

泌尿器科腫瘍学における分子研究の展望： 遺伝子診断の実際と問題点

岐阜大学医学部泌尿器科学教室（主任：出口 隆教授）

山 本 直 樹

THE PRACTICE OF THE GENETICAL DIAGNOSIS AND ITS PROBLEMS

Naoki YAMAMOTO

From the Department of Urology, Gifu University School of Medicine

Carcinoma is a genetic disease. The malignant phenotype is acquired only after several mutations lead to derangement in a variety of gene products. Traditional methods in molecular biology generally work on a "one gene in one experiment" basis, which means that the throughput is very limited and the "whole picture" of gene function is hard to obtain. In recent years, new technology, called DNA microarray, has attracted interest. This technology promises to monitor the whole genome on a single chip so that researchers can have a better picture of the interactions among thousands of genes simultaneously. In cancers, the detection of minimal residual disease may have prognostic and therapeutic implications. Molecular tools are being used more frequently to enhance the detection of minimal residual disease in many types of cancer. Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) amplification of genes expressed by the tumor in a tissue-specific manner is the method with the highest diagnostic sensitivity. Quantification of tumor mRNA markers expressed by occult circulating tumor cells may be of prognostic value in a variety of neoplasms and disease stages. Medical professionals need to understand the basic concepts and principles of genetics; the role of genetics in diagnosing and managing different cancers; the ethical, legal and social issues surrounding genetic predisposition testing; and how to manage long-term care of patients at high risk for cancer.

(Acta Urol. Jpn. 47 : 825-828, 2001)

Key words: DNA microarray, Reverse-transcription polymerase chain reaction, Genetic predisposition testing, Ethics

緒 言

癌化とは遺伝子の変化に伴う正常細胞の表現形質の変化と考えられている。したがって癌の診断に遺伝子診断は有用と考えられる。正常細胞の癌化に伴う表現形質の変化には、1. 細胞の不死化、2. 異常増殖、3. 浸潤、4. 転移のプロセスが存在し、各ステップには各種の遺伝子群が関与すると考えられている。これまで臨床検査室での遺伝子検査は細菌やウイルスなどの感染症がおもな対象であった。しかし多くの癌でその責任遺伝子がクローニングされてくると検査室での癌遺伝子診断検査への期待が高まってきた。癌の最終診断が標本上で病理組織学的に行われることは今後も変わらないであろうが、個々の癌がもつ生物学的な性状（浸潤度や転移能などの悪性度）を遺伝子異常から明らかにする日が近づきつつあると考えられている。癌遺伝子診断検査は癌の characterization, 癌予知検査, 癌の存在診断の3つに分類できる。

癌の characterization とは、できた癌の広がり易さや悪性度を調べ放射線療法や抗癌剤への感受性を予測することである。これによって治療の指針の決定に役立てることが可能である。

癌予知検査とは、遺伝性の腫瘍では生まれつき癌抑制遺伝子の方が欠けているために若年で癌が発生するので、この遺伝子異常を早期に検索することである。これによって家系診断ができ、家族のリスクを予知可能である。また偶発癌においても遺伝子多型と癌の発生に密接な関係が存在する場合があります。遺伝子多型の検査によって癌の予防や早期治療につとめることができる。

癌の存在診断とは癌ができていないか、あるいは治療後に癌細胞が残っているか、癌が再発をしていないかなど癌細胞の存在を診断する検査である。これらの現状と問題点を明らかにするために、文献を検索し review した。

対象と方法

MEDLINE を用いてキーワードより癌の遺伝子診断についての文献を検索し考察を加えた。使用したキーワードは ploidy, oncogene, tumor supresor gene, DNA chips, single nucleotide polymorphysm (SNPs), reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), molecular detection, renal cell carcinoma, urothelial tumor, bladder tumor, prostate carcinoma, germ cell tumor である。

結 果

1 Ploidy

Ploidy では1,786件の文献が検索可能であった。その中で renal cell carcinoma に関しては178件, urothelial tumor に関しては64件, prostate carcinoma に関しては269件検索可能であった。deoxyribonucleic acid (DNA) の ploidy を flow cytometry (FCM) による1細胞あたりの定量によって癌細胞を diploid と aneuploid に分けること, 細胞周期の中のS期の割合の定量が試されていて, これらはガンの生物学的悪性度, 臨床成績と強く関連することが確かめられている¹⁾

