

特別講演

遺伝子医療の到来 —ヒトゲノム情報と 21 世紀の産科婦人科診療—

名古屋市立大学大学院医学研究科教授

鈴 森 薫

The Advent of Gene-Based Medical Treatments—Information on Human Genome and Medical Care in the Obstetrics and Gynecology Field for the 21st Century

Kaoru SUZUMORI

*Department of Human Reproduction and Embryology, Nagoya City University,
Graduate School of Medical Sciences, Nagoya*

Key words : Chromosome aberration · Single gene defect · Polygenic disease ·
Somatic cell line mutation · DNA Chips

要旨 1953 年 Watson and Crick は DNA の二重らせん構造を提唱した。1965 年代には遺伝子 hunter の時代に突入し遺伝病と遺伝子変異との関係が明らかにされた。1970 年からはヒトゲノム解析計画が開始されゲノムの一次構造のドラフト・シーケンスが 2000 年に公表された。このような時代背景からヒトの疾患をゲノムという視点で捉える体勢が整ってきた。遺伝病は 4 種類、染色体異常症、単一遺伝子病、多因子疾患と、癌などの体細胞遺伝疾患に分けられる。

1. 染色体異常症

染色体異常症は、数的異常、構造異常の結果起こる疾患で各染色体には数百から数千の遺伝子が座位している。異常の多くは自然流産として淘汰される。染色体異常の出生前診断では、光顕的に可視的な異常のみならず判別不能な微細な異常の診断を要求されることがあり、telomere FISH や SKY 法が有用となった。FISH 法では間期細胞における染色体分析が可能で精子や初期胚の染色体分析にも応用できる。

2. 単一遺伝子病

単一遺伝子病の中で責任遺伝子が判明している疾患は 3,000 程度である。遺伝子 hunter の時代は 21 世紀になっても終わっていない。多くの単一遺伝子病で遺伝子解析が行われ、病気の重症度や予後との関係が精力的に解明された。これら Mendel の遺伝法則に従う単一遺伝子病から、Mendel の法則では説明できない 3 塩基反復配列伸長型遺伝病まで出生前診断の対象となっている。

3. 多因子疾患

複数の疾患感受性遺伝子と環境因子との相互作用で発症する疾患を多因子疾患と定義されている。多因子疾患には高血圧・糖尿病などの生活習慣病が代表的である。これらの疾患は頻度が高いばかりでなく慢性化することが多いため医療全体からみても最も解明が待たれている。現在、多因子疾患の遺伝的背景の解明に向け各個人の 1 塩基置換による遺伝子多型 (SNP) を体系的に収集し正常群と疾患群を比較することが盛んに行われており、我々も妊娠中毒症とダウン症の再発について SNP 解析をした。

4. 体細胞遺伝疾患

通常の遺伝病における遺伝子型は性腺細胞を含む体細胞すべて共通で、次世代に受け継がれる。しかし

癌は遺伝子変異を基盤に発症する疾患であるが、癌細胞のみに変異が発現しているものと、家族性腫瘍のように性腺細胞にも変異が認められ変異をもつ個体のすべての細胞が Mendel 遺伝に従う遺伝子変異を一方の対立遺伝子に認め優性遺伝するものがある。婦人科腫瘍のうち卵巣癌と *BRCA1* 遺伝子との関連は知られており、日本人における卵巣癌と本遺伝子について分析した。また、卵巣癌組織標本スライド上、FISH 法で *BRCA1* の発現と予後との関係について検討した。一方、最近、HPV 感染と子宮頸癌発生機序が明らかになってきた。そこで、HPV DNA マイクロチップ法により十代女性における HPV 感染陽性率について調査した。

5. ヒトゲノム情報と遺伝病研究の将来

現在、最も精力的に研究されているのは SNP など個人の遺伝情報を基にして生活習慣病の発症リスクを算定し、効率的な予防や治療を行うものと癌治療における癌感受性遺伝子型を基調とした抗癌剤の組み合わせによる「オーダーメイドの医療」の戦略であろう。

はじめに

近代の遺伝医学の基礎となった Watson and Crick による DNA の二重らせん構造の発表後、今年は丁度 50 年を迎える。この DNA 二重らせんに何が書かれているのかを解明するのが生命科学の最も大きな課題であり、これに関する研究が分子細胞遺伝学、分子生物学であり、DNA の理解も深まってきた。特に 70 年代、80 年代の DNA 解析技術の進歩はすさまじく、それが土台となってゲノムが解析できるようになり、米国を枢軸の中心にしてヒトゲノムの全解読を実際に行おうとする「ヒトゲノム解析計画」が 1990 年代に始まった。開始当初は 15 年、20 年というスパンで解析していこうという計画であったが、その後のテクノロジーの著しい発展により着実にレベルが向上するとともに解析速度も早まり、予想よりも早く 2001 年にはヒトゲノムのドラフト・シーケンスの公表を迎えている。このままの速度が維持されるなら本年度にはヒトのもつすべての DNA の一次構造が決定されることになる。

ヒトの遺伝子数に関して、当初 8~10 万個と推定されていたが、今までの成果から実際はこれよりずっと少ないと考えられ、推定総数は約 3~4 万個とされている。

遺伝医学分野で最も有名な遺伝病カタログである McKusick の「Mendelian Inheritance in Man (MIM)」の 2002 年 1 月時点では 13,000 種類の遺伝病や遺伝形質が記載されており、このうち原因遺伝子が単離されたり遺伝子の染色体上の座位が明らかにされた疾患は 9,700 種に及ぶ。MIM に記

載されたいわゆる遺伝病以外にも、高血圧・糖尿病・心筋梗塞・高脂血症などの生活習慣病、アレルギー疾患、悪性腫瘍、感染症に対する易感染性などほとんどあらゆる医療の問題に、遺伝や遺伝子が関与することが明らかになっており、ヒトゲノム情報がすべての医療分野で応用されるのは間違いないことであろう。このような最近の分子医学の著しい進展による成果は、医療の面で遺伝子診断という形で現場に導入されつつある。遺伝病は大きく 4 種類に分類される。すなわち、染色体異常症、単一遺伝子病、多因子疾患、それに癌などの体細胞遺伝疾患である。

