

総 説

## 腫瘍における異所性ホルモン産生と遺伝子発現

斎藤 史郎    吉本 勝彦    斎藤晴比古\*

**要旨** 異所性ホルモン産生とはもともと非内分泌腺腫瘍によるホルモン産生を指していたが、現在では正所性産生と考えられる場合も少なくないことが知られている。本腫瘍はペプチドホルモン、神経ペプチド、成長因子などを産生・分泌し、生化学的、免疫化学的ならびに形態学的研究により、産生ホルモンの種類・分子多様性、複数ホルモン同時産生などに個々の腫瘍による特徴が見出される。最近、遺伝子組換え技術の進歩により多数のホルモンの遺伝子構造が解明され、ホルモン前駆体のアミノ酸配列も明らかにされた。今後、正常細胞と腫瘍細胞におけるホルモン遺伝子の相違の有無、遺伝子発現機構およびホルモン前駆体のプロセシングの機構についての研究の発展が期待される。

〔癌と化学療法 12(1) : 1-12, 1985.〕

### はじめに

副腎皮質機能亢進症状が内分泌腺以外の組織に発生した腫瘍にみられることは Brown (1928年) 以来少なからず報告されていたが、Liddle ら<sup>1)</sup> (1962年) によって腫瘍組織から ACTH 様物質が初めて抽出され、これが副腎皮質ホルモンの分泌を刺激して Cushing 症候群を呈することが明らかにされてから異所性 ACTH 症候群、異所性 ACTH 産生腫瘍などと呼ばれるようになった。その後 ACTH 以外のホルモンも非内分泌腺性腫瘍からしばしば産生されることが知られ、異所性ホルモン産生腫瘍 (または症候群)<sup>2)</sup> と命名され、

その起原細胞、ホルモン産生・分泌動態などについて多くの知見が発表された。

一方、近年の遺伝子解析技術の進歩により、多数のホルモン遺伝子の構造が次々に解明され、それに対応してホルモン前駆体の構造とホルモン生成過程が明らかにされた。

このことは異所性ホルモン産生腫瘍のホルモン産生機構をホルモン遺伝子の発現機構の面より検討することを可能とすると考えられ、現在この領域におけるもっとも重要なテーマの一つとなっている<sup>3)</sup>。本稿では腫瘍における異所性ホルモン産生とホルモン遺伝子の発現機構に関する研究の現況を紹介し、今後の問題点についても述べる。

\* 徳島大学医学部・第一内科

本文中に用いた略語：

ACTH, 副腎皮質刺激ホルモン; APUDoma, APUD腫瘍; cDNA, 相補的 DNA; CEA, 癌胎児性抗原; CLIP, corticotropin-like intermediate lobe peptide; CRF, コルチコトロピン放出因子; CG, 絨毛性ゴナドトロピン; CS, 絨毛性ゾマトマンモトロピン (=PL, 胎盤性ラクトゲン), CT, カルシトニン; EGF, 上皮性成長因子; GH, 成長ホルモン; GRF, 成長ホルモン放出因子; hGH, ヒト成長ホルモン;  $\beta$ -LPH,  $\beta$ -リポトロピン; MSH,メラニン細胞刺激ホルモン; mRNA, メッセンジャーRNA; NGF, 神経成長因子; PDGF, 血小板由来成長因子; POMC, プロオピオメラノコルチン; PRL, プロラクチン; PTH, 副甲状腺ホルモン; VP, バゾプレッシン

### 異所性ホルモン産生腫瘍とは

前述のように異所性ホルモン産生腫瘍とは、従来、内分泌腺以外の組織に発生した腫瘍、たとえば肺の小細胞癌、胸腺腫、結腸癌などが ACTH などのホルモンを産生する場合をよんでいた。しかしホルモンの微量測定法や免疫組織化学などの進歩により、ACTH は下垂体前葉以外に脳、気管支上皮、消化管などの正常組織にも存在することが知られ、必ずしも異所性産生といえなくなった。したがって特定のホルモンがそのおもな産生

内分泌腺以外の組織の腫瘍によって産生される場合に、これを異所性ホルモン産生として取扱っていることが多い。

### 1. 異所性ホルモン産生腫瘍の種類

異所性ホルモン産生腫瘍の産生するホルモンはすべてペプチドまたは蛋白であり、ステロイドホルモンやアミンホルモンの異所性産生は知られていない。これはペプチド以外のホルモンの合成には多くの酵素系を必要とするので、多数の酵素の異所性産生が同時に行われることが困難なためと考えられる。

異所性ホルモン産生腫瘍は発生学的、形態学的、産生ホルモンの種類などによって概ね2群に分類される。第1群は神経堤細胞 neural crest cell などの外胚葉由来の腫瘍で、肺小細胞癌、カルシノイド、胸腺癌、甲状腺髄様癌、膵島癌、褐色細胞腫、網膜芽細胞腫などがこれに属する。この群の腫瘍からは ACTH/ $\beta$ -LPH 関連ペプチド、下垂体後葉ホルモン、視床下部ホルモン、カルシトニン、脳一腸管ペプチドなどが産生・分泌される。これらの腫瘍は発生学的類似性と機能 (amine precursor uptake and decarboxylation) から Pearse<sup>4)</sup> によって APUDoma とよばれたが、藤田ら<sup>5)</sup> はパラニューロン由来と考えてパラニューローマとよぶ方がより適切であるとしている。

第2群は中胚葉ならびに内胚葉由来の腫瘍で腎癌、肺の扁平上皮癌、大細胞癌、ヘパトーマなどが含まれ、PTH, GH, PRL, CG などを産生する。しかし APUDoma であっても CG や CS を産生するものもあり、両者の区別は厳密なものとはいえない。

このほか、エリスロポエチン、各種成長因子、colony stimulating factor, osteoclastic factor などを産生する腫瘍もあるが、それが異所性産生か否かは明らかでない。

### 2. 複数ホルモンの同時産生

異所性ホルモン産生腫瘍は一種のホルモンだけでなく、しばしば複数のホルモンを産生する。Sorenson ら<sup>6)</sup> は肺小細胞癌の培養株が培養液中に14種のペプチドホルモン、糖蛋白ホルモン、およびエストラジオールを放出することを認め、そのうち一つの腫瘍細胞株は10種の異なったホルモンを

産生・放出することを見出した。この複数ホルモンの同時産生は、ACTH/ $\beta$ -LPH 関連ペプチド産生腫瘍のように、これらのホルモンの前駆体 (pro-opiomelanocortin) が共通の場合は当然と考えられる。また個々の腫瘍により ACTH/ $\beta$ -LPH 関連ペプチドの組み合わせパターンが異なることもプロセシング酵素による前駆体の分解過程の差によって説明が可能である。しかしわれわれが報告したように甲状腺髄様癌<sup>7)</sup> では、前駆体がそれぞれ別と考えられるカルシトニンとソマトスタチンの同時産生がみられること (図1)、褐色細胞腫<sup>8)</sup> ではソマトスタチンとVIPが免疫組織化学的に明らかに異なる細胞に存在することなどから、複数ホルモン産生の機構も単一ではないと考えられる。

