

成長ホルモン産生腺腫におけるp18^{INK4C}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

最近、家族性成長ホルモン（GH）産生腺腫の原因遺伝子が aryl hydrocarbon receptor - interacting protein（AIP）であることが報告されたが¹⁾、散発性 GH産生腺腫と診断された症例において、胚細胞変異や腺腫における体細胞変異による不活化はまれであることが明らかにされている²⁾。このように、これまでの解析においてGH産生細胞の腫瘍化には gsp遺伝子変異の関与以外は明らかになっていない³⁾。

細胞周期を負に制御する INK4 familyに属するp16^{INK4A}、p15^{INK4B}、p18^{INK4C}遺伝子の異常が、種々の腫瘍で認められることが報告されている⁴⁾。この INK4 familyはCDK（cyclin-dependent kinase）4および CDK6に特異的に結合してキナーゼ活性を抑制する。すなわちINK4 familyの不活化は、CDK活性が促進することより、細胞増殖を惹起させる。下垂体腺腫においてはp16^{INK4A}遺伝子のプロモーター部位のメチル化異常による発現低下が既に報告されている⁵⁾。またp18^{INK4C}遺伝子欠損マウスでは臓器腫大、下垂体中葉の腫瘍、リンパ腫、精巣腫瘍、褐色細胞腫が生じる⁶⁾。さらに、p18^{INK4C}^{-/-}とPten^{+/-}のダブル欠損マウス⁷⁾やp18^{INK4C}^{-/-}とMen1^{+/-}のダブル欠損マウス⁸⁾は、Pten^{+/-}あるいはMen1^{+/-}欠損マウスに比べて下垂体前葉腫瘍の発生頻度が高くなるとの報告があり、p18^{INK4C}異常はヒトの下垂体の腫瘍化に関与している可能性がある。

本研究では、ヒトGH産生腺腫におけるp18^{INK4C}遺伝子の関与を検討するために、腺腫におけるp18^{INK4C}遺伝子の発現レベル、体細胞変異、メチル化異常を解析した。

症例および研究方法

1. 症例

散発性GH・プロラクチン産生腺腫1例およびGH産生腺腫14例においては、p18^{INK4C}蛋白の発現を免疫組織化学で、p18^{INK4C}遺伝子発現を定量的リアルタイム RT-PCR 法にて解析した。また、正常下垂体のmRNA量に比べて30%以下を示す腺腫についてp18^{INK4C}遺伝子プロモーター部位のCpG配列のメチル化の有無を検討した。さらに全例（15例）および別の40例の散発性GH産生腺腫におけるp18^{INK4C}遺伝子の体細胞変異の有無を検討した。

2. 免疫組織化学

パラフィン包埋標本を用いてp18^{INK4C}蛋白および Ki-67抗原蛋白の発現を検討した。抗体は、マウスモノクロナル抗p18^{INK4C}抗体 (Santa Cruz Biotech)、マウスモノクロナル抗Ki-67抗体 (Dako-Cytomation) を用い、抗原抗体複合体は cobalt-3,3'-diaminobenzidine反応にて検出した。陽性細胞数の割合により0；陽性細胞なし、1+；1-5%、2+；5-30%、3+；30-50%、4+；50%以上とスコア化した。またKi-67抗原ラベル化指数を500-1000個の腫瘍細胞での陽性細胞数を数えることにより求めた。

3. 定量的リアルタイム RT-PCR 法

腺腫組織からRNAを抽出し、定量的リアルタイムRT-PCR法を用いて、p18^{INK4C} mRNA量を定量した。比較検討のため nonfunctioning (NF)-FSH腺腫 13例、ACTH産生腺腫4例、silent ACTH産生腺腫4例、プロラクチノーマ11例、subtype 3 腺腫3例、TSH産生腺腫2例、正常下垂体組織3例について解析した。p18^{INK4C}では、forwardは5'-GGGGACCTAGAGCAACTTACT-3'、reverseは5'-GGCAATCTCGGGATTTCCAAG-3'、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) では、forwardは5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'、reverseは5'-GAAGATGGTGTGGGATTTTC-3'のプライマー配列を用いた。組織におけるp18^{INK4C} mRNA量はGAPDH mRNA量で補正した。

