

成長ホルモン (GH) 産生腺腫における DNA メチル化異常の解析

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部分子薬理学分野	吉本勝彦
徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部人体病理学分野	錢志 栄
徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部人体病理学分野	佐野壽昭
虎の門病院内分泌センター-間脳下垂体外科	山田正三

はじめに

最近、癌抑制遺伝子の不活化の新たな機構として、DNA のメチル化の関与が注目を集めている¹⁾。我々は下垂体腺腫における RASSF1A 遺伝子発現低下がプロモーター領域のメチル化によることを明らかにした²⁾。本研究においては、接着因子である H-cadherin 遺伝子 (CDH13) および E-cadherin 遺伝子 (CDH1) を対象として、GH 産生腺腫を含めた下垂体腺腫における DNA メチル化による不活化機構と腺腫の臨床病理学的特徴との関連性を検討した。

研究方法

1. CDH13 と CDH1 のプロモーター領域のメチル化の解析

24 例の GH 産生腺腫および 2 例の GH・プロラクチン産生腺腫を含む 69 例の下垂体腺腫における CDH13 と CDH1 のプロモーターのメチル化を解析した。5 例の正常下垂体および下垂体腺腫より抽出したゲノム DNA を、CpGenome DNA modification kit (Intergen 社) で処理した。処理済みゲノム DNA を鋳型にして、メチル化を認識するプライマー対および非メチル化を認識するプライマー対を用いて PCR を行った (メチル化感受性 PCR 法)。ヒトゲノム DNA を CpG メチラーゼでメチル化したものを陽性コントロールとして用いた。またバイサルファイトで処理済みゲノム DNA を鋳型とした PCR 産物をベクターにクローニングし、数個のクローンの塩基配列を決定することにより、両遺伝子プロモーター領域の CpG アイランドのメチル化について検討した (バイサルファイト - 塩基配列決定法)。それぞれのプライマーの塩基配列は既報に従った³⁻⁵⁾。

2. 半定量的 RT-PCR 法による CDH13 mRNA の解析

正常下垂体および腺腫より抽出した RNA を用いて、RT-PCR を行い、CDH13 mRNA 量を半定量した。プライマーの塩基配列は既報に従った^{3,4)}。内部コントロールとして、グリセアルデヒド-3-リン酸 脱水素酵素 (GAPDH) を用いた。PCR 産物をアガロース電気泳動にて分離後、エチジウム ブロマイドにて染色した。それぞれの mRNA レベルは NIH image にて定量を行い、CDH13 mRNA と GAPDH mRNA の比 (CDH13 mRNA/GAPDH mRNA) として表示した。

3. 免疫組織化学における E-cadherin の発現の検討

ホルマリン固定パラフィン包埋標本について、モノクロナル抗 E-cadherin 抗体 (Transduction Laboratories 社) を用いて免疫組織化学をおこなった。陽性コントロールとして正常表皮を用いた。正常表皮で認められるように、シグナルが細胞膜に局在した場合を陽性細胞とした。また、シグナル強度および陽性細胞の割合を半定量的に表した。腺腫における陽性細胞の分布は 5 段階に、シグナル強度は 3 段階に分類した。両者を組み合わせて 0 から 6 に表示し、1-3 のスコアを発現減少とした。

結果

1. CDH13 と CDH1 のプロモーター領域のメチル化の解析

メチル化感受性 PCR の代表的な結果を図 1 に示す。CDH13 と CDH1 のプロモーター領域のメチル化状況と 69 名の下垂体腺腫患者の臨床病理学的特徴の関連性を表 1 に示す。CDH13 と CDH1 のメチル化は、それぞれ下垂体腺腫の 30% および 69% に認められた。正常下垂体においては、いずれもメチル化は認めなかった。

このうち GH 産生腺腫においては、CDH13 では 25% に、CDH1 では 21% にメチル化を認めた。機能性腺腫 (CDH13、31%; CDH1、31%) と非機能性腺腫 (CDH13、29%; CDH1、46%) 間では、メチル化の頻度に差異を認めなかった。