染色体異常症

ヒトの染色体数が 46 本であることが明らかになったのは 1954 年 (Tjio & Levan¹⁾) であり、それから 3 年経った 1959 年にヒトの染色体異常症が France の Lejunne et al.²⁾ によってダウン症候群ではじめて明らかにされた。その後多くの先天奇形、自然流産胎児などで染色体異常症が報告され今日に至っているが、考えてみるとヒトの染色体異常症がはじめて発見されてから約 45 年の歳月が経過したことになる。染色体分析と一口でいっても目的の検体組織によって容易なものから、ある程度熟練を要するものまで多彩である。染色体核型分析は分裂中期の細胞でなければならない。臨床的に染色体分析に用いる材料のうち培養法のやさしいものから列举すると、末梢血リンパ球、ヒト生体組織、絨毛組織、人工流産胎児、羊水細胞、自然流産胎児の順となる。しかし、最近では培養液が改良され目的材料に応じて選択できるように

なり比較的容易に培養できるようになっているが今でも問題になるのは材料自体の細菌汚染である。

1970年代に入り、染色体分染法(chromosome banding pattern technique)が相次いで開発され³⁾⁴⁾、ヒトを中心にした細胞遺伝学は急速な進展を遂げた。染色体分染法とは、染色体の縦軸方向に沿って多数の横縞(bands)を描出し、検出される特徴的なbandのパターンにより、個々の染色体を正確に同定できるばかりではなく、染色体の部分的識別が可能となり染色体構造異常の解析精度が飛躍的に向上した。

染色体異常症とは、染色体の部分または全体の欠損や挿入の結果起こる疾患である。各染色体上には、数百から数千の遺伝子が座位しており、その症状は、主に発育障害、精神遅滞、奇形などである。しかし、染色体異常症の80~90%は自然淘汰される。事実、自然流産の約半数以上に染色体異常がみつまっている⁵⁾⁶⁾。ヒトゲノムの遺伝的な長さは約3,000cM(centimorgan)とされているが、1,000band期の小さなsub-band1個は3cM、塩基対にすると 3×10^7 塩基対に相当する。もし濃染bandには遺伝的に非活性なDNAが多くDNA圧縮率も高いとすると、1個の淡染sub-band内でも約50個以上の遺伝子が含まれることになり、光学顕微鏡レベルのband構造と遺伝子との間にはきわめて大きな隔たりが存在するといわねばならない。この両者のギャップを狭めるべく登場したのが分子細胞遺伝学である。

in situ ハイブリダイゼーション法は、DNA配列の存在を直接染色体の標本上で証明する方法である。精度は比較的良好約 12×10^7 塩基対でも、染色体上の特定配列の局在を同定できる。従来目標とするDNA領域の標識にはRIが用いられていたが、近年、非放射性物質のビオチンやデオキシゲニンなどのハプテンを利用した標識法や蛍光検出法などが開発され、FISH(fluorescence *in situ* hybridization)法が普及している。FISH法の特徴のひとつは古典的な染色体分析では不可能であった複雑な転座や染色体の増幅などの構造変化の診断を可能にしたばかりでなく分裂中期のみならず

間期核を使った間期細胞遺伝学(interphase cytogenetics)という新しい手法を登場させたことであろう。

FISH法の臨床応用：

FISH法は、染色体上のシグナルの位置を直接検出でき、古典的な染色体分染法では診断できなかったような疾患との関連性が示唆される責任領域を検出することにより、客観的に微細な異常の診断ができるようになった。FISH法が注目されているのは各染色体に特異的なcentromere近傍のプロンプを用いて13, 18, 21および性染色体(X, Y)の数的異常をスクリーニング的に迅速に検出する間期細胞遺伝学で、産科的には母体血中胎児細胞による出生前診断、精子の染色体分析⁹⁾¹⁰⁾、初期胚の染色体分析^{11)~15)}などに応用されている。

1) 母体血中胎児細胞による出生前診断

羊水診断や絨毛診断は母体や胎児に多少とはいえ危険を伴うことがあり受診者の不安材料の一つとなっている。非侵襲的な方法を目指したのが母体血にわずかに存在する胎児由来の細胞を利用した診断法である。母体血中には胎児由来の3種類の細胞(絨毛細胞、リンパ球と赤芽球)が循環しているといわれているが、現時点では母体血中の胎児由来細胞候補としては赤芽球が最も広く使用され、出生前診断法に関する研究が進んでいる。胎児赤芽球膜表面に存在するTransferrin ReceptorとGlycophorin Aに対するMcAbを利用しフローサイトメトリー法や免疫磁気ビーズ法で赤芽球細胞を濃縮し、満足すべき成績が得られたとの報告が多い。形態的には陽性細胞の大半は無核の網状赤血球で、約20mlの母体血から2,000~20,000個の陽性細胞が選別され、その約10%が赤芽球であることが確認された。選別された陽性細胞のゲノムDNAからY染色体特異領域DNA塩基配列をPCR法で増幅し胎児性別判定を試みることから本研究は開始された。我々も羊水検査で染色体数的異常胎児を妊娠していると診断された妊婦から静脈血を採取し胎児特異的McAbを用いた免疫磁気ビーズ法で赤芽球を濃縮し染色体特異のプロンプによるFISH法で21トリソミー、18トリソミーの診断に成功している⁷⁾⁸⁾。我々の経験でも、

