

カレントレビュー

4. 腫瘍

a. 婦人科癌と遺伝子診断

Genetic Testing for Gynecological Malignancies

相田 浩 田中 憲一

Hiroshi AIDA and Kenichi TANAKA

はじめに

癌遺伝子や癌抑制遺伝子の発見は、人々に癌抑制への期待を抱かせたが、遺伝子レベルでの研究が進むにつれ、癌化への機構は単純なものではなく予想以上に複雑であることが判明してきた。残念ながら現時点での発癌機構の分子レベルでの解明は、断片的な理解にとどまっている状態といわざるを得ない。これらの断片的な理解が一つにつながるにはまだまだ多くの時間が必要であろう。しかしながら、急速な進歩を示す最近の分子病態に関する研究により、多くの知見が得られていることも事実である。すべての疾患は遺伝子の変化に基づくものとしてとらえられ、これまでに幾つかの疾患に関連遺伝子が同定されてきている。今後多くの疾患において原因遺伝子が特定されれば、遺伝子診断による発症前診断を含む次世代のスクリーニング法の開発の道が開け、ひいては予後不良とされ

る疾患の救命率の向上が期待される。ここでは婦人科腫瘍、主に上皮性卵巣癌に関して遺伝子レベルの研究成果を紹介すると共に、遺伝子診断の臨床応用について述べる。

遺伝子とその機能

遺伝子はその機能を発現するためには蛋白に翻訳される必要がある。この過程を簡潔に述べると、まずDNAを鋳型としてRNAが合成される(transcription: 転写)。このRNAからイントロン(intron)が除かれ(splicing), エクソン(exon)だけからなるmRNAがつくられる。さらに、このmRNAを鋳型として、蛋白が合成される(translation: 翻訳)。これらの過程のいずれかで異常が生じれば、正常な機能が阻害される。また遺伝子は全身すべての細胞で同一であるが、組織や細胞又は時期により蛋白に翻訳される量に相違がでる。このため遺伝子によっては、特定の細胞でしか働いていないものもある。

癌と遺伝子

癌に関連する遺伝子は、大きく二つに分類される。遺伝子自身が発癌に関与している癌遺伝子(oncogene, proto-oncogene)と、ある遺伝子に異常が生じ、その遺伝子産物が正常に機能し

新潟大学医学部産婦人科

〒951 新潟市旭町通1-757

Department of Obstetrics and Gynecology,
Niigata University School of Medicine, Niigata**Key words:** BRCA1 • Genetic testing •

Ovarian cancer

なくなることで癌が生じる癌抑制遺伝子(suppressor gene)とである。車に例えれば癌遺伝子はアクセル、癌抑制遺伝子はブレーキの役割を担っているものである。これらの遺伝子は、レトロウイルスやhuman papilloma virus (HPV)などによって生体内に持ち込まれる外来遺伝子であることもあるが、普通に人の遺伝子に組み込まれているものもある。また、これらの遺伝子は癌のみに関わるのではなく、通常、個体発生や細胞の分化増殖過程に深く関わっており、このことが癌化のメカニズムを解明するうえで、問題をより複雑化している原因となっている。

癌抑制遺伝子と発癌

家系内集積性の高い悪性腫瘍の場合は、癌抑制遺伝子に起因するものが多い。遺伝子は、通常父親、母親の双方から一つずつ受け継ぎ、性染色体を除き誰でも二つずつの遺伝子を有する。癌抑制遺伝子の異常により癌が生じる場合、Knudson et al. の2 ヒット説によれば、両方の

遺伝子の不活化が不可欠と考えられている(図1)¹⁾。一般に家系内に集積が認められる悪性腫瘍の場合、生まれつき一方の癌抑制遺伝子に異常が生じているため、残された一方の遺伝子の異常で悪性腫瘍が生じる。このような場合、すべての細胞が正常な遺伝子を持つしかもたないため、常に癌化する危険性に晒されていることから、遺伝学的には劣性遺伝であるが、表現系としては優性遺伝形式をとる。また、家族歴のない孤発例の場合は、二つの遺伝子に異常が生じるのに対し、このような患者の場合、一つの遺伝子の異常により癌化へ進むことから比較的若年に発症する。

