悪性腫瘍と DNA 診断 **

The molecular diagnosis of cancer

丸 山 昭 治*

SHOJI MARUYAMA B.S.

ヒト細胞ゲノム中のプロトオンコジーンを解明した M. Bishop, H. Barmas が今年、1989 年度ノーベル医学・生理学賞を受賞した。今、最も注目されている分野である。分子生物学ないし遺伝子技術自体はまだ歴史の浅いもので、これが臨床検査の分野に応用されるようになったのもここ数年のことである。したがって、期待の大きさはともかく、臨床検査の領域で立場を確立したものはまだない。緒についたばかりのこの新しい分野では、検査成績と臨床を結びつける情報が少なく、その意義も限界もこれから明らかにされていく段階である。つまり、従来の概念の延長線では解釈しきれないような所見に接して惑うことも多い。ここではそのような中でも、比較的良く利用・評価されつつある血液疾患での、腫瘍細胞の系統逸脱を思わせるようなケースの紹介を交えて、DNA 診断法の技術的な側面からの総論的解説を試みた。

索引用語：悪性腫瘍，DNA 診断，遺伝子異常，癌遺伝子，白血病

Key words : cancer, molecular diagnosis, gene abnormality, oncogene, leukemia

はじめに

臨床検査としての DNA 技術に期待される応用分野の中でも悪性腫瘍は特に大きなテーマで、従来の染色体分析法や cytometric な解析法とともに検体検査による癌の直接診断法として期待が大きい。癌診断の対象は遺伝子（ジーン）上に異常を生じ、そのために無制御にクローナルに増殖する悪性細胞群である。そして、発癌につながる遺伝子異常は全くランダムということではなく、ある程度の規則性・系統性を示すことがわかってきた。この遺伝子異常の発生が、従来は染色体分析によって追跡されてきたのであるが、残念なこと

にこれは顕微鏡レベルのものでしかない（塩基対 [bp] にして約数100万以上）。それが DNA 診断によれば、わずかに1塩基対の突然変異でさえも、オンコジーンの活性化を通じて発癌に至ると考えられる例も少なくない。一方、このような1塩基対異常まで含めると遺伝子変化の出現頻度は極めて高い。検出したい遺伝子の塩基配列に相補性の DNA プローブを用いて、両者の結合 (hybridize) の有無でみる現状の DNA 診断技術においては、この遺伝子異常の多様性は利点とも欠点ともいえるようで、技術の未熟さと相まって結果の解釈を難しくしていると感じられることもある。

遺伝子上の変化とその検出法^{1)~5)}

DNA 異常の類型としては、点突然変異 (point mutation) とグロースな変異とに分けられる。前者は1塩基ないし2~3塩基ほどの置換・挿入・

* (株) ビー・エム・エル総合研究所開発部長
BML General Laboratory, Biomedical
Laboratories, Inc., Saitama, Japan

** 第251回順天堂医学会学術集会〔Nov. 18, 1989 開催〕
〔Dec. 19, 1989原稿受領〕

欠失のため本来の機能を失い、あるいは異常発現をきたす場合である。後者は再構成〔rearrangement〕・転位〔transposition、細胞内の他のシーンの挿入 (insertion) や逆位 (inversion) などが含まれる〕・欠失〔deletion〕・重複〔duplication〕・増幅〔amplification〕、あるいは染色体間の大きな転座〔translocation〕などがある。さらに、外来遺伝子 (ウィルスゲノム) の組み込み〔integration〕によるものも含まれる。その他に遺伝子の発現〔expression〕、すなわち mRNA への transcript の亢進も重要な情報で、遺伝子診断の対象である。

遺伝子異常の DNA プローブによる検出法のうち、主として解析を目的とする定性法としては Southern blotting (DNA を対象、遺伝子自体の異常の解析)・Northern blotting (RNA を対象、遺伝子の発現状況の解析) および in situ hybridization (細胞レベルでの遺伝子の局在・増幅・発現などをみる) が重要である。対象遺伝子の性質は問わず、量を測定する目的には dot blotting・slot blotting が汎用され、特殊なケースでは Southern・Northern blotting の結果をデンストメーターで定量化することも可能である。

対象遺伝子の直接検出法としては、その遺伝子の全シーケンスまたはその一部 (通常、数100～数1,000bp) に相補的なプローブが用いられてきたが、最近では微小塩基対異常の検出も可能な、合成した小ヌクレオチド (allele specific oligonucleotide; ASO、通常20bp 程度) もよく用いられる。ただ ASO では、完全なシーケンスの一致が必要で、異常の位置や塩基の種類にバラエティがあれば対応しきれない。このため、従来のグロースなプローブを用いて、微小変化をみようとする RNase cleavage method (RNase sensitivity method、塩基対の不一致な部分を RNase で消化し、生ずるフラグメントを解析する) や、Duplex melting method (stringency の勾配を与えて泳動し、塩基対の不一致による2本鎖 DNA の変成のし易さを泳動距離でみる) などの工夫・改良も行われてきた。