Patients	Disomy 18	Disomy XX	Disomy YY	Disomy XY	Diploidy	Total
1	0.14	0.12	0.15	0.40	0.18	10,029
2	0.13	0.13	0.09	0.34	0.12	11,271
3	0.12	0.09	0.10	0.19	0.15	10,000
4	0.20	0.10	0.17	0.45	0.12	10,082
5	0.16	0.08	0.12	0.37	0.11	10,120
6	0.18	0.15	0.11	0.40	0.17	10,030
7	0.11	0.06	0.20	0.46	0.13	10,000
8	0.16	0.13	0.13	0.26	0.09	10,000
9	0.19	0.07	0.07	0.35	0.19	10,000
10	0.12	0.10	0.14	0.39	0.10	10,000
Controls Average	0.14	0.15	0.14	0.14	0.10	50,000

Frequency of XY Disomy is significantly higher than that of controls at $p < 0.01$

図 1 The Frequencies (%) of 18 and Sex Chromosome Disomy and Diploidy in Patients with Oligoasthenozoospermia and Controls

免疫磁気ビーズ法で胎児赤芽球をある程度濃縮できてもかなりの量の母体細胞の混入が診断の障害となっているし、胎児細胞の分離・選別される割合が妊娠時期によってどのように異なるのか基礎的データの持ち合わせもない。母体血採取の至適な時期を決定するのも大切なことであるし、母児間の ABO や Rh 不適合が胎児赤芽球の検出頻度にどのような影響を与えるかについても考えておく必要があろう。欧米の大規模合同研究である「Nifty Study」では、1,500 人の妊婦を対象に母体血による出生前診断が試みられた。方法は免疫磁気ビーズ法で赤芽球を濃縮後、FISH 法で性別判定、21 番、18 番染色体の検出を行っているが、男性胎児における Y 特異的シグナルの出現率は 45% に過ぎず、5% 以下の頻度で疑陽性例を認めている。しかし、染色体異常症の検出率は高く 80% に異常数のシグナルがみつかったと報告している。母体血による出生前診断の目的が達成できるにははまだ道遠しの感が否めず精度の向上のためには新たな breakthrough が必要であらう。

2) ヒト精子の染色体分析

精子は 1 個の核で、その染色体構成を調べることは困難であった。ヒト精子の染色体研究を可能にしたのは、透明帯除去したゴールデンハムスター卵にヒト精子が受精できることが分かってからで(異種間体外受精)、この現象を応用したヒト

精子染色体分析法が開発された。本法では精子 1 個の分析に 1 個のハムスター卵が使用される。そのため精液の入手に合わせて昼夜を人工的に調節した環境下で飼育されたハムスターに過排卵処理する必要がある、数多くの精子を分析するのは至難の技であった。その後、ハムスター未受精卵の凍結保存が可能になり精子分析はかなり便利になったとはいえ、異種の卵子に受精した後に入る分裂中期の細胞でしか観察できないという技術的な煩雑さや精子分析数は 1 回の実験で数十個というように限界があり本研究の発展の妨げとなっていた。

FISH 法を用いれば間期細胞核内のシグナル数により数的異常の診断は簡単である。プローブには目的とする染色体に特異的な DNA が使用される。FISH 法では一度に数千から数万の染色体異常の観察ができる。しかし、すべての染色体の数的な異常が識別できる訳ではなく、準備した染色体プローブに限った情報しか得られない。また、ハムスター卵子を用いた場合に分析できた構造異常の有無は FISH 法では困難である。

しかし、1990 年代になって FISH 法による精子染色体分析が相次いで発表された。主に X, Y, 1 番, 13 番, 16 番, 18 番, 21 番染色体に特異的な DNA プローブが使用されている。Rubino et al.⁹⁾ は正常な男性精子の分析を行い、98.73% が正常一倍

性、異数性検出頻度は 1.27% であった。異数性の内訳は、21 番染色体のダイソミーの出現率が各々 0.37%, 18 番染色体のダイソミーは 0.10%, 二倍性精子の出現率が 0.25% であった。我々の施設でも乏精子症、精子無力症男性から提供を受けた精子を用いて精子染色体分析を行った。分析には X, Y と 18 番染色体特異的プローブを用いた¹⁰⁾。対照として 10 人の健常男性から得られた精子 50,000 個について分析したが、乏精子症・精子無力症男性では有意に XY ダイソミーの頻度が高いことが明らかにされた(図 1)。最近、乏精子症や精子無力症男性に対しては ICSI (intracytoplasmic sperm injection) 法がなされているが、本研究結果をみると性染色体異常児の出生の可能性についても十分に説明しておく必要がある。

3) ヒト初期胚の染色体分析

受精卵の第 1 次染色体異常頻度は、卵子の第 2 成熟分裂で生ずる染色体不分離による異常、さらに受精時に生ずる種々の倍数性異常などが加わり 50% を越えるとされている。

ヒト体外受精・胚移植が行われるようになってから、形態異常や余剰の受精卵の染色体研究ができるようになった。しかし、もともと体外受精による胚には染色体異常、とくに多倍体の出現率が高いことがマウスやウシなどの哺乳動物で報告されてきた。とくに多倍体の高出現率は、本来、哺乳動物卵子に備わっている単精子受精を保障する多精子防御機構が体外受精という体内環境と異なる条件で、その役割をうまく果たせなかったことに起因していると考えられてきた。多精子受精によって生じた多倍体の胚は、前核形成期において前核数が 3 個以上観察できるので判定できる。また、多倍体の一部の胚は胚盤胞まで発育し着床するものもあるが、ヒトではほとんど流産する。

多くの研究者がヒト受精卵や初期胚の染色体標本作製を試みてきた。1992 年に, Zenzes and Saper は 30~40 個の割球からなる胚盤胞の染色体分析を行い、25~40% に染色体異常を認めたと発表した。その内訳は二倍体と数的異常のモザイクが大半で、分割の過程で発生する二倍体と一倍体、二倍体と四倍体のモザイクも存在した。最近、染色

体標本技術も改良され、胚盤胞の一部から、絨毛細胞のように精度の高い band 標本が作られ詳細な結果が得られるようになったが世間の注目は染色体分析から FISH 解析に移ってきた。