CDH13 のメチル化は、非浸潤性増殖を示す腺腫 (19%) よりも浸潤性増殖を示す腺腫 (42%) で高頻度に認められた (表 2)。また、CDH1 のメチル化は、グレード I を示す腺腫よりもグレード IV を示す腺腫 (42%) で高頻度に認められた。CDH13 あるいは CDH1 のいずれかにメチル化を認めるのは 51% で、グレード I あるいは非浸潤性腺腫よりもグレード IV あるいは浸潤性腺腫で高頻度に認められた。

一部の腺腫において、メチル化感受性PCRの結果とバイサルファイト - 塩基配列決定法の結果を比較検討したところ、2つの方法の結果は一致していることを確認した。

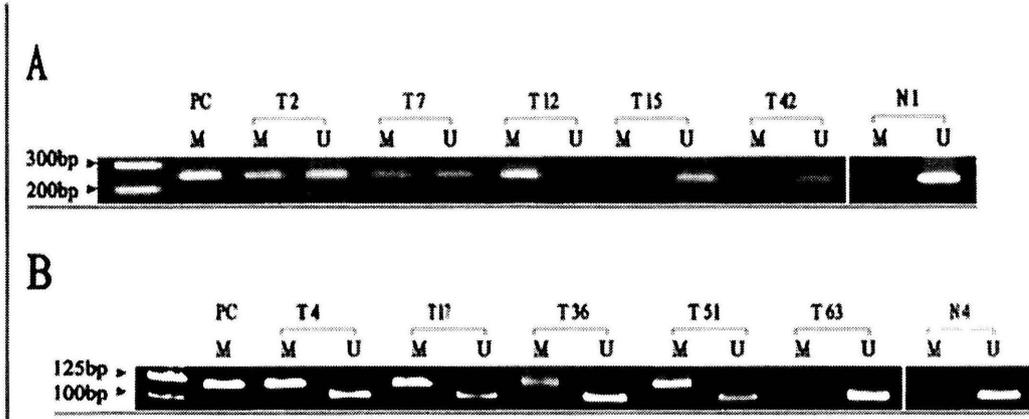


図1 CDH13 (A) およびCDH1 (B) 遺伝子プロモーター部位のメチル化感受性PCR
 A 下垂体腺腫 2, 7, 12でCDH13 遺伝子プロモーター部位のメチル化を認める。
 B 下垂体腺腫 4, 17, 36, 51でCDH1 遺伝子プロモーター部位のメチル化を認める。

MはCpGがメチル化されている場合に増幅するプライマーを、Uは非メチル化されている場合に増幅するプライマーを用いた。PCはメチル化の陽性コントロールを、N1、N4は正常下垂体を示す。

2. CDH13 mRNA の解析

5例の正常下垂体においては、いずれも高い発現レベル (CDH13 mRNA / GAPDH mRNA 0.85-1.09、平均0.97) を認めた (表3)。個々の下垂体腺腫に対応する正常下垂体は得られないため、CDH13 mRNA/GAPDH mRNAが0.48以下を、CDH13の発現量の減少と判定した。発現消失と発現減少は、それぞれ6例、16例の腺腫に認められた。

CDH13 mRNAの減少は非浸潤性増殖を示す腺腫 (27%) よりも浸潤性増殖を示す腺腫 (61%) で高頻度に認められた。

3. E-cadherin の発現の検討

5例の正常下垂体において、E-cadherinはほとんど全てのホルモン産生細胞の細胞膜に発現が認められた。E-cadherinの発現は、30%の腺腫で消失を、32%の腺腫で減少を認めた。軽度の発現減少あるいは正常発現は38%の腺腫に認められた。また、非浸潤性でミクロの腺腫よりも、浸潤性（グレードIVおよびIII）およびマクロ（グレードII）の腺腫で有意に発現減少が認められた。しかし、グレードIV、IIIおよびII間では差異は認められなかった。

E-cadherinの発現はfibrous bodyを有する8例のGH腺腫では全てにおいて発現が低下していた。一方、fibrous bodyを有さない16例のGH腺腫では、1例を除いて発現が認められた。またプロラクチノーマにおいては女性よりも男性患者で発現が低下している傾向を認めた。

4. CDH13とCDH1のプロモーター領域のメチル化と発現低下との関連

両遺伝子ともにメチル化を受けていない正常下垂体においては、高い発現レベルを有していた（表4）。CDH13の低メチル化を示した70%の腺腫において、発現レベルは正常であった。逆にCDH13のメチル化を有する69%の腺腫に発現の低下を認めた。CDH1の低メチル化を示した52%の腺腫において、発現レベルは正常であった。CDH1のメチル化を有する88%の腺腫に発現の低下を認めた。

