

## 成長ホルモン（GH）産生腺腫における癌抑制遺伝子異常の解析

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分子薬理学分野	岩田武男
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	水澤典子
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

家族性に成長ホルモン（GH）産生腺腫を来す疾患として、多発性内分泌腫瘍症 1 型（MEN1）およびカーニー複合体が報告され、それぞれの原因遺伝子は11q13に位置する *MEN1* 遺伝子、17q22-24に位置する type I  $\alpha$  regulatory subunit (RI $\alpha$ ) of adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate (cAMP) -dependent protein kinase (PKA; *PRKARIA*) であることが明らかにされている。*MEN1* 変異は70%以上のMEN1家系で、*PRKARIA* 変異は約60%のカーニー複合体に認められる。両者とも癌抑制遺伝子として作用する。

家族性GH産生腺腫は、家系内に少なくとも2名の先端巨大症あるいは巨人症の発症を認めるが、カーニー複合体やMEN1の症候を呈さない疾患と定義される。これまでに約50家系が報告され、散発性先端巨大症に比べ、若年で発症し巨人症を示すことが多い。本症の特徴として浸透率が低いことが挙げられる。2006年、フィンランドの家族性GH産生腺腫家系の解析により原因遺伝子は染色体11q13.3に位置するaryl hydrocarbon receptor-interacting protein (AIP) (別名XAP2、ARA9) であることが報告された<sup>1)</sup>。本遺伝子はがん抑制遺伝子として作用し、約50%の家系でAIP遺伝子の胚細胞変異が認められる。

我々は、これまでに1家系においてAIPの胚細胞変異と2個のGH産生腺腫における同遺伝子座のヘテロ接合性の消失 (LOH) を確認した<sup>2)</sup>。本研究は、我が国における家族性GH産生腺腫の残りの5家系のAIP遺伝子解析および*MEN1* 遺伝子、*PRKARIA* 遺伝子、MEN1型の亜型に変異が認められることが明らかとなった*p27<sup>Kip1</sup>* 遺伝子 (*CDKN1B*) の解析により、家族性に発症するGH産生腺腫の腫瘍化機序を解明することを目的とする。

### 症例および研究方法

#### 1. 家族性GH産生腺腫家系

東京医大八王子医療センターの3家系（家系1：母、先端巨大症、娘、プロラクチノーマ；家系2：兄、先端巨大症、弟、先端巨大症；家系3：姉、先端巨大症、妹、先端巨大症）<sup>3)</sup>、帝京大学ちば総合医療センターの1家系（家系4：姉、巨人症、妹、巨人症）<sup>4)</sup>、新潟県立中央病院の1家系（家系5：長女、先端巨大症、次女、先端巨大症、三女、先端巨大症）<sup>5)</sup> について、AIP遺伝子および*MEN1*、*PRKARIA*、*p27<sup>Kip1</sup>* 遺伝子の胚細胞変異を検討した。いずれの家系においてもカーニー複合体の症候である皮膚色素沈着、皮膚粘液腫、心粘液腫、原発性色素性副腎結節性異形成、甲

状腺腫瘍は認められていない。家系5において、長女は原発性副甲状腺機能亢進症を、次女は褐色細胞腫を合併している。

## 2. 白血球からのゲノムDNA抽出およびAIP、PRKARIA、p27<sup>Kip1</sup>遺伝子解析用プライマー

ゲノムDNAの抽出は常法に従った。AIP遺伝子解析用プライマーは既報に従い、5種のプライマーペアを用いて、コーディング領域およびエクソン・イントロン境界域を含めて増幅した<sup>2)</sup>。さらに、AIP遺伝子のプロモーター部分の遺伝子配列を決定した（プライマー塩基配列 F: 5'-CTCTGCAGTGCTGTTATATTCC-3'； R: 5'-CAGAAGCCAAAAGGGACTGAG-3'；PCR産物サイズ 256bp）。またMEN1、PRKARIAおよびp27<sup>Kip1</sup>遺伝子についても、それぞれ12種<sup>3)</sup>、12種<sup>6)</sup>および3種<sup>7)</sup>のプライマーペアを用いて増幅した。

