

特集 膵内分泌腫瘍

1

総論

(4) 膵内分泌腫瘍の遺伝子異常

吉本 勝彦*

Key words: MEN 1, 癌遺伝子, 腫瘍抑制遺伝子, トランスジェニックマウス

要旨

膵内分泌細胞は多発性内分泌腫瘍症1型(MEN 1)の原因遺伝子の異常が初期に起こり、その後、複数の遺伝子異常が重なって腫瘍化すると考えられる。しかし癌遺伝子やp53遺伝子異常の頻度は少なく、また他の腫瘍抑制遺伝子の関与も明らかにされていない。今後、さらに悪性化および転移に関与する遺伝子についても明らかにする必要がある。

トランスジェニックマウスを用いた多段階腫瘍化機構の研究が進み、膵内分泌細胞の腫瘍化に関与する遺伝子の単離や血管新生抑制因子を用いた治療への応用が試みられている。

本稿では遺伝性を示す多発性内分泌腫瘍症1型(MEN 1型)あるいは孤発性の膵内分泌腫瘍における遺伝子異常とトランスジェニックマウスを用いて分子レベルで明らかにされた腫瘍化機構の知見について述べる。

I. MEN 1型における遺伝子異常

MEN 1型の腫瘍性病変は副甲状腺にもっとも多くみられ、膵と下垂体はほぼ同頻度である。日本で1966~1994年に報告されたMEN 1型症例143例のうち67%に膵内分泌腫瘍が認められた。

1988年、Larssonらにより、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、MEN 1型患者のインスリノーマにおいて、第11染色体上のrestriction fragment length polymorphism (RFLP)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ることが報告された¹⁾。この点より、MEN 1型の原因遺伝子は網膜芽細胞腫遺伝子(Rb)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

はじめに

内分泌腺には機能性あるいは非機能性の腫瘍性病変が、遺伝性あるいは非遺伝性(孤発性)に発生する。また内分泌腺の腫瘍性病変は過形成、腺腫、癌、カルチノイドと多彩で、一部の腫瘍では過形成から腺腫、癌への移行も考えられている。これらの点から内分泌腺は腫瘍化機構の解明の有力なモデルになりうると考えられる。

*徳島大学医学部臨床分子栄養学
(〒770 徳島市蔵本町3-18-15)

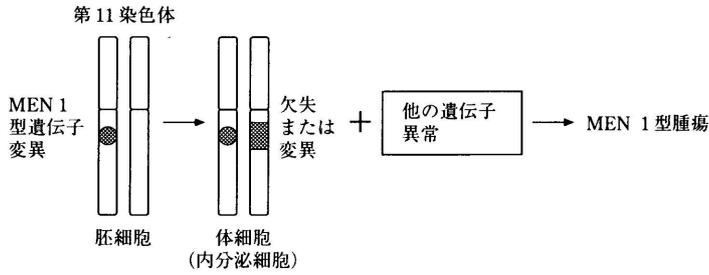


図 MEN 1 型における腫瘍発生機構

MEN 1 型である親より受け継いだ MEN 1 型原因遺伝子変異はすべての細胞に存在する。下垂体、副甲状腺、膵に、さらに健康な親から受け継いだ正常 MEN 1 型原因遺伝子に欠失や変異などの変化が生じると、MEN 1 型原因遺伝子産物の機能が消失し、これに他の遺伝子異常が加わって腫瘍化すると考えられる。

表 1 MEN 1 型膵内分泌腫瘍における第11染色体の LOH

座位(位置)	症例 1	症例 2		症例 3		症例 4	症例 5	症例 6			
		1	2	1	2			1	2	3	
HRAS1 (11p15)		LOH	LOH								
INS (11p15)	LOH										
PTH (11p15)		LOH	R								
CALCA1 (11p15)	LOH	LOH	R								
D11S151 (11p13)		LOH	LOH								
D11S325 (11p13)	LOH										
CAT (11p13)	LOH										
D11S480 (11q13)				LOH	LOH	LOH					
D11S457 (11q13)				LOH	LOH	nd					
PYGM (11q13)		LOH	LOH	ni	ni	ni	LOH	ni	ni	ni	
D11S449 (11q13)				LOH	LOH	LOH	LOH				
D11S1889 (11q13)				LOH	LOH	ni	ni				
D11S913 (11q13)				LOH	LOH	ni	LOH				
D11S987 (11q13)				ni	ni	LOH	R				
D11S146 (11q13)		LOH	nd								
INT2 (11q13)	LOH										
D11S534 (11q13)		LOH	R				ni	ni	ni	ni	
D11S527 (11q13)		LOH	R			LOH	R	LOH	LOH	LOH	
APOA1 (11q23)	LOH										
CD3D (11q23)	LOH	nd						ni	ni	ni	
PBGD (11q23)	LOH										
ETS1 (11q23)	LOH										