### 3. 産生ホルモンの分子多様性

腫瘍組織や血漿より抽出されるホルモンに分子多様性が認められることは、Yalow and Berson<sup>9)</sup> が異所性 ACTH 産生腫瘍中に ACTH と big ACTH を見出して以来、多くの報告がある。図2は褐色細胞腫組織より抽出したソマトスタチン様免疫活性のゲル濾過による分画パターンを示したもので、ソマトスタチン-14, ソマトスタチン-28 (プロソマトスタチン) およびプレプロソマトスタチンにそれぞれ相当する溶出位置にソマトスタチン免疫活性が見出される。血中にはおもにソマトスタチン-14が認められ、バイオアッセイにより合成ソマトスタチン-14とほぼ同等の成長ホルモン放出抑制作用が認められる。このような分子多様性はプレプロホルモン、プロホルモン、そしてホルモンへと特定の分子構造上の部位を切断するプロセシング酵素の作用の結果によるもので、この酵素の量あるいは活性の変化により3者の比率が異なるものと考えられる。

一方、CG のような糖蛋白ホルモンでは、 $\alpha$ -subunit と  $\beta$ -subunit の不均衡な合成によって遊離型 subunit が増加する場合と、糖鎖に異常のみられる場合がある。その結果、バイオアッセイとラジオイムノアッセイで測定されるホルモンの測定値に解離を生ずる<sup>10)</sup>。

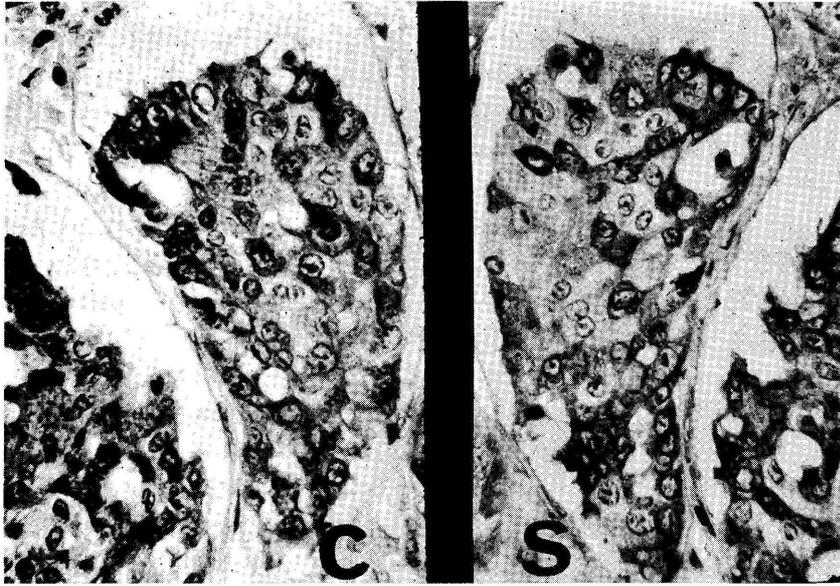


図1 甲状腺髄様癌の免疫組織化学所見 (PAP法)

左 (カルシトニン染色) と右 (ソマトスタチン染色) は mirror section で、両者とも陽性、一方のみ陽性、いずれも陰性の腫瘍細胞が認められる (Saito, S. *et al.*: In Brain-Gut Axis, p. 290, 1983)。

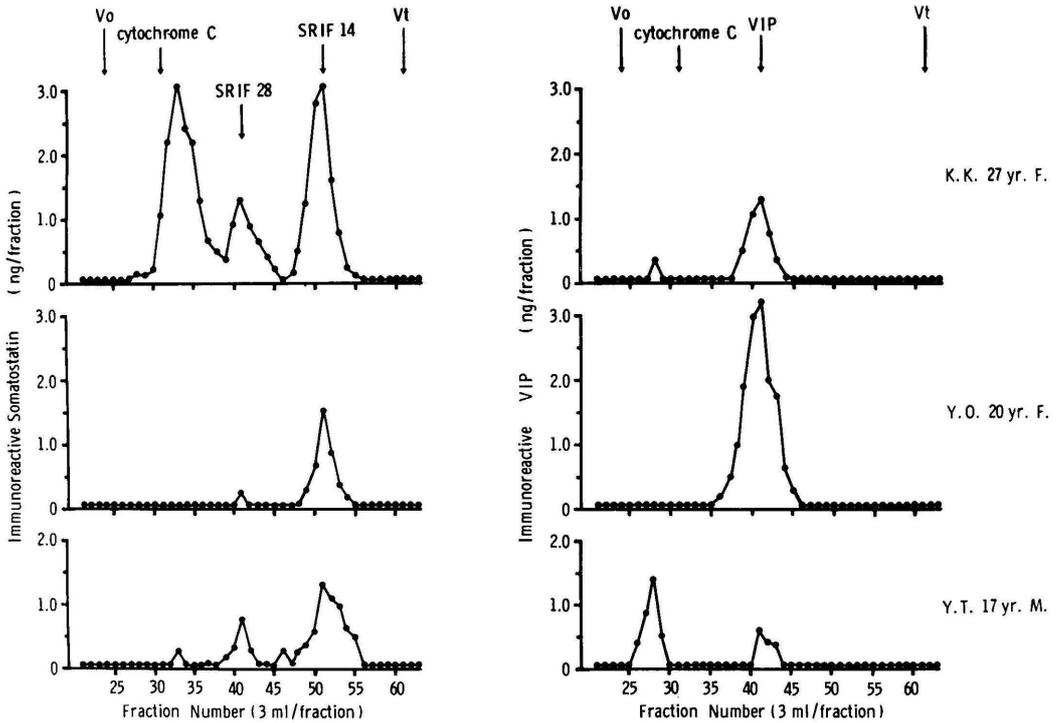


図2 パラガングリオーマ組織抽出物のゲル濾過

パターン (1.6×85cm Sephadex G-50 fine カラム), 3 症例についてソマトスタチン (SRIF) と vasoactive intestinal polypeptide (VIP) の測定成績を示す。(文献は図1と同じ)

### ホルモンの異所性産生の機構

異所性ホルモン産生機構についてはこれまでに幾つかの仮説が提唱されている。スポンジ説は腫瘍が血中のホルモンをスポンジのように吸収し、放出するという考えであるが、腫瘍細胞中にホルモンの mRNA が検出されるようになった現在、否定的である。

異常遺伝子説は遺伝子の突然変異により偶然、異所性ホルモンが産生されるという説であるが、①異所性ホルモン産生は random には起こらない、②腫瘍細胞に異常な DNA 配列や遺伝子産物が見出されないなどによりこの説も支持されていない。

