

## 論文の内容の要旨

論文題目 ヒト下垂体腺腫の腫瘍発生機構について

指導教官 藤田 敏郎 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成12年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 盛田 幸司

### 要旨

下垂体前葉細胞は、下垂体前葉ホルモンの分泌や細胞増殖について、視床下部から分泌される視床下部ホルモンによって正および負の調節を受けている。ヒト下垂体 GH 産生細胞では、視床下部ホルモンである GHRH の受容体への結合・刺激に続く PKA の活性化が、非選択的陽イオン電流を活性化し、細胞膜を脱分極させることで電位依存性カルシウム電流を活性化し、また電位依存性カルシウム電流を直接増加させることで GH 分泌に作用する。GH 産生下垂体腺腫の病因のひとつである *gsp* 変異では、GHRH 受容体と共役する  $G_s\alpha$  蛋白が持続的に活性化して下流の PKA の持続的活性化を引き起こす。そのような GH 産生下垂体腺腫細胞では、非選択性陽イオン電流が持続的に活性化されており、GH の過剰分泌の原因となっている。

症例数を 32 例まで増やし、*gsp* 変異の有無と GHRH に対する非選択性陽イオン電流の反応性の関係を検討していく中で、ふたつの事実に着目した。ひとつは、本邦における GH 産生腺腫症例中の *gsp* 変異の頻度が、これまでの報告より高いことである。本邦では欧米の 40% 程度の頻度に比べ、10% 以下と低い頻度が報告されていたが、我々の手で 32 例を検討したところ、実に 20 例で *gsp* 変異が陽性であった。もうひとつは、*gsp* 変異陰性の腺腫（12 例）でも非選択性陽イオン電流が持続的に活性化している症例が 8 例認められたことである。以上のことから、本邦の *gsp* 変異の頻度についてさらに症例数を増やし検討を行うとともに、*gsp* 変異以外に GHRH シグナル伝達系を持続

的に活性化するような病因の有無について検討を行った。

本邦 2 施設の脳神経外科学教室で経蝶形骨洞的に手術され、病理学的に確定診断がなされている GH 産生下垂体腺腫 76 症例について、*gsp* 変異を検討した。摘出された腫瘍検体を初代培養し、messenger RNA を抽出、RT-PCR・直接塩基配列決定法を用い、*gsp* 変異の有無を検索した。このうち 20 例では凍結検体から genomic DNA を抽出し、こちらからも PCR・直接塩基配列決定法で検索し、messenger RNA からの結果と同一であることを確認した。その結果 76 例中 39 例に *gsp* 変異を認め、その頻度は約 51.3 % であった (95 % 信頼区間 : 40~63 %)。本邦でも欧米と同等に、*gsp* 変異が高頻度に認められることが明らかとなった。*Gsp* 変異の有無による臨床的特徴の差を検討したところ、*gsp* 陽性群で GHRH 負荷に対する反応が弱く、TRH や LHRH 負荷に対する奇異性反応の陽性率が高く、ブロモクリプチンでより強く抑制される傾向を認めた。

次に、*gsp* 変異以外に GHRH シグナル伝達系を持続的に活性化する病因として、GHRH 受容体活性化変異の可能性を考え、検討を行った。*Gsp* 変異陰性にもかかわらず非選択性陽イオン電流が持続的に活性化していた 8 例について、cDNA を元に GHRH 受容体翻訳領域の塩基配列を調べたところ、3 例に 2 種類の点突然変異 (Ala57Thr と Val225Ile) の変異が同一個人にヘテロ接合性に共存) が同定された。

この変異の病因的意義を明らかにする目的で、協力の得られた上記 3 例中 2 例について、末梢血の genomic DNA についても PCR、直接塩基配列決定法を行い、同変異が存在するか確認した。また対照として健常者 51 名について、末梢血 genomic DNA から PCR、SSCP 及び restriction analysis を行い、同変異の有無を検索した。上記変異以外にも GHRH 受容体遺伝子変異が存在しないか確認するため、症例を増やし合計 32 例の GH 産生下垂体腺腫について、腫瘍由来の cDNA から同受容体翻訳領域の PCR、直接塩基配列決定法を用い、解析を行った。その結果上記 2 種の変異は症例の末梢血 genomic DNA からも確認され、健常者 51 名中 3 名にも認められた。このことから、この変異は胚細胞由来であり、その頻度から疾患感受性にも影響しない遺伝子多型であると判明した。また 32 例の GH 産生腺腫について解析したが、1 例を除き GHRH 受容体遺伝子変異は同定されず、GHRH 受容体変異は本疾患の主要な病因ではないことが判明した。