考察

細胞接着因子は、細胞間の機械的な接着のみならず、細胞の増殖、分化、アポトーシスなどの基本的な細胞活動に関与している。細胞間あるいは細胞・細胞外マトリックス間での変化は、浸潤性や転移に関与することが知られている⁵⁾。これまでに、種々の腫瘍でCDH13とCDH1のプロモーター領域のメチル化による発現異常が報告され、腫瘍化・浸潤性との関連が検討されている^{3,4,7)}。

下垂体腺腫におけるCDH13とCDH1のプロモーター領域のメチル化は、それぞれ30%および36%に認められた。両遺伝子のメチル化はGH産生腺腫を含めた全てのタイプの腺腫および全ての腫瘍ステージで認められた。これらのメチル化と発現減少の有無については有意な相関が認められた。これまでの報告および本研究結果より、下垂体の腫瘍化においてメチル化の異常が大きく関与していることが明らかとなった。

CDH13のメチル化は浸潤性の高い腺腫で高頻度に認められ、グレードの程度とも関連が認められた。また、発現低下も腺腫の浸潤性との関連がみとめられた。これらの結果から、CDH13のメチル化による発現低下は、他の種類の腫瘍と同様に下垂体の腫瘍化に関与していると考えられる^{4, 8-10)}。ただし、H-カドヘリンは細胞内ドメインを欠いているため、細胞間接着とは別の機構で腫瘍化に関与している可能性がある。

E-カドヘリンに関して、我々はプロラクチノーマにおける発現低下が腫瘍サイズや浸潤性と関連があること¹¹⁾、fibrous bodyを有するGH腺腫では発現が低下していることを報告している¹²⁾。本研究においては、CDH1のメチル化はグレードIVの腺腫で高頻度に認められること、発現低下は全てのタイプの腺腫で認められ、腫瘍のサイズや浸潤性と関連があることを明らかにした。CDH13とCDH1のプロモーター領域のメチル化が両方の遺伝子に認められたのは11個存在し、いずれもグレードII、III、IVのステージであった。

以上の結果より、CDH13とCDH1遺伝子のメチル化による発現低下が、GH産生腺腫を含めた下垂体腺腫の伸展に関与している可能性が示唆されるとともに、腺腫の伸展性の予知因子となりうる可能性を有することが明らかとなった。

文献

1. Herman JG, Baylin SB: Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 349: 2042-2054, 2003
2. Qian ZR, Sano T, Yoshimoto K, Yamada S, Ishizuka A, Mizusawa N, Horiguchi H, Hirokawa M, Asa SL. Inactivation of RASSF1A tumor suppressor gene by aberrant promoter hypermethylation in human pituitary adenomas. *Lab Invest* 85: 464-473, 2005
3. Sato M, Mori Y, Sakurada A, Fujimura S, Horii A: H-cadherin (CDH13) gene is inactivated in human lung cancer. *Hum Genet* 103:96-101, 1998
4. Toyooka KO, Toyooka S, Virmani AK, Sathyanarayana UG, Euhus DM, Gilcrease M, Minna JD, Gazdar AF: Loss of expression and aberrant methylation of the CDH13 (H-cadherin) gene in breast and lung carcinomas. *Cancer Res* 61:4556-4560, 2001
5. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB : Methylation-specific

- PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9821-9826, 1996
6. Cavallaro U, Christofori G : Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer* 4:118-132, 2004
 7. Strathdee G: Epigenetic versus genetic alterations in the inactivation of E-cadherin. *Semin Cancer Biol* 12:373-12379, 2002
 8. Lee SW: H-cadherin, a novel cadherin with growth inhibitory functions and diminished expression in human breast cancer. *Nat Med* 2:776-782, 1996
 9. Maruyama R, Toyooka S, Toyooka KO, Harada K, Virmani AK, Zochbauer-Muller S, Farinas AJ, Vakar-Lopez F, Minna JD, Sagalowsky A, Czerniak B, Gazdar AF : Aberrant promoter methylation profile of bladder cancer and its relationship to clinicopathological features. *Cancer Res* 61:8659-8663, 2001
 10. Takeuchi T, Liang SB, Matsuyoshi N, Zhou S, Miyachi Y, Sonobe H, Ohtsuki Y : Loss of T-cadherin (CDH13, H-cadherin) expression in cutaneous squamous cell carcinoma. *Lab Invest* 82:1023-1029, 2002
 11. Qian ZR, Li CC, Yamasaki H, Mizusawa N, Yoshimoto K, Yamada S, Tashiro T, Horiguchi H, Wakatsuki S, Hirokawa M, Sano T : Role of E-cadherin, alpha-, beta-, and gamma-catenins, and p120 (cell adhesion molecules) in prolactinoma behavior. *Mod Pathol* 15:1357-1365, 2002
 12. Xu B, Sano T, Yoshimoto K, Yamada S: Downregulation of E-cadherin and its undercoat proteins in pituitary growth hormone cell adenomas with prominent fibrous bodies. *Endocr Pathol* 13: 341-351, 2002

表1. 下垂体腺腫における CDH13 および CDH1 プロモーターのメチル化

Variable	No.	CDH13 methylation			CDH 1 methylation		
		+	-	P	+	-	P
Patients	69	21 (30%)	48 (70%)		25 (36%)	44 (64%)	
Age (yr)		43.6 ± 3.2	48.4 ± 2.3	0.25	47.7 ± 3.6	46.5 ± 2.2	0.75
Gender				0.28			0.60
Male	33	8 (24%)	25 (76%)		13 (40%)	20 (60%)	
Female	36	13 (36%)	23 (64%)		12 (33%)	24 (67%)	
Functional adenomas							
GH	24	6 (25%)	18 (75%)		5 (21%)	19 (79%)	
GH/PRL	2	1 (50%)	1 (50%)		0	2 (100%)	
PRL	12	4 (33%)	8 (67%)		6 (50%)	6 (50%)	
ACTH	4	1 (25%)	3 (75%)		1 (25%)	3 (75%)	
TSH	3	2 (67%)	1 (33%)		2 (67%)	1 (33%)	
Total	45	14 (31%)	31 (69%)		14 (31%)	31 (69%)	
Non-functional adenomas							
Total	24	7(29%)	17 (71%)		11 (46%)	13 (54%)	
Normal pituitary	5	0	5 (100%)		0	5 (100%)	

表2. CDH13 および CDH1 プロモーターのメチル化とグレード・浸潤性との関連

Variable	No.	CDH13 methylation			CDH 1 methylation		
		+	-	P	+	-	P
Grade							
I	9	1 (11%)	8 (89%)		1(11%)	8(89%)	
II	27	6 (22%)	21 (78%)	0.4 ^a	10 (37%)	17 (63%)	0.1 ^a
III	25	10 (40%)	15 (60%)	0.1 ^b	9 (36%)	16 (64%)	0.1 ^b
IV	8	4 (50%)	4 (50%)	0.08 ^c	5 (63%)	3 (37%)	< 0.05 ^c
Invasion				< 0.05			0.31
Invasive	33	14 (42%)	19 (58%)		14 (42%)	19 (58%)	
Noninvasive	36	7 (19%)	29 (81%)		11 (31%)	25 (69%)	

a: II vs I; b: III vs I; c: IV vs I.

表3. 下垂体腺腫における CDH13 発現

	No.	CDH13 mRNA expression			P
		-	± ^a	+	
Invasive	23	3 (13%)	11 (48%)	9 (39%)	< 0.05
Noninvasive	29	3 (10%)	5 (17%)	21 (73%)	

^a ±: 腺腫における CDH13 mRNA レベルが正常下垂体に比べて優位に低下している。

表4. CDH13 および CDH1 プロモーターのメチル化と遺伝子発現との関連

CDH13 mRNA RT-PCR	No.	CDH13 methylation			E-cadherin IHC	No.	CDH1 methylation		
		+	-	P			+	-	P
-	6	5 (83%)	1	<.005	=	21	14 (67%)	7	<.0005
± ^a	16	6 (38%)	10		≤ 3 ^b	22	8 (36%)	14	
+	30	5 (17%)	25		≥ 4	26	3 (12%)	23	

^a ±: CDH13 mRNA の有意な低下, ^b ≤ 3: E-cadherin 蛋白の有意な低下, IHC: 免疫組織化学.