## 3. 塩基配列決定

各PCR産物をExoSAP-IT処理後、直接塩基配列決定法により塩基配列を決定した。

## 4. 家族性副甲状腺機能亢進症家系におけるp27<sup>Kip1</sup>遺伝子解析

家族性副甲状腺機能亢進症はMEN1の垂型の可能性がある。そこで、家族性副甲状腺機能亢進症9家系<sup>8)</sup>についてp27<sup>Kip1</sup>遺伝子解析異常を検討した。これらの家系では、MEN1遺伝子、家族性低カルシウム尿性高カルシウム血症の原因遺伝子であるカルシウム感受性受容体遺伝子（CASR）および副甲状腺機能亢進症-顎腫瘍症候群（HPT-JT）の原因遺伝子であるHRPT2の変異は認められなかった。

## 結果

### 1. 家族性GH産生腺腫家系におけるAIP遺伝子の胚細胞変異

5家系において、AIP遺伝子のコーディング領域に胚細胞変異は認められなかった。AIP遺伝子のプロモーター部位の遺伝子変化について検討したところ、家系4においてC-270-269CG>AAおよびC.911G>Aの変化を認めた。このプロモーター部位の遺伝子変化は、日本人コントロール78名には認められなかった。

### 2. 家族性GH産生腺腫家系におけるMEN1、PRKARIA、p27<sup>Kip1</sup>遺伝子の胚細胞変異

5家系ともにMEN1、PRKARIA、p27<sup>Kip1</sup>遺伝子の胚細胞変異は認められなかった。

### 3. 家族性副甲状腺機能亢進症家系におけるp27<sup>Kip1</sup>遺伝子解析

9家系の家族性副甲状腺機能亢進症症例におけるp27<sup>Kip1</sup>遺伝子の胚細胞変異は認められなかった。1家系においてc.165A>G (alanine to alanine) (NCBI reference SNP ID number rs16908375) の一塩基多型を検出した。

## 考察

フィンランドのグループにより、pituitary adenoma predisposition (PAP) と命名された疾患

(家族性にGH産生腺腫、GH・PRL産生腺腫およびPRL産生腺腫を来たすが、低い浸透率を示す疾患。本疾患は、従来から提唱されていた家族性GH産生腺腫と同一である可能性が高い。)において、AIP遺伝子にQ14Xのナンセンス変異が認められた<sup>1)</sup>。この変異は家系内の健康人には認められず、下垂体腺腫を有する症例にのみ認められた<sup>1)</sup>。

私たちは、我が国における家族性GH産生腺腫の1家系においてAIP遺伝子の不活化をもたらすc.286-287delGTの胚細胞変異を認めた<sup>2)</sup>。本家系における2つの腺腫ともにAIPの胚細胞変異とLOHが認められることから、AIPの機能消失が、本家系におけるGH産生腺腫の発症に関与していると考えられる。しかしながら、残りの5家系については、AIP遺伝子のコーディング領域の胚細胞変異は認められなかった。さらに、プロモーター部分の塩基配列を検討したところ、1家系にC.-270-269CG>AAおよびC.911G>Aの変化を認めた。本遺伝子変化は健常日本人78名には認められなかったことより、病因と関連する可能性がある。レポーターアッセイ法により、野生型と遺伝子変化を有するプロモーターの活性を、それぞれ比較検討する必要がある。

細胞周期を負に調節し、Cip/Kipファミリーの一つである*p27<sup>Kip1</sup>*遺伝子の機能消失性の胚細胞変異が、MEN様症候群(両側性褐色細胞腫、副甲状腺腫、甲状腺C細胞過形成、パラガングリオーマ、膵内分泌細胞過形成、白内障)を示すラットの系統に認められた<sup>9)</sup>。この報告を受けて、*p27<sup>Kip1</sup>*遺伝子の胚細胞変異が、MEN1の亜型と考えられるヒトParathyroid/Pituitary variant of MEN1(下垂体腺腫、副甲状腺腫瘍、カルチノイド、血管筋脂肪腫などを伴う)の2家系に認められることが報告された<sup>9-11)</sup>。MEN1型とMEN2型の混合型を示す家系5は、ラットに発生する腫瘍のパターンから*p27<sup>Kip1</sup>*遺伝子変異の可能性が示唆された。そこで、家系5を含む家族性GH産生腺腫の5家系および家族性副甲状腺機能亢進症を示す9家系について検討したが、*p27<sup>Kip1</sup>*遺伝子の胚細胞変異は認められなかった。

