRKAR1A 遺伝子変異および 17q22-24 領域における LOH の解析

32 例の GH 産生腺腫症例について検討した結果、エクソン 1a、エクソン 4 の 5' 側のイン

トロン領域、エクソン6に新規の一塩基多型(SNP)を認めたのみで、体細胞変異は認められなかった(表2)。また、染色体の欠失を示すLOHは認められなかった(表2)。

3. 2p16領域におけるLOHの解析

検討し得た26症例においてはLOHは認められなかった(表2)。

考察

視床下部より分泌されたGHRHがGHRH受容体に結合すると、Gsの α サブユニットであるGs α に結合したGDPがGTPに変換される。その結果 α サブユニットは $\beta\gamma$ サブユニットから離れて、アデニル酸シクラーゼを活性化する。アデニル酸シクラーゼはATPからcAMPを生成する。プロテインキナーゼAは2個の調節サブユニットと2個の触媒サブユニットからなるヘテロテトラマーである。cAMPはプロテインキナーゼAの調節サブユニットに結合し、その結果、触媒サブユニットが解離し、転写因子cAMP-responsive element binding protein (CREB)をリン酸化する。リン酸化されたCREBはCREに結合し、そこにCREB-binding proteinが結合して、特定の遺伝子の転写が促進される。Gs α はGTPをGDPに加水分解するGTPase活性を有しており、GTPからGDPに変換されたGs α は、再び $\beta\gamma$ サブユニットと結合して、シグナル伝達がオフとなる(図1)。

Gs α 遺伝子のコドン201および227は、GTPを加水分解するのに重要な部位である。同部位の体細胞変異により、分子内に結合したGTPをGDPに加水分解するGTPaseが作用しなくなると、活性型Gs α が持続する。その結果、アデニル酸シクラーゼの活性化が継続し、細胞内のcAMPの増加が維持される。すなわち、GH産生細胞中のGs α 蛋白の変異はGHRHによるGH分泌刺激をバイパスしてしまうことになる。我々は以前に、GH産生腺腫におけるGs α 遺伝子の活性化変異が10%前後と、欧米の報告に比べて低頻度であることを報告したが⁸⁾、今回解析した新規の症例に関しては53%に変異が認められたことより、人種によ

る変異の頻度の差は認められないと考えられる。

Carney complex は皮膚色素沈着、心臓や皮膚の粘液腫や、副腎皮質小結節性異形成などの他に、10-20%の頻度でGH産生腺腫による先端巨大症を生じる疾患で、常染色体優性の遺伝形式をとる。散発性のGH産生腺腫において、その腫瘍化にPRKAR1A遺伝子異常が関与しているか否かを検討した。PRKAR1A遺伝子は癌抑制遺伝子として作用することが想定されたので、2つの対立遺伝子が、それぞれ変異およびLOHを示す可能性について検討した。PRKAR1A遺伝子が機能を消失するとcAMP dependent protein kinase Aのcatalytic subunitが恒常的に活性化され、その結果細胞増殖に到ると考えられる。しかし、GH産生腺腫における変異あるいはLOHは認められないことより、同遺伝子が腫瘍化に関与している可能性は低いと考えられた。また、もう一つの原因遺伝子座である2p16領域に位置する原因遺伝子に実体は明らかにされていないが、2p16領域のLOHが検出されなかったことより、2p16に位置する原因遺伝子も散発性GH産生腺腫の腫瘍化に関する関与は少ないと考えられた。

以上の結果より、Carney complexの原因遺伝子の異常は散発性GH産生腺腫の腫瘍化に関与していないことが示唆された。

文献

1. Lyons, J., Landis, C.A., Harsh, G., Vallar, L., Günewald, K., Feichtinger, H., Duh, Q-Y., Clark, O.H., Kawasaki E., Bourne, H.R. & McCormick, F. (1990) Two G protein oncogenes in human endocrine tumors. *Science*, **249**, 655-659.
2. Tanaka, C., Kimura, T., Yang, P., Moritani, M., Yamaoka, T., Yamada, S., Sano, T., Yoshimoto, K. & Itakura, M. (1998) Analysis of loss of heterozygosity on chromosome 11 and infrequent inactivation of the MEN1 gene in sporadic pituitary adenomas. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **83**, 2631-2634.