4. Bisulfite sequencing

腺腫組織からDNAを抽出し、sodium bisulfite処理を行った。bisulfite 処理のDNAを鋳型としてPCRを行った。forwardは5'-TAGGAAATTGGGGTAGTTGGGG-3'、reverseは5'-TTACCTCTCAAAAAAAAAATACCARTTT-3'のプライマー配列を用いた。この領域は42個のCpG dinucleotides配列を含む。得られた425 bpのPCR産物をベクターに組み込み、それぞれ少なくとも6個のクローンについて塩基配列を決定し、メチル化の有無を検討した。

5. 体細胞変異の検討

組織から抽出したDNAについて、direct sequencing法を用いてexon部位、exon・intron境界部位における点突然変異・小さな欠失や挿入の有無を検討した。さらに比較検討のため、NF-FSH腺腫13例、ACTH産生腺腫4例、silent ACTH産生腺腫4例、プロラクチノーマ11例、subtype 3 腺腫3例、TSH産生腺腫2例、GH産生腺腫40例についても検討した。コード領域であるexon 2 および exon 3 について塩基配列を解析した。exon 2 (PCR 産物サイズ、280 bp) では、forwardは5'-AGTCTCCGATGCCATCATGCAGC-3'、reverseは5'-CACGTAGGCAACATTATTGACTTGTT-3'、exon3 (PCR産物サイズ、515 bp) では、forwardは5'-GAAGGATTCTACCATTCTACTTCTTT-3'、reverseは5'-CTGCTTAACATATGACAGAACTGT-3'のプライマー配列を用いた。

結果

1. GH産生腺腫におけるp18^{INK4C}蛋白発現の検討

4例の正常下垂体組織においては、30%から40%の細胞に核に陽性のシグナルを認めた。表1に示すように4+を示す腺腫が1例に認められたが、0から1+が8例を占め、発現の低下を認めた。GH産生腺腫を含めた45例の腺腫の解析では、p18^{INK4C}蛋白レベルは、患者の年齢、性、腫瘍サイズ、

Ki-67抗原ラベル化指数とは有意な相関は認められなかった。

2. GH産生腺腫におけるp18^{INK4C} mRNA量の検討

13例のGH産生腺腫において、正常下垂体組織のp18^{INK4C} mRNA量（3例の平均）の17%から332%のmRNA量が認められた。そのうち50%以下の低下を示すものが7例に認められた（表1）。その他の腺腫では、全てのACTH産生腺腫およびNF-FSH腺腫では有意に発現が低下していた。また42例の腺腫について、p18^{INK4C}蛋白とp18^{INK4C} mRNA量の関連を検討したところ、正の相関を認めた。

3. プロモーターメチル化の解析

p18^{INK4C} mRNA量が正常下垂体組織の30%以下を示す腺腫（19例、GH産生腺腫の3例を含む）において、メチル化の有無を検討した。NF-FSH腺腫の1例にのみメチル化を認めた。

4. p18^{INK4C}遺伝子の体細胞変異

検討した89例の腺腫のいずれにおいても、体細胞変異は認められなかった。5例のGH産生腺腫と1例のNF-FSH腺腫においては、一塩基多型であるc.342T>C（p.G114G）を認めた。

考察

p18^{INK4C}はp16^{INK4A}、p15^{INK4B}、p19^{INK4D}とともにINK4ファミリーを形成しCDK4/6を阻害して細胞周期を負に制御する。このためp18^{INK4C}の機能消失は細胞増殖促進に作用すると考えられる。実際にp18^{INK4C}遺伝子を細胞で過剰発現させると細胞増殖が抑制されること、p18^{INK4C}を欠失させたマウスでは下垂体中葉の腺腫が生じること⁶⁾、およびp18^{INK4C}とMEN1のダブル欠失マウスでは下垂体中葉のみならず下垂体前葉の腺腫が生じることが明らかにされている⁸⁾。また、最近p18^{INK4C}の欠失はRETと協調して、甲状腺髄様癌の発症・進展を促進することが報告されている⁹⁾。これらの結果からp18^{INK4C}の遺伝子異常あるいは発現低下は、ヒト下垂体腺腫の腫瘍化に関与している可能性がある。