遺伝子脱抑制説は、ふつう遺伝子は一部のみ発現されていて他の大部分は抑制されているが、細胞が腫瘍化すると抑制されていたホルモン遺伝子に脱抑制が起こりホルモンの合成が始まるという考えである。この説は腫瘍の産生するホルモンの分子構造と正常のそれとは本質的に差がなく、前駆体を同じくするホルモンは同時に産生されるという事実があるので理解しやすい。しかし脱抑制の起こり方が単純なものでないことは、ある種の腫瘍が特定のホルモンを産生しやすいという事実からも推測される。また、消化管における ACTH 産生のように正常の非内分泌腺組織でも少量のホルモンが産生されていることは、その細胞でホルモン遺伝子が完全には抑制されていないことを示している。

分化異常説は腫瘍化により、①胎生期以後の分化過程を逆行して元より原始的な時期にもどる dedifferentiation, または ②異方向への分化である dysdifferentiation で説明しようとする考えである。肺癌における異所性ホルモン産生を例にあげると、原始的な段階にとどまる腫瘍細胞は CG や CEA を産生するが、一方非 APUD 系から発生したと考えられる腫瘍も一部の細胞がホルモン産生細胞に分化してホルモンを産生する可能性がある。しかしこれについてはいまだ実証に乏しく、後述のように真核細胞における遺伝子制御や細胞分化の調節機構が明らかにされることが先決である。

ホルモン産生細胞の腫瘍化説は、多くのペプチドホルモン、脳一腸管ペプチドが内分泌腺以外の正常組織にも存在していることから、これらの細胞の腫瘍化によりホルモン産生が著明となるという考えである。この場合には異所性ではなく正所性産生というべきで、APUDoma, パラニューローマなどはこれに属する。しかしなぜ腫瘍化するかという基本的な疑問は依然として残る。

このように、異所性ホルモン産生腫瘍のホルモン産生機構については不明の点が多いが、近年遺伝子組換え技術の進歩によりホルモン遺伝子の構造とその発現機構が明らかにされつつある。また組換え技術で作成したキメラ遺伝子を細胞内に導入し、この外来性遺伝子の発現を指標として遺伝子制御系の仕組を観察することも行われている。これらの研究の進展により腫瘍細胞におけるホルモン遺伝子の switch on-off の機構も次第に判明すると思われるので、次にホルモン遺伝子とその発現機構について述べる。

### ホルモン遺伝子

真核細胞の DNA には最大30万個の遺伝子が存在するといわれ、ホルモン遺伝子もこれに含まれている。個々の細胞では特定の遺伝子のみ発現されており、ペプチドホルモンの場合も一般のペプチドと同様に生合成は次のように行われる。

#### 1. 転写

DNA のヌクレオチド塩基配列を鋳型として、まず RNA polymerase II によって相補的な RNA が合成される。この過程を転写 transcription というが、RNA polymerase はプロモーターとよばれる DNA 上の特定の塩基配列を認識し、その地点から一定の位置より DNA の転写、すなわち RNA の合成を始め、terminator とよばれる DNA 上の塩基配列に至るまでの部分を合成する。合成された RNA は mRNA 前駆体とよばれ、このうちよりイントロン（介在配列）という部分が切りとられ、エクソンがつなぎ合わされる（この過程をスプライシングという）。さらに mRNA の 5' 末端にキャップ構造（7-メチルグアノシンがピロリン酸を介して 5' 末端のリン酸に結合した形）が付加されるが、それは5'末

端からの酵素分解に対する保護作用と mRNA の翻訳開始にも重要な働きを示す構造と考えられている。さらに3'末端に poly A (約200塩基のアデニンヌクレオチドの重合した構造) が付加されて成熟 mRNA となる。

## 2. 翻訳

成熟 mRNA は核膜を通過して細胞質にはいり、粗面小胞体上に位置しているリボソーム上に到達し、ここで mRNA の塩基構造に対応した蛋白質が合成される。すなわち mRNA 上のコドンという3種の塩基の組み合わせに対応したアミノ酸が tRNA により運ばれてきてポリペプチド鎖が作られる。

## 3. ペプチドホルモン前駆体からホルモンへのプロセシング

mRNA の翻訳により生成されたペプチドホルモンはプレプロホルモンとよばれる。そのN末端に存在する信号ペプチドは小胞体膜を通過するのに必要で、通過のさいに切断されてプロホルモンとなる。一部のホルモン (GH, PRL, CS など) はこの段階で最終ホルモンとなるが、他のホルモンでは、プロホルモンに糖鎖がつけられることがある。プロホルモンは小胞体内でプロセシング酵素により特定の amino 酸配列部分の切断、リン酸化、アセチル化、C末端のグリシンのアミド化などをうけてホルモンとなる。ホルモンは小胞体腔よりゴルジ装置に移動し、他の物質 (ATP, アミンなど) とともに包みこまれて分泌顆粒となり、細胞膜から exocytosis の形で細胞外に放出される。

## 4. 転写の制御領域

ホルモン生合成の調節は上述のすべての過程で行われると考えられるが、その最初の段階である転写の開始には RNA ポリメラーゼの DNA への結合が必要である。この結合部位は特異的な塩基配列を示し、プロモーター (約60塩基対) とよばれ、開始点の塩基から転写される方向と反対方向 (すなわち上流) にある。種々の因子がプロモーターに作用してホルモン遺伝子の発現を調節するが、最近さらに上流の塩基配列も RNA ポリメラーゼのプロモーターへの結合に影響するといわれている。すなわち-30塩基上流にみられる塩基

配列 (TATAAA, TATA ボックスまたは Hogness box という) がそれで、ACTH/ $\beta$ -LPH 前駆体遺伝子の発現には Hogness box が必要といわれている。また多くの遺伝子では約80塩基上流に CAT box とよばれる共通塩基配列があり、転写の効率に関与するといわれる。

一方、下流には poly (A) の約15塩基上流に ATAAA という塩基配列があり、poly (A) のテイルを付加する位置を規定するシグナルと考えられており、このシグナルの約150塩基下流で mRNA が切断され、poly (A) が付加されることになる。

一方、スプライシングの過程に alternative splicing という現象のみられることがある。たとえばカルシトニン遺伝子にはカルシトニンに相当するエクソンの後に calcitonin-gene related product (CGRP) をコードしているエクソンがあり、甲状腺ではカルシトニン mRNA が、視床下部では CGRP mRNA が主に存在し<sup>11)</sup>、組織によってスプライシングのやり方が異なることがある。

## ホルモン遺伝子と前駆体の構造

### 1. ACTH/ $\beta$ -LPH 前駆体遺伝子

中西ら<sup>12)</sup> はウシ下垂体中葉より ACTH/ $\beta$ -LPH 前駆体 mRNA を精製し、逆転写酵素によって mRNA の塩基配列と相補的な塩基配列をもつ相補的 DNA (cDNA) を合成し、cDNA をクローニング (純化) してその全塩基配列を明らかにした。図3のように ACTH/ $\beta$ -LPH 前駆体遺伝子は3つのエクソンと2つのイントロンからなり、イントロンはスプライシングにより切断されて消失し成熟 mRNA となる。エクソン3に由来する部分には  $\gamma$ -MSH,  $\alpha$ -MSH,  $\beta$ -MSH という3つの繰返し構造が存在し、エクソン2には prepro ACTH/ $\beta$ -LPH の残りの部分と翻訳されない塩基部分が含まれている。エクソン1はキャップ構造などをコードしている。ACTH/ $\beta$ -LPH の amino 酸配列をみると processing signal として2塩基性 amino 酸対が10か所あり、これらに両側をはさまれた形で ACTH,  $\beta$ -LPH,  $\beta$ -エンドルフィンなどの ACTH/ $\beta$ -LPH 関連ペプチドが