初期の初期胚の FISH 解析は、X と Y の性別判定から始まった (Griffin et al.¹¹⁾, Harper et al.¹²⁾。その後、体外受精で胚移植に用いられなかった受精卵を使って多種の染色体プローブによる FISH 解析が行われるようになった。FISH 法の利点は、胚を構成するそれぞれの割球について分析できることである。

想像されたように、分裂が停止したり発生異常をきたした初期胚には数的異常やモザイクが高頻度 (56.5%) に存在することが明らかにされた (Munné et al.¹³⁾。また、一連の研究で常染色体のモノソミーでも少なくとも初期発生の段階では淘汰されないことも明らかになった。

一方、外見上に正常発育を遂げている胚にも、染色体異常が高頻度に存在する (Harper et al.¹⁴⁾, Munné et al.¹⁵⁾。数的異常の出現率は低く、30% 近くは異数性染色体や多倍体との低頻度モザイクであった。我々も余剰胚の FISH 解析を行っており、高頻度の異常を認めている¹⁶⁾。しかし、使用された初期胚は不妊問題を抱えている女性から得られた卵子を用いたもので、必ずしも正常女性から得られた受精卵や初期胚の染色体分析結果を代表するものではない。Delhanty et al.¹⁷⁾ は、妊孕性を有する X 連鎖遺伝病の保因者である女性から提供された受精卵・初期胚を分析する機会を得た。この研究は一般的に生殖効率の悪いヒトという種においてその理由を解明し受精と初期流産の間にある未知の部分の明らかにするには貴重なものであった。彼女らは 93 個の受精卵を分析した。分析には X, Y, 1 番染色体に特異的なプローブを用いた 3 色カラーによる FISH 解析を行った。93 個の初期胚の染色体分析は不妊問題を抱える女性の体外受精で提供された受精卵・初期胚とほぼ同じような結果であった。非モザイクで数的異常胚は 2 個のみで、22 個はモザイク、そのうち 4 個は構成する割球のほとんどが数的異常で、もともとは数的異常胚に由来するものと思われた。

体外受精から得られた受精卵のなかに割球ごとに染色体構成が異なるものがあり、このような胚を chaotic と命名した。その後の彼女らの研究から chaotic 胚は特定のカップルに集中して出現していることが分かった。出現率は女性により異なるが、どのような機序で発生するのかは分かっていない。Zenzes et al.¹⁸⁾は過去の初期胚染色体研究において、体外受精・胚移植が妊娠不成立に終わった女性に chaotic と思われるような異常分裂胚が多いことを示し、妊娠成立した女性では染色体の正常胚が有意に多かったと述べている。

chaotic であることとモザイクとは密接に関連している。正常発育を遂げている胚におけるモザイク頻度は Munné et al.¹⁵⁾の報告の方が Harper et al.¹⁴⁾のものよりかなり高いが、chaotic という分類をしなかったことが理由となっている。Delhanty et al.¹⁷⁾の指摘している chaotic な胚をモザイクと判定すると全体の染色体異常胚の出現率は Munné et al.¹⁵⁾とほぼ同頻度の 30% となる。

Delhanty et al.¹⁷⁾は、発育良好胚と染色体異常出現率の検討も行っているが、良好な grade I の初期胚における染色体モザイクや chaotic の出現頻度は低く、不良胚である grade II や III では正常と異常の出現頻度はほぼ同率であったと述べている。FISH 法で分析しなければ異常な胚かどうかは判定できず外見上正常として子宮に戻されることもあろう。chaotic 胚は着床したとしても成育していく可能性は少ないので前もって取り除ければ、それだけ体外受精・胚移植の妊娠率や生児獲得率の向上に結びつくことになる。同様に、二倍体と異数性とのモザイク胚の子宮内成育の予後については未知であるが、多くは妊娠反応陽性のみの化学的妊娠の経過を辿り胎嚢も形成されず吸収されるのでなかろうか。

4) 疾患原因遺伝子の有無の検出

先天性疾患と関連する遺伝子の染色体上の責任領域が分かれば FISH 法を用いて検出でき、客観的な微細な変化の判定も可能である。このような疾患の代表としては Prader-Willi 症候群 (PWS)、Angelman 症候群 (AS) と Miller-Dieker 症候群 (MDS) がある。PWS は乳児期の筋緊張低下と、そ

の後顕著となる肥満、精神発育遅滞、性腺発育遅延を主徴とし、低身長、短い手足、アーモンド様眼裂などの小奇形を呈する症候群である。典型例では第 15 番染色体長腕 q11.2 の染色体微細欠失が認められる。一方、AS は、重度精神遅滞、癲癇、発作的な笑い、筋緊張低下、小頭、下顎突出、あやつり人形様失調歩行などを特徴とし、患者はほぼ PWS と同一部位の欠失が報告されている。同一部位の欠失が認められるが、全く臨床症状が異なることからゲノム刷込み現象の代表例としてこれらの疾患は有名で、欠失した染色体が父由来なら PWS に、母由来なら AS となる。

MDS とは滑脳症と顔貌の異常を伴い、患者の大多数に第 17 番染色体の短腕 p13.3 を含む欠失が認められる。

5) 複雑な染色体異常の検出

以上述べたのは代表的な遺伝子特定領域の欠失により発症する先天異常であるが、微小部分の相互転座を保有する家系で転座部位近傍の cosmid DNA を用いた FISH 法で出生前診断に成功している。分子細胞遺伝学の進歩、とくに FISH 法の登場は染色体の構造や機能についてより微細な分析が可能になった。しかし、通常の G band 法や cosmid DNA による FISH 法をもってしても染色体の末端部 (telomeric region) の変化を捉えることはできない。近年、ヒト染色体末端部の telomeric region に特異的なプローブが開発され cryptic で確認できないような染色体末端部の異常の有無も検出できるようになった。この telomeric FISH は、染色体末端部に転座を有する家系の出生前診断には極めて有用で今までにいくつかの家系において臨床応用を試みている¹⁹⁾。