2. 癌遺伝子と癌抑制遺伝子

Oncogene では71,964件の文献が検索可能であった。その中で renal cell carcinoma に関しては206件, urothelial tumor に関しては66件, prostate carcinoma に関しては325件, germ cell tumor に関しては4,050件検索可能であった。癌遺伝子 H-ras は正常な細胞癌遺伝子と比べると1塩基だけ異なっていて, 転写産物は活性型の guanosine diiphosphate (GDP) 結合タンパクと成り細胞の増殖を促進する²⁾ 遺伝子の過剰発現は転写タンパクの過剰発現として最終的には表現されている。転写タンパクの過剰発現は免疫組織学的に証明できる。Tumor supressor gene では1,970件の文献が検索可能であった。その中で renal cell carcinoma に関しては43件, bladder tumor に関しては40件, prostate carcinoma に関しては17件, germ cell tumor に関しては264件検索可能であった。腎細胞癌では癌抑制遺伝子の一種である von Hippel-Lindau gene (VHL gene) の存在している3番染色体短腕がほとんどの例で欠失していて, 膀胱癌では各種の染色体の欠失が確認されている³⁾。癌抑制遺伝子の一種である p53 の遺伝子産物は正常の場合には degradation が早い免疫組織学的には検出できずに, 突然変異をきたして異常タンパク質ができた時のみに検出できる。

4. 癌の characterization

DNA CHIPS では1,235件の文献が検索可能であっ

た。DNA チップ技術は1991年に Affymax Research Institute の Stephen P.A. Fodor と Duke 大学, Stanford 大学の研究者達により開発された⁴⁾。この技術は DNA だけでなく Peptide をシリコンあるいはガラスの表面で任意の異なる配列で同時に合成する方法である。コンピュータの半導体マイクロチップの技術の応用により, スライドガラスやシリコンなどの基板上に, 1万種類以上にもものぼる微量の DNA 断片を高度にスポットして, 整列固定が可能となっている。最新の機械では 150 μ m のサイズのスポットを得ることができるため, 1枚のスライドガラス (25.4×76.2 mm) に, 2万5千個以上の DNA を再現性良く, 高速でスポットting することができる。スライドガラスの上で DNA マイクロアレーと, 蛍光色素で標識した研究対象の細胞より抽出した messenger ribonucleic acid (mRNA) をハイブリダイゼーションさせ, そのシグナルを DNA チップ読み取り装置で読み取ることによって発現している多種類の mRNA を一度に解析することができる。DNA チップを応用することにより癌の genotype を解析することができ, 各個人に応じた個別の医療が可能になる⁵⁾

遺伝子多型は SNPs を初めとして5種類に分類される。SNPs は多型マーカーとして病気の発症や増悪に関連する遺伝子を見つけるための有用なマーカーであるばかりでなく, SNPs が直接病気の危険因子であったり酵素活性に関与する場合がある。5-fluorouracil (5-FU) の代謝に関与する dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) の splicing site での SNPs は DPD の活性に関係している。variant type の人は DPD の活性が低いため 5-FU の代謝が遅れ重大な副作用が起きる可能性がある⁶⁾ Cytochrome P450 (CYP) は遺伝子スーパーファミリーを形成していて CYP1 から3が薬物代謝の中心となる酵素である。CYP3A4 はテストステロンの酸化による活性化に関与する酵素である。Rebeck らは CYP3A4 に発現調節領域の新たな SNPs を見出し, 前立腺癌の進展との密接な関係を見出している⁷⁾。

5. 癌細胞の検出を目的とする遺伝子診断

Molecular detection では27,105件の文献が検索可能であった。その中で urothelial tumor に関しては27件, prostate carcinoma に関しては193件, germ cell tumor に関しては523件検索可能であった。癌細胞には特異的な蛋白が発現している (前立腺癌における prostate-specific membrane antigen (PSMA) または prostate-specific antigen (PSA), 上皮腫瘍での cytokeratin) のため, それをコードしている mRNA が存在する。近年は逆転写酵素を用いて RNA を鋳型にして DNA の合成反応を行った後にその DNA を鋳型に polymerase chain reaction (PCR) を行う

reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) を用いて癌細胞に特異的に発現している mRNA を検出する方法が開発されてきた⁸⁾ 従来の PCR 法は、サーマルサイクラーで PCR を行い目的 DNA を増幅した後、増幅産物を電気泳動で解析するという手順で行ってきたため定性反応であったが、近年 PCR の定量化が可能となってきた⁹⁾

