

膵胆道腫瘍の遺伝子・DNA 量分析

膵内分泌腫瘍の遺伝子異常*

吉本 勝彦¹⁾

要約：膵内分泌腫瘍の内、異所性ホルモン産生腫瘍として、「ガストリノーマ」および「GHRH 産生腫瘍」をとりあげた。ガストリン遺伝子の発現調節機構として、プロモーター部位に **negative element** が存在し、その部位に抑制因子が結合し、遺伝子発現を調節しているため、「ガストリノーマ」では、この抑制因子の発現が減少している可能性がある。一方 GHRH 産生機構に関しては、腫瘍における GHRH 遺伝子の再編成、増幅が認められないこと以外には、ほとんど明らかにされていないので、「GHRH 産生腫瘍」における発現調節機構は不明である。膵内分泌腫瘍の腫瘍化の遺伝子レベルの機構として、MEN 1 型に伴う腫瘍で原因遺伝子の存在する第 11 染色体の欠失が認められ、また一部の散発性の腫瘍でも同染色体に欠失が認められることより、少なくとも MEN 1 型の膵内分泌細胞の腫瘍化に、第 11 染色体での遺伝子変化が重要な役割を果たしていると考えられる。

Key words：異所性ホルモン産生膵内分泌腫瘍，MEN 1，第 11 染色体の欠失

はじめに

膵に発生する腫瘍のなかで、ホルモンを産生・分泌する腫瘍を、膵内分泌腫瘍と呼び、膵腫瘍の約 5% を占める。

ランゲルハンス島（ラ島）には、インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、膵ポリペプチド（PP）の産生細胞が確認されている。膵内分泌腫瘍ではこれらのホルモンの他に、ガストリン、vasoactive intestinal polypeptide (VIP)、副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）、カルシトニン、成長ホルモン放出ホルモン（GHRH）、コルチコトロピン放出ホルモン（CRH）、抗利尿ホルモン（ADH）、gastrin-releasing peptide (GRP)、peptide histidine methionine (PHM)、パンクレアスタチンなどの産生も報告されている。

本邦例での膵内分泌腫瘍の内訳¹⁾は、機能性が 83% と圧倒的に多く非機能性は 17% と少ない。機能性のうちではインスリノーマ 83%、ガストリノーマ 12%、グ

ルカゴノーマ 1%、WDHA 症候群 1% の順である。また臨床的に重要な点は、一部の症例が多発性内分泌腺腫瘍症 1 型（MEN 1 型）に属する場合があることである。膵内分泌腫瘍は MEN 1 型の主要な病変の一部であり、この場合には膵自体においても、多発性に腫瘍が発生する点に特徴がある。本邦では MEN 1 型症例の 63% に膵内分泌腫瘍が認められている²⁾。

本稿では、これらの膵内分泌腫瘍での遺伝子異常として、異所性ホルモン産生機構と膵内分泌腫瘍の腫瘍化機構について、これまでに分子レベルで明らかにされた知見について述べる。

I. 膵内分泌腫瘍における異所性ホルモン産生機構

異所性 ACTH 産生腫瘍のような異所性ホルモン産生腫瘍では、しばしば大分子型のペプチド、あるいは正常の内分泌組織では存在しない分子型のペプチドが産生されるため、正常のペプチドと異なるアミノ酸配列や遺伝子構造をもつことが期待されていた。しかし、これまで腫瘍からクローニングされたペプチドホルモン cDNA に基づいたアミノ酸配列は、すべて正常組織由来ペプチドのアミノ酸配列と同一であるため、現在