SKY (spectral karyotyping) 法とは特定の染色体の全体像を蛍光シグナルとして描出する染色体 painting 法と複数の hybridization signal を異なった蛍光色素で描出するマルチカラー法で FISH 法の基本的な応用法のなかでも特筆すべきものといえよう。これら 2 つの技術を合わせて、マルチカラー FISH 法の究極ともいえるべきヒト染色体の 24 種類を染め分ける multiplex-FISH 法²⁰⁾²¹⁾が開発された。現在、筆者らは G band 法、telomere FISH

法に加え SKY 法を症例に応じて使い分け先天異常の診断や出生前診断に応用している²²⁾。

CGH(comparative genomic hybridization)法が、最近注目を浴びている。CGH 法というのは標的細胞と対象細胞由来 DNA 断片をそれぞれ異なる色素で標識し等量混合したものをプローブとし、正常細胞分裂中期標本の鋳型にハイブリダイズして標的細胞における特定の染色体領域の欠損、増幅といった質的变化を 2 つの色素の相対量の変化として検出する方法である。CGH 法が copy number karyotype の決定法といわれるように、本法では複雑な染色体異常を呈する固形腫瘍でも特定染色体あるいは特定領域の欠損、増幅の同定が可能である。また、CGH 法では全染色体を見渡して異常を同定できることから、癌化に伴う新しい遺伝子増幅領域を探索するのに非常に優れた方法である。実際、種々の腫瘍細胞株や散発例をサンプルにした CGH 解析から、いくつかの新規遺伝子増幅領域や欠損がみつかってきている。このように CGH 法は癌領域で多大な業績をもたらしているが、生殖医療においてもその利用が考えられている。Munné et al. は着床前遺伝子診断に使用される 1 割球の染色体数異常のスクリーニングにこの方法が利用できる可能性を検討している。

単一遺伝子病

単一遺伝子病の数は約 9,700 である。この単一遺伝子病のなかで責任遺伝子の判明している疾患の数は 3,000 程度である。1980 年代に始まった単一遺伝子病の責任遺伝子の hunter の時代はまだ終わっておらず、多くの研究者の努力が続けられている。単一遺伝子病であっても、ひとつの遺伝子が 2 つ以上の遺伝病に関係している例も多く、遺伝病の多様性は責任遺伝子の種類の多さだけでなく、その発症機構の多様さにも存在することが明らかにされた。単一遺伝子病症例を多く集め遺伝子解析が行われており、病気の重篤度や予後と遺伝子変異との関連性が検討されているが、責任遺伝子変異が同定できても、各症例の重篤度や予後を予測できないことも示されてきた。これらの事実は遺伝カウンセリングや出生前診断の是非などを一層複雑なものにしている原因のひとつと

なっている。多くの単一遺伝子病の基本は Mendel 遺伝の法則で理解できるが、最近この Mendel 遺伝で説明のつかない遺伝現象が知られるようになってきた。たとえば、AS や PWS に代表されるゲノム刷込み現象、脆弱 X 症候群、ハンチントン病、球脊髄性筋萎縮症など triplet repeats 病(3 塩基反覆伸長型遺伝病)における表現促進現象、mRNA の成熟過程における遺伝子配列の変化する mRNA 編集などの現象は、いずれも Mendel 遺伝では説明できない。このように単一遺伝子病とはいえ、以前考えられていたように「1 遺伝子 - 1 酵素」という単純な解釈では説明できないことも次第に明らかになってきた。

単一遺伝子病の診断には遺伝子診断が必要である。遺伝子診断は従来の遺伝生化学的検査とは異なる面を有している。その特徴を列挙すると、①個体を形成する細胞はすべて同じ遺伝子構成を有している。したがって神経疾患であっても血液細胞の DNA で診断できる。②個体が発生して以降、遺伝子構成は変化しない。そこで生まれる前の胎児期の診断(出生前診断)が、また、ハンチントン病のように晩期発生する疾患では発症前診断も可能である。③遺伝子は血縁者間で共有されている。被検者は遺伝情報について「知る権利(right to know)」と共に「知りたくない権利(right not to know)」も有しており、いずれも尊重されねばならない。よって遺伝子検査は、それを受ける者の自主性に基づいた意思決定に従って行われる。遺伝情報の守秘義務は当然のことであるが、得られた被検者の診断結果が、血縁者での発症予防や治療に確実な情報として利用でき、その血縁者が蒙る重大な被害が確実に防止できると判断され、その血縁者からの情報開示の要望があり、繰り返し被検者に説明しても同意が得られず、かつ被検者本人が不当な差別を受けないと判断された場合、診断、予防、治療に限って遺伝情報を開示することも許される。

1985 年以来、約 20 年弱にわたって各専門施設の協力のもとに単一遺伝子病の出生前診断を行ってきた。疾患は 21-水酸化酵素欠損症、血友病、Duchenne 型、Becker 型筋ジストロフィー、Lesch-

Nyhan 病, 筋緊張性ジストロフィーなど 20 種類に及んでいる。

多因子疾患

単独では小さな効果しかない複数の疾患感受性遺伝子が相互作用することにより発症する疾患とか, 多様な遺伝因子と環境因子の相互作用で発症する疾患を多因子疾患と定義している。多因子疾患には, 高血圧, 糖尿病, 高脂血症, 心筋梗塞などの生活習慣病, 統合失調症(精神分裂病), 口唇・口蓋裂, 先天性心疾患などの疾患が考えられる。多因子疾患は頻度が多いばかりでなく, 慢性的で医療全体からみても最も解明の待たれる疾患群である。これらの疾患は Mendel 遺伝はしないが, 遺伝的要因が重要であるという多くの証拠が家系分析や双胎研究などの疫学調査からも明らかである。これらの疾患の多くは多数の家系解析により得られた経験的リスクが相談者に告げられるということに対応されてきた。

現在, 多因子疾患の遺伝的背景の解明に向け, 各個人のもつ 1 塩基の違いによる遺伝子多型(SNP: single nucleotide polymorphism)を体系的に収集し, 正常群と疾患群で比較するというプロジェクトが進行中である。この研究の積み重ねにより, 多因子疾患の疾患感受性遺伝子の同定や各個人の発症リスクの推定が可能になるものと期待されている。