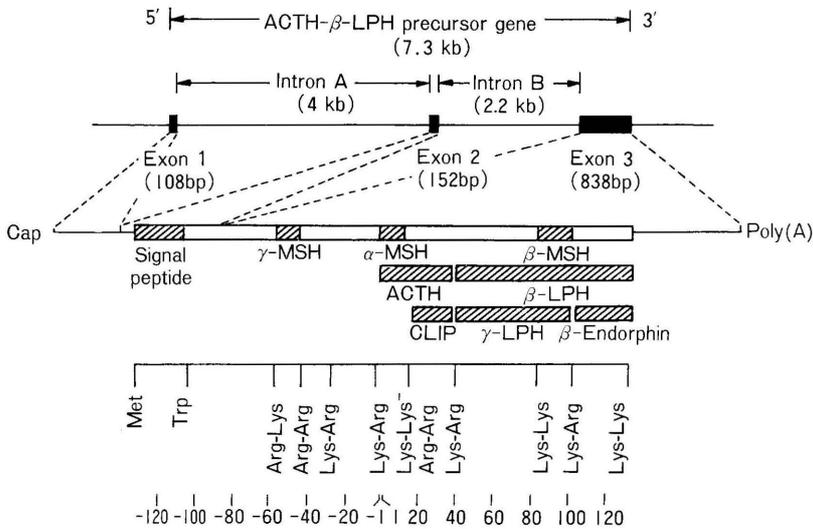


図3 ウシ ACTH/β-LPH 前駆体遺伝子の構造

上段に遺伝子の構造，その下方に mRNA を示し，蛋白をコードしている部分を太く示している。下段に，プレプロホルモンの N 末端（メチオニン）とプロホルモンの N 末端（トリプトファン）のアミノ酸残基および塩基性アミノ酸対の存在を示す。ACTH の最初のアミノ酸残基を 1 として C 末端方向に正の番号をつけている。（Numa, S. and Nakanishi, S.: Trends in Biochemical Sciences. 6, 274, 1981）

含まれている。そのプロセッシングは下垂体前葉と中葉とで異なり，前者では  $\gamma$ -MSH, ACTH,  $\beta$ -LPH と少量の  $\beta$ -エンドルフィン，後者ではさらに分解されて  $\gamma$ -MSH,  $\alpha$ -MSH, CLIP,  $\beta$ -MSH,  $\beta$ -エンドルフィン,  $\delta$ -エンドルフィンおよびこれらの N 端がアセチル化されたものが生成される<sup>13)</sup>。沼らのグループは *in vivo* の系<sup>14)</sup>や *in vitro* の転写系<sup>15)</sup>を用いて ACTH/β-LPH 遺伝子の発現に TATA box が必須であること，また転写開始部位より 53-59塩基対上流の構造を欠失させると転写が促進されることを明らかにした。さらに彼ら<sup>16)</sup>はウシでは下垂体 mRNA にくらべてその他の組織（副腎髄質，甲状腺，胸腺，十二指腸，肺）の mRNA は小さいことを認めた。

## 2. Proenkephalin A および Proenkephalin B

オピオイドペプチドの一種であるエンケファリン類はエンドルフィン類と前駆体を異にすることが Noda ら<sup>17)</sup>により見出された。その成績によると proenkephalin A には 4 個の Met-enkephalin と各 1 個の Leu-enkephalin, Met-enkephalin-Arg<sup>6</sup>-Phe<sup>7</sup>, Met-enkephalin-Arg<sup>6</sup>-Gly<sup>7</sup>-Leu<sup>8</sup> が含まれ，それぞれ 2 個の塩基性アミノ酸

残基配列によって境界されている。さらに彼らは  $\beta$ -preproenkephalin B ( $\beta$ -neo-endorphin/dynorphin precursor) 前駆体の遺伝子のヌクレオチド配列とアミノ酸配列を解明した<sup>18)</sup>。Proenkephalin A, B および ACTH/β-LPH 前駆体の遺伝子は構造的に似ており，prohormone 中に共通のアミノ酸配列 Met-enkephalin を有することなどから，共通の遺伝子から進化してきたものと推測される。

## 3. カルシトニン

Amara ら<sup>11)</sup>はカルシトニン産生の少ないラット甲状腺髄様癌組織よりヌクレオチドがカルシトニン mRNA より 50~250 多い calcitonin-gene-related product (CGRP) mRNA を見出した。これは図 4 のようにカルシトニン遺伝子の後に CGRP をコードするエクソンを含み，mRNA 前駆体の段階では両者はともに存在するが，その後のスプライシングに組織による差が認められるという。すなわち，甲状腺 C 系細胞ではカルシトニン mRNA が，視床下部ではスイッチングによりカルシトニンの部分が失われて CGRP mRNA が作られるものと考えられ，このような機序を