*Gsp* 変異、GHRH 受容体活性化変異以外に、GHRH シグナル伝達系を持続的に活性化させる可能性のある遺伝子変異の候補として、GH 産生下垂体腺腫を部分症に持つ Carney complex の一部に認められる PRKAR1A 遺伝子変異がある。これは PKA の活性を制御する Protein kinase A regulatory subunit 1 $\alpha$  をコードする遺伝子の変異である。この変異及び対立遺伝子の LOH によりこの蛋白の機能が失われると、GHRH シグナル伝達系にあたる PKA の活性が、持続的に活性化されることが予想される。

このことを確認するため、本邦で Carney complex と診断され、GH 産生下垂体腺腫の摘出手術を受けた 40 歳男性 (当時) の症例について、末梢血の PRKAR1A 遺伝子解

析及び GH 産生腺腫細胞の電気生理学的検討を行った。遺伝子解析では、PRKAR1A 遺伝子の exon 2 に新規のフレームシフト変異 (227delT) を認め、その 81 コドン下流に終止コドンを生じるものであった。本腫瘍細胞の電気生理学的検討では、GHRH の添加や PKA 阻害薬を用いた実験により、*gsp* 変異陽性の腫瘍の場合と同様に、非選択性陽イオン電流の持続的活性化が確認された。この腫瘍は *gsp* 変異を有していないことが確認されており、PRKAR1A 遺伝子変異も *gsp* 変異と同様に、GHRH シグナル伝達系を持続的に活性化していることが明らかとなった。一方、その後の検討や他施設からの報告では、GH 産生腫瘍を含む散発性下垂体腺腫で本遺伝子変異は確認されず、散発性での主要な病因ではないと思われた。

以上のように、*gsp* 変異以外の GH 産生下垂体腺腫の病因についてはまだ解明されていない。GH 産生腺腫以外の下垂体腺腫についてはそのほとんどの病因が未解明であった。最近になって下垂体腺腫の約 40%に、正常下垂体には存在しない fibroblast growth factor 受容体 subtype 4 (FGFR4) の N-terminally truncated isoform (pituitary tumor derived FGFR4 : ptd-FGFR4) が発現しており、下垂体 PRL 産生細胞特異的に ptd-FGFR4 を発現させたトランスジェニックマウスでは、PRL 産生下垂体腺腫が生じることが報告された。このことから、*gsp* 変異陰性の GH 産生下垂体腺腫や、GH 産生腺腫以外の下垂体腺腫で ptd-FGFR4 が病因となっている可能性も推測されたが、その頻度や腫瘍発生機構の多くは不明であり、病因的意義についての評価は定まっていない。

そこで本邦の 109 例の下垂体腺腫について、腫瘍組織から RT-PCR により ptd-FGFR4 の発現頻度を解析した。臨床的データが得られたものについては、ptd-FGFR4 の有無と腫瘍サイズ、海綿静脈洞への浸潤との関係について検討した。GH 産生腺腫については、ptd-FGFR4 の有無と既知の病因である *gsp* 変異との関係も検討した。また、ptd-FGFR4 陽性及び陰性の GH 産生腺腫について、FGF 受容体シグナル伝達系の下流にあたる PI3 kinase の阻害薬を添加した場合の電気生理学的な変動を比較し、ptd-FGFR4 の有無による特性の差異を検討した。その結果、109 例中 48 例 (約 44%) で ptd-FGFR4 の messenger RNA 発現を認めた (GH 産生腺腫 46 例中 20 例、PRL 産生腺腫 14 例中 3 例、ACTH 産生腺腫 8 例中 2 例、TSH 産生腺腫 6 例中 1 例、FSH 産生腺腫 3 例中 1 例、非機能性腺腫 32 例中 21 例)。GH 産生腺腫では、ptd-FGFR4 発現と *gsp* 変異の有無に関連はなかった。臨床的データの解析では、ptd-FGFR4 陽性例の方が陰性例に比べ、腫瘍サイズの大きいもの、浸潤を有するものが多い傾向を認めた。また電気生理学的検討では、ptd-FGFR4 陽性細胞では PI3 kinase の阻害薬により膜電流の減少を認め、ptd-FGFR4 により PI3 kinase が持続的に活性化している可能性を示唆する結果が得られた。以上より、ptd-FGFR4 は、FGF 受容体シグナル伝達系の持続的活性化により細胞増殖に影響し、病因的意義を有している可能性が示唆された。