〔特別講演〕

遺 伝 子 診 断 と 治 療 の 臨 床

—現 状 と 将 来 の 展 望—

今 井 浩 三

SUMMARY

Genetic analysis for tumor cells has recently been advanced due to the development of the new biotechnology. In this review article, recent advancement of the genetic instability in digestive tract cancers and hypermethylation of the promoter region of the gene was reviewed. The new data from our laboratory concerning these points was presented in addition to the detailed description of the methodology.

Key words: gene analysis, gene therapy, replication error, genetic instability, methylation of gene.

はじめに

近年のバイオテクノロジーの進展により遺伝子診断と治療の状況も大きく変化しつつある。本特別講演においては癌に焦点をあてて、遺伝子解析とそれに基づいた治療の方向性について述べた。ここでは誌面の都合もあり、それらの中から遺伝子不安定性と遺伝子のメチル化について最近の知見を述べさせていただく。

I. 消化器癌における遺伝子不安定性（修復異常）

発癌には大きく分けて、Gatekeeper 遺伝子と Caretaker 遺伝子の異常が関与する機構が考えられている¹⁾。

Gatekeeper 遺伝子とは、癌遺伝子の活性化、癌抑制遺伝子の不活化など、その遺伝子異常により直接的に細胞の増殖、分化に異常を引き起こし、腫瘍に至る遺伝子が相当する。一方、Caretaker 遺伝子とは、その異常が直接的に細胞の増殖、分化に影響を与えないが、遺伝子の修復異常をきたすことにより、細胞が遺伝子変異をきわめて起こしやすくなり、腫瘍に至るも

のである。近年、Caretaker 遺伝子の中でも DNA ミスマッチ修復 (MMR) 遺伝子の異常は、遺伝性非ポリポーシス大腸癌 (HNPCC) だけでなく、通常の大腸癌などの発癌機構として注目されている²⁾。

1. 遺伝子診断法としての replication error の検出

MMR 遺伝子の異常があると、DNA 複製の際に生じる変異を正しく修復することができない。このため、ヒト染色体に多数存在する (A)_n, (CA)_n などの 1~数塩基単位の繰り返し配列を増幅するマイクロサテライトマーカーを用いた PCR により、癌組織において正常組織ではみられない異常バンドが検出されることにより replication error 陽性と判定できる (図 1)。

2. RER 陽性大腸癌と標的遺伝子

HNPCC や散発性 RER 陽性大腸癌ではこれまで大腸癌の発癌メカニズムと考えられてきた K-ras 遺伝子や p 53 遺伝子などの遺伝子変異は、頻度が低い^{2,3)}。一方で、MMR 異常に起因する標的遺伝子として II 型 TGF β レセプター (TGF β RII)⁴⁾ や BAX 遺伝子⁵⁾、MMR 遺伝子 (hMSH 3, hMSH 6)⁶⁾ 内に

Molecular diagnosis and gene therapy in clinical medicine.

Kohzoh Imai; 札幌医科大学第一内科

Correspondence address: Kohzoh Imai, First Department of Internal Medicine, Sapporo Medical University, South 1, West 16, Chuo-ku, Sapporo 060-8543, Japan.

第 48 回日本電気泳動学会春季大会・特別講演

図1. マイクロサテライトマーカー。

BAT 26 を用いた PCR 法による RER の検出. N: 非癌部組織, T: 癌部組織。

存在する, (A)10, (G)8 などの繰り返し配列において変異が高頻度で起こっていることが明らかになってきた。これらの繰り返し配列は, 各遺伝子のタンパク質をコードする領域にあるため, ここに 1~2 塩基の挿入あるいは欠失が起こると, フレームシフトが起こり, 正常遺伝子産物が作られなくなる。p 53 遺伝子変異の頻度の低い RER 陽性大腸癌での BAX 遺伝子変異は, p 53 遺伝子による BAX 遺伝子の転写促進作用⁷⁾を考えると非常に興味深い。また hMSH 3, hMSH 6 の変異より, 一つの MMR 遺伝子の変異に起因した MMR 異常が他の MMR 遺伝子の変異を誘導し, MMR 異常がさらに加速する機構 (mutator mutates another mutator model) が提唱されている^{8,9)}。