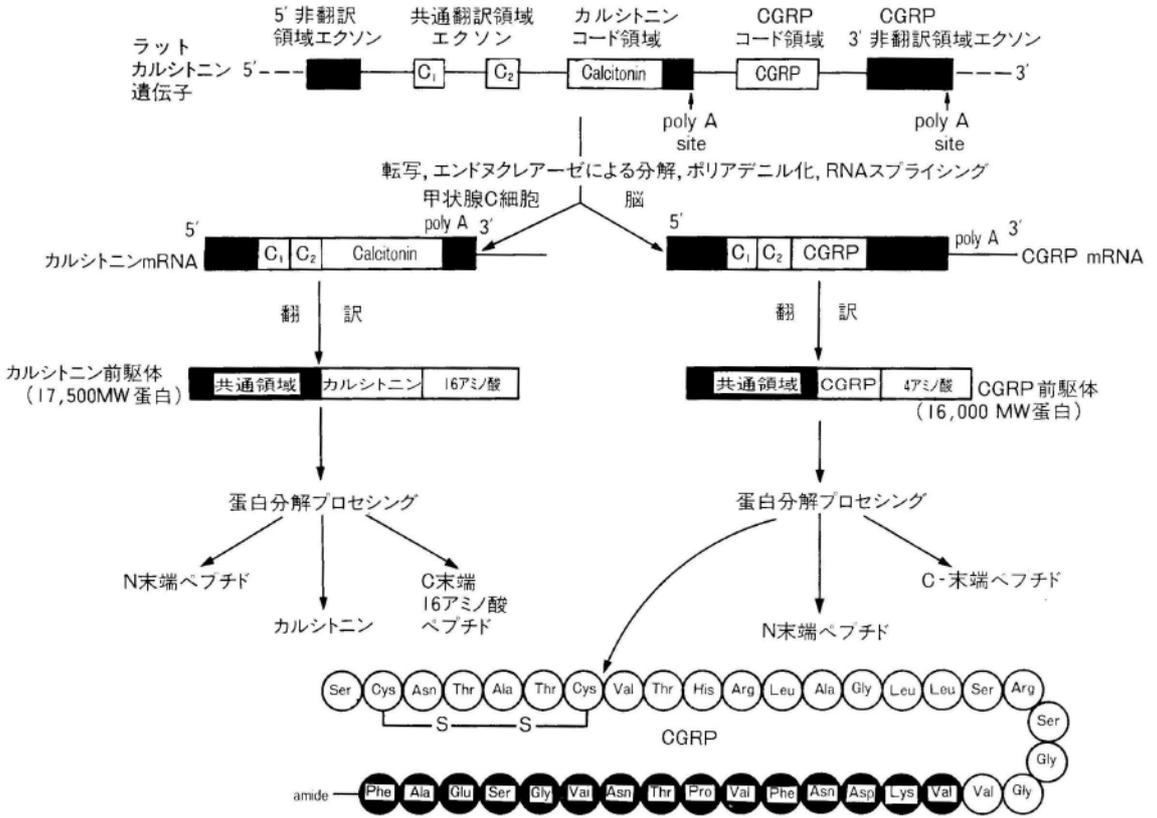


図 4 選択的 RNA スプライシングによる組織特異的なカルシトニン遺伝子発現モデル (Rosenfeld, M. G. et al : Nature 304 : 129, 1983)

alternative splicing といひ、成長ホルモンの場合にも認められる。この機構は他のホルモンの場合にも恐らく存在して、ホルモン遺伝子の発現調節に関与するものと考えられる。

#### 4. 成長ホルモン、プロラクチンおよび絨毛性ソマトマンモトロピン

ヒト GH とラット GH の遺伝子を比較すると両者のイントロンは同じ部位に配列しており、TATA box と -154~-193塩基上流の DNA 塩基配列も共通である。このことは両者が同じ祖先 DNA に由来すること、遺伝子発現の調節機構が共通していることを示唆する<sup>19)</sup>。一方、下垂体には22K hGH より小さい20K variant が存在することが知られ、この20K GH は32~46位のアミノ酸配列が欠落しており、イントロンBの alternative splicing の結果と考えられている。hCS の遺伝子の構造は蛋白コード領域のみ比較すると

hGH と92%の同一性を示し、相互に近い関係にあることがわかる。図5は hGH と hCS の遺伝子で形成されている multigene を示し、GH が2個、hCS が5個が存在し、hCS-2のみ逆の方向に転写される。

一方、PRL は GH および CS と構造、免疫化学および機能の上で一部類似性を示すポリペプチド群に属し、これらのホルモン産生は組織特異的である。遺伝子構造上にも類似性が認められ、共通の祖先から生じたものと考えられる。そのモデルを図6に示すが、祖先遺伝子の形成された後、それぞれ分化して GH と PRL となり、GH はさらに分化して現在の GH と CS になったものと考えられる。またエクソン1の部位は GH と PRL の間に相同性がないことから GH と PRL が分化したのちに regulatory domain が挿入されたと思われる<sup>20,21)</sup>。

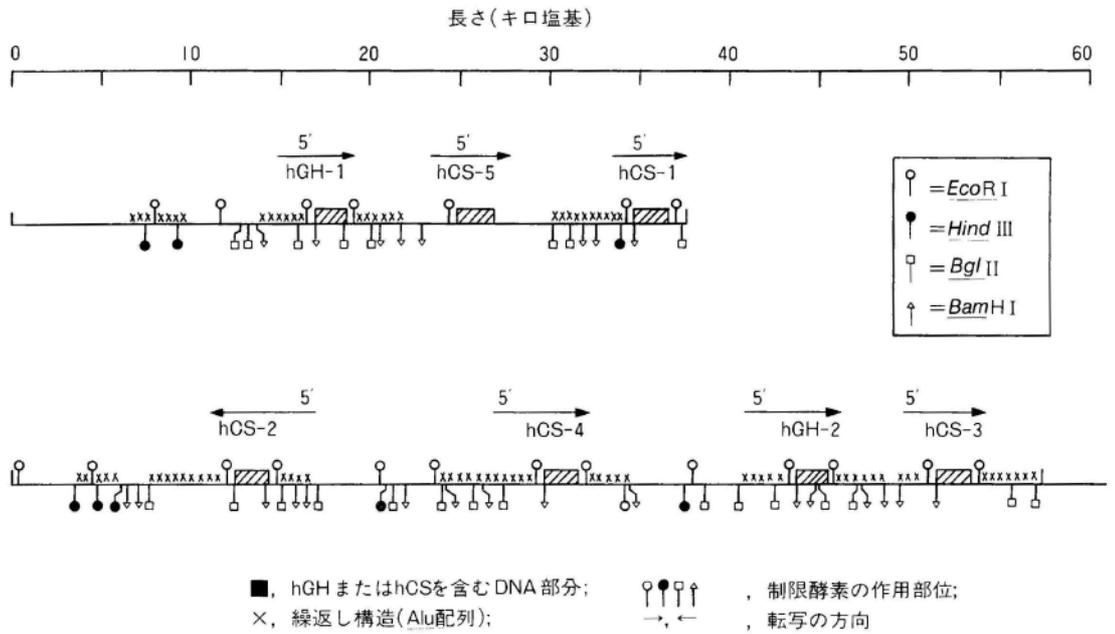


図 5 hGH 遺伝子と hCS 遺伝子の連鎖<sup>21)</sup>

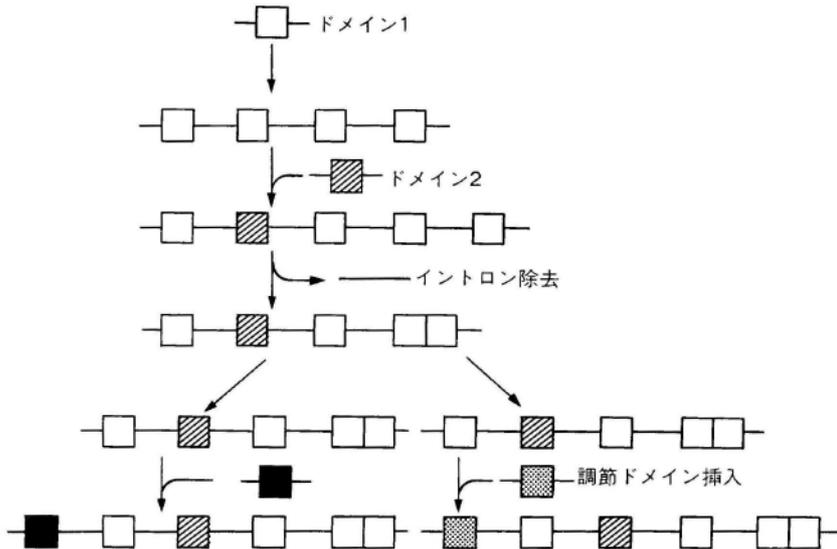


図 6 成長ホルモン、プロラクチンおよび絨毛性ソマトトロピン遺伝子の進化の模型図<sup>21)</sup>。祖先遺伝子(ドメイン1)が重複し、その後、糖代謝調節機能をもつ遺伝子(ドメイン2)が挿入し、その後一部のイントロンが除去され、最後に調節ドメインが挿入されてホルモン遺伝子が形成されることを示す。まず GH と PRL に分化し、GH は さらに分化して現在の GH と CS になったと考えられる。