1) 妊娠中毒症と Angiotensinogen 遺伝子多型についての研究

1993年, Ward et al.²³⁾は, 149名のPIH(pregnancy induced hypertension)あるいは preeclampsia を発症した白人女性と Angiotensinogen 遺伝子 M235T 多型との関連について調査した。人種間の関連を知るために我々も協力し日本人で PIH, preeclampsia を発症した女性についても同様多型分析を行った。T235 の検出頻度は白人よりも非白人において有意に高率であった。T235 の SNP を有する白人女性では preeclampsia と有意の相関があることが明らかになった。しかし, 日本人ではこの有意差を明らかにすることはできなかった。そこで, 改めて我々は日本人女性における妊娠中毒症と Angiotensinogen SNP M235T との関

連について再検討した²⁴⁾。313 人の日本人妊婦を Angiotensinogen SNP に従って, TT, MT, MM 型の 3 群に分類した。313 名の妊婦のうち 33 名に PIH が発症したが, Allele T は preeclampsia, PIH, 正常妊婦間で同じ検出頻度であった。ただ, TT 型において本態性高血圧の発現頻度が高いことが判明し, この TT 型ホモは妊娠中毒症の予知というよりは潜在していた本態性高血圧と関連があることが示唆された。

2) 葉酸代謝遺伝子 1 塩基多型とダウン症発症に関する研究

葉酸は DNA 合成の前駆体生合成に必須のビタミン B 複合体で, 慢性的な欠乏状態は異常なメチル化, DNA 鎖破断, 染色体組み換えの変化, 染色体分離異常の原因と考えられている。そこで葉酸代謝に関連する 2 つの遺伝子多型とダウン症発症に関連があるかについて検討した。対象は, ダウン症を出産した母親 68 名, 正常児出産の母親 175 名で, 各群の年齢と経産回数はマッチさせて分析した。分析した SNP は MTHFR(methylenetetrahydrofolate reductase)の C677T と MTRR(methionine synthase reductase)の A66T である。その結果, MTHFR 多型には有意差はなかった。しかし, MTRR 多型の GG 型に AA+AG 型に比し, ダウン症児をもつ母親が有意に少なかった。これは白人とは逆の結果であった。

これらの結果から疾患感受性遺伝子の SNP 情報, 体質に関わる SNP 情報は人種ごとに収集する必要があることを改めて痛感した。

体細胞遺伝疾患

単一遺伝子病, 多因子疾患のいずれも遺伝子型は生殖細胞を含む体の全細胞で共通であり次世代に受け継がれる。癌は遺伝子変異を基盤に発症する疾患であるが, その変異は特定の体細胞のみに認められ, 他の体細胞には存在せず Mendel 遺伝しない。しかし, 家族性腫瘍の場合にも同様に癌細胞には種々の遺伝子変異が認められるが, 癌細胞以外の体細胞にも同じ変異を一方の対立遺伝子に認め Mendel 優生遺伝形式をとることがある。癌遺伝子の解析と臨床応用の試みとして, 日本人卵巣癌患者と BRCA1 遺伝子について検討した。

この遺伝子は乳癌、卵巣癌多発家系を用いた連鎖解析から 17 番染色体長腕 q21 の領域に mapping され遺伝子として単離された。欧米では乳癌・卵巣癌家系について調査がなされ生殖細胞遺伝子変異 (germline mutation) が相次いで報告された。1992 年、この遺伝子が癌抑制遺伝子として機能していることが示され、*BRCA1* と乳癌・卵巣癌のみならず内膜癌との関連にも興味をもたれるようになった。しかし、日本人にも卵巣癌患者において *BRCA1* 遺伝子変異が関与している可能性が推定されるが体細胞レベルの変異で癌発生に至ったのか生殖細胞の変異が関与しているのかどうかは不明であった。そこで日本人において卵巣癌の発生と予後に *BRCA1* がどのように関わっているかを検討する目的で以下の実験を行った。

1) 日本人卵巣癌患者と *BRCA1* 遺伝子

対象は卵巣癌患者 76 症例 (5 例は乳癌の既往、4 例は家族内に卵巣癌、残りの 67 例は散发例) である。まず癌病巣部および健常組織から DNA を抽出、PCR-SSCP 法で変異部位を検索。うち 4 例 (5.3%) の癌組織に変異を同定した。変異の種類は塩基の欠失/増幅による frame shift が 2 例、nonsense mutation が 1 例、intron 内の 1 塩基置換が 1 例であった。いずれの症例でも正常組織から抽出した DNA に同様の変異が認められ生殖細胞レベルの変異 (germline mutation) であった。今回の結果からこの遺伝子が散发性の卵巣癌の発生に関連している可能性は少ないことが確認されたが、家族発生するような家系の女性には本遺伝子変異のスクリーニングを積極的に行い変異があれば集中的に管理し卵巣癌の早期発見・治療に努めれば生命予後が劇的に改善されることになろう。

2) 日本人卵巣癌患者における *BRCA1* gene copy 数の FISH 解析

1984 年から 1997 年の間に行われた 47 例の卵巣癌 paraffin 切片を試料に *BRCA1* 遺伝子の FISH 解析を行った。患者の平均年齢は 51 歳 (33~64 歳) であった。スライドを 2 枚ずつ作成し 1 枚は HE 染色で悪性部位と間質を確認。もう 1 枚を FISH 検索に供した。悪性部位および間質領域より重なり of the 少ない標本部位を選び 17 番染色体