6. 遺伝性癌の発症前リスク診断と倫理的諸問題

遺伝性癌では保因者はすべての細胞に遺伝子異常があるために、発症前に診断可能である。生殖細胞系列で癌化に関与する遺伝子が突然変異を起している個体は現在のところがん患者全体の1～2%以下と考えられているが、その他にも遺伝的なバックグラウンドががんの発症に重要な役割を果たしているものは、まだ発見されていない遺伝子を含め全体の5～10%あると考えられている。World medical association (WMA) は、ヘルシンキ宣言の中でヒトを対象とする医学生物学的研究に携わるすべての医師の指針としての勧告を用意している。その中でヒトを対象とする医学生物学的研究の分野では、目的が本質的に患者のための診断あるいは治療のためである医学的研究と、その本質的目的が純粋に学術的であって、研究の対象となるヒトにとっては診断または治療において直接的価値のない医学的研究との間には、根本的な区別を認めなければならないとしている。また、第34回 WMA 総会で採択された患者の権利に対するリスボン宣言では、人間を対象とした生物医学的研究との関連においては、被験者は通常の患者と同様の権利と配慮を受ける権利があるとされている。これらの宣言をもとに日本では2000年12月20日に文部省、厚生省、通商産業省、科学技術庁（当時の名称）よりヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（案）が提示されている。

(<http://www1.mhlw.go.jp/topics/bosyuu/tpl220-1-6.html#bessi2>).

考 察

癌の遺伝子診断の多くは未だに実験室内レベルの物が多い中、遺伝子型 (genotype) の変化の検出としての従来より行われている FCM による1細胞あたりの DNA 量の定量が現在のところ臨床に実用化されている最も有用な遺伝子診断と考えられた。

癌遺伝子はウイルスによる発癌から発見された。細胞癌遺伝子の多くは発現していてもそれだけで細胞を癌化させることはない。1982年にヒト膀胱癌細胞株から NIH3T3 細胞の形質を悪性に転換させる遺伝子 H-ras が発見された¹⁰⁾ 癌細胞は正常細胞に存在する癌遺伝子が、1. 点突然変異、2. 遺伝子増幅、3. 遺伝子再構成という変化のうちどれかを起している。遺伝子の過剰発現は転写タンパクの過剰発現として最

終的には表現される。臨床的には Ha-ras, erbB の過剰発現が予後不良の因子と考えられているが、すべての報告で一致しているわけではない¹¹⁾ 一方、癌抑制遺伝子は Knudson の仮説から見い出された。1971年 Knudson は遺伝性および非遺伝性の網膜芽細胞腫の発症年齢の統計的解析から癌は2段階の遺伝子変異によって発生するという2ヒットセオリーを発表した¹²⁾ 2ヒットセオリーとは、遺伝性の癌は単一の遺伝子が生殖細胞系列で突然変異を起して、生後もう1回の遺伝子変化によって癌が発生し、一方非遺伝性の癌は2回の遺伝子変化によってがんが発生するという仮説である。当初は仮説であったが癌細胞での染色体の欠失が証明されることにより、癌抑制遺伝子の存在が実際に確認された。癌抑制遺伝子是不活性化することにより細胞を癌化させる遺伝子群のため、正常細胞に癌化には対立遺伝子2回の変化を必要とする。変化には、1. 片方だけのアレルの欠失と突然変異、2. 双方ともアレルの欠失、3. 双方とも突然変異の3型が考えられる。一般的には癌抑制遺伝子の変異が予後不良の因子と考えられているが、すべての報告で一致しているわけではない¹³⁾ 従来は癌の個性については HE 染色による病理形態学的な診断（分化度、組織型、組織構築など）のみであった。それでも癌の生物学的悪性度は組織学的分化度と相関することが従来から確かめられている。世界中でゲノムプロジェクトが進められ、多数の遺伝子構造が明らかにされてきた。今後はポストゲノムプロジェクトとして、遺伝子機能や発現の研究が、疾患の予防と診断、医薬品の開発などに新しい道を開くための非常に重要なテーマとなっている。DNA チップによって single nucleotide polymorphisms (SNPs) などの多型解析のほか、塩基配列決定や遺伝子の増幅/欠失領域の解析などを行うこともできる。DNA チップは、多数の遺伝子の発現や変異、多型性を同時に解析することができるため、これらの研究を簡便、かつ迅速に進めることが可能である。現在ではまだ限られているが、近い将来には抗癌剤の感受性に関与する遺伝子が多数発見されると考えられる。しかし臨床材料はサンプリングできる組織は限られているため、現在のところ既存のタイプの cDNA マイクロアレイは、生化学検査の代替にはなっていない。今後は遺伝子の発現と抗癌剤の感受性に関する遺伝子発現情報のデータベースを構築することにより生検材料より適切な抗癌剤の選択が可能となるであろう⁵⁾ Single-nucleotide Polymorphisms は様々な疾患のリスクを捉えたり、様々な疾患の遺伝的背景を解明することにつながる。

