

第2章5節 がんの遺伝子変異

—遺伝性変異と非遺伝性変異—

1. はじめに

がんは細胞の増殖能・分化能に変化が生じ、過剰な増殖・浸潤・転移が起きる疾患です。がんの原因は、その大半が喫煙、飲酒、食事などの生活習慣です。がんは遺伝子の塩基配列の変異による病気ですが、遺伝子変異には生殖細胞と体細胞に区別して考えることが重要です。生殖細胞の遺伝子変異は精子や卵子を作る細胞に生じる変異で、子供に伝わる可能性があります。これに対して体細胞変異は、生殖細胞以外の細胞に生じる変異ですから、子孫には伝わりません。

体細胞ががん化するには、一つまたは複数の遺伝子変異が生じ、タンパク質に変化が生じます。このような特性が子孫に遺伝する場合にそのがんが遺伝性であるといい、遺伝性がんの特徴のひとつは家族性集積性を示します。がん家系症候群(Cancer family syndrome)の概念として同一家系内に複数のがん患者が生じたとしても、それが遺伝性である確率は決して高くありません。一般に高齢者のがんは遺伝と関係が小さく、長年の食生活やたばこなど、環境の影響が主な原因と考えるべきです。遺伝性のがんとは、血縁者で複数の比較的若い人にがんが生じ、それが同じ臓器の場合などに疑われます。

2. 遺伝の形式

単一遺伝子病の遺伝形式は、一般にメンデルの法則(優性の法則、分離の法則、独立の法則)に従います。一方、ミトコンドリア遺伝子(母系遺伝)や多因子遺伝病はメンデルの法則に従わないので、非メンデル型遺伝と呼ぶことがあります。メンデル型遺伝病の場合、異常な遺伝子が常染色体上にある場合は常染色体性遺伝(autosomal inheritance)と呼び、X染色体上にある場合はX連鎖性(X-linked inheritance)遺伝と言います。

3. 遺伝子の発現様式

遺伝にはその形質の発現様式により、優性遺伝(dominant inheritance)劣性遺伝(recessive inheritance)があります。異型接合体(ヘテロ)¹で明確に形質が表れる場合はそれを優性形質と呼び、同型接合体(ホモ)²にならないとその形質が表れない形質を劣性形質と呼んでいます。例外としてABO式血液型のA型とB型のようにどちらも優性形質を示すもの(共優性)、ヘテロ接合体が優性ホモ接合体と劣性ホモ接合体の中間の形質表現を取るもの(不完全優性)もあります。家族性大腸腺腫症の原

¹異型接合体(ヘテロ)

1対(2本)相同染色体の遺伝子座の、片方は正常な遺伝子を、もう一方は変異のある遺伝子を持っている個体。

²同型接合体(ホモ)

1対(2本)相同染色体の遺伝子座の、両方が同じ遺伝子を持っている個体。

因遺伝子である *APC* や Li-Fraumeni 症候群の原因遺伝子である *P53* 遺伝子の変異が生殖細胞に起きていると、もう一方の対立遺伝子に異常が起きただけでその細胞はがん化してしまいます。この場合、遺伝子がホモになって発病するので劣性遺伝形式ですが、ある特定のがん遺伝子が親から子に伝えられ必ず発症するという点では優性遺伝形式です。

4. 生殖細胞系列の変異と体細胞系列の変異

遺伝病の検査では、次世代に伝播される遺伝的形質として生殖細胞系列の変異を主に扱っていますが、遺伝性が不明な大部分の腫瘍の遺伝子検査では、腫瘍部と非腫瘍部の DNA を対比して生殖細胞系列の変異と体細胞系列の変異の鑑別を明確に行い診断する必要があります。EBV はリンパ球、HIV は主に T 細胞に感染します。固形腫瘍は「かたまりをつくるがん」の意で体細胞系列のがんと同じではないです。

5. 家族性腫瘍

家族性腫瘍とは、腫瘍(多くはがん)が家族内に集積して発生する状態であり、単一遺伝子の変異が原因で発生する遺伝性腫瘍と多因子による場合が含まれます。がん家系症候群(Cancer family syndrome)の概念として①家系内に大腸がん、子宮内膜症、卵巣がんなどのがん発生頻度が高いこと、②若年発症であること、③多重性発症の頻度が高いこと、④常染色