## 5. その他のホルモン

Land ら<sup>22)</sup>により vasoressin-neurophysin II 前駆体 mRNA の塩基配列が決定され、N端側に vasopressin, 中央に neurophysin II, C端側に 39個のアミノ酸を有する糖ペプチドが連なっていることが明らかにされた。その後 oxytocin-neurophysin I 前駆体構造も判明した<sup>23)</sup>、これには糖ペプチドは含まれていない。最近尿崩症ラットで vasopressin-neurophysin II 遺伝子のエクソン B の塩基の一つ (グアニン) が欠損し、そのため糖鎖添加部位がなくなり neurophysin の C 末端が極端に変化していることが見出された。その結果 VP や neurophysin が mRNA より翻訳されないか、または翻訳後に急遽に分解する可能性が考えられる。しかしこのラットの卵巣<sup>24)</sup>や副腎<sup>25)</sup>に VP の存在も報告されており、翻訳後の過程における VP 分子構造の修飾や、別の VP 遺伝子の発現されている可能性も否定できない。

このほか、ヒトプレプロインスリン遺伝子の染色体上の位置 (第11染色体短腕) と構造も判明し<sup>26,27)</sup>、さらに異常インスリン、プロインスリン血症患者のインスリンにアミノ酸置換のおこっていることが報告されている<sup>28,29)</sup>。そのほか糖蛋白ホルモンの  $\alpha$ -subunit<sup>29)</sup>、 $\beta$ -subunit<sup>30)</sup>、ガストリン<sup>31,32)</sup>、cholecystokinin<sup>33,34)</sup>、VIP<sup>35)</sup>、ソマトスタチン<sup>36)</sup>、グルカゴン<sup>37)</sup>、副甲状腺ホルモン<sup>38)</sup>、CRF<sup>39,40)</sup>、GRF<sup>41,42)</sup>、レニン<sup>43,44)</sup>、アンジオテンシン<sup>45,46)</sup>、キニノーゲン<sup>47,48)</sup>、心房性利尿因子 (ANF)<sup>49,50)</sup> などの遺伝子構造が発表されている。

## 6. 成長因子

IGF-I<sup>51)</sup>、IGF-II<sup>52)</sup>、 $\beta$ -NGF<sup>53,54)</sup>、EGF<sup>55,56)</sup>、PDGF<sup>57)</sup> などの各種成長因子の遺伝子構造も判明した。

### 腫瘍におけるホルモン遺伝子の発現

#### 1. 生化学的研究

ある腫瘍がホルモンを産生しているか否かを確かめるには、*in vivo* または *in vitro* の系で腫瘍細胞よりホルモンが放出されていることを証明するか、腫瘍細胞中にホルモンの mRNA を生化学的または組織化学的に証明すればよい。

塚田、中井ら<sup>58,59)</sup>はヒト異所性 ACTH 産生胸腺腺カルシノイドについて ACTH/ $\beta$ -LPH mRNA の存在を無細胞蛋白合成系を用いて検討し、腫瘍と下垂体由来の mRNA はともに同じ分子量の前駆体を生成することを見出した。また、前駆体 mRNA に対する cDNA をプローブとする blot hybridization 法により検討した結果、下垂体では一本のバンド (1100塩基対、分子量 $3.7 \times 10^5$ ) が認められるが、腫瘍 mRNA には2つのバンドが見出され、主要なバンドは下垂体のそれに一致し、他の一つはこれより分子量が大であった。DeBold ら<sup>60)</sup>も同様に2つのバンドを認めているが、大分子のバンドの本態についてはまだ不明である。このように腫瘍中の ACTH/ $\beta$ -LPH 前駆体の mRNA は下垂体のものと同じと考えられ、腫瘍組織によって ACTH および関連ペプチドのゲル濾過パターンが異なるのはプロセシングの差によるものと思われる。

このほか腫瘍の産生するホルモン mRNA は異所性 VP/neurophysin 産生肺燕麦細胞癌<sup>61)</sup> CG 産生の肺癌由来 ChaGo 細胞<sup>62)</sup>などで報告されている。一方、Simpson ら<sup>63)</sup>は高 Ca 血症を伴った悪性腫瘍より northern blot hybridization assay (感度50pg) で PTH mRNA が検出されなかったことより、異所性 PTH 産生腫瘍はかなりまれなものとしている。

#### 2. 形態学的研究

##### a) 免疫組織化学

本法の特徴は腫瘍全体はもちろん個々の腫瘍細胞について直視下にホルモンの存在と産生を検査できることにある。最近、光顕レベル免疫組織化学は蛍光抗体法、酵素抗体法、PAP 法と次々に新しい方法が開発され広く応用されている。一方電顕レベルの免疫組織化学としてはプロテイン A・金コロイド法<sup>64)</sup>が注目され、金コロイド粒子の大きさを変えることにより2種の抗原を同一切片上で証明できる。

##### b) In situ hybridization histochemistry<sup>65)</sup>

単一細胞内の特徴的な核酸配列を検出するために開発された方法で、理論的には免疫組織化学と同じであるが、抗体の代わりに DNA や RNA プローブを用いる点が異なる。プローブは細胞内で

特異的 mRNA や DNA とハイブリッドを作るのでこれをオートラジオグラフィなどの方法で検出する。Roberts ら<sup>60)</sup>は <sup>3</sup>H 標識 POMC cDNA を用いてラット視床下部のニューロンに POMC mRNA を証明した。

### おわりに

異所性ホルモン産生腫瘍の研究の現状について述べた。本腫瘍の起原細胞、産生ホルモンの分子多様性、腫瘍細胞内局在、多ホルモン同時産生などについてはこれまでに多くの興味ある知見がえられたが、現在、研究の焦点はそのホルモン産生の遺伝子レベルにおける機構の解明に向けられている。しかし正常細胞における遺伝子の発現機構、転写ならびに翻訳レベルの調節機構およびプロホルモンのプロセシング酵素とその作用機構などについてはなお不明の点が多い。今後、この方面の研究の発展に伴って腫瘍細胞におけるホルモン遺伝子発現とホルモン産生機構が明らかにされるものと期待される。