逆に、このような家系内に集積が認められるような疾患について、その家系を調べ、原因遺伝子に迫るという手法で同定された遺伝子も知られている。

また、最近の知見からは、発癌過程に関わる遺伝子は単一ではないと推測されている。正常細胞が癌化する際に、さまざまな遺伝子異常が蓄積されていき、その結果として癌化し、さら

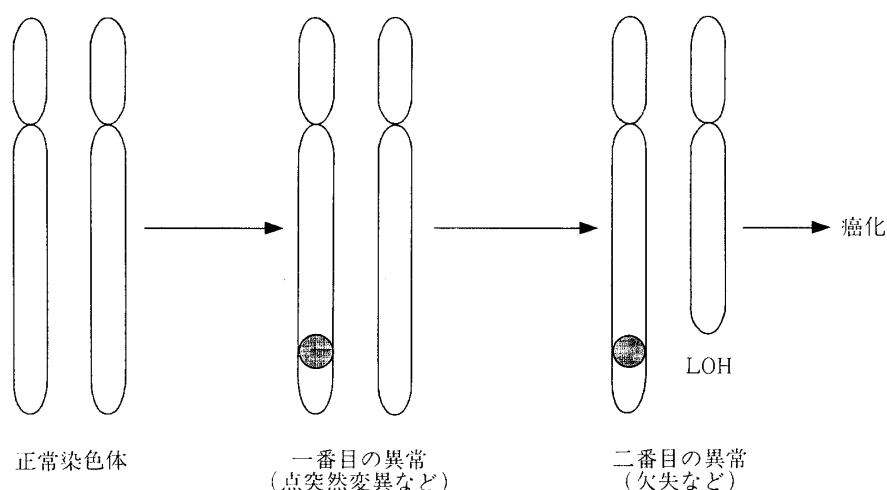


図1 癌抑制遺伝子の不活化による癌化

正常細胞が癌抑制遺伝子の不活化により癌化する場合、二段階の異常が起きている(Knudson et al.の2 ヒット説)。遺伝的に一方の遺伝子に異常を有する場合は一回の異常のみで癌化へのプロセスが進むため、若年発症の傾向があり、かつ家系内集積性を認める。

なる遺伝子異常により転移能などを獲得していくものと考えられている。

BRCA1遺伝子

乳癌はかなり以前より疫学的研究からその遺伝性が示唆され、遺伝子の同定が試みられてきたが、1994年 Miki et al. により家族性乳癌に関係すると考えられていた BRCA1遺伝子が分離同定された²⁾。この遺伝子は、それより4年前にポジショナルクローニングにより、第17番染色体長腕上にその存在が推測されていたものである³⁾。

BRCA1は、約100kb にわたる大きな遺伝子であり、24個のエクソンから構成される。そこから転写されてくる mRNA も約7.8kb と比較的大きなものである。そのアミノ酸の配列の分析から、BRCA1は転写調節因子と考えられている。さらにグラニンコンセンサスが確認され、分泌蛋白の可能性も否定できないとされ、細胞内での局在や機能を同定するためのさまざまなアプローチが試みられている^{4)~6)}。また、有糸分裂の際の核内での特殊な分布と他の蛋白との会合が確認されたことから、染色体の分裂に関して重要な役割を有することが示唆されている⁷⁾。

BRCA1遺伝子の異常と家族性卵巣癌および乳癌

卵巣癌患者の一部には、家系内集積が認められる症例が存在する⁸⁾。このような家族性の卵巣癌症例に基づいた研究により、幾つかの遺伝子が卵巣癌発症に関連するのではないかと推測されている。家族性卵巣癌症例をその特徴から分類すると表1のようになる。

BRCA1が実際に同定(遺伝子の塩基配列が決定)される以前から、疫学的研究により、若年発症の家族性乳癌の約45%で BRCA1が関与していると推測されてきた⁹⁾。BRCA1が分離同定

表1 家族性卵巣癌の分類

- | | |
|--------------------------|------------------------------|
| 1. 家族性卵巣癌(狭義) | 複数の卵巣癌患者の集積を認めるが乳癌患者がいない家系 |
| 2. 家族性乳癌・卵巣癌家系 | 複数の卵巣癌および乳癌患者の集積を認める家系 |
| 3. 卵巣癌を含む悪性腫瘍の集積が認められる家系 | リンチ症候群
リ・フラウメニ症候群 など |

