

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591168

研究課題名（和文）SDHBを指標とした悪性褐色細胞腫の遺伝子診断の確立と悪性化機序の基礎研究

研究課題名（英文）Research of SDHB as Malignant marker and oncogenesis in malignant pheochromocytomas

研究代表者

竹越 一博（TAKEKOSHI KAZUHIRO）

筑波大学・医療医学系・准教授

研究者番号：40261804

研究成果の概要（和文）：SDHBを主とする褐色細胞腫の遺伝子解析を行った。結果、10例のSDHB陽性悪性例を同定し得た。TMEM127の変異による褐色細胞腫について、新たな検出系を立ち上げた。結果、本邦の異なる地域からの両側副腎性褐色細胞腫2症例で、新規なかつ同一のTMEM127の変異(c.116\_119delTGTC, p. Ile41ArgfsX39)を同定した。悪性褐色細胞腫の治療薬として有効と報告されているSunitinibは、血管新生のみならず腫瘍細胞にも直接作用が想定された。

研究成果の概要（英文）：In Japanese malignant pheochromocytoma patients, we detected SDHB mutation in 10 cases, including large deletion. Also, we detected germline TMEM127 mutation (c.116\_119delTGTC, p. Ile41ArgfsX39) associated with 2q deletion loss of heterozygosity with bilateral adrenal pheochromocytoma. We have, for the first time, introduced the hypothesis that the antitumor effect of sunitinib observed in malignant pheochromocytomas seems to be associated with direct effects on tumor cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：内分泌学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：悪性褐色細胞腫・SDHB・TMEM127

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 今世紀に入り、以下の3点が見出され、遺伝性褐色細胞腫という概念が確立した。①近年のSDHBおよびSDHDの発見、②臨床的に

散発性でも潜在的な遺伝性である可能性があること、③悪性化と関係する遺伝子(SDHB)が判明した事。一方、日本における遺伝子解析研究は欧米に比して大変に遅れている。

(2) TMEM127はmTORの活性を負に制御してい

るタンパクをコードしている遺伝子である。最近その変異が褐色細胞腫において同定された。発症機序は、*TMEM127* が癌抑制遺伝子として働くと考えられる。臨床的な特徴としては、年齢が 45 歳前後と比較的高齢、両側副腎性が多い、家族歴は約半数で認め、悪性化は少ない等が挙げられる。ただし日本人のデータは不明である。

(3) Sunitinib は、複数の受容体型チロシンキナーゼに対する阻害薬であり、特に内皮細胞の VEGF 受容体を阻害することで、偽低酸素状態における HIF から VEGF 活性化にいたる経路を阻害することで効果を発揮するとされる。最近、悪性褐色細胞腫治療に有効性が報告されている (JCEM. 2009 ;94:386-91、JCEM. 2009;94:5-9)。一方、その機序の詳細は不明である。今回、血管新生のみならず腫瘍細胞自身にも抗腫瘍効果を発揮する可能性も考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、日本における *SDHB* 遺伝子をはじめとする種々の新規に同定された遺伝子解析の実施体制の整備 (筑波大学での集中解析体制の確立) とそれに伴う臨床的評価の確立を目標とする。同時に悪性化機序解明、新規悪性マーカーの同定および治療法 (分子標的薬の作用機序) の確立を目的とする基礎的研究の推進である。

## 3. 研究の方法

(1) 検体 (血液) より DNA 抽出を行った。*SDHB* のエクソンを増幅し、シーケンス解析を行った。シーケンス解析で変異陰性例では、大欠失を検出する目的で MLPA 法を追加した。

(2) 既に *SDHB*, *SDHD*, *RET*, *VHL* 遺伝子変異陰性だった本邦 74 例を対象に *TMEM127* の検索

を行った。

(3) ラット褐色細胞腫由来の培養細胞 PC12 を用いた。リン酸化とタンパク測定は Western blot。細胞増殖は MTT アッセイ、アポトーシスは DNA の断片化をそれぞれのキットで測定した。

## 4. 研究成果

(1) 合計 26 例の悪性褐色細胞腫で SDHB の検索を行った結果、腹部のパラガングリオーマが初発であった 14 例中 8 例で変異を同定 (8/14 : 8 例中大欠失 1 例を含む)。一方、副腎初発例は 12 例中 2 例で変異を同定 (2/12)。本邦においても SDHB 変異陽性悪性褐色細胞腫は腹部のパラガングリオーマを初発とする場合が多い。変異同定例のうち 1 例は、直接シーケンス変異陰性例に、multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA) 法により SDHB 遺伝子の欠失を同定した。今後、このような症例の蓄積を通じて、SDHB を指標とする悪性化の早期診断に貢献したい。ところで発表者らは、日本国内での褐色細胞腫・パラガングリオーマの遺伝的背景を研究している。HPPS も遺伝子診断に基づく個別医療への進展が期待できる。適切な遺伝子診断の必要性の啓発は非常に重要である。

(2) 本邦の異なる地域からの両側副腎性褐色細胞腫 2 症例で、同一な *TMEM127* の変異 (c.116\_119delTGTC, p.I1e41ArgfsX39) を同定した。また、2 症例の腫瘍組織を用いてフラグメント解析により、それぞれ第 2 染色体長腕の LOH を証明した。114 例の健常日本人を high-resolution melting curve analysis (hrMCA) 法でスクリーニングしたが、本変異は認められなかった。頻度は両側性の 25% (2/8)、全体の 2.7% (2/74) であった。同定し