* Genetic Abnormalities in Endocrine Pancreatic Tumors

1) 徳島大学臨床分子栄養学（〒770 徳島市蔵本町 3-18-15）

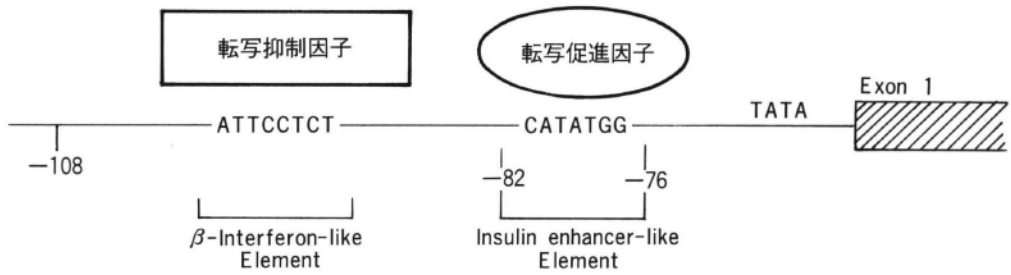


図 1 膵ラ島におけるヒトガストリン遺伝子発現調節

プロモーター領域に negative element と positive element が近接して位置している。negative element は β -interferon 遺伝子発現に対して負に作用する塩基配列に一致し、positive element はラットインスリン遺伝子のエンハンサーの塩基配列と類似している。

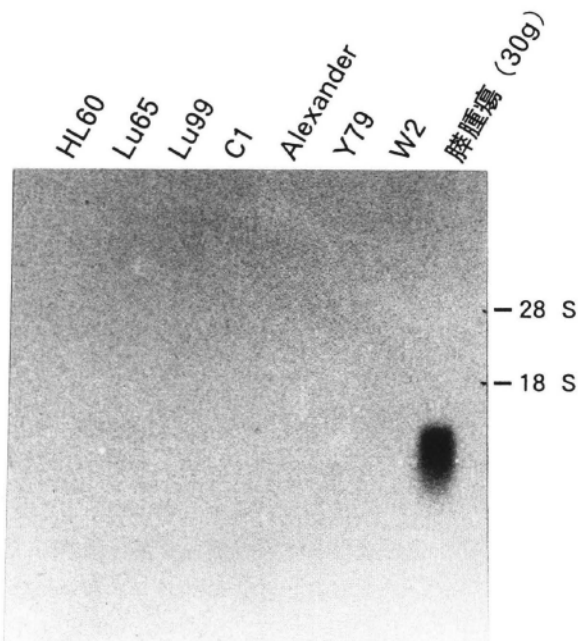


図 2 GHRH 産生膵腫瘍における GHRH 遺伝子の発現 (ノーザン・プロット分析)

HL 60: 前骨髄性白血病細胞, Lu 65, Lu 99: 肺巨細胞癌細胞, C1: 大腸癌細胞, Alexander: 肝細胞癌細胞, Y 79: 網膜芽細胞腫, W 2: Wilms 腫瘍細胞
プローブは GHRH cDNA を用いた。

ではプロセッシング酵素や糖鎖付加などによる翻訳以降の差異によるものとされている。

本稿では、本来膵ラ島では発現せず、膵内分泌細胞の腫瘍化に伴い発現するホルモンの代表としてガストリンおよび GHRH をとりあげ概説する。本来ガストリンは胃前庭部 G 細胞で、また GHRH は視床下部で発現しているホルモンであるが、膵内分泌腫瘍ではガストリンでは高頻度に、また GHRH では稀ながら、これらの異所性発現が存在する。

1. ガストリノーマ

膵島では、胎児期にガストリン遺伝子を発現しているが、肝におけるアルファフェトプロテインのように、

生後急速に発現がストップし、成人では発現がまったく認められなくなる。

従来ガストリノーマと正常胃粘膜とでは転写開始点が相違しているのではないかとの見解も示されていたが、Kariya ら³⁾の S₁ マッピングの成績により転写開始点は同一であることが示された。またガストリノーマ DNA のサザン・プロットにより、ガストリノーマではガストリン遺伝子 DNA の再編成が認められないことも報告されている。われわれも 1 例のガストリノーマでガストリン遺伝子の明らかな再編成および増幅がおこっていないことを明らかにした。つまりガストリノーマでは、正常の遺伝子発現機構に従ったまま、発現量が増加していることが示唆される。

ガストリン遺伝子の発現機構については、Brand らの一連の仕事がある。彼ら⁴⁾は、種々の長さのガストリン遺伝子 5' 上流部分にレポーター遺伝子 CAT を結合した組み換え DNA を作り、ラットインスリノーマ由来の RIN 細胞に導入、発現させたところ、-108 から -76 の部分に cis に遺伝子発現を調節する領域を見出した (図 1)。このうち抑制的に作用する -108 から -82 部分は β -インターフェロンプロモーターでの negative element に存在する ATTCCTCT の塩基配列を有する。しかもゲルシフトアッセイおよび DNase フットプリンティング法によりラ島細胞の核蛋白が結合することが確認されている。また negative element のすぐ下流にガストリン遺伝子の転写を促進する positive element (-82 CATATGG -76) が存在する。この配列はインスリン遺伝子のラ島特異的エンハンサー配列 (CATCTGG/C) と類似しており、この部位にはラットインスリン遺伝子のエンハンサーに結合する核蛋白と同じ蛋白が結合し、ガストリン遺伝子の転写を促進していることが明らかにされた。すなわち RIN 細胞はガストリン遺伝子の発現を促進する因子