間接的な方法としては、先天性疾患の解明に多用されてきた連鎖解析 (linkage analysis) がある。病原遺伝子が未知の場合のアプローチの手段で、家系の悪性腫瘍にも応用されてきた。この場合の対象としては、単一遺伝子の他に variable number of tandem repeat sequences (VNTRs)、つまり高い頻度の繰り返し配列を含むために、高い多様性を示す部分もよく用いられる。遺伝子異常に多様性がある、直接のプローブで全てをカバーすることが難しい場合にも有効で、つまり、異常遺伝子そのものを認識せずとも、それと密接にリンクするマーカー遺伝子であればそれを手がかりにするというものである。

DNA 検出の増感法として、近年特に注目されている polymerase chain reaction (PCR) 法⁶⁾がある。対象遺伝子の両端のシーケンスに相当するオリゴマー (プライマー、20bp ほどの合成1本鎖 DNA) と、DNA ポリメラーゼを用いて対象遺伝子を繰り返し複製・増量する方法である。耐熱性の Taq ポリメラーゼによる高温 PCR 法とその反応装置が開発されて、それまでの ideal な段階からいっきに実用化に及んだ。さらに適応性を高めるために、遺伝子情報の不確かな場合にも可能な anchored PCR 法・inverse PCR 法など多様な試みがなされつつある。現状レベルでは必ずしも理想的な増幅反応は得られず、低サイズフラグメント生成によるノイズの増加、ポリメラーゼの複写ミス (Taq ポリメラーゼは比較的その頻度が高く、約3～400塩基当たり1回といわれる)、テクニカルなコンタミネーションなど解決されなければならない問題も多い。しかし、従来の技術に直接応用し得てその超高感度化が可能であるのみならず、遺伝子材料の容易な調整 (プローブ作製)、プローブの不要なダイレクトゲル泳動法 (DNA の可視的な検出レベルまで増幅) など、極めて応用範囲の広がり、かつ実用性の高い画期的技術である。現在、この方法は特許権の保護のもとにあって、一般的な実用化が遅滞していることは残念だが、最近、Q β ファージのレプリカーゼによる複製反応など新しい原理の開発も盛んである。

核酸 (DNA・RNA) を対象とする新しい検査法という意味ならば、フローサイトメトリー・顕微測光法など cytometric な方法も極めて有用な手段で、急速に臨床検査の分野に浸透しつつある。たとえば、フローサイトメトリーは癌細胞の kinetic な追跡も可能であるなど、他にない特徴がある。しかし、これらはすでに独自の地位をなしている分野であるから、今回のテーマから省く。

DNA ポリモルフィズムと 制限酵素切断片多型性 (RFLP)

制限酵素 (restriction endonuclease) は 2 本鎖 DNA の特定の塩基配列 (1 ないし数塩基) を認識してこれを切断する能力を持つもので、すでに何 10 種類も知られている。それらの組み合わせで、いわば自由自在に遺伝子にハサミを入れることができる。この際、対象遺伝子上に変化が生じている場合には、この制限酵素による切断部位の消失・出現 (切断片の数の増減)、または切断部位のずれ (切断片の長さの変化) を生じることになる。従って、この切断片を電気泳動 (アガロースゲル) で分離、これをニトロセルロースフィルター・ナイロンフィルターなどに移し取って、必要な対象遺伝子に相補性のシーケンスを持ったプローブ (DNA・RNA) を hybridize させると、それによって染まる位置 (バンド) のずれと数の増減を生ずる (Southern blotting による DNA 解析の原理)。このバンドパターンは個々にいろいろな多様性を示し、その比較から個々の遺伝子異常を探索することができる。これまでの最もオーソドックスな方法の制限酵素切断片多型性 (restriction fragment length polymorphism ; RFLP) と呼ばれる原理である。ちなみに、1 塩基異常を含めると、従来の概念では相同 (homologous) といわれる遺伝子対の中にも、実際には数 100 塩基に 1 回ほどの配列異常があるといわれる。

プローブ (探索子) は目的とする遺伝子のシーケンスと対をなす (2 本鎖のペアーとなる) DNA 断片で、20 塩基ほどの合成スクレオチドから数

1,000 塩基の、実際の DNA 断片をプラスミドに組み込んでクローニングしたもの (多型情報量の連鎖検定によってその有用性が導き出されてきたもの) まで用いられる。プローブの検出には放射性同位元素 (^{32}P ・ ^3H) 標識によるオートラジオグラフィ、あるいはビオチン-アビジン法や抗体法 (蛍光法・酵素法) など、用途に応じた方法が選択される。