そこで、下垂体腺腫におけるp18^{INK4C}の発現レベルを蛋白およびmRNAレベルで検討した。検討した64%の腺腫で、蛋白レベルでの発現低下を認めた。この結果は最近報告されたKirschらの報告と一致する¹⁰⁾。また、mRNAレベルでは特にACTH産生腺腫およびNF-FSH腺腫で有意な発現低下が認められたが、この結果もMorrisらのACTH産生腺腫で低下が認められるという報告¹¹⁾と一致する。

下垂体腺腫における発現低下機構の解明のため、p18^{INK4C}遺伝子のプロモーター部位のメチル化およびコーディング領域の体細胞変異の有無について検討した。Kirschらは、methylation-specific PCR (MSP)の方法を用いて検討し、約40%の腺腫にp18^{INK4C}プロモーター部位の高メチレーションを認めたと報告している¹⁰⁾。メチレーションの頻度は低いという本研究結果との相違は、用いた方法の違いによる可能性がある。MSPは、簡便で感度が高い方法であるが、PCRで用いるプライマーや反応条件により、false positiveの結果をもたらすことがある。またMSPはプライマーに対応する塩基配列範囲内でのメチル化の有無を検出するが、本研究で用いたbisulfite sequencing法は42個のCpG dinucleotidesの変化を検出することが可能である。これらより、p18^{INK4C}発現低下にはプロモーター部位のメチル化の関与の可能性は少ないと考えられる。

また、p18^{INK4C}遺伝子発現に正に作用するmenin¹²⁾や負に制御するRET⁹⁾においては、それぞれ散

発性下垂体腺腫での体細胞変異はまれである^{13,14)}。遺伝子発現に関わるエピジェネティックな変化として、プロモーター部位のメチル化の他、p18^{INK4C}遺伝子発現に関わるヒストンのメチル化やアセチル化が関与している可能性があり、今後の検討課題である。

結語

GH産生腺腫の54%にp18^{INK4C} mRNAレベルの減少を認めた。この遺伝子発現低下に、プロモーター部位のメチル化やコーディング領域の体細胞変異の関与は小さいことが明らかとなった。遺伝子改変マウスの結果とあわせると、ヒト下垂体においてもp18^{INK4C} mRNAレベルの減少が腫瘍化に関与している可能性がある。