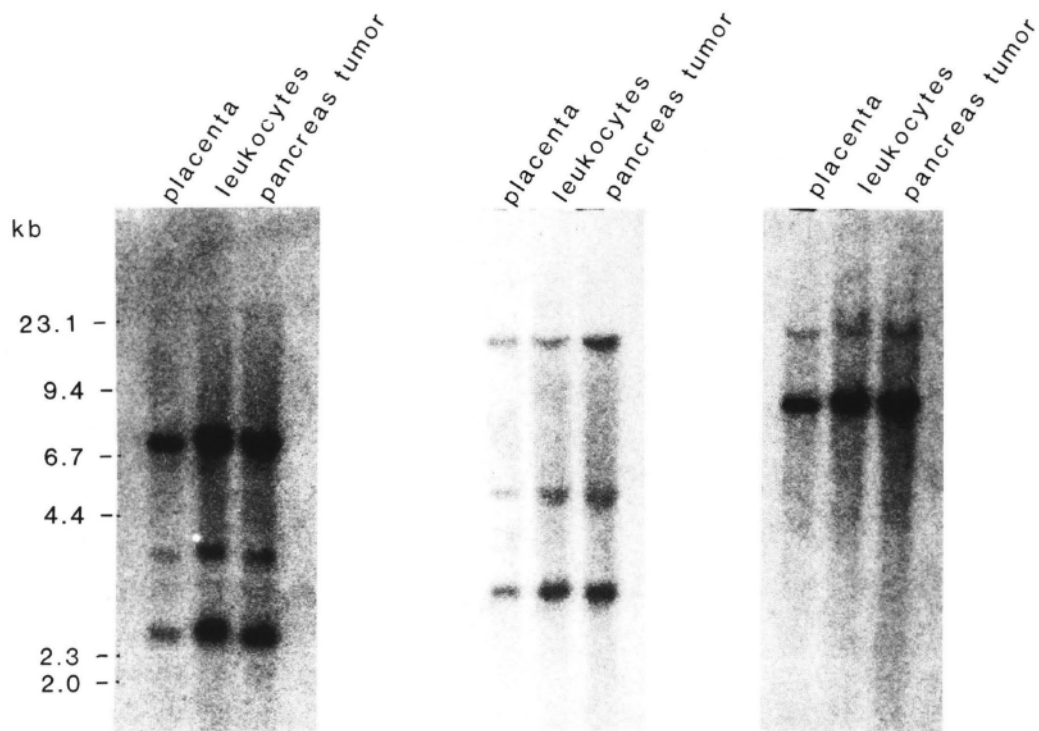


図3 GHRH 産生膵腫瘍における GHRH 遺伝子のサザン・プロット分析
膵腫瘍での GHRH 遺伝子のパターンは、胎盤および患者白血球と同一であり、明らかな遺伝子再編成や増幅は認められない。プローブは GHRH cDNA を用いた。

とともに、抑制する因子を有していることが示唆される。膵島細胞ではこの抑制因子が減少すると、ガストリン遺伝子発現がおきると考えられる。しかしながら、これらの転写因子の単離と、どのようなメカニズムでこの抑制因子が胎児期では減少し、生後再び増加するのか、そして腫瘍化に伴い減少するのかは、今後の研究に待たなければならない。

2. GHRH 産生腫瘍

視床下部ホルモンである GHRH を産生・分泌する腫瘍は、標的臓器である下垂体に GH を過剰産生する病変を形成し先端巨大症を惹起する。GHRH 産生腫瘍の発生部位のうち、膵は肺に次いで 2 番目に多いため、先端巨大症患者が膵腫瘍を有する場合、頻度は低いが、鑑別診断上重要となる。