された後、ほぼ同じ頻度で BRCA1の異常が報告されている。本邦での Inoue et al.の報告によれば、20家系の乳癌家系中 germline mutation (胚細胞性遺伝子異常：全身すべての細胞に同じ遺伝子異常が受け継がれているもの)が確認されたのは2家系(10%)のみで、欧米との相違が示唆された¹⁰⁾。

また家系を分類整理することで、この BRCA1が卵巣癌の発症にも関与していることが示唆された。乳癌家系の一部には、卵巣癌も集積している家系が存在する。これらの家系において BRCA1遺伝子の異常がみつかる割合は、約80%と大変高いものと考えられている。すなわち乳癌と卵巣癌の二つの悪性腫瘍が集積する家系では、その多くが BRCA1の異常に起因している可能性がある。著者らの検索結果からも、このような家系には約70%程度で BRCA1遺伝子に点突然変異などの異常が認められた¹¹⁾。

一方、卵巣癌のみが集積している site-specific ovarian cancer family に関しては、どの程度で BRCA1が関与しているかは今後の検討が待たれる。著者らが site-specific ovarian cancer family を13家系解析した結果では、3家系(23%)に germline mutation と、BRCA1領域に後述する LOH が認められたことより、これらの家系での BRCA1の関与が示唆された。しかし、これら以外の site-specific な卵巣癌

家系においては、BRCA1以外の遺伝子異常が関与している可能性もある。

ヘテロ接合性の消失 (LOH: Loss Of Heterozygosity)

前述したように、癌抑制遺伝子は一対ある対立遺伝子の双方に異常が起きて不活化される。癌細胞のDNAを解析すると、LOHが多くの例で観察される。LOHとは、対立遺伝子の一方が欠落している状態である(図1)。LOHが高頻度に生じている染色体領域には、癌に関連した遺伝子が存在する可能性がある。BRCA1が存在する領域においては、乳癌および卵巣癌でのLOHが高頻度に観察されており、このことからBRCA1が乳癌および卵巣癌発症に強く関わっていることが示唆された。

しかし、孤発例でBRCA1遺伝子の異常が確認された症例は、卵巣癌で10%程度と、推測されていた頻度よりかなり低いものであった¹²⁾¹³⁾。BRCA1遺伝子のプロモーター領域の異常、転写活性の異常、イントロンの異常に基づく転写の異常(abnormal splicing)などの異常を検出できなかった、もしくはBRCA1の近くにある遺伝子がこのような症例に関係しているなどの可能性も考えられるが、LOHの頻度とBRCA1遺伝子の異常が認められる頻度とのギャップを説明する理由は現在のところ不明である。

BRCA1と孤発例の卵巣癌

卵巣癌症例のほとんどは孤発例である。これらの症例においては、約10%にBRCA1遺伝子の異常が確認されたのみである。さらに、後天的にBRCA1に異常が生じたと考えられる体細胞性遺伝子異常(somatic mutation)は非常に稀で、症例のほとんどはgermline mutationであった¹⁴⁾。後者の場合、姉妹もしくは娘などの血縁者が同じ異常を有している可能性があり、今

後家系内に新たな患者が発生する可能性がある。またこれらの結果から、卵巣癌全体の約10%程度が家族歴を有するのではないかと推測される。

BRCA1遺伝子異常と遺伝子診断への応用

卵巣癌と乳癌でBRCA1遺伝子の異常が起こる場所が異なっている傾向があるとする報告もあるが¹⁵⁾、遺伝子異常が集中している場所、いわゆるhot spotはないと考えられている。人種によってはある特定の遺伝子異常が高頻度に見つかるという報告もある¹⁶⁾。これまでのところ、遺伝子異常はすべての翻訳領域(coding region)において確認されている。

また、BRCA1の細胞内での働きは前述したようにほとんど不明であるが、これまでの疫学的研究からは、この遺伝子の一方に異常があると、一生の間に乳癌に罹患する危険性が80%程度、卵巣癌に罹患する危険性が40%程度とされている¹⁷⁾。このような浸透率の高さと臓器特異性を示す点から、BRCA1遺伝子に異常を示す家系の構成員の女性を対象とした、定期的な健診によるフォローアップがこのような家系での卵巣癌の予後を改善できるのではないかと期待される。