悪性腫瘍の遺伝子異常

1. 点突然変異 (point mutation)

単一ないし 2~3 塩基対の異常が、本来、正常な機能をもつヒトのプロトオンコジーン (c-oncogene) を活性化して発癌につながることは、いくつかの例で知られている。

ras 系オンコジーンはその代表的なケースで、Haras では codon 12 の G (guanine) が T (thymine) に (これにコードされるアミノ酸は Glycine から Valcine に変換)、codon 61 の A (adenine) が T に (Glycine が Leucine に) 置換されたものが、それぞれ膀胱癌・肺癌細胞に見出されている。同様に Ki-ras では、codon 12 の G が T に、codon 13 の G が A に、codon 61 の A が T に変わったケースが肺癌・乳癌に、N-ras でも codon 12 または 13 の G から A が、それぞれ奇型腫・血液腫瘍に、codon 61 の C (cytosine) から A が神経芽細胞腫で報告されている。特に codon 12 の異常が腫瘍の悪性度と関わりがあるといわれる。

微小遺伝子異常検出の最も確実な方法は、対象遺伝子をクローニングして塩基配列を全解析することであるが、実用的ではない。普通には、適当な制限酵素を選んで RFLP 解析が行われるが、酵素の認識配列に該当しないような例では非力である。ヒト遺伝子上に起こっている点突然変異に対して RFLP の有効な範囲は、わずかに 5~10% ほどといわれる。先述の ASO は目的のシーケンスを確実に検出できるが、オールマイティではない。グロースなプローブを用いる RNase clea-

vage method や duplex melting method などの試みも行われた。いずれにしても、点突然変異による遺伝子活性化のメカニズムや、その腫瘍特異性についてはまだ不明な部分が多い。

2. 遺伝子再構成 (gene rearrangement)

リンパ性白血病・リンパ腫における cell lineage の決定は重要な診断ポイントである。B細胞・T細胞はともに幹細胞から分化成熟していく段階で、それぞれ、免疫グロブリン (Ig) 遺伝子・T細胞レセプター (TCR) 遺伝子の再構成を経て免疫応答の多様性を獲得していく。遺伝子の座位は Ig H 鎖が14q32, κ L・ λ L鎖がそれぞれ2p22・22q11, TCR α (δ) 鎖が14q11, β ・ γ 鎖が7q32・7p12というように散在しており、細胞の分化・成熟にともなう、それらの再構成の過程は極めてよく類似している。そして、この Ig 遺伝子・TCR 遺伝子の再構成の有無をみることで、その lineage が判別可能である^{7)~9)}。Ig は、例えばH鎖J領域 (J_H), κ ・ λ L鎖C領域 (C_κ ・ C_λ), TCR は β 鎖C領域 (CT_β) がよく用いられ、制限酵素 BamHI・BglII・HindIII などによる Southern blotting で検出される。現状での検出感度は、組織化学的・免疫学的染色法併用による病理検査や、モノクローナル抗体を用いる immunophenotyping を上回るほどのものではなく、今後の技術改良が望まれる。また、従来の概念からみた分類に当てはまらないケースも散見され、判断に迷うことも少なくない。

〔例1〕IgH 遺伝子に明瞭な再構成を持つ症例 (Fig.-1)

4歳の common ALL 患者。白血球 19,000/ mm^3 , 芽球出現率20%。骨髓細胞による BamHI・EcoRI・HindIII の切断パターン上に全て再構成を認める。特に germ line バンド (コントロール) に比べ再構成バンドがいちじるしく強く、非常に大きなモノクローンの存在がうかがわれる。cALL の大多数で Ig 遺伝子再構成がみられ、L鎖のそれをみることで細胞の分化段階をうかがい知ることができるといわれる。本例は C_κ ・ C_λ 鎖ともに再構成がみられず、cALL の中でも分化

Fig.-1 IgH-Rearrangement (+) of Young (4 y) cALL Patient

の若いタイプといえる。

〔例2〕TCR, Ig 両遺伝子に再構成を示した症例 (Fig.-2 a・2 b)