### 文 献

- 1) Meador, C.K., Liddle, G.W., Island, D.P. *et al*: Cause of Cushing's syndrome in patients with tumors arising from "nonendocrine tissue. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **22**: 693-703, 1962.
- 2) Liddle, G.W., Nicholson, W.E., Island, D.P. *et al*: Clinical and laboratory studies of ectopic humoral syndrome. *Rec. Progr. Horm. Res.* **25**: 283-314, 1969.
- 3) Imura, H.: Ectopic hormone production viewed as an abnormality in regulation of gene expression. *Advances Cancer Res.* **33**: 39-75, 1980.
- 4) Pearse, A.G.E.: The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone producing cells of the APUD series and the embryonic, physiologic and pathologic implications of the concept. *J. Histochem. Cytochem.* **17**: 303-313, 1969.
- 5) Fujita, T. and Kobayashi, S.: Current views on the paraneurone concept. *Trends Neurosci.* **2**: 27-30, 1979.
- 6) Sorenson, G.D., Pettengill, O.S., Brinck-Jensen, T. *et al*: Hormone production by cultures of small-cell carcinoma of the lung. *Cancer* **47**: 1289-1296, 1981.
- 7) Saito, S., Saito, H., Matsumura, M. *et al*: Molecular heterogeneity and biological activity of immunoreactive somatostatin in medullary carcinoma of the thyroid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **53**: 1117-1122, 1981.
- 8) Sano, T., Saito, H., Inaba, H. *et al*: Immunoreactive somatostatin and vasoactive intestinal polypeptide in adrenal pheochromocytoma. An immunochemical and ultrastructural study. *Cancer* **52**: 282-289, 1983.
- 9) Yalow, R.S. and Berson, S.A.: Size heterogeneity of immunoreactive human ACTH in plasma and extracts of pituitary glands and ACTH-producing thymoma. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **44**: 439-445, 1971.
- 10) Odell, W.D.: Humoral manifestations of cancer. Textbook of Endocrinology (ed. by Williams, R.H.) 6th edition, Saunders Company, pp. 1228-1241, 1981.
- 11) Amara, S.G., Jonas, V., Rosenfeld, M.G. *et al*: Alternative processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature* **298**: 240-244, 1982.
- 12) Nakanishi, S., Teranishi, Y., Watanabe, Y. *et al*: Isolation and characterization of the bovine corticotropin/ $\beta$ -lipotropin precursor gene. *Eur. J. Biochem.* **115**: 429-438, 1981.
- 13) 中井義勝: ACTH および関連ペプチド, 視床下部, 下垂体 (鎮目和夫ほか編), pp. 131-150, 医歯薬出版, 1982.
- 14) Mishina, M., Kurosaki, T., Yamamoto, T. *et al*: DNA sequences required for transcription *in vivo* of the human corticotropin- $\beta$ -lipotropin precursor gene. *EMBO J.* **1**: 1533-1538, 1982.
- 15) Notake, M., Karasaki, T., Yamamoto, T. *et al*: Sequence requirement for transcription *in vivo* of the human corticotropin/ $\beta$ -lipotropin precursor gene. *Eur. J. Biochem.* **133**: 599-605, 1983.
- 16) Jingami, H., Nakanishi, S., Imura, H. *et al*: Tissue distribution of messenger RNAs coding for opioid peptide precursors and related RNA. *Eur. J. Biochem.* **142**: 441-447, 1984.
- 17) Noda, M., Furutani, Y., Takahashi, H. *et al*: Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal preproenkephalin. *Nature* **295**: 202-206, 1982.
- 18) Kakidani, H., Furutani, Y., Takahashi, H. *et al*: Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine  $\beta$ -neo-endorphin/dynorphin precursor. *Nature* **298**: 245-249, 1982.
- 19) Moore, D.D., Walker, M.D., Diamond, D.J. *et al*: Structure, expression, and evolution of growth hormone gene. *Rec. Progr. Horm. Res.* **38**: 197-225, 1982.
- 20) Cooke, N.E. and Baxter, J.D.: Structural analysis of the prolactin gene suggests a separate origin for its 5' end. *Nature* **297**: 603-606, 1982.
- 21) Miller, W.L. and Eberhardt, N.L.: Structure and evolution of the growth hormone gene family. *Endocrine Rev.* **4**: 97-130, 1983.

- 22) Land, H., Schütz, G., Schmale, H. *et al*: Nucleotide sequence of cloned cDNA encoding bovine arginine vasopressin-neurophysin II precursor. *Nature* **295**: 299-303, 1982.
- 23) Land, H., Grez, M., Ruppert, S. *et al*: Deduced amino acid sequence from the bovine oxytocin-neurophysin I precursor cDNA. *Nature* **302**: 342-344, 1983.
- 24) Lim, A.T.W., Lolait, S.J., Barlow, J.W. *et al*: Immunoreactive arginine-vasopressin in Brattleboro rat ovary. *Nature* **310**: 61-64, 1984.
- 25) Nussey, S.S., Ang, V.T.Y., Jenkins, J.S. *et al*: Brattleboro rat adrenal contains vasopressin. *Nature* **310**: 64-66, 1984.
- 26) Bell, G.I., Pictet, R.L., Rutter, W.J. *et al*: sequence of the human insulin gene. *Nature* **284**: 26-32, 1980.
- 27) Bell, G.I., Karam, J.H. and Rutter, W.J.: Polymorphic DNA region adjacent to the 5' end of the human insulin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **78**: 5759-5763, 1981.
- 28) Kwok, S.C.M., Steiner, D.F., Rubenstein, A.H. *et al*: Identification of a point mutation in the human insulin gene giving rise to a structurally abnormal insulin (insulin Chicago). *Diabetes* **32**: 872-875, 1983.
- 29) Fiddes, J.C. and Talmadge, K.: Structure, expression, and evolution of the genes for the human glycoprotein hormones. *Rec. Progr. Horm. Res.* **40**: 43-78, 1984.
- 30) Boorstein, W.R., Vamvakopoulos, N.C. and Fiddes, J.C.: Human chorionic gonadotropin  $\beta$ -subunit is encoded by at least eight genes arranged in tandem and inverted pairs. *Nature* **300**: 419-422, 1982.
- 31) Wiborg, O., Berglund, L., Boel, E. *et al*: Structure of a human gastrin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **81**: 1067-1069, 1984.
- 32) Ito, R., Sato, K., Helmer, T. *et al*: Structural analysis of the gene encoding human gastrin: The large intron contains an *Alu* sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **81**: 4662-4666, 1984.
- 33) Deschenes, R.J., Lorenz, L.J., Haun, R.S. *et al*: Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding rat preprocholecystokinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 726-730, 1984.
- 34) Gubler, U., Chua, A.O., Hoffman, B.J. *et al*: Cloned cDNA to cholecystokinin mRNA predicts an identical preprocholecystokinin in pig brain and gut. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 4307-4310, 1984.
- 35) Itoh, N., Obata, K., Yanaihara, N. *et al*: Human preprovasoactive intestinal polypeptide contains a novel PHI-27-like peptide, PHM-27. *Nature* **304**: 547-549, 1983.
- 36) Shen, L-P. and Rutter, W.J.: Sequence of the Human Somatostatin I Gene. *Science* **224**: 168-171, 1984.
- 37) Bell, G.I., Santerre, R.F. and Mullenbach, G. T.: Hamster preproglucagon contains the sequence of glucagon and two related peptides. *Nature* **302**: 716-718, 1983.
- 38) Vasicek, T.J., McDevitt, B.E., Freeman, M.W. *et al*: Nucleotide sequence of the human parathyroid hormone gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **80**: 2127-2131, 1983.
- 39) Furutani, Y., Morimoto, Y., Shibahara, S. *et al*: Cloning and sequence analysis of cDNA for ovine corticotropin-releasing factor precursor. *Nature* **301**: 537-540, 1983.
- 40) Shibahara, S., Morimoto, Y., Furutani, Y. *et al*: Isolation and sequence analysis of the human corticotropin-releasing factor precursor gene. *EMBO J.* **2**: 775-779, 1983.
- 41) Gubler, U., Monahan, J.J., Lomedico, P.T. *et al*: Cloning and sequence analysis of cDNA for the precursor of human growth hormone-releasing factor, somatotropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 4311-4314, 1983.
- 42) Mayo, K.E., Vale, W., Rivier, J. *et al*: Expression-cloning and sequence of a cDNA encoding human growth hormone-releasing factor. *Nature* **306**: 86-88, 1983.
- 43) Imai, T., Miyazaki, H., Hirose, S. *et al*: Cloning and sequence analysis of cDNA for human renin precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 7405-7409, 1983.
- 44) 村上和雄: レニン遺伝子. *医学のあゆみ* **129**: 926, 1984.
- 45) Ohkubo, H., Kageyama, R., Ujihara, M. *et al*: Cloning and sequence analysis of cDNA for rat angiotensinogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 2196-2200, 1983.
- 46) Tanaka, T., Ohkubo, H. and Nakanishi, S.: Common structural organization of the angiotensinogen and the  $\alpha_1$ -antitrypsin genes. *J. Biol. Chem.* **259**: 8063-8065, 1984.
- 47) Nawa, H., Kitamura, N., Hirose, T. *et al*: Primary structures of bovine liver low molecular weight kininogen precursors and their two mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 90-94, 1983.
- 48) Kitamura, N., Takagaki, Y., Furuto, S., *et al*: A single gene for bovine high molecular weight kininogens. *Nature* **305**: 545-549, 1983.
- 49) Oikawa, S., Imai, M., Ueno, A. *et al*: Cloning and sequence analysis of cDNA encoding a precursor for human atrial natriuretic factor. *Nature* **309**: 724-726, 1984.
- 50) Nakayama, K., Ohkubo, H., Hirose, T. *et al*: mRNA sequence for human cardiodilatin-atrial natriuretic factor precursor and regulation of prec-