また、孤発例の卵巣癌においても、確認された遺伝子異常はほとんどがgermline mutationであり、潜在性の家族性症例といえることから、このような症例においても卵巣癌と乳癌の重複癌の可能性、家系内における新たな患者の発症の可能性などを考慮に入れ、遺伝子診断を含めたフォローアップの必要性があるものと思われる。

遺伝子診断の臨床応用という点で考えると、BRCA1のように臓器特異性があり、通常の集団検診では早期発見が難しく、治療成績が不良である疾患が最もよい適応となるのではないかと考えられる。

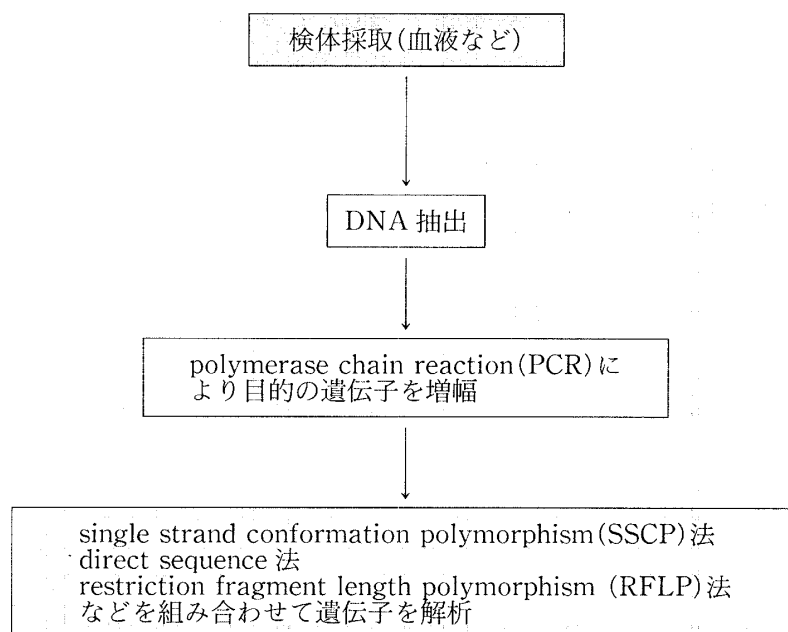


図2 遺伝子診断の実際

遺伝子診断の実際

遺伝子診断の実際の流れをフローチャートに示すと図2のようになる。germline mutationは先天的なものであり、すべての細胞に同じ異常が認められることより、検査材料としては血液を初め組織など生体のあらゆるものが利用可能である。これらの組織もしくは白血球よりDNAもしくはRNAを抽出。このDNA又はRNAを鋳型としてPCR法により目的の遺伝子を必要に応じて幾つかに分けて増幅し解析する。RNAを鋳型とする場合にはreverse transcriptaseを用いてcDNA(RNAに相補的なDNA鎖を合成)にするステップが加わる。このPCR産物を用いて実際の塩基配列を調べる。通常遺伝子は、翻訳領域だけでも数キロbp(1kbpは1,000個の塩基対よりなる)に及び、なおかつこれらの翻訳領域はイントロンにより幾つかに分けられている。このため、遺伝子全体の塩基配列を調べることは大変な労力が必要である。そこで、塩基配列自身は解析できないが、遺伝子異常がある部位を迅速に判定できるSSCP

法や、遺伝子異常がその遺伝子の制限酵素部位に影響を与えるような場合に利用できるRFLP法などを組み合わせて検索することが多い。これらの解析法の実際の手技や原理については成書に譲る。

その他の癌関連遺伝子と婦人科腫瘍

1. BRCA2

若年性の家族性乳癌の原因の約45%ずつがBRCA1とBRCA2であると推測されている。このBRCA2遺伝子が、BRCA1に引き続き同定された¹⁸⁾。このBRCA2もBRCA1と同様、ポジショナルクローニングにより第13番染色体上にその存在が予測されていて、実際に遺伝子が同定分離されるまでは卵巣癌発症との関連性は否定的であったが、今後の研究の蓄積が必要と考えられる。