70歳の ALL 患者。immunophenotyping は B-lineage. DNA 検査では J_H ・ CT_β 両遺伝子に再構成を持つ2重遺伝子型。Ig- C_κ ・ C_λ の再構成はみられなかった。cALL では2重遺伝子型を持つ症例がまれではない¹⁰⁾。考えられる機序の一つは、遺伝子の再構成の開始にともない、酵素作用等により他の遺伝子の再構成も誘発されるというものである。また、B-lineage ALL にみられる CT_β 再構成では、mRNA が全く検出されないか、または極く少量の不完全な mRNA のみであって、いわゆる休眠 CTR であるともいわれる。cALL の2重遺伝子型を示す例が全て30歳代以前であったとの報告もあるが、本例のような高齢者も例外というわけにはいかないようである。

〔例3〕TCR・Ig 両遺伝子に再構成を示す他の症例

66歳の CML の急性転化ないし AML と診断された患者。白血球33,500/ mm^3 , ペルオキシダーゼ染色陰性芽球70~80%・陽性芽球5~10%。immunophenotyping はB細胞マーカー・骨髓球

Fig.-2a IgH-, TCR-Double Rearrangement (+) of Old (70y) ALL Patient

Fig.-2b IgH-, TCR-Double Rearrangement (+) of Old (70y) ALL Patient

マーカーともに陽性. DNA 検索では前例同様, $J_H \cdot CT_\beta$ 両遺伝子再構成陽性の 2 重遺伝子型. $C_\kappa \cdot C_\lambda$ 遺伝子再構成は陰性. 本例はリンパ球系芽球と骨髄球系芽球が同時に出現した CML 急性転化の混合型と推測された.

3. 遺伝子欠失 (gene deletion)

網膜芽細胞腫は第13番染色体, Wilms tumor (nephroblastoma) は第11番染色体の, それぞれ

部分欠失 del 13q 14およびdel 11p 13を特徴とする遺伝性腫瘍であることで知られる. この他にも遺伝性の膀胱癌の del 11p, 大腸ポリポーシスの del 5p 21~22や特発性の肺小細胞癌の del 3p 14~21・del 3p 21~23など, 遺伝子の部分的な欠失が癌原要素となっている例は多い. このようなケースでは, 癌細胞と正常細胞を実験的に融合させるか, 正常遺伝子を癌細胞

に移入してやることで癌細胞の特徴が消失する現象がある. また遺伝子の異常に関して hemi-または homozygous であるか, または同一細胞内の対になる遺伝子座の両方に, 損傷があることが発癌の必要十分条件となる. anti-oncogene・tumor suppressive oncogene・two mutation theory という概念¹¹⁾は, 上記のような状況に沿って提唱されてきた. このような, いわゆる癌抑制遺伝子は, すでに単離されてシーケンスまで明らかな retinoblastoma susceptibility gene (RB 遺伝子) を除けば, まだ不明確なもの, 仮想段階のものも多い. 新しいものも次々に見出されている. これらの検出の手段としては, 主に RFLP による loss of heterozygosity をみることが行われる. つまり, 1 対の対立遺伝子が hetero-である人 (正常組織細胞の RFLPパターン上に複数のバンドを与える) を対象に, 癌細胞でのバンドの消失 (hemi-または homo-接合のバンドパターンを与える) をみるわけである. この場合のプローブおよび制限酵素は, hetero-の出現頻度のできるだけ高いものをいくつも組み合わせで検出精度を高めることが必要で, 研究用途には有効であるものの, これを臨床まで応用するには難がある. Zbar らは第 3 染色体上の多数の

polymorphic probe の中から3種類を用いて、突発性の腎細胞癌、肺小細胞癌の抑制遺伝子の存在を示唆した¹²⁾。この際、バンドパターンをデンストメトリーで定量化することが有効だが、バンドの消失を証明するものであるために、癌組織に浸潤した白血球などの正常細胞が精度に影響したという。

4. 染色体間の転座 (chromosomal translocation)

染色体間の転座による遺伝子再構成で、オンコジーンの活性化につながるケースは白血病・リンパ腫などで顕著にみられる。慢性骨髄性白血病 (CML) は第9・22番染色体間の相互転座 $t(9; 22)(q34; q11)$ によるものであって、生じた Ph^1 染色体の有無が最もよい診断マーカーとなる。DNA 検索ではこれを bcr (breakpoint cluster region) 遺伝子の異常 (再構成) の有無で検出することができる¹³⁾。9q34位にはc-ablオンコジーンと、比較的切断の生じ易いブレイクポイント (切れ方は一定していない) がある。一方、22q11には Ig λ L鎖遺伝子と5.8Kbほどの切断し易い領域 (bcr) がある。相互転座によって生じた Ph^1 染色体は、22番染色体の bcr に9番染色体長腕先端の abl が接合したもので、これにより bcr-abl 複合遺伝子が構成される。この際、bcr 上の切断領域は2個所にみられ、中間位置 (3'側 bcr エクソン領域) で組み換えが生じた場合には8.5Kb bcr-ab mRNA、それより5'側上流で生じた場合は7Kb bcr-abl mRNA が transcript される。その結果2種類のキメラ蛋白質 p210^{bcr-abl}・p190^{bcr-abl} が translate される。本来の正常遺伝子からは、6Kbおよび7Kb c-abl mRNA と4.5・6.7Kb bcr mRNA を経て、p145^{c-abl}・p160^{bcr} 蛋白質がコードされる。前者は細胞膜に局在してチロシンキナーゼ活性を持つ機能蛋白質である (後者の機能はまだ明確ではない)。p210^{bcr-abl} キメラ蛋白質も強いチロシンキナーゼ活性を持ち、これを与える上記遺伝子再構成の過程で正常な制御からはずれて産生亢進し、細胞の癌化へとつながると考えられる。