3. Casey, M., Vaughan, C.J., He, J., Hatcher, C.J., Winter, J.M., Weremowicz, S., Montgomery, K., Kucherlapati, R., Morton, C.C. & Basson, C.T. (2000) Mutations in the protein kinase A R1 α regulatory subunit cause familial cardiac myxomas and Carney complex. *Journal of Clinical Investigation*, **106**, R31-38.
4. Kirschner, L.S., Carney, J.A., Pack, S.D., Taymans, S.E., Giatzakis, C., Cho, Y.S., Cho-Chung, Y.S. & Stratakis, C.A. (2000) Mutations of the gene encoding the protein kinase A type 1- α regulatory subunit in patients with the Carney complex. *Nature Genetics*, **26**, 89-92.
5. Kirschner, L.S., Sandrini, F., Monbo, J., Lin, J.P., Carney, J.A. & Stratakis, C.A. (2000) Genetic heterogeneity and spectrum of mutations of the PRKAR1A gene in patients with the Carney complex. *Human Molecular Genetics*, **9**, 3037-3046.
6. Stratakis, C.A., Carney, J.A., Lin, J.P., Papanicolaou, D.A., Karl, M., Kastner, D.L., Pras, E. & Chrousos, G.P. (1996) Carney Complex, a familial multiple neoplasia and lentiginosis syndrome. Analysis of 11 kindreds and linkage to the short arm of chromosome 2. *Journal of Clinical Investigation*, **97**, 699-705.
7. Shintani, Y., Yoshimoto, K., Horie, H., Sano, T., Kanesaki, Y., Hosoi, H., Yokogoshi, Y., Bando, H., Iwahana, H., Kannuki S., Matsumoto, K., Itakura, M. & Saito, S. (1995) Two different pituitary adenomas in a patient with multiple endocrine neoplasia type 1 associated with growth hormone-releasing hormone-producing pancreatic tumor: clinical and genetic features. *Endocrine Journal*, **42**, 331-340.
8. Yoshimoto, K., Iwahana, H., Fukuda, A., Sano, T. & Itakura, M. (1993) Rare mutations of the Gs alpha subunit gene in human endocrine tumors: mutation detection by polymerase chain reaction-primer-introduced restriction analysis. *Cancer*, **72**, 1386-1393.

表1 GH 産生腺腫におけるGs α 遺伝子変異

症例 番号	Gs α	
	201 Arg (CGT)	227 Gln (CAG)
1	WT	WT
2	Cys (TGT)	WT
3	Cys (TGT)	WT
4	WT	WT
5	Cys (TGT)	WT
6	WT	WT
7	WT	WT
8	Cys (TGT)	WT
9	Cys (TGT)	WT
10	WT	WT
11	WT	WT
12	WT	WT
13	Cys (TGT)	WT
14	WT	WT
15	WT	Arg (CGG)
16	WT	WT
17	His (CAT)	WT
18	WT	WT
19	Cys (TGT)	WT
20	WT	WT
21	Cys (TGT)	WT
22	Cys (TGT)	WT
23	Cys (TGT)	WT
24	Cys (TGT)	WT
25	WT	WT
26	WT	WT
27	Cys (TGT)	WT
28	Cys (TGT)	WT
29	WT	WT
30	Cys (TGT)	WT
31	WT	WT
32	Cys (TGT)	WT

WT, wild type

表2 GH 産生腺腫におけるPRKAR1Aの遺伝子変異及びLOHの解析

症例 番号	PRKAR1A 一塩基多型		LOH	
	Exon	Exon 4 IVS-5	17q22-24	2p16
1		4T / 5T	RH	RH
2		4T / 4T	RH	RH
3		4T / 4T	NI	ND
4		5T / 5T	RH	ND
5	exon 6 546 g/a	4T / 5T	RH	RH
6		4T / 5T	RH	RH
7		4T / 5T	RH	RH
8	exon 1a 103 a/c	4T / 4T	RH	RH
9		4T / 5T	RH	RH
10		4T / 4T	RH	RH
11		4T / 5T	RH	RH
12	exon 1a 103 a/c	4T / 4T	RH	RH
13		4T / 5T	RH	RH
14		4T / 4T	NI	ND
15		4T / 5T	RH	RH
16		4T / 5T	RH	ND
17		4T / 5T	RH	RH
18	exon 1a 103 a/c	4T / 4T	RH	RH
19	exon 6 546 g/a	5T / 5T	RH	RH
20	exon 1a 103 a/c	4T / 4T	RH	RH
21		4T / 4T	RH	RH
22		4T / 5T	RH	RH
23		4T / 5T	RH	RH
24		4T / 4T	RH	ND
25		4T / 5T	RH	RH
26		4T / 4T	RH	RH
27		4T / 4T	RH	RH
28		4T / 5T	RH	RH
29		4T / 5T	RH	RH
30		4T / 5T	RH	ND
31		4T / 5T	RH	RH
32		4T / 4T	RH	RH

RH, retention of heterozygosity; NI, not informative; ND, not done

図1 GH産生細胞腫瘍化に関するadenylate cyclaseシグナル経路