2. p53

p53は、アポトーシスの制御、p21を介した細胞周期の制御など、細胞内において重要な働きをしていると考えられている癌抑制遺伝子の代表である。先天的に一方の対立遺伝子に異常が

ある場合は、あらゆる悪性腫瘍が生じてくることで知られているリ・フラウメニ症候群の原因となる。悪性腫瘍における p53 の研究は比較的広範囲に行われており、多くの腫瘍で異常やその頻度に関する報告がある。婦人科腫瘍においても、卵巣癌を初め子宮体癌、子宮頸癌などで p53 の異常が少なからず検出される。これがそのままこれらの癌の原因となっているかどうかは今後の研究を待たねばならないが、HPV の産生する E6 などの蛋白が p53 を不活化するという報告や、ウイルスの産生する蛋白が p53 の細胞内の局在を変化させるという報告は、発癌機序を説明するうえで大変興味深い¹⁹⁾。また化学療法などの治療の際に、これらの遺伝子異常を考慮に入れた治療の個別化なども今後の課題であろう。

3. その他の癌関連遺伝子

Rb や p16 などの遺伝子異常も各種の悪性腫瘍で報告されている。これまで報告されている癌に関連した遺伝子は、ほとんどが細胞内にあってその細胞周期に何らかの関わりをもっていることが示唆されている遺伝子である。癌細胞が正常の細胞増殖から逸脱した状態であるものととらえる場合、これらの遺伝子の機能の破綻が、発癌過程に何らかの影響を及ぼしているものと考えられる。

このほかにも卵巣癌においては、K-ras 遺伝子の異常や c-myc の過剰発現などの報告がある。また、c-erbB-2 遺伝子異常が卵巣癌の予後に影響するという報告もみられるが、これらの遺伝子の発癌機構への関与の解明には今後の更なる研究が待たれる。

また、リンチ症候群などでは卵巣癌や子宮体癌、結腸癌の家系内集積が認められるが、MSH2 遺伝子と呼ばれる DNA の異常を修復する働きをもつとされる遺伝子の異常が原因として報告されている。

遺伝子診断とその問題点

ある特定の疾患に関していえば、遺伝子診断は十分可能となっているし、実際に国内でも一部施設で実施されているものもある。BRCA1 の場合、米国では既に遺伝子診断が実施されたが、この遺伝子診断に対し幾つかの問題点が指摘された。その一つに保険や雇用などにおける差別が生じる点が挙げられる。しかしこれは、今後家族性腫瘍の原因遺伝子が解明されていくに従い、遺伝子診断実施の有無にかかわらず、家族歴があること自身がこのような社会的弱者を作り出してしまう可能性がある。このような点からも、何らかの社会的な配慮もしくは体制づくりが望まれる。

また、発症前診断という点に焦点を絞る場合、どのような疾患を対象とするかが問題であろう。遺伝子は 1×10^7 個程度存在するといわれ、生まれつきすべての遺伝子が正常な人間は稀であり、これらすべての遺伝子について検査するのはまず不可能である。例えば子宮頸癌のように、細胞診などの検査システムが充実し早期発見が比較的容易なものと、卵巣癌のように集団検診などで早期発見が難しく予後が不良な疾患とで、遺伝子診断の有用性を検討する必要があるものと思われる。

将来における展望

遺伝子診断の臨床応用を考える場合、次のような分野での発展が期待される。一つには、今後多くの疾患でその原因遺伝子が同定されていくにつれ、我々臨床家にとっても遺伝子診断は現実問題となっていくと思われる。新たな技術が開発され、遺伝子診断が迅速化および低コスト化されれば、スクリーニングの一手段として利用できる可能性が出てくる。残念ながら現在の技術では、ある一つの遺伝子を調べるだけでも、大変な労力と時間およびコストがかかるた

め、特定の施設でしかも対象者を絞って実施しているのが現状である。将来的にこれらの問題が解決されれば、予後不良でかつ集団検診で早期発見が困難な疾患に対し、遺伝子診断により発症前よりその危険性を推測し、ハイリスク群に対して精度の高い検診をしていくことで、早期発見ひいては予後の改善が期待される。