CML 患者では約90%以上に Ph^1 がみられ、そ

のほぼ97%以上に bcr の再構成 (bcr⁺) がみられる。その場合、bcr エクソンに相当する5.8Kbの狭い範囲に切断点が集中しており、p210^{bcr-abl} 蛋白質を産生する。一方、ALL はその約10~20%が Ph^1 、その中に bcr⁺と bcr⁻が約半々ほどにあるといわれる。bcr⁺ALL は主として CML と同様の bcr-abl 構成をとることが知られており、この病態を慢性期のとらえられなかった CML の lymphoid crisis とする考えもある。bcr⁻の Ph^1 ALL は CML と切断領域が異なり、bcr 遺伝子の5'側第1イントロンで生じたケース (p190^{c-abl}を与える) に相当するものと思われる。いずれにしても、染色体の相互転座という、大きな異常の背景に部分的な異常が複雑に及んでいるはずで、限られたプローブと制限酵素の組み合わせで検出されなかったとしても、それは bcr 遺伝子の再構成がないことの確証ではない点に留意すべきである。逆に、2重の転座などのために Ph^1 染色体が検出されない、いわゆる masked Ph^1 または hidden Ph^1 のような例では bcr 再構成がよいマーカーとなる。

〔例1〕 Ph^1 小児 ALL 2患者の bcr 再構成

5歳と4歳の同一所見を示す2例 (Fig.-3・4およびFig.-7の1) 2)) で、前者は0.6Kb (bcr 第2エクソンにまたがる領域) と1.2Kb (第3, 4エクソン間) のプローブを用いた Bgl II・BamHI・Hind III 切断パターンに germ line (コントロール) と一致するバンドのみがみられ、少なくとも3'側 bcr エクソン領域での再構成はなかった。後者は0.6Kb/Bgl II・Hind III・1.2Kb/BamHI・Bgl II に異常バンドがみられ、この領域での再構成が確認された。他の報告例では、小児 ALL では bcr⁻、成人で bcr⁺・bcr⁻の混在がみられたという¹⁰⁾。今回のbcr⁺小児 ALL 患者は、CML でも最もポピュラーな再構成パターンであるにもかかわらず、過去11回実施した染色体分析では、時期により Ph^1 出現頻度が0~100%の間で大きく変動し、明らかに CML とはいえないものであった。

〔例2〕 Ph^1 成人 CML 2患者の bcr 再構成 (Fig.-5, 6およびFig.-7の3) 4))

Fig.-3 bcr-Rearrangement (-) of Ph⁺ (5 y) ALL Patient

Fig.-4 bcr-Rearrangement (+) of Ph⁺ (4 y) ALL Patient

1例は臨床所見から CML と診断されたが、途中2回の染色体分析の結果 Ph⁺を全く見出すことのできなかった49歳の男性。DNA 検索では0.6Kb/Bgl II・1.2Kb/BamHI・Bgl II・Hind IIIで明らかな異常を検出し、CML と確定できた。おそらく、c-abl を含む第9染色体長腕末端部分が第22染色体 bcr 内に interstitial insertion し、これが光学顕微鏡レベルの量的変化に及ばなかったか、あるいは、極めて巧妙な転座があって分染法によっても染色体異常が認められなかったものであろう。つまり、masked Ph⁺として存在していたと考えられるわけである。