以上、家族性GH産生腺腫5家系においてAIP遺伝子コーディング領域の胚細胞変異は認められなかった。さらにMEN1遺伝子、PRKARIA遺伝子、*p27<sup>Kip1</sup>*遺伝子いずれの変異も認められないことから、他の遺伝子変化が家族性GH産生腺腫発症と関連している可能性が高い。

## 文献

1. Vierimaa O, Georgitsi M, Lehtonen R, Vahteristo P, Kokko A, Raitila A, Tuppurainen K, Ebeling TM, Salmela PI, Paschke R, Gundogdu S, De Menis E, Makinen MJ, Launonen V, Karhu, A & Aaltonen LA (2006) Pituitary adenoma predisposition caused by germline mutations in the AIP gene. *Science* 312:1228-1230.
2. Iwata T, Yamada S, Mizusawa N, Golam HM, Sano T & Yoshimoto K (2007) The aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene is rarely mutated in sporadic GH-secreting adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)* 66:499-502.
3. Tanaka C, Yoshimoto K, Yamada S, Nishioka H, Ii S, Moritani M, Yamaoka T & Itakura M (1998) Absence of germline mutations of the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) gene in familial pituitary adenoma in contrast to MEN1 in Japanese. *J Clin Endocrinol Metab*

83:960-965.

4. Matsuno A, Teramoto A, Yamada S, Kitanaka S, Tanaka T, Sanno N, Osamura RY & Kirino T (1994) Gigantism in sibling unrelated to multiple endocrine neoplasia: case report. *Neurosurgery* 35:952-955.
5. 田村哲郎、関泰弘、吉田誠一 (2008) Menin遺伝子に異常を認めなかった家族性下垂体腺腫の2家系. *ホルモンと臨床* 56増刊号「内分泌クリニカル・カンファレンス48」 p33-38.
6. Yamasaki H, Mizusawa N, Nagahiro S, Yamada S, Sano T, Itakura M & Yoshimoto K (2003) GH-secreting pituitary adenomas infrequently contain inactivating mutations of PRKAR1A and LOH of 17q23-24. *Clin Endocrinol (Oxf)* 58:464-470.
7. Tanaka C, Yoshimoto K, Yang P, Kimura T, Yamada S, Moritani M, Sano T & Itakura M (1997) Infrequent mutations of p27<sup>Kip1</sup> gene and trisomy 12 in a subset of human pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 82:3141-3147.
8. Mizusawa N, Uchino S, Iwata T, Tsuyuguchi M, Suzuki Y, Mizukoshi T, Yamashita Y, Sakurai A, Suzuki S, Beniko M, Tahara H, Fujisawa M, Kamata N, Fujisawa K, Yashiro T, Nagao D, Golam HM, Sano T, Noguchi S & Yoshimoto K (2006) Genetic analyses in patients with familial isolated hyperparathyroidism and hyperparathyroidism-jaw tumour syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 65:9-16.
9. Pellegata NS, Quintanilla-Martinez L, Siggelkow H, Samson E, Bink K, Höfler H, Fend F, Graw J & Atkinson MJ (2006) Germ-line mutations in p27<sup>Kip1</sup> cause a multiple endocrine neoplasia syndrome in rats and humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:15558-15563.
10. Georgitsi M, Raitila A, Karhu A, van der Luijt RB, Aalfs CM, Sane T, Vierimaa O, Mäkinen MJ, Tuppurainen K, Paschke R, Gimm O, Koch CA, Gündogdu S, Lucassen A, Tischkowitz M, Izatt L, Aylwin S, Bano G, Hodgson S, De Menis E, Launonen V, Vahteristo P & Aaltonen LA (2007) Germline CDKN1B/p27<sup>Kip1</sup> mutation in multiple endocrine neoplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 92:3321-3325.
11. Ozawa A, Agarwal SK, Mateo CM, Burns AL, Rice TS, Kennedy PA, Quigley CM, Simonds WF, Weinstein LS, Chandrasekharappa SC, Collins FS, Spiegel AM & Marx SJ (2007) The parathyroid/pituitary variant of multiple endocrine neoplasia type 1 usually has causes other than p27<sup>Kip1</sup> mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 92:1948-1951.