他の応用範囲としては、発症後の症例において、遺伝子異常もしくは遺伝子の発現の変化などを検索することで、これまで主に病理診断に依存してきた治療方針をさらに個別化できる可能性があることである。例えば薬剤耐性遺伝子などが同定されれば、実際の患者に対し、治療薬剤の選択もしくは治療法の変更など治療方針決定への応用の可能性がある。すなわち、各患者ごとに病理学的診断に加えてその分子病態も考慮し、治療の個別化を行うことで最大限の治療効果を上げるなどの応用が期待できるであろう。これらの点でも既に臨床に応用されているものもある。婦人科領域においても、子宮体癌での estrogen receptor の発現を検査し、維持療法を設定することなどもこの一例であるといえる。

さらに原因遺伝子が同定され、その機能が解明されていけば、悪性腫瘍などにおいては正常細胞への分化誘導、転移阻止などへの新たな遺伝子治療の道が将来的に開ける可能性もある。

このような遺伝子研究の利点を臨床の場に生かすためには、今後の研究の積み重ねが必要であると共に、遺伝子診断においては、臨床的適応、社会的適応などを考慮して進めていく必要があるだろう。また遺伝子診断で発症前診断をする場合、診断でハイリスク女性を検索するのが目的ではなく、その先の早期発見と治療成績の向上が最終的な目標であり、そのための検診体制の整備などが急務であると考ええる。

文 献

1. Knudson AG, et al. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. Proc Natl Acad Sci USA 1971; 63: 820—823
2. Miki Y, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. Science 1994; 266: 66—71
3. Hall JM, et al. Linkage of early-onset familial breast cancer to Chromosome 17q21. Science 1990; 250: 1684—1689
4. Jensen RA, et al. BRCA1 is secreted and exhibits properties of a granin. Nature Genet 1996; 12: 303—308
5. Thakur S, et al. Localization of BRCA1 and a splice variant identifies the nuclear localization signal. Mol Cell Biol 1997; 17: 444—452
6. Holt JT, et al. Growth retardation and tumour inhibition by BRCA1. Nature Genet 1996; 12: 298—302
7. Scully R, et al. Association of BRCA1 with Rad 51 in mitotic and meiotic cells. Cell 1997; 88: 265—275
8. 市川喜仁, 西田正人, 杉田匡聡, 有沢ゆう子, 佐藤豊実, 沖 明典, 河野圭子, 重光貞彦, 角田 肇, 久保武士. 卵巣癌患者における卵巣癌および乳癌の家族内集積の検討. 日産婦誌 1995; 47: 901—906
9. Easton DF, et al. Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: results from 214 families. Am J Hum Genet 1993; 52: 678—701
10. Inoue R, et al. Germline mutation of BRCA1 in Japanese breast cancer families. Cancer Res 1995; 55: 3521—3524
11. Takano M, et al. Mutational analysis of BRCA1 gene in ovarian and breast-ovarian cancer families in Japan. Jpn J Cancer Res 1997; 88
12. Hosking J, et al. A somatic BRCA1 mutation in an ovarian tumour. Nature Genet 1995; 9: 343—344

13. *Merajver SD, et al.* Somatic mutations in the BRCA1 gene in sporadic ovarian tumours. *Nature Genet* 1995; 9: 439—443
 14. *Matsushima M, et al.* Mutation analysis of the BRCA1 gene in 76 Japanese ovarian cancer patients: four germline mutations, but no evidence of somatic mutation. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 1953—1956
 15. *Gayther SA, et al.* Germline mutations of the BRCA1 gene in breast and ovarian cancer families provide evidence for a genotype-phenotype correlation. *Nature Genet* 1995; 11: 428—433
 16. *Struwing JP, et al.* The carrier frequency of the BRCA1 185 del AG is approximately 1 percent in Ashkenazi Jewish individuals. *Nature Genet* 1995; 11: 198—200
 17. *Narod SA, et al.* An evaluation of genetic heterogeneity in 145 breast-ovarian cancer families. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 254—264
 18. *Wooster R, et al.* Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 1995; 378: 789—792
 19. *Ueda H, et al.* Functional inactivation but not structural mutation of p53 causes liver cancer. *Nature Genet* 1995; 9: 41—47
-