他の1例も、CML の診断にもかかわらず Ph⁺のみられなかった31歳の男性である。DNA 検索では0.6Kb/Bgl II・Hind IIIに明瞭な再構成がみられたが、1.2Kbでは BamHI・Bgl II・Hind IIIいずれにもみられなかった。これだけの結果では、むしろ技術上の問題も疑われるが、5 Kb (bcr エクソン全域にわたる) プローブを追加して再構成が確認された。この状況を遺伝子上の位置関係でみると Fig.-7の4) のようになる。すなわち、第3エクソンあたりで再構成があり、0.6 Kb を含む Hind III断片はむしろ伸長しているが、第3・第4エクソン間1.2Kb プローブに相当する位置が完全に欠落し、5.8Kb bcr エクソン領域は全体としてやや短縮されたと解釈される結果である。ちなみに、Ph⁺+CML で1.2Kb プローブで検出されない例は約10%程といわれる。Ph⁺-CML にはほとんど bcr 再構成がみられるはずとの報告もある¹⁰⁾。筆者らの bcr エクソン領域のプローブを用いての成績では、Ph⁺-CML の bcr⁺は本例のみ(数例の経験より)であった。CML の〈疑い〉や cMMoL、他の骨髄増殖性疾患などの可能性を含む対象を、一括して扱ったことに低検出率の1因はあるが、成熟細胞での表現型や遺伝子型に依拠する〈系統特異性〉が、未分化の幹細胞・腫瘍化細胞では必ずしも当てはまらないことを示す例とも感じられた。もちろん、技術上の未

Fig.-5 bcr-Rearrangement (+) of Ph⁺ (-) Adult (49y) CML Patient

熟さも未解決である。

5. 遺伝子増幅および発現 (gene amplification and expression)

オンコジーンなど、特定の遺伝子の増幅やその発現 (mRNA とそれによる蛋白の産生) の異常亢進が多く、癌で高頻度にみられ、その程度が悪性の臨床像 (進行性・転移性・治療反応性・予後など) とよく一致する。DNA 検査が癌の診断やスクリーニングにはまだ無力に近いレベルにある中で、この領域は、従来なかった新しい情報を提

供するという意味で、臨床検査としても早くから注目されてきた。一般的には増幅と発現亢進は平行してみられ、DNA・RNA の dot・slot blotting で定量される。Southern・Northern blotting のデンシトメリーや in situ hybridization も有効な方法である。dot・slot blotting で定量するに当たっては、DNA の絶対量を秤量するやっかいさを避けるため、ヒトゲノム中に普遍的に存在して変化のない遺伝子 (たとえば β -グロビン遺伝子など) のプローブを平行して用い、それとの比を正常コントロール細胞のそれに対比して、相対的増幅度・発現度として求めることが便利である。

増幅・発現亢進を伴うオンコジーンの種類は多いが、現在有望と評価されているものとして、血液腫瘍・胃癌・肺癌・乳癌などでの c-myc、神経芽細胞腫・網膜芽細胞腫での N-myc、肺小細胞癌での L-myc、肺癌・大腸癌の K-ras、CML の c-abl、乳 (腺) 癌・扁平上皮癌の c-erb B-2 などがある。

従来、薬剤での治療に対応してみられる癌細胞の染色体上の変化として、homogeneously staining region (HSR) や double minute chromosome (DMs) が知られている。これらは同じ現

Fig.-6 bcr-Rearrangement (+) of Ph⁺ (-) Adult (31y) CML Patient

Fig. -7 bcr-Rearrangements of Ph¹ (+) ALL and Ph¹ (-) CML Patients

象が形を変えて出現したものと考えられ、DNA 解析の結果、種々のオンコジーンを含む腫瘍に特異的な遺伝子の増幅によってことが明らかとなった。特に methotrexate 耐性株では dihydroxyfolate reductase 遺伝子の増幅が関与し、その変化は methotrexate の負荷に対して可逆的といわれる¹⁴⁾。

もう1つの薬剤耐性のメカニズムに multiple-drug resistance gene (mdr1) がある。これがコードする P170^{mdr1}, 別名 P (permeability)-glycoprotein は正常な肝や腎などの細胞膜に存在し、細胞内疎水性分子の汲み出しポンプに相当する機能分子である。多薬剤耐性を示す培養細胞で mdr1 遺伝子増幅度約80倍、4.5Kb mRNA 発現度約11,000倍と、これに伴う P-glycoprotein の産生亢進が報告されている¹⁵⁾。

6. ウィルス遺伝子の組み込み (integration of viral gene)

発癌と関わりのある身近なウィルスとしては、Epstein-Baar ウィルス (リンフォーマ)・成人T細胞白血病ウィルス (HTLV-1)・パピローマウィルス (子宮頸癌)・B型・非A非B型肝炎ウィルス (肝癌) などがある。HTLV-1 のような RNA 型ウィルスは、自身の RNA から逆転写酵素により DNA を複製して感染細胞の DNA にインテグレートする。HBウィルスは RNA 型ウィルスではないが、自身の DNA プロゲノムを転写したのち逆転写酵素で DNA を複製し、RNA 型ウィルスと同様にしてインテグレートする。このようなウィルス遺伝子の細胞 DNA への組み込みにもなって生ずる、細胞の発癌性獲得のメカニズムの1つは insertional mutagenesis である。これにより細胞 DNA の直接の損傷、あるいはウィルスゲノム内のプロモーター・エンハンサーによる支配を受けて、本来、正しい制御のもとにあった遺伝子あるいは発現されなかった遺伝子の発現につながる。オンコジーンを持たないウィルスによる発癌はこれに相当すると考えられる。