RT-PCR は定性反方であったため、検出結果と臨床成績が相関しなかった。近年開発されたリアルタイム PCR 法では、サーマルサイクラーと分光蛍光光度

計を一体化した機器を用いて PCR での増幅産物の生成過程をリアルタイムで検出解析する。増幅産物の生成の過程を連続して見る事ができるため、より正確な定量が可能である。われわれも現在前立腺癌症例における末梢血中の前立腺癌細胞の定量を検討中である。

遺伝子診断の研究および診察を実施するにあたっては、医師は被検者およびその家族に対して、各個人の状況に合わせた最新の遺伝学的情報をはじめ、適切で十分な情報を伝え、その正確な理解および意思決定を助けると同時に、被検者およびその家族の心理的变化に応じた支援を提供する必要がある。また遺伝子診断の研究および診療を実施するにあたっては、被検者およびその家族に対して、医学的、心理的、社会的な支援を継続的に与える体制を整備することが急務と考える。

結 語

泌尿器科腫瘍学における遺伝子診断の実際と問題点について文献を検索し考察を加えた。現在における癌遺伝子診断検査は癌の characterization, 癌予知検査, 癌の存在診断の3つに分類できた。遺伝子診断を実施するにあたっては、被検者およびその家族に対して支援を継続的に与える医療体制を整備する必要があると考えられた。

文 献

- 1) Ruiz-Cerda JL, Hernandez M, Sempere A, et al.: Intratumoral heterogeneity of DNA content in renal cell carcinoma and its prognostic significance. *Cancer* **86**: 664-671, 1999
- 2) Bos J: Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* **49**: 4682-4689, 1989
- 3) Velickovic M, Delahunt B, Storkel S, et al.: VHL and FHIT locus loss of heterozygosity is common in all renal cancer morphotypes but differs in pattern and prognostic significance. *Cancer Res* **61**: 4815-4819, 2001
- 4) Fodor SP, Read JL, Pirrung MC, et al.: Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* **251**: 767-773, 1991
- 5) Debouck C and Goodfellow PN: DNA microarrays in drug delivery and development. *Nat Genet* **21**: 48-50, 1999
- 6) Ridge SA: *Br J Cancer* **77**: 497-500, 2000
- 7) Bebbek TR, Jaffe JM, Walker AH, et al.: Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *J Natl Cancer Inst* **90**: 1225-1229, 1998
- 8) Deguchi T, Yang M and Kawada Y: Micro-metastasis of prostate cancer to lymph nodes: detection by means of reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Natl Cancer Inst* **89**: 1471-1473, 1997
- 9) Max N, Willhauck M, Wolf K, et al.: Reliability of PCR-based detection of occult tumour cells: lessons from real-time RT-PCR. *Melanoma Res* **11**: 371-378, 2001
- 10) Der CJ, Krontiris TG and Cooper GM: Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 3637-3640, 1982
- 11) Olderoy G, Daehlin L and OGREID D: Low-frequency mutation of Ha-ras and Ki-ras oncogenes in transitional cell carcinoma of the bladder. *Anticancer Res* **18**: 2675-2678, 1998
- 12) Knudson AG Jr: Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* **68**: 820-823, 1971
- 13) Berggren P, Steineck G, Adolfsson J, et al.: p53 mutations in urinary bladder cancer. *Br J Cancer* **84**: 1505-1511, 2001

(Received on September 18, 2001)
(Accepted on October 5, 2001)