文献

1. Vierimaa O, Georgitsi M, Lehtonen R, Vahteristo P, Kokko A, Raitila A, Tuppurainen K, Ebeling TM, Salmela PI, Paschke R, G?ndogdu S, De Menis E, M?kinen MJ, Launonen V, Karhu A, Aaltonen LA. Pituitary adenoma predisposition caused by germ-line mutations in the AIP gene. *Science* 312:1228-1230, 2006.
2. Iwata T, Yamada S, Mizusawa N, Golam HM, Sano T, Yoshimoto K. The aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene is rarely mutated in sporadic GH-secreting adenomas. *Clin Endocrinol* 66:499-502, 2007.
3. Yamasaki H, Mizusawa N, Nagahiro S, Yamada S, Sano T, Itakura M, Yoshimoto K. GH-secreting pituitary adenomas infrequently contain inactivating mutations of PRKAR1A and LOH of 17q23-24. *Clin Endocrinol* 58:464-470, 2003.
4. Ortega S, Malumbres M, Barbacid M. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1602:73-87, 2002.
5. Woloschak M, Yu A, Xiao J, Post KD. Frequent loss of the P16^{INK4a} gene product in human pituitary tumors. *Cancer Res* 56:2493-2496, 1996.
6. Franklin DS, Godfrey VL, Lee H, Kovalev GI, Schoonhoven R, Chen-Kiang S, Su L, Xiong Y. CDK inhibitors p18^{INK4c} and p27^{Kip1} mediate two separate pathways to collaboratively suppress pituitary tumorigenesis. *Genes Dev* 12:2899-2911, 1998.
7. Bai F, Pei X, Pandolfi PP, Xiong Y. p18^{INK4c} and Pten constrain a positive regulatory loop between cell growth and cell cycle control. *Mol Cell Biol* 26:4564-4576, 2006.
8. Bai F, Pei XH, Nishikawa T, Smith MD, Xiong Y. p18^{INK4c}, but not p27^{Kip1}, collaborates with Men1 to suppress neuroendocrine organ tumors. *Mol Cell Biol* 27:1495-1504, 2007.
9. van Veelen W, Gasteren CJ, Action DS, Franklin DS, Berger R, Lips CJ, Höppener JW. Synergistic effect of oncogenic RET and loss of p18 on medullary thyroid carcinoma development. *Cancer Res* 68:1329-1337, 2008.
10. Kirsch M, Mörz M, Pinzer T, Schackert HK, Schackert G. Frequent loss of the CDKN2C

(p18^{INK4c}) gene product in pituitary adenomas. Genes Chromosomes Cancer 48:143-154, 2009.

11. Morris DG, Musat M, Czirják S, Hanzély Z, Lillington DM, Korbontís M, Grossman AB. Differential gene expression in pituitary adenomas by oligonucleotide array analysis. Eur J Endocrinol 153:143-151, 2005.
12. Karnik SK, Hughes CM, Gu X, Rozenblatt-Rosen O, McLean GW, Xiong Y, Meyerson M, Kim SK. Menin regulates pancreatic islet growth by promoting histone methylation and expression of genes encoding p27^{Kip1} and p18^{INK4c}. Proc Natl Acad Sci USA 102:14659-14664, 2005.
13. Tanaka C, Kimura T, Yang P, Moritani M, Yamaoka T, Yamada S, Sano T, Yoshimoto K, Itakura M. Analysis of loss of heterozygosity on chromosome 11 and infrequent inactivation of MEN1 gene in sporadic pituitary adenomas. J Clin Endocrinol Metab 83:2631-2634, 1998.
14. Yoshimoto K, Tanaka C, Moritani M, Shimizu E, Yamaoka T, Yamada S, Sano T, Itakura M. Infrequent detectable somatic mutations of the RET and glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) genes in human pituitary adenomas. Endocr J 46:199-207, 1999.

表1 GH産生腺腫症例の臨床像、p18^{INK4c}の免疫組織化学、mRNA定量の結果

症例番号	年齢	性別	病理診断	Hardy分類	p18 ^{INK4c} 免疫組織化学 ^a	p18 ^{INK4c} mRNA ^a
38	25	女性	GH+PRL	III-0	1+	27
39	63	男性	GH	III-A	0	138
40	48	男性	GH	II-A	0	83
41	55	男性	GH	II-0	2+	17
42	26	男性	GH	II-0	2+	65
43	61	男性	GH	II-B	未解析	40
44	33	男性	GH	III-B	未解析	40
45*	56	男性	GH	III-0	0	-
46*	33	男性	GH	III-B	0	-
47	39	女性	GH	III-B	未解析	47
48	63	女性	GH	II-A	4+	116
49	36	女性	GH	II-0	2+	25
50	56	女性	GH	II-0	0	83
51	74	女性	GH	II-0	1+	332
52	39	女性	GH	I-0	1+	33

^ap18^{INK4c}陽性腫瘍細胞は0から4にスコア化した (0, 陽性細胞なし; 1+, 1 - 5%; 2+, 5 - 30%; 3+, 30 - 50%; 4+, > 50%)

*mRNA レベルと体細胞変異は未解析