3. 胃癌における RER

我々は, 167 例の胃癌手術材料を用いて散発性胃癌における RER について検討を加えた。5 loci のマイクロサテライトマーカー (BAT 26, BAT 40, D 2 S 123, D 5 S 346, Mfd 15) の中で 2 loci 以上で異常バンドを認めた症例を RER 陽性とした場合, 167 例中 25 例 (15%) において RER を認めた。これまでに, 胃癌の RER に関して, 数多くの報告がみられるが¹⁰⁾, RER の統一基準がないため, RER の頻度には, 大きな差がみられる。1 塩基配列の繰り返し配列が, RER により影響を受けやすいことは, Perucho らの最初の RER の報告で述べられている²⁾が, さらに最近, アデニンの 26 回繰り返し配列 (A)26 を増幅する BAT 26 が RER 検出の感度の高いマーカーであることが明らかになってきている¹¹⁾。ところが, これまでの多くの胃癌の RER に関する報告において BAT 26 を検討しているものはほとんどない。また, マイクロサテライト領域は, 本来不安定な配列であ

図2. RER陽性胃・大腸癌における標的遺伝子変異の頻度。

IGFIIR, insulin-like growth factor II receptor; GS, glycogen synthase; NGFR, nerve cell growth factor receptor; DRP, DNA repair protein; NSEP, nuclease-sensitive element DNA binding protein.

り, 数 (多くは 1) 繰り返し配列のみのシフト, いわゆる type II mutation¹²⁾ は, DNA MMR 遺伝子の異常による RER がなくても, 腫瘍の clonality により検出されうる現象と考えられる。以上のことから, 遺伝子診断法としての RER の検出を目的とした PCR 法は簡便であるが, マーカーの選択, 結果の解釈には注意を要する。

4. RER 陽性胃癌における標的遺伝子変異

興味深いことに, 大腸癌と同様に RER 陽性胃癌は, RER 陰性胃癌に比べ, p 53 遺伝子変異の頻度が低いことが報告されている¹³⁾。このことより, RER 陽性胃癌においても BAX 遺伝子が標的遺伝子の一つとなっている可能性が示唆される。

25 例の RER 陽性胃癌を対象に, 標的遺伝子変異を解析したところ, BAX, hMSH 3, hMSH 6, TGF β R II 遺伝子のフレームシフト変異をそれぞれ, 64%, 64%, 52%, 72% の症例に認めた。これらの結果を大腸癌での解析結果とともに図 2 にまとめた。同様の繰り返し配列を遺伝子内にもつが, 発癌との関連を認めない遺伝子には, 異常をほとんど認めないことから, BAX 遺伝子をはじめとする標的遺伝子の変異が発癌過程で positive selection を受けているものと考えられる。

5. RER と胃癌患者の予後との関連

Kaplan-Meier 法を用いて, RER と予後との関連を検討したところ, RER 陽性胃癌患者の予後は,

図3. Kaplan-Meier法を用いた胃癌患者の予後の比較。

RERの有無(A)ならびにRER陽性癌患者においてはさらにBAX遺伝子変異の有無(B)で比較検討した。

RER陰性胃癌患者に比べ、有意に良好であった($p=0.0008$, Logrank test, 図3)。興味深いことにRER陽性胃癌において、BAX遺伝子変異陽性の症例は、陰性の症例に比べて予後不良であった($p=0.0465$)。

II. 消化器癌におけるメチル化の異常の検出

近年の分子生物学的研究により癌の発生、進展には様々な癌遺伝子、癌抑制遺伝子の異常が蓄積することが重要とされている¹⁴⁾。癌抑制遺伝子は遺伝子の点突然変異および、染色体欠失により不活化され、その機能の喪失は細胞周期のチェックポイントやアポトーシスを起こす機構の異常、転移の誘発など癌の様々な生物学的異常の原因となっている。しかし遺伝子変異、欠失などのgeneticな変化だけでは癌抑制遺伝子の機能の喪失を100%説明できず、遺伝子の一次構造には変化を認めないが、メチル化やアセチル化の異常などのepigeneticな異常が注目されつつある。なかでも遺伝子のプロモーター領域の異常メチル化(hypermethylation)は様々な癌抑制遺伝子の不活化に重要