われわれは MEN 1 に伴った GHRH 産生膵腫瘍を有する患者を経験した⁵⁾。この症例は 36 歳男性で、父と妹が MEN 1 型と診断されている。既往歴としては 31 歳時に副甲状腺摘出術をうけ、33 歳時に手足の肥大、血漿 GH 値高値、トルコ鞍拡大より先端巨大症と診断されている。その後腹部 CT にて膵尾部に腫瘍が発見され、血漿 GHRH 値が高値より異所性 GHRH 症候群と診断した。

膵腫瘍は 2 個 (30 g と 2 g) 発見され、組織学的に大きな腫瘍は渦巻状配列を示す紡錘形細胞と索状配列を示す円柱状細胞からなり、膵内分泌腫瘍として特異な像を示した。免疫組織学的では GHRH 陽性細胞が多数認められ、また免疫電顕にても腫瘍細胞内に

GHRH 陽性の分泌顆粒を認めた⁶⁾。本腫瘍より抽出した RNA について、GHRH cDNA をプローブとしてノーザン・プロット解析を行うと、視床下部 GHRH mRNA と同じ約 800 ヌクレオチドのサイズの GHRH mRNA が検出された (図 2)。小さな腫瘍は典型的な膵島細胞腫の所見を示し、グルカゴンと PP の陽性細胞が認められたが、GHRH 陽性細胞は検出されなかった。

異所性 GHRH 産生機構を明らかにする目的で、GHRH 産生腫瘍より抽出した DNA について GHRH 遺伝子の変化を、サザン・プロット法にて解析したが、明らかな再編成および増幅は認められず (図 3)、GHRH 遺伝子のプロモーター部分あるいは転写因子の異常が予想されている。

異所性ホルモン産生腫瘍の範疇にはあてはまらないが、最近 GHRH 遺伝子は胎盤にても発現していることが明らかにされ、その cDNA がラットより単離された⁷⁾。その結果、胎盤 GHRH ペプチドは視床下部 GHRH と同一であるが、胎盤と視床下部では、非翻訳領域のエクソン 1 が異なり、別々のプロモーターが使用されていることが明らかにされている。異所性 GHRH 産生腫瘍でもこのような可能性も考えられ、プロモーター部位の解析が必要である。

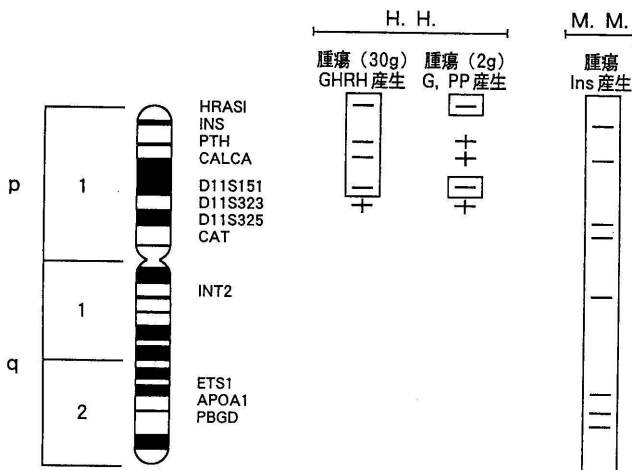


図4 MEN 1型症例の膵内分泌腫瘍での第11染色体における対立遺伝子の欠失
 +はヘテロ接合性が保たれていること, -はヘテロ接合性が消失していることを示す。

II. 膵内分泌細胞における遺伝子レベルでの腫瘍化機構

膵内分泌腫瘍における腫瘍化機構の研究は、主にMEN 1型における腫瘍化機構との関連ですすめられてきた。

1988年、Larssonら⁹⁾により、MEN 1型の原因遺伝子が連鎖分析により第11染色体長腕(11q12-q13)に位置すること、2人のMEN 1型患者での悪性インスリノーマやB細胞過形成において、ともに第11染色体上のRFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) を示すプローブを用いて遺伝子の欠失の指標となるヘテロ接合性の消失 (loss of heterozygosity, LOH) が第11染色体全体にわたって認められ、MEN 1型の原因遺伝子は網膜芽細胞腫と同様に腫瘍抑制遺伝子としての性格を有していることが示唆された。