症例 1：インスリノーマ，症例 2-1：GHRH 産生腫瘍，症例 2-2：グルカゴン，PP 産生腫瘍，症例 3-1，3-2：インスリノーマ，症例 4：グルカゴノーマ，症例 5：PTHrP 産生腫瘍，症例 6-1，6-3：ソマトスタチン産生腫瘍，症例 6-2：ホルモン非産生腫瘍

LOH：ヘテロ接合性の消失，R：ヘテロ接合性の保持，ni：ホモ接合性のため情報が得られない，nd：未施行

示唆された。その後の研究により原因遺伝子は 11q13 の D11S1883(セントロメア側)から D11S449(テロメア側)までの約 2 Mb 内に存在することが明らかにされた²⁾。当初, Larsson らにより連鎖を示すマーカーとして指摘された PYGM もこの領域に含まれる。この領域に存在する種々の遺伝子が単離されているが, CAPN, FAU, FKBP2, PLCB3, ZMF1 などの遺伝子は MEN 1 型患者で変異が認められないことから, MEN 1 型原因遺伝子であることは否定されている。

下垂体, 副甲状腺, 膵内分泌腫瘍のいずれにも, MEN 1 型原因遺伝子が位置する第 11 染色体に LOH が認められることより³⁾⁻⁵⁾, これらの三つの内分泌腺の腫瘍化は, 腫瘍抑制遺伝子である MEN 1 型原因遺伝子の機能消失を共通の基盤として発生すると考えられる(図)。しかし MEN 1 型原因遺伝子のホモ接合性と考えられる変異を示す症例が報告された。ヘテロ接合体の変異と考えられる症例との間に差がないことから, MEN 1 型原因遺伝子の二つの対立遺伝子の変異のみでは腫瘍の発生と進展に不十分と考えられる。

表 1 にわれわれが第 11 染色体の LOH について解析した症例の結果を示す。症例 1 と 2 の一部は, RFLP マーカーを用いてサザン

法により解析した。症例 2 の一部と症例 3~6 は, DNA 自動シーケンサーにて蛍光を検出するマイクロサテライト法を用いて 11q13 のマーカーについて解析した。これまでの報告例では症例 1, 2-1 の腫瘍のように第 11 染色体全体にわたって LOH が認められる例が多いが, 症例 2-2 のように MEN 1 型原因遺伝子が位置する PYGM および 11p15 に位置する HRAS1 に LOH が認められるが, 他のマーカーではヘテロ接合性が保たれているなど複雑なパターンを示す腫瘍も存在する。

第 11 染色体の LOH に関するこれまでの報告例を集計して表 2 にまとめた。MEN 1 型腫瘍では 58% に LOH が報告されているが, 11q13 のマイクロサテライトマーカーを用いて詳細に検討すると頻度はさらに高まることが期待される。もちろん変異や微細な欠失, 挿入によって MEN 1 型原因遺伝子が不活化している場合には LOH として検出されない。ガストリノーマは, 他のホルモン産生腫瘍に比べて LOH を示す頻度は 19% と低い。ガストリノーマにおける MEN 1 型原因遺伝子の不活化が, 変異あるいは微細な欠失, 挿入によるのか否かは今後の課題である。表 3 に他の常染色体における LOH についての解析の集計結果を示す。第 11 染色体以外の染色体

用語解説

DNA 多型マーカー

DNA 多型マーカーとしては, ① 制限酵素切断部位の多型(RFLP), ② 20~30 塩基の単位配列が直列に繰り返して連なる配列の繰り返し回数の違いによる多型(variable number of tandem repeat; VNTR), ③ CA などのジヌクレオチド(dinucleotide)配列の繰り返し回数の多型(ジヌクレオチドリピートまたはマイクロサテラ

イト)が利用されている。これらの多型のなかでジヌクレオチドリピートはゲノム中に広く分布し, ヘテロ接合性を示す頻度も高いので, 最近では好んで用いられている。ジヌクレオチドリピートの検出では, 多型を示すジヌクレオチドリピートをはさむ, 適切なプライマーを設定して PCR にて繰り返し回数の多型を検出する方法がとられている。