た変異は4塩基の欠失によるフレームシフトで停止コドンが入る。本変異は既にブラジルの家系で報告されている。今回、それぞれの腫瘍組織でLOHを2qにわたりフラグメント解析で証明した。さらにコントロールの健康な日本人には本変異は認めず多型は否定できた。以上より、*TMEM127*はガン抑制性遺伝子として働き、本変異は病因であると考えられた。頻度や臨床的な特徴も先行報告とほぼ一致した。本邦（のみならずアジア）における初めての*TMEM127*の変異による症例報告である。

(3) PC12細胞においてSunitinibは1) アポトーシス促進と抗増殖作用を示した。2) Akt、BADそれぞれのリン酸化の減少が見られた。3) Bcl-2、Bcl-xLタンパクの減少が見られた。3) mTORおよび下流のS6Kのそれぞれのリン酸化が抑制された。4) HIF- $\alpha$ には影響を認めなかった。5) VEGF2型受容体のsiRNAによるノックダウンにより、Sunitinibによるアポトーシスが抑制された。SunitinibによるBclファミリーの挙動、すなわち抗アポトーシス因子であるBcl-2、Bcl-xLの減少とアポトーシス促進因子BADの活性化（リン酸化の減少）は、アポトーシス促進と合致した。この作用はVEGF2型受容体/Akt/mTOR系およびその下流のS6Kの抑制を介しており、HIFは含まれないことが示唆された。悪性褐色細胞腫の治療時、Sunitinibは血管新生のみならず腫瘍細胞にも作用点が想定される。

##### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

1) Takeichi N, Midorikawa S, Watanabe A, Naing BT, Tamura H, Kano T, Sugihara H,

Nissato S, Saito Y, Aita Y, Ishii KA, Igarashi T, Kawakami Y, Hara H, Ikeda T, Shimizu K, Suzuki S, Shimano H, Kawamoto M, Shimada T, Watanabe T, Oikawa S, Takekoshi K. Identical germline mutations in the *TMEM127* gene in 2 unrelated Japanese patients with bilateral pheochromocytoma. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012 [Epub ahead of print] (査読あり)

2) Saito Y, Tanaka Y, Aita Y, Ishii KA, Ikeda T, Isobe K, Kawakami Y, Shimano H, Hara H, Takekoshi K: Sunitinib induces Apoptosis in Pheochromocytoma Tumor Cells by Inhibiting VEGFR2/AKT/mTOR/S6K1 Pathways Through Modulation of Bcl-2 and BAD. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, vol.302, E615-625, 2012 (査読あり)

3) Kodama H, Iihara M, Nissato S, Isobe K, Kawakami Y, Okamoto T, Takekoshi K: A large deletion in the succinate dehydrogenase B gene (*SDHB*) in a Japanese patient with abdominal paraganglioma and concomitant metastasis. *Endocrine Journal*, vol.57, 351-356, 2010 (査読あり)

[学会発表] (計12件)

1. Takekoshi K, Saito Y, Tanaka Y, Aita Y, Ishii KA, Ikeda T, Isobe K, Kawakami Y, Shimano H, Hara H: Effects of Sunitinib on Catecholamine Synthesis, Secretion and Apoptosis in Pheochromocytoma PC12 Cells. Third International Symposium on PHEOCHROMOCYTOMA (Paris, France), 2011, Sep, 16.

2. Takekoshi K, Isobe K, Kawakami Y :  
Pheochromocytoma: an update in  
Japan(Symposium ;Pheochromocytoma). 14<sup>th</sup> International Congress of  
Endocrinology (KYOTO, Japan), 2010,  
March, 14.

〔図書〕(計 6 件)

1. 竹越一博、川上康：悪性褐色細胞腫・MEN  
-遺伝子診断に重きを置いて- (特集；内  
分泌疾患-診断と治療の進歩)、日本内  
科学会雑誌、101 号、949-958 頁、2012
2. 竹越一博、星野雅也、川上康：褐色細胞  
腫の遺伝子診断(特集；褐色細胞腫の診  
断と治療 -最近の進歩と今後の展開)、  
医学のあゆみ、240 号、173-180 頁、2012
3. 竹越一博、櫻井晃洋：褐色細胞腫遺伝子  
解析の現状、褐色細胞腫診断マニュアル  
改訂第 2 版 (成瀬光栄、平田結喜緒編)、  
診断と治療社、70-78 頁、2012
4. 竹越一博、斎藤優莉亜、池田達彦、田中  
優子、會田雄一、石井清朗、川上康、原  
尚人：分子標的薬の基礎、褐色細胞腫診  
断マニュアル 改訂第 2 版 (成瀬光栄、  
平田結喜緒編)、診断と治療社、99-100  
頁、2012
5. 竹越一博、星野雅也、川上康：褐色細胞  
腫感受性遺伝子の動向、褐色細胞腫診断  
マニュアル 改訂第 2 版 (成瀬光栄、平  
田結喜緒編)、診断と治療社、121-123  
頁、2012
6. 竹越一博、新里寿美子、星野雅也、會田  
雄一、磯部和正、川上康：遺伝性褐色細  
胞腫・パラガングリオーマ症候群(特  
集；神経内分泌腫瘍-診断とトピックス  
-)、病理と臨床、29 号、472-479 頁、  
2011

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/clinical-med/lab-med/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹越 一博 (TAKEKOSHI KAZUHIRO)

筑波大学・医療医学系・准教授

研究者番号：40261824

### (2) 研究分担者

島野 仁 (SHIMANO HITOSHI)

筑波大学・医療医学系・教授

研究者番号：20251241

石井 清朗 (ISHII KIYOAKI)

筑波大学・医療医学系・助教

研究者番号：80419150

### (3) 連携研究者

なし