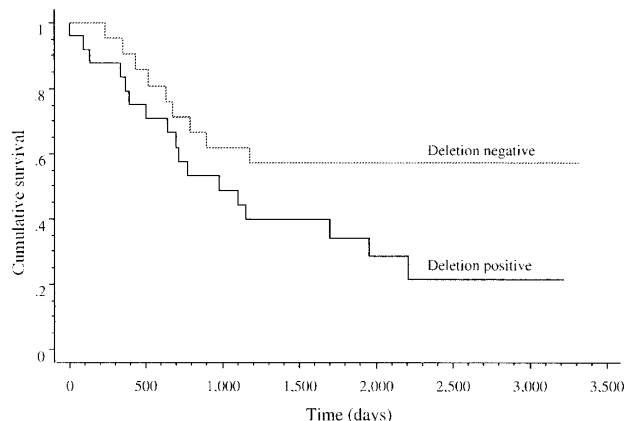


図2 *BRCA1* 遺伝子 deletion positive と negative の生命予後

の centromere 領域を緑、*BRCA1* シグナルを赤で表示し、deletion の有無を算定した。結果は、① 47 例の卵巣癌組織のうち、25 症例 (53.2%) が deletion positive であった。② deletion positive の症例の発生年齢は negative に比して有意に若かった。③ 癌の進行期との関連では高い程 deletion positive 例が高くなる傾向がみられた。④ Kaplan-Meier でみた生存曲線は deletion positive 症例ほど不良であった (図 2)。

最近、DNA Chips による遺伝子検査法が登場している。DNA Chips とは DNA を高密度に整列化したものでプローブ DNA とのハイブリダイゼーションにより遺伝子発現量、SNP などの解析に用いられる。今回は癌そのものではないが子宮頸癌に関連深い HPV (human papillomavirus) 感染の有無を STD (sex transmitted disease) を心配して来院した十代女性を対象に検索したのでその成績の一端を紹介する。新しく開発された HPV DNA Chips 上には 22 種の HPV type 別プローブが配置され、それぞれの位置に検体 DNA を反応させれば陽性の有無のみならず HPV の type を検出することができる。ここ 6 カ月間に 50 名の十代女性の HPV 感染の有無および HPV type の検査を終了したが、驚くべきことに 20 名 (40%) の女性が HPV 感染陽性でしかも HPV type はすべてハイリスク群であった (図 3)。これら陽性者には厳重な follow up が必要と考えている。

Characteristics	HPV Negative (n=30)	HPV Positive (n=20)
Age (y [range])	17.9 ± 1.1 [15 ~ 19]	17.7 ± 1.3 [15 ~ 19]
Occupation		
Student	21	18
Part-timer	5	1
Others	4	1
Menarche	12.1 ± 1.2 [10 ~ 15]	12.7 ± 1.5 [10 ~ 16]
Age at first coitus	16.0 ± 1.4 [14 ~ 19]	15.0 ± 1.1 [13 ~ 17] *
Condom use		
Yes (not always)	13	8
No	17	12
No. having undergone D/C	6	2
No. of sex partners	5.1 ± 6.0 [1 ~ 20]	9.3 ± 8.0 [1 ~ 30] *
Partner's occupation		
Student	11	8
Salaried man	10	4
Part time worker	6	1
Others	3	7
Other venereal diseases		
Chlamydial infection	6 (20%)	7 (35%)
Gonococcal infection	1 (3.3%)	3 (15%)

Values are given as mean ± SD. * Statistically significant differences.

図3 Participant characteristics

おわりに

ヒトゲノム全塩基配列の決定を背景に、臨床医学の領域ではDNA Chips 解析などの新しいテクノロジーを駆使し、ウイルス診断のみならず分子病態解明、薬剤感受性遺伝子や疾患関連遺伝子の同定、さらにはそれに基づいた遺伝子医療への応用が進み、オーダーメイド医療や予防医学への展開が予想される。また、今後、分子標的治療や遺伝子治療などの最先端治療法の開発にも、より一層拍車がかかるものと推察される。

文 献

1. Tjio JH, Levan A. The chromosome number of man. *Hereditas* 1954; 42: 1—6
2. Lejunne J, Gautier M, Turpin R. Les chromosomes humains en culture de tissus. *C R Acad Sci (Paris)* 1959; 248: 602—603
3. Sumner AT, Evans HJ, Buckland RA. New technique for distinguishing between human chromosomes. *Nature New Biol* 1971; 232: 31—32
4. Seabright M. A rapid binding technique for human chromosomes. *Lancet* 1971; 2: 971—972
5. Suzumori K. Studies on the cytogenetic fields of human abortion. *Nagoya Med J* 1968; 14: 167—

192

6. BouéJ, BouéA, Lazar P. Retrospective and prospective epidemiological studies of 1, 500 karyotyped spontaneous human abortions. *Teratology* 1975; 12: 11—18
7. Zhao XX, Ozaki Y, Suzumori N, Sato T, Suzumori K. Enrichment of fetal cells from maternal blood by magnetic activated cell sorting (MACS) with fetal cell specific antibodies: One-step versus two-step MACS. *Cong Anom* 2002; 42: 120—124
8. Zhao XX, Ozaki Y, Suzumori N, Sato T, Suzumori K. An examination of different fetal specific antibodies and magnetic activated cell sorting for the enrichment of fetal erythroblasts from maternal blood. *Cong Anom* 2002; 42: 175—180
9. Rubino C, Simon C, Blanco J, Vidal F, Minguez Y, Egozcue J, Crespo J, Remohi J, Pellicer A. Implications of sperm chromosome abnormalities in recurrent miscarriage. *J Assist Reprod Genet* 1999; 16: 253—258
10. Nishikawa N, Murakami I, Ikuta K, Suzumori K. Sex chromosome analysis of spermatozoa from infertile men using fluorescent in situ hybridization. *J Assist Reprod Genet* 2000; 17: 97—102
11. Griffin DK, Handyside AH, Harper JC, et al.