であることがわかってきている¹⁵⁾。ここでは、消化器癌におけるメチル化の異常の新しい検出法とその応用について概説する。

1. メチル化による癌抑制遺伝子の不活化

これまで、既知の癌抑制遺伝子のうち約半数はメチル化により不活化されることが明らかとなっている。これらのうち、網膜芽細胞腫におけるRb¹⁶⁾、腎癌におけるVHL¹⁷⁾、乳癌におけるBRCA1¹⁸⁾は組織特異的なメチル化の異常である。一方p16^{19,20)}、E-cadherin^{21,22)}のように多くの組織でメチル化の異常を認める例もある。メチル化により遺伝子の発現が消失している例では、遺伝子のアミノ酸をcodeする領域の変異を認めないことから、この場合メチル化が遺伝子を不活化する唯一の原因となっていると考えられる。よってメチル化の異常は単に癌化の結果ではないと考えられる。

2. 胃癌におけるメチル化の異常の検出

p16遺伝子は染色体9p21の領域に位置し、多くの癌でhomozygous deletionにより不活化されている。p16遺伝子はプロモーター領域のメチル化により不活化される(図4A)。しかしメチル化がexon2に局限し、プロモーターに影響を与えない場合には発現の低下は認められない(図4A)。従来、大腸癌、胃癌といった消化器系の腫瘍では、p16の異常は頻度は低いとされてきた²³⁾。われわれはp16遺伝子のpromoter領域のメチル化を検出するため、bisulfite処理したDNAをmethylated allele特異的なprimerとunmethylated allele特異的なprimerで増幅すること²⁴⁾により(Methylation Specific PCR: MSP法)、胃癌におけるp16遺伝子のメチル化を検出した(図4B)。p16遺伝子のメチル化は59例中19例(32%)に認められ、p16遺伝子の不活化が胃癌の発生進展に重要である可能性が示唆された。

胃癌は大腸癌同様、一部の散発性腫瘍でmicrosatellite instabilityが検出され²⁵⁾、ミスマッチ修復系の異常が示唆されているが、既知のDNA修復酵素の中でも、hMSH2、hMLH1の遺伝子異常はほとんど検出されず、点突然変異、欠失以外のメカニズムの関与が示唆された²⁶⁾。われわれはBisulfite-PCR法によりhMLH1遺伝子のプロモーターのメチル化を検討したところ、59例中5例(8%)にメチル化を認めた。よって一部の胃癌においてhMLH1遺伝子のメチル化の異常がmicrosatellite instabilityの原因となっていることが示唆された。このことはepigeneticな異常がgeneticな異常を誘発する例として興味深

図4. Methylation specific RCR (MSP) 法によるp16遺伝子のメチル化の検出。

A. p16 遺伝子における CpG island とそのメチル化。CpG island はその多くが遺伝子のプロモーター領域に存在し、正常組織ではメチル化されていない (例外として、imprinting されている遺伝子、X 染色体上の遺伝子)。遺伝子のプロモーター領域のメチル化は遺伝子の発現を抑制するが、プロモーター以外の領域のメチル化は発現に影響を与えない。

B. MSP 法における p16 遺伝子のメチル化の検出。正常組織では unmethylated allele 特異的な primer (U) でのみ DNA 断片の増幅を認める。癌組織では methylated allele 特異的な primer (M) でも増幅を認める。RKO: 大腸癌細胞株。

い。

3. MCA 法によるメチル化により不活化されている新規癌抑制遺伝子の同定

このようにメチル化により不活化される癌遺伝子の例はますます増加している。このことは癌におけるメチルの異常を指標として、新たな癌抑制遺伝子を同定できる可能性を示唆している。われわれは PCR 法をベースとしたメチル化されている CpG island のみを増幅する方法 (Methylated CpG island Amplification: MCA 法) を開発した²⁷⁾。MCA 法は、(1) メチル化感受性制限酵素とメチル化非感受性制限酵素によるゲノムの切断 (selection) と、(2) PCR 法の bias を利用した、GC rich な領域を特異的な増幅 (representation) の二つのコンポーネントからなる (図 5)。MCA 法により増幅した DNA 断片は全てメチル化した CpG island 由来であり、癌におけるメチル化の異常だけでなく、imprinting している遺伝子や X 染色体上の遺伝子の promoter の検出にも威力を発揮すると思われる。