表2 膵内分泌腫瘍における第11染色体のLOHの頻度

	MEN 1型腫瘍	孤発性腫瘍
ガストリノーマ	4/21	8/28
インスリノーマ	7/8	3/8
グルカゴノーマ	3/3	1/1
VIP産生腫瘍	1/1	2/2
ホルモン非産生腫瘍	8/8	nd
その他	2/2	2/4

数字は“LOHを示した腫瘍数/情報が得られた腫瘍数”を示す。nd;未施行

Larsson, C., et al.: Nature 332; 85-87, 1988
 Yoshimoto, K., et al.: Cancer Res. 49; 2716-2721, 1989
 Patel, P., et al.: J. Clin. Pathol. 43; 377-378, 1990
 Radford, D. M., et al.: Cancer Res. 50; 6529-6533, 1990
 Bale, A. E., et al.: Cancer Res. 51; 1154-1157, 1991
 Ding, S. F., et al.: Br. J. Cancer 65; 809-812, 1992
 Iwamura, Y., et al.: Jpn. J. Clin. Oncol. 22; 6-9, 1992
 Sawicki, M. P., et al.: Hum. Genet. 89, 445-449, 1992
 Eubanks, P. J., et al.: Am. J. Surg. 167; 180-185, 1994
 Beckers, A., et al.: J. Clin. Endocrinol. Metab. 79; 1498-1502, 1994
 Pang, J. T., et al.: Hum. Genet. 97; 732-741, 1996

について解析された腫瘍はきわめて少ない。第2, 第3の腫瘍抑制遺伝子の関与を示唆する遺伝子異常については明らかでなく, 今後の検討課題である。

II. 孤発性内分泌腫瘍における

遺伝子異常

MEN 1型原因遺伝子が位置する第11染色体のLOHは, 孤発性の副甲状腺腫瘍および下垂体腫瘍において20~30%の頻度で認められる。孤発性の膵内分泌腫瘍に関しても解析が行われ, 報告例を集計すると37%にLOHが認められ, MEN 1型原因遺伝子異常の関与が示唆される(表2)。孤発性腫瘍では, 体細胞レベルで変異あるいは欠失などの異常がMEN 1型原因遺伝子の両方の対立遺伝子に生じて腫瘍化に関与するものと考えられる

表3 全常染色体におけるLOHの解析

染色体	MEN 1型腫瘍	孤発性腫瘍
1	0/7	2/4
2	0/7	nd
3	1/5	0/5
4	nd	0/5
5	1/4	0/2
6	0/5	nd
7	0/5	1/5
8	0/5	nd
9	2/7	nd
10	0/5	nd
11	25/43	16/43
12	0/7	nd
13	0/10	2/11
14	nd	nd
15	0/5	nd
16	1/2	1/4
17	0/2	0/10
18	0/2	0/1
19	0/5	nd
20	0/4	nd
21	nd	nd
22	0/4	nd

数字は“LOHを示した腫瘍数/情報が得られた腫瘍数”を示す。nd;未施行
 文献は表2と重複

(図)。他の常染色体部位の異常に関しては解析が十分に行われていない(表3)。最近, マサチューセッツ総合病院のChungらは, 第3染色体短腕25(3p25)において高頻度にLOHを認めた(Chung, D. C., et al.: J. Clin. Invest., in press)。まれに膵内分泌腫瘍を伴うvon Hippel-Lindau症候群の3p25-p26に位置する原因遺伝子には変異を認めなかった。さらにこの部位のLOHと悪性度の関連が認められることを明らかにしている。

成長ホルモン産生下垂体腺腫で変異が認められるGsa遺伝子や卵巣腫瘍で変異が認められるGi2α遺伝子の変異は認められない。またras遺伝子の変異も膵癌では高頻度に認め

表4 膵内分泌腫瘍における ras, Gs α , Gi2 α , p53 遺伝子変異

ras	6/71 (4例 悪性インスリノーマ, 2例 良性インスリノーマ)
Gs α	0/30
Gi2 α	0/6
p53	1/22 (1例 ガストリノーマ)

Yoshimoto, K., et al. : Cancer Res. 49 ; 2716-2721, 1989
 Tada, M., et al. : Cancer 66 ; 930-935, 1990
 Yoshimoto, K., et al. : Cancer Res. 52 ; 5061-5064, 1992
 Yoshimoto, K., et al. : Jpn. J. Cancer Res. 83 ; 1057-1062, 1992
 Yoshimoto, K., et al. : Cancer 74 ; 1386-1393, 1993
 Yashiro, T., et al. : Surgery 114 ; 758-764, 1993
 Vessey, S. J. R., et al. : Clin. Sci. 87 ; 493-497, 1994
 Evers, B. M., et al. : Ann. Surg. 219 ; 596-604, 1994
 Boothroyd, C. V., et al. : Biochem. Biophys. Res. Commun. 211 ; 1063-1070, 1995
 Pavelić, K., et al. : Anticancer Res. 16 ; 1707-1718, 1996
 Sakurai, A., et al. : J. Clin. Endocrinol. Metab. 81 ; 2394-2396, 1996