われわれも上述した家族性のMEN 1型患者での2個の膵内分泌腫瘍において、第11染色体上の欠失を見出した⁹⁾。図4(症例H.H)に示すように30gの腫瘍では第11染色体上のマーカーを用いて検索したところ、HRAS1(11p15.5)からD11S151(11p13)にいたる広い範囲の欠失が、また2gの腫瘍ではHRAS1とD11S151に欠失が認められた。しかもHRAS1とD11S151座位で欠失を示したアレルは2つの腫瘍の両方に共通していた。一方原因遺伝子が存在するとされる第11染色体長腕(11q)で検討した4つの遺伝子座(PGA, 11q13; INT2, 11q13; APOA1, 11q23-q24; ETS1, 11q23.3)はこの症例

ではhomozygousであり、LOHの有無については情報が得られなかった。また他の染色体座(20染色体32遺伝子座)では30gの腫瘍でD9S1にて欠失を認めただけで、2個の腫瘍に共通した欠失部位は第11染色体短腕(11p)のみであった。また検討した19種の癌遺伝子では増幅や明らかな再編成を認めなかった。

またもう1例は家族歴の明らかでない31歳の女性で、副甲状腺摘出術をうけ、血漿プロラクチン高値に対して、プロモクリプチンの投与を受けているMEN 1型症例である。低血糖症状よりインスリノーマ症候群と診断し膵尾側切除術を施行した。10個の腺腫と多発性のラ島過形成(1mm大)が見出され、そのうちの1個の腫瘍(東京女子医科大学内分泌疾患総合医療センター藤本吉秀教授より提供)について第11染色体での各遺伝子座のLOHの有無について検討した。図4(症例M.M)に示すようにINS(11p15.5)からPBGD(11q23.2-qter)にいたる広範囲の領域で欠失を認めた。HRAS1およびD11S151座についてはhomozygousのため欠失の有無についての情報は得られなかった。これらの結果より本腫瘍では第11染色体全体の欠失が存在すると考えられた(未発表データ)。

その後、Tehら¹⁰⁾により家族性のMEN 1型患者に生じた無症候性の膵内分泌腫瘍においてMEN 1型の原因遺伝子座に近いINT2(11q13)での欠失を認め、この欠失したアレルは正常な母由来であること、またMEN 1型とは関連の認められない(散发性)のグルカゴノーマでも同様にINT2の欠失を認めた。

Rodfordら¹¹⁾は、MEN 1型症例で、同時に見出された膵尾部でのインスリノーマと膵頭部でのグルカゴノーマの2個の腫瘍とともにINT2およびHRAS1座位での欠失を認め、しかも2個の腫瘍ともに同じアレルが欠失していることを見出した。

Baleら¹²⁾は確実な家族性のMEN 1型の2症例での膵内分泌腫瘍(VIPoma, インスリノーマ)およびMEN 1型疑い例1例での悪性の無症候性ラ島腫瘍において11q13でのマーカー(D11S149, PGA, PYGM, D11S146, INT2)やINS(11p15.5), D11S29(11q23)での欠失を認め、いずれも第11染色体全体にわたっているが、散发性の膵内分泌腫瘍ではいずれも第11染色体の欠失は認められなかったと報告している。

Patelら¹³⁾は、散发性のインスリノーマ3例のうち、1例でD11S144(11q22.3-q23.3)で、またもう1例では第11染色体全体にわたるLOHを認めたと報告している。

これらの知見を総合すると、MEN 1型での膵内分

泌腫瘍では原因遺伝子座である 11q13 領域を含んで第 11 染色体全体にわたって欠失が多く認められることが明らかである。この結果は MEN 1 型の副甲状腺腫瘍¹⁴⁻¹⁶⁾や下垂体腫瘍¹⁷⁾においても 11q13 領域の欠失が認められることと一致し、同部位に MEN 1 型の発症に関係する腫瘍抑制遺伝子が存在することはほぼ確実であると考えられる。しかしわれわれの症例のように第 11 染色体短腕部位の欠失も高頻度で認められることより、11q13 以外に短腕部位にも MEN 1 型の発症に関連した別の腫瘍抑制遺伝子が存在する可能性が否定できない。また散発性の膵内分泌腫瘍でも、MEN 1 型の腫瘍と同様に第 11 染色体での LOH が存在することが明らかとなり、散発性の膵内分泌腫瘍の腫瘍化と、MEN 1 型で認められるような第 11 染色体での遺伝子変化が関連している可能性がある。