ウィルス DNA と細胞 DNA 間の組み換えで、細胞内の proto-oncogene (c-onc) がウィルスゲノム内に transduct され tumorigenesis を獲得したものが、発癌ウィルスのオンコジーン (v-onc) である。このようなウィルスの感染による v-onc の組み込みも発癌メカニズムの1つである¹⁶⁾。

このようなウィルスの検出には免疫学的な簡便法が普及しているが、一層高感度な検出法として DNA hybridization assay に期待が大きい。特に PCR の併用は威力を発揮しよう。HB ウィルス・パピローマウィルスの dot blotting は臨床検査として実用の域にある。また、細胞 DNA へのウィルスゲノムの組み込みの有無や、その組み込み様式をみるためには、DNA プローブによる Southern blotting・in situ hybridization が必須の手段である。

悪性腫瘍のDNA診断：期待と問題点

対象が生命活動の基本を成す DNA であること、その DNA がわずかに4種の塩基という極めて単純な要素で構成され、全ての生物に共通であることなどから、DNA 診断の卓越した原理が容易に理解される。つまり、従来の臨床検査法の及ばなかった領域まで可能とし得るのみならず、全ての疾患に同様の技術でアプローチできるという適応性の広さ・深さに、格別の期待が持たれるわけである。加えて、単一塩基の異常まで検出可能であり、PCR 法を併用すれば数万分の1のクローンも検出レベルまで引き上げることができるという、高感度・高特異性への期待も大きい。

再発・悪性転換のモニタリングには、治療に抵抗した残存クローンや形質転換したクローンの有無を追跡することで、ある程度の目的には適うようになりつつある。骨髄移植に伴う hematologic reconstitution の確認のために、autologous と allogeneic の完全な識別が必要で、この目的にも現状のレベルで適いつつある。治療抵抗性や転移性、予後などを知るための癌の性格の十分な鑑別については、従来、病理学所見以外には何もなかった中で、DNA 診断法から少しづつ情報が得られるようになった。

しかし一方、現実の段階では、癌診断の最大の目標である早期診断（望ましくは悪性クローンの発生段階ないしその前段階）に有効なものはまだない。また、DNA 診断から得られる情報と臨床を結びつける情報が、まだいかに乏しい段階である。

だがしかし、急速な技術開発と臨床情報の蓄積によって、従来の概念に変革をせまる DNA 診断法本来の役割も、まもなく現実のものとなっていくであろう。

おわりに

悪性腫瘍の DNA 診断法に関して、今回の課題である意義と限界を述べるには時期尚早である。

そこで、対象となる遺伝子異常とその検出法を分類して、概観することで責を果たさせていただいた。すでに詳細にわたる総説や成書がたくさんあり、ここに示した知見は一部の自験例を除き、それら^{17)~21)}から引用した。紙面の都合で引用原著の詳細は省かせていただいた。

文 献

- 1) Bishop, J.M.: The molecular genetics of cancer. *Science*, **235** : 305~311, 1987
- 2) Caskey, C.T.: Disease diagnosis by recombinant DNA methods. *Science*, **236** : 1223~1229, 1987
- 3) Chaganti, R.S.K., *et al.*: The role of molecular genetics in diagnostic and prognostic evaluation of cancer and leukemia. *Nucleic Acid Probes in Diagnosis of Human Genetic Diseases* (Willey, A.M., ed.), New York : Alen R. Liss, Inc., p55~81, 1988
- 4) Landegren, U., *et al.*: DNA diagnostics—molecular techniques and automation. *Science*, **242** : 229~237, 1988
- 5) Antonarakis, S.E.: Diagnosis of genetic disorders at the DNA level. *N. Eng. J. Med.*, **320** : 153~163, 1989
- 6) Erlich, H.A., ed.: *PCR Technology—Principles and Applications for DNA Amplification*, New York : M Stockton press, 1989
- 7) Ha, K., *et al.*: Lineage specific classification of leukemia. *Brit. J. Haematol.*, **61** : 237~249, 1985
- 8) Waldmann, T.A., *et al.*: Molecular genetic analysis of human lymphoid neoplasms. *Annals Inter. Med.*, **102** : 497~510, 1985
- 9) Van Dongen, J.J.M., *et al.*: T cell receptor-CD3 complex during early T cell differentiation. *J. Immunol.*, **138** : 1260~1269, 1987
- 10) 柴田 昭, 他 : 第14回新潟シンポジウム: 白血病と新しい診断技術—分類と最近の問題点, 東京 : 医歯薬出版, 1988
- 11) Kundson, A.G.Jr.: *Genetics of human cancer*.