られるが、膵内分泌腫瘍では多数例の解析にもかかわらず変異の報告はなかった。最近、Pavelićらは悪性インスリノーマの4/6に、また良性インスリノーマの2/8にK-ras 遺伝子の変異を報告している(Pavelić, K., et al. : Anticancer Res. 16 ; 1707-1718, 1996)。また、ミスマッチ修復系の異常を示唆するマイクロサテライト不安定を有する腫瘍の報告は認められない(表4)。

Rb 遺伝子の一方の対立遺伝子を破壊された状態(Rb+/-)と p53 遺伝子の一方の対立遺伝子を破壊された状態(p53+/-)を有するマウスでは6~14%に、またRb+/-と p53 遺伝子の両方の対立遺伝子を破壊された状態(p53-/-)を有するマウスでは7~23%に膵内分泌腫瘍が発生することが明らかにされている^{6),7)}。しかしRb+/-, p53+/-, p53-/-の状態では膵内分泌腫瘍は発生しない。ヒト膵内分泌腫瘍においては、p53 遺伝子の変異は5%と低頻度であり、Rb 遺伝子が存在する第13染色体長腕14(13q14)のLOHも認められないことから(Chung, D. C., et al. : Clin. Endocrinol., in press), これらの遺伝子変異

の関与は少ないものと考えられる。

III. トランスジェニックマウスを用いた腫瘍化機構の解析

Hanahanらは、ラットインスリンプロモーター下にSV40 T抗原を結合させたハイブリッド遺伝子を導入したトランスジェニックマウス(RIP1-Tag2)を用いて、インスリノーマにおける多段階腫瘍化機構の解析を進め、その結果を治療への応用に試みようとしている。

T抗原蛋白はRb蛋白に結合して不活化することにより腫瘍化活性を有すると考えられている。このマウスではインスリン遺伝子発現が認められる胎生9日からT抗原は発現しており、成体に達してもすべての膵ランゲルハンス島(膵ラ島)B細胞で発現が認められる。3~5週で約400個の膵ラ島のうち50~75%の膵ラ島で過形成が生じ(hyperplastic islet), その際、insulin-like growth factor 2 (IGF 2)の発現が認められるようになる。5週には過形成を示す膵ラ島B細胞の一部に血管新生を示す部分が出現する(early angiogenic is-

let). 9週までには膵ラ島の約10%で血管新生を示すようになる(angiogenic islet). 最終的には12週から腫瘍が出現し, 1~2%の膵ラ島が腫瘍を形成する. すべてのマウスは低血糖のため14~15週で死亡する. このようにT抗原の発現は腫瘍化には必須であるが, 腫瘍形成には不十分であり, 他の遺伝子変化の関与が必要であることを示唆している.

このうちIGF2の関与に関しては, RIP1-Tag2とIGF2ノックアウトマウスとの交配により検討された. もっとも明らかな変化として顕著な腫瘍サイズの減少が認められた. IGF2遺伝子を欠くマウスの腫瘍はIGF2遺伝子を保持しているマウスの腫瘍に比較して, 同程度の分裂係数を示すが, 約5倍アポトーシスが促進されていた. この結果よりIGF2は増殖作用より, むしろ生存因子として作用していることが示唆された.

さらにマイクロサテライト解析により, 腫瘍におけるマウス第9染色体および第16染色体のLOHが明らかにされた⁸⁾. 第16染色体のLOHはangiogenic isletで認められ, その頻度は最終的な腫瘍でも差が認められないことから, この部位には血管新生抑制因子が存在する可能性が示唆される. 第9染色体のLOHの頻度はangiogenic islet(5%)から最終的な腫瘍(18%)への過程で増加することから, この部位にはangiogenic isletから最終的な腫瘍への進展に関与する遺伝子(たとえばアポトーシスやテロメラーゼ活性を調節する遺伝子など)が存在することを示唆している. この部位はヒトにおいては第3染色体長腕および第15染色体長腕に相当する.