また MEN 1 型の膵内分泌腫瘍の病理学的特徴として、「多発性である点とともに過形成から腺腫、癌、カルチノイドにいたるまで組織型が多彩である点」があげられる。それぞれの組織型においてこのような悪性度を規定する遺伝子変化が存在するものと予想される。血管新生因子の新たな発現や腫瘍形成の後期に欠失、変異がおこるとされる p53 遺伝子もその候補の一つである。われわれは先にふれた MEN 1 型の 8 個の腫瘍と、散発性のインスリン- α およびガストリン- α 各 2 例について H-, K-, N-ras 遺伝子のコドン 12, 13, 61, GH 産生下垂体腺腫で変異が認められる Gs α 遺伝子のコドン 201, 227, 副腎皮質腫瘍および卵巣腫瘍で変異が認められる Gi 2 α 遺伝子のコドン 179 を含む領域を、また一般の腫瘍で高頻度に変異が認められ、癌抑制遺伝子とされる p53 遺伝子ではエクソン 5 から 10 部分を PCR で増幅後、Single-Strand Conformational Polymorphism 法にて分析した。これらの遺伝子については変異が検出されず、膵内分泌腫瘍の腫瘍化にこれらの遺伝子変異の関与は少ないことが示唆された¹⁸⁾。

む す び

膵内分泌腫瘍における異所性ホルモン産生機構と腫瘍化機構に関する現在までの知見を遺伝子異常の面から概説した。現在、遺伝子発現に関しては種々の転写促進、あるいは抑制因子が単離されており、異所性の

ホルモン遺伝子の発現機構の解明もそう遠くないと思われる。また腫瘍化に関しては、MEN 1 型の原因となる腫瘍抑制遺伝子の単離にむけて努力が続けられており、やがて原因遺伝子が単離され、その性質も明らかとなるものと考えられる。このような遺伝子変異は散発性の膵内分泌腫瘍の腫瘍化にも関連するものと思われ、今後の MEN 1 型の腫瘍化の分子機構に関する研究の進歩に期待がよせられる。

本稿を校閲して頂いた板倉光夫教授に感謝します。

参 考 分 献

- 1) 中村卓次, 笹野伸昭, 黒田 慧: 第 19 回日本消化器外科学会総会アンケート調査報告, 膵島細胞腫瘍, 259, 中村卓次監修, 医学図書出版, 1983.
- 2) 吉本勝彦, 斎藤史郎: 日本内分泌学会雑誌 **67**: 764, 1991.
- 3) Kariya Y, Kato K, Hayashizaki Y, et al.: *Gene* **50**: 345, 1986.
- 4) Wang TH, Brand SJ: *J Biol Chem* **265**: 8908, 1990.
- 5) Yamasaki R, Saito H, Sano T, et al.: *Endocrinol Jpn* **35**: 97, 1988.
- 6) Sano T, Yamasaki R, Saito H, et al.: *Am J Surg Pathol* **11**: 810, 1987.
- 7) Gonzalez-Crespo S, Boronat A: *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 8749, 1991.
- 8) Larsson C, Skogseid B, Oberg K, et al.: *Nature* **332**: 85, 1988.
- 9) Yoshimoto K, Iizuka M, Iwahana H, et al.: *Cancer Res* **49**: 2716, 1989.
- 10) Teh BT, Hayward NK, Wilkinson S, et al.: *Br J Cancer* **62**: 253, 1990.
- 11) Radford DM, Ashley SA, Wells Jr SA, et al.: *Cancer Res* **50**: 6529, 1990.
- 12) Bale AE, Norton JA, Wong EL, et al.: *Cancer Res* **51**: 1154, 1991.
- 13) Patel P, O'Rahilly SO, Buckle V, et al.: *J Clin Pathol* **43**: 377, 1990.
- 14) Thakker RV, Bouloux P, Wooding C, et al.: *N Engl J Med* **321**: 218, 1989.
- 15) Friedman E, Sakaguchi K, Bale AE, et al.: *N Engl J Med* **321**: 213, 1989.
- 16) Bystrom C, Larsson C, Blomberg C, et al.: *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 1968, 1990.
- 17) Yoshimoto K, Iwahana H, Kubo K, et al.: *Jpn J Cancer Res* **82**: 886, 1991.
- 18) Yoshimoto K, et al.: in preparation

* * *