- ursor mRNA in rat atria. *Nature* **310** : 609-611, 1984.
- 51) Jansen, M., van Schaik, F.M.A., Ricker, A.T. *et al*: Sequence of cDNA encoding human insulin-like growth factor I precursor. *Nature* **306** : 609-611, 1984.
- 52) Bell, G.I., Merryweather, J.P., Sanchez-Pescador, R. *et al*: Sequence of a cDNA clone encoding human preproinsulin-like growth factor II. *Nature* **310** : 775-777, 1984.
- 53) Ullrich, A., Gray, A., Berman, C. *et al*: Human  $\beta$ -nerve growth factor gene sequence highly homologous to that of mouse. *Nature* **303** : 821-825, 1983.
- 54) Scott, J., Selby, M., Urdea, M. *et al*: Isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the precursor of mouse nerve growth factor. *Nature* **302** : 538-540, 1983.
- 55) Scott, J., Urdea, M., Quiroga, M. *et al*: Structure of a mouse submaxillary messenger RNA encoding epidermal growth factor and seven related proteins. *Science* **221** : 236-240, 1983.
- 56) Gray, A., Dull, T.J. and Ullrich, A.: Nucleotide sequence of epidermal growth factor cDNA predicts a 128,000-molecular weight precursor. *Nature* **303** : 722-725, 1983.
- 57) Waterfield, M.D., Scrace, G.T., Whittle, N. *et al*: Platelet-derived growth factor is structurally related to the putative transforming protein p<sup>285</sup> of simian sarcoma virus. *Nature* **304** : 35-39, 1983.
- 58) Tsukada, T., Nakai, Y., Jingami, H. *et al*: Identification of the mRNA coding for the ACTH- $\beta$ -lipotropin precursor in a human ectopic ACTH-producing tumor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **98** : 535-540, 1981.
- 59) 中井義勝, 塚田俊彦, 田中一成・他: 異所性ホルモン産生腫瘍と遺伝子発現. *細胞工学* **2** : 1312-1320, 1983.
- 60) DeBold, C.R., Schworer, M.G., Connor, T.B. *et al*: Ectopic pro-opiomelanocortin: sequence of cDNA coding for  $\beta$ -melanocyte-stimulating hormone and  $\beta$ -Endorphin. *Science* **220** : 721-723, 1983.
- 61) Yamaji, T., Ishibashi, M. and Katayama, S.: Nature of the immunoreactive neurophysins in ectopic vasopressin-producing oat cell carcinomas of the lung. *J. Clin. Invest.* **68** : 388-398, 1981.
- 62) Wong, D.T.W., Hartigan, J.A. and Biswas, D.K.: Mechanism of induction of human chori-  
onic gonadotropin in lung tumor cells in culture. *J. Biol. Chem.* **259** : 10738-10744, 1984.
- 63) Simpson, E.L., Mundy, G.R., D'Souza, S.M. *et al*: Absence of parathyroid hormone messenger RNA in nonparathyroid tumors associated with hypercalcemia. *N. Eng. J. Med.* **309** : 325-330, 1983.
- 64) 内田 隆: ホルモン産生細胞のためのプロテインA・金コロイド法について. *細胞* **16** : 52-59, 1984.
- 65) Gee, C.E. and Roberts, J.L.: *In Situ* hybridization histochemistry: A technique for the study of gene expression in single cells. *DNA* **2** : 157-163, 1983.
- 66) Gee, C.E., Chen, C.-L.C. and Roberts, J.L.: Identification of proopiomelanocortin neurones in rat hypothalamus by *in situ* cDNA-mRNA hybridization. *Nature* **306** : 374-376, 1983.

### Summary

[*Jpn J Cancer Chemother* **12**(1) : 1-12, January, 1985.]

### ECTOPIC HORMONE PRODUCTION AND GENE EXPRESSION IN TUMORS

Shiro Saito, Katsuhiko Yoshimoto and Haruhiko Saito

*First Dept. of Internal Medicine, School of Medicine, The University of Tokushima*

Recent progress in research into ectopic hormone production and hormone gene expression in tumors is reviewed. Biochemical, immunochemical and morphological studies have shown that differentiation between "ectopic" and "eutopic" has become difficult and that the types of peptide hormones, neural peptides and growth factors produced, their molecular heterogeneities and ability of plural hormone production are greatly different in each tumor. Recently, the gene structures of many hormones and amino acid sequences of hormone precursors have been determined by genetic recombination techniques. However, the nature of hormone genes, the mechanism of gene expression and the processing mechanisms of hormone precursors in normal and tumor cells remain to be studied.