- Annu. Rev. Genet., **20** : 231~251, 1986
- 12) Zbar, B.: Chromosomal deletions in lung cancer and renal cancer. Important Advances in Oncology 1989 (DeVita, V.T.Jr., *et al.*, eds.), Philadelphia : J.B.Lippincott Company, p41~60, 1989
- 13) Kurzrock, R., *et al.*: The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. N.Eng. J. Med., **319** : 990~998, 1988
- 14) 斉藤弘行, 他 : Double minute chromosome の増加に伴い methotrexate 耐性を獲得したヒト白血病細胞株の遺伝子増幅に関する検討. 日血会誌, **51** : 278, 1988
- 15) Pastan, I., *et al.*: Multiple-drug resistance in human cancer. N.Eng. J. Med., **316** : 1388~1393, 1987
- 16) Burck, K.B., *et al.*, eds.: Oncogenes: An introduction to the concept of cancer gene, New York: Springer-verlag, 1988
- 17) Vande Woude, G.F., *et al.*: Principles of cancer biology: molecular biology. Cancer: Principles and Practice of Oncology, 2nded. (De Vita, V.T.Jr., *et al.*, eds.), Philadelphia: J.B. Lippincott Company, p23~47, 1985
- 18) 日本臨床病理学会編 : 遺伝子技術の臨床への応用, 臨床病理 (臨時増刊), 特集65号, 1985
- 19) 秋山 徹, 他編 : 癌'88, 代謝, **25** (臨時増刊) 1988
- 20) 村松正實, 他編 : DNA 診断—分子生物学の臨床応用, 日本臨床, **47** (1989年増刊号), 1989
- 21) 大久保昭行, 他編 : 癌の臨床検査. 臨床検査, **33** (増刊号), 1989

白血球によるペプチドロイコトリエンの代謝機構

生化学第二講座 長岡 功

炎症反応の惹起には局所で産生される種々のメディエーターが関与すると考えられている。ヒスタミン、ブラジキニンなどの従来知られているメディエーターに加え、近年、細胞膜リン脂質のアラキドン酸からロイコトリエン (LT) と呼ばれる一群のメディエーターが産生されることが明らかになった。

LTは、水酸基をもつがアミノ酸残基をもたないLTB₄と、水酸基とアミノ酸残基の両方をもつLTC₄、D₄、E₄ (これらのLTはペプチドロイコトリエンと総称される) の二つに大別される。LTB₄は、白血球遊走作用を、また、ペプチドロイコトリエンは血管透過性亢進作用や気管支平滑筋収縮作用をもつことから、これらLTは、炎症の重要なメディエーターとして注目されている。

LTは、その名が示すようにおもに白血球 (leukocyte) によって産生されるが、特にペプチドロイコトリエンは肥満細胞、好酸球、マクロファージなどによって産生される。アラキドン酸にLTA₄合成酵素 (5-リポキシゲナーゼ) が作用するとLTA₄が生成され、これにLTC₄合成酵素の働きによって、グルタミン酸-

システイン-グリシンからなるグルタチオンが結合するとLTC₄が生成される。LTA₄合成酵素、LTC₄合成酵素および多くのグルタチオンは細胞内に存在するためLTA₄、C₄は細胞内で生成される。生成されたLTC₄は細胞外に放出された後、γ-グルタミルトランスぺプチダーゼおよびジペプチダーゼによってLTD₄、さらにLTE₄へと、それぞれ代謝される。これらの酵素は、白血球の細胞膜表面あるいは顆粒内に局在するため、LTC₄は、白血球の細胞膜表面酵素や、細胞外に放出された顆粒酵素によって細胞外でLTD₄、E₄へと代謝される。

LTC₄およびD₄は、強力な血管透過性亢進作用、気管支平滑筋収縮作用をもつことから、アレルギー性鼻炎、喘息などのメディエーターとして考えられている。しかし、LTC₄、D₄の代謝産物であるLTE₄は、C₄やD₄よりも生物活性が一般的に弱いと言われている。従って、白血球は、LTC₄を産生するとともに、C₄をD₄、E₄へと変換する能力をもち、炎症局所においてLTの生物活性を変化させることによって、炎症反応を調節していると考えられる。