- Clinical experience with preimplantation diagnosis of sex by dual fluorescent in situ hybridization. *J Assist Reprod Genet* 1994 ; 11 : 132—143
12. *Harper JC, Coonen E, Ramaekers FCS, et al.* Identification of the sex of human preimplantation embryos in two hours using an improved spreading method and fluorescent in situ hybridization (FISH) using directly-labelled probes. *Hum Reprod* 1994 ; 9 : 721—724
 13. *Munné S, Grifo J, Cohen J.* Chromosome abnormalities in human arrested preimplantation embryos : a multiple-probe FISH study. *Am J Hum Genet* 1994 ; 55 : 150—159
 14. *Harper JC, Cooneb E, Handyside AH, et al.* Mosaicism of autosomes and sex chromosomes in morphologically normal, monospermic, preimplantation human embryos. *Prenat Diagn* 1995 ; 15 : 41—50
 15. *Munné S, Alikani M, Tomkin G, et al.* Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil Steril* 1995 ; 64 : 382—391
 16. *Sato T, Ikuta K, Suzumori K, et al.* *Prenat Diagn* (accepted)
 17. *Delhanty JDA, Harper JC, Ao A, et al.* Multicolour FISH detects frequent chromosomal mosaicism and chaotic division in normal preimplantation embryos from fertile patients. *Hum Genet*, 1997 ; 99 : 755—760
 18. *Zenzes MT, Wang P, Casper RF.* Chromosome status of untransferred (spare) embryos and probability of pregnancy after in vitro fertilization. *Lancet* 1992 ; 340 : 391—394
 19. *Wakui K, Tanemura M, Suzumori K, Hidaka E, Ishikawa M, Kubota T, Fukushima Y.* Clinical application of two-color telomeric fluorescence in situ hybridization for prenatal diagnosis : identification of chromosome translocation in five families with recurrent miscarriages or a child with multiple congenital anomalies. *J Hum Genet* 1999 ; 44 : 85—90
 20. *Schöck E, du Monoir S, Verdman T, et al.* Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 1996 ; 173 : 494—497
 21. *Verdman T, Vigon C. Schöck E, Rowley JD, Ried T.* Hidden chromosomal abnormalities in haematological malignancies detected by multicolour spectral karyotyping. *Nature Genet* 1997 ; 15 : 406—410
 22. *Tanemura M, Suzumori K, Nishikawa N, Ishihara Y.* Multicolor spectral karyotyping for complex rearrangements in repeated abortion or congenital anomalies. *Prenat Diagn* 2001 ; 21 : 1123—1128
 23. *Ward K, Hata A, Jeunemaitre X, Helin C, Nelson L, Namikawa C, Farrington PF, Ogasawara M, Suzumori K, Tomoda S, Berrebi S, Sasaki M, Corvol P, Lifton RP, Laloue J-M.* A molecular variant of angiotensinogen associated with preeclampsia. *Nature Gent* 1993 ; 4 : 59—61
 24. *Suzuki Y, Murakami I, Suzuki Y, Suzumori K.* Is angiotensinogen gene polymorphism associated with hypertension pregnancy? *Hypertension in Pregnancy* 1999 ; 18 : 261—271

Abstract

It is only in the last few decades that the idea of grasping human disorders of the genomic level has begun to take serious hold. Looking back at historical main events, the proposal of the double helix structure of DNA by Watson & Crick in 1953 is notable or heralding the new era of genetic medicine. In 1973, recombinant DNA was produced for the first time and we entered "the times of the gene hunter". Newly developed technology, especially PCR enabled gene analysis from very small amounts of DNA from 1980, and the Human Genome Project began formally in 1990 as an international research effort with the goal of analyzing the structure of human DNA and to determine the location of the estimated 100,000 human genes. Through this research, a source book for biomedical research in the 21st century and beyond is being generated. Genes contain the chemical information that makes cells work. They instruct the cellular machinery to produce proteins vital to the cell's function. A protein is, indeed, the product of expression of a gene. When the gene is damaged, the protein-making instruction can become garbled and disease can result if the cell is unable to produce a protein it needs to be healthy, or if it produces an abnormal version of that protein. Thus, identifying, isolating, and studying genes and their functions is a powerful approach to achieving a better understanding of diseases, and we entered "the era of genetic disease candidate gene hunters" at the close of the 20th century. With the announcement of draft-sequencing of human genome reported in 2001, the currently human known genes are estimated to number almost 30,000–40,000.

Chromosomal anomalies, single gene defects, polygenic diseases and in addition, somatic cell mutations can give rise to hereditary disorders. Chromosomal analysis is the most common approach for clinical diagnosis of an abnormal fetus. Looking back at the history of cytogenetics, the initial methods involved application of conventional banding techniques which can reveal almost all numerical aberrations and usual translocations. However, it is sometimes difficult to identify small *de novo* unbalanced rearrangements. Advances in molecular cytogenetics, especially FISH (fluorescence *in situ* hybridization) have allowed generation of more precise information on chromosome structure. In this report, we describe telomeric FISH and SKY (spectral karyotyping) for subtle balanced translocation. We have also used this FISH technique for chromosome analysis of spermatozoa from infertile men. In addition, we introduced CGH (comparative genomic hybridization), which is useful for genome-scale screening for chromosome aberrations in tumors or single blastomeres. Current research in human genetics is providing more and more examples of the central role that genes play in human disease. From single gene defects to common disorders, evidence is mounting that genetic factors underlie susceptibility to a broad range of human health problems. We have found good examples in associations between an angiotensinogen gene polymorphism and hypertension in pregnancy, and an MTHFR (methylenetetrahydrofolate reductase) gene polymorphism and mothers at high risk of a Down child. A family history is a known risk factor in many common cancers. We have performed to assessing mutation analyses of the *BRCA 1* gene in ovarian cancer patients, in addition the relation between clinical features and deletion of the *BRCA 1* locus using the FISH procedure. Lastly, a relationship between persistent HPV (human papilloma virus) infection and cervical cancer has been proposed on the basis of epidemiological analysis. Now, STD (sex transmitted disease) is very common in young, sexually active people and we have investigated the HPV infection rate in teen age girls using HPV DNA Chips. The enormously increased technical capacity in genomic medicine and increased level of understanding of human biology will profoundly alter our approach, allowing tailor-made care with a shift from treating disease that is already advanced to a preventative mode, focused on identification of individual risk.