治療への応用として, このトランスジェニックマウスに血管新生抑制物質を投与すると, 腫瘍発生自体には変化は認められないが, 腫瘍の体積がコントロールの約11%に減少する

ことが明らかにされた⁹⁾. 血管新生抑制物質投与群とコントロール群間で腫瘍細胞の増殖係数には変化は認められないが, 血管新生抑制物質投与群ではアポトーシス係数が2倍高く認められた. この結果はde novoでの腫瘍の進展が血管新生抑制物質投与によって抑制されうることを示している.

おわりに

従来, インスリン遺伝子の転写因子の範疇に属していたPDX1やISL1が, ノックアウトマウスの解析により, 膵ラ島の形態形成に重要な役割を果たしていることが明らかにされた. 今後とも, 発生工学的手法を用いた研究が, 膵内分泌細胞の腫瘍化機構の解明にも重要な情報を提供する可能性が高いと考えられる.

追記: 最近, MEN 1型原因遺伝子が単離された(Chandrasekharappa, S. C., et al.: Science 276; 404-407, 1997).

文 献

- 1) Larsson, C., Skogseid, B., Oberg, K., et al.: Multiple endocrine neoplasia type 1 gene maps to chromosome 11 and is lost in insulinoma. Nature 332; 85-87, 1988
- 2) Courseaux, A., Grosgeorge, J., Gaudray, P., et al.: Definition of the minimal MEN 1 candidate area based on a 5-Mb integrated map of proximal 11q13. Genomics 37; 354-365, 1996
- 3) Yoshimoto, K., Iizuka, M., Iwahana, H., et al.: Loss of the same allele of HRAS1 and D11-S151 in two independent pancreatic cancers from a patient with multiple endocrine neoplasia type 1. Cancer Res. 49; 2715-2721, 1989
- 4) Yoshimoto, K., Iwahana, H., Kubo, K., et al.: Allele loss on chromosome 11 in a pituitary tumor from a patient with multiple endocrine

- neoplasia type 1. *Jpn. J. Cancer Res.* 82;886-889, 1991
- 5) Shintani, Y., Yoshimoto, K., Horie, H., et al. : Two different pituitary adenomas in a patient with multiple endocrine neoplasia type 1 associated with growth hormone-releasing hormone-producing pancreatic tumor : Clinical and genetic features. *Endocrine J.* 42 ; 517-525, 1995
 - 6) Williams, B. O., Remington, L., Albert, D. M., et al. : Cooperative tumorigenesis effects of germline mutations in Rb and p53. *Nature Genet.* 7 ; 480-484, 1994
 - 7) Harvey, M. H., Vogel, H., Lee, E. Y-H. P., et al. : Mice deficient in both p53 and rb develop tumors primarily of endocrine origin. *Cancer Res.* 55 ; 1146-1151, 1995
 - 8) Parangi, S., Dietrich, W., Christofori, G., et al. : Tumor suppressor loci on mouse chromosome 9 and 16 are lost at distinct stages of tumorigenesis in a transgenic model of islet cell carcinoma. *Cancer Res.* 55 ; 6071-6076, 1995
 - 9) Parangi, S., O'Reilly, M., Christofori, G., et al. : Antiangiogenic therapy of transgenic mice impairs de novo tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 ; 2006-2007, 1996

Summary

Genetic Changes in Pancreatic Endocrine Tumors

Katsuhiko Yoshimoto*

Delineation of the genetic events correlating with

neoplastic transformation of pancreatic endocrine cells is at an early stage. Nevertheless, the high frequency of allelic loss on chromosome 11q in pancreatic endocrine tumors suggests that inactivation of the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN 1) gene may be an essential step. In contrast to many other tumors, the frequency of activation of oncogenes such as ras, Gs α , and Gi2 α or inactivation of the p53 gene is low. Because multiple mutations, which accumulate over time, are required to confer a neoplastic phenotype upon a cell, a global search of the genome for allelic loss in human pancreatic endocrine tumors is necessary. A transgenic mouse model demonstrated the feasibility of analyzing the temporal appearance of genetic changes during multistage tumorigenesis. The appearance of allelic loss of mouse chromosome 9 in insulinomas may contribute to the progression from the angiogenic stage to a solid tumor. Nascent tumors can be significantly impaired solely by applying angiogenesis inhibitors. The transgenic mouse models of de novo tumor progression are anticipated to provide more information concerning the mechanisms of tumorigenesis.

Key words : MEN 1, oncogenes, tumor suppressor genes, transgenic mice

*Otsuka Department of Clinical and Molecular Nutrition, School of Medicine, The University of Tokushima, Kuramoto-cho, Tokushima 770, Japan