われわれは大腸癌で特異的にメチル化されている遺伝子の同定を目的として、大腸癌細胞株由来の MCA

産物を tester に正常大腸粘膜由来の MCA 産物を driver として、representational difference analysis (RDA) 法を行った。図 6 にその概要を示す。癌細胞、正常組織からそれぞれ MCA 法によるメチル化している CpG island を増幅し、RDA 法によりサブトラクションを行った。得られた産物は、Southern blot 法、Bisulfite-PCR 法によるメチル化の解析、さらに DNA sequencing、遺伝子 mapping などの検討を行った。これまで約 30 の大腸癌で特異的にメチル化している CpG island を同定した。Radiation hybrid pannel を用いて、これらのうちいくつかのクローンは癌抑制遺伝子の存在が示唆されている染色体座位に mapping された。これまで同定した CpG island のうち、4 clone は既知の遺伝子と相同性を示した (versican, alpha-tubulin, CSX, ribosomal DNA)。Versican はプロテオグリカンの 1 種で Differential display 法を用いて検出され、Rb 遺伝子により認導される²⁸⁾。Rb 遺伝子の異常が少ないとされる大腸癌でその下流の遺伝子の発現がメチル化により低下しているのは興味深い。

MCA 法を用いることによってメチル化している

図5. MCA 法によるメチル化されている CpG island の増幅。

メチル化感受性制限酵素と非感受性制限酵素の組み合わせにより DNA を切断後、adaptor を laigation する。GC rich な領域ではメチル化感受性酵素の認識部位が接近しているので、PCR の bias により、CpG island が効率よく増幅される。

CpG island を dot blot 法により検出できるので、多くの遺伝子の変化を大量の検体について一度に解析することが可能である。このことを利用すれば、従来一つ一つの遺伝子についてなされていた異常の検出をゲノムレベルで解析することが可能となる。現在 MCA/RDA 法を得られた clone を用いて大腸癌、胃癌における methylation profile の解析を進めている。この methylation profile はメチル化の異常のメカニズムの解析や、個々の症例の予後の予測などに有用と考えられる。

ここでは遺伝子のプロモーター領域の異常メチル化 (hypermethylation) について、その検出と応用を概説した。メチル化の異常は癌に特異的であり、しかも遺伝子欠失のような“loss”ではなく、“gain”であるので正常組織の混入に影響を受けることが無い。この点は喀痰、尿、糞便、尿液などのサンプルを用いて微量の癌細胞を検出する際に有用と考えられる。メチル化の変化は従来 Southern blot 法によって検出されてきた。Bisulfite PCR 法 (MSP, COBRA) や MCA 法のような PCR をベースとしたメチル化の検出法の進歩は癌の早期発見、予後の予測、新たな癌抑制遺伝子の同定に大いに貢献しうると考えられる。

図6. MCA と RDA 法による癌で特異的にメチル化されている遺伝子の同定。

MCA 産物を用いたメチル化されている遺伝子の単離のアプローチを模式化した。この組み合わせは positive selection であり、癌組織における正常組織の混入に影響を受けることなく subtraction を行える利点がある。

このような機会を与えてくださいました会長の塚田裕博士に心より感謝いたします。また、共同研究者の当科 日野田裕治助教授、安達正晃講師、伊東文生講

師, 豊田実特別研究員 (学振), 山本博幸特別研究員 (学振), 矢和田敦博士, および米国の M. Perucho 博士 (Burnham 研), S. Baylin 教授 (Johns Hopkins 大学) はじめ多くの方々に深謝いたします。

この研究の一部は文部省がん重点領域研究, 厚生省がん研究助成金の補助によった。

文 献

- 1) Kinzler KW, Vogelstein B. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 1997; 386: 761-3.
- 2) Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993; 363: 558-61.
- 3) Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, Tanaka K, Muraoka M, Onda A, Okumura Y, Kishi N, Iwama T, Mori T, Koike M, Ushio K, Nomizu S, Konishi F, Utsunomiya J, Miyaki M. Molecular nature of colon tumors in hereditary nonpolyposis colon cancer, familial polyposis, and sporadic colon cancer. *Gastroenterology* 1996; 111: 307-17.
- 4) Markowitz SD, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan RS, Zborowska E, Kinzler KW, Vogelstein B, Brattain M, Wilson JKV. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 1995; 1336-8.
- 5) Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC, Perucho M. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 1997; 275: 967-9.
- 6) Malkhosyan S, Rampino N, Yamamoto H, Perucho M. Frameshift mutator mutations. *Nature* 1996; 382: 499-500.
- 7) Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p 53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 1995; 80: 293-99.
- 8) Perucho M. Microsatellite instability: The mutator that mutates the other mutator. *Nat Med* 1996; 2: 630-1.
- 9) Perucho M. Cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Biol Chem* 1996; 377: 675-84.
- 10) Arzimanoglou II, Gilbert F, Barber HRK. Microsatellite instability in human solid tumors. *Cancer* 1998; 82: 1808-20.
- 11) Hoang JM, Cuttu PH, Thuille B, Salmon RJ, Thomas G, Hamelin R. BAT-26, an indicator of the replication error phenotype in colorectal cancer and cell lines. *Cancer Res* 1997; 57: 300-3.
- 12) Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 260: 816-9.
- 13) Renault B, Calistri D, Buonsanti G, Nanni O, Amadori D, Ranzani GN. Microsatellite instability and mutations of p 53 and TGF-beta RII genes in gastric cancer. *Hum Genet* 1996; 98: 601-7.
- 14) Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996; 87: 159-70.
- 15) Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP. Iterations in DNA methylation: A fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res* 1998; 72: 141-96.
- 16) Sakai T, Toguchida J, Ohtani N, Yandell DW, Rapaport JM, Dryja TP. Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 880-8.
- 17) Herman JG, Latif F, Weng Y, Lerman MI, Zbar B, Liu S, Samid D, Duan DS, Gnarr JR, Linehan WM. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9700-4.
- 18) Dobrovic A, Simpfendorfer D. Methylation of the BRCA 1 gene in sporadic breast cancer. *Cancer Res* 1997; 57: 3347-50.
- 19) Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, Baylin SB, Sidransky D. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p 16/CDKN 2/MTS 1 in human cancers. *Nat Med* 1995; 1: 686-92.
- 20) Gonzalez-Zulueta M, Bender CM, Yang AS, Nguyen T, Beart RW, Van Tornout JM, Jones PA. Methylation of the 5' CpG island of the p 16/CDKN 2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing. *Cancer Res* 1995; 55: 4531-5.
- 21) Yoshiura K, Kanai Y, Ochiai A, Shimoyama Y, Sugimura T, Hirohashi S. Silencing of the E-cadherin invasion-suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 7416-9.
- 22) Graff JR, Herman JG, Lapidus RG, Chopra H, Xu R, Jarrard DF, Isaacs WB, Pitha PM, Davidson NE, Baylin SB. E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. *Cancer Res* 1995; 55: 5195-9.

- 23) Takaoka AS, Kakiuchi H, Itoh F, Hinoda Y, Kusano M, Ohara M, Tsukakoshi H, Hosokawa M, Imai K. Infrequent alterations of the p16 (MTS-1) gene in human gastric cancer. *Tumour Biol* 1997; 18: 95-103.
- 24) Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 9821-6.
- 25) Han HJ, Yanagisawa A, Kato Y, Park JG, Nakamura Y. Genetic instability in pancreatic cancer and poorly differentiated type of gastric cancer. *Cancer Res* 1993; 53: 5087-9.
- 26) Wu MS, Sheu JC, Shun CT, Lee WJ, Wang JT, Wang TH, Cheng AL, Lin JT. Infrequent hMSH 2 mutations in sporadic gastric adenocarcinoma with microsatellite instability. *Cancer Lett* 1997; 112: 161-6.
- 27) Toyota M, Baylin SB, Issa JPJ, Imai K. Epigenetic instability in colorectal cancer. (submit).
- 28) Rohde M, Warthoe P, Gjetting T, Lukas J, Bartek J, Strauss M. The retinoblastoma protein modulates expression of genes coding for diverse classes of proteins including components of the extracellular matrix. *Oncogene* 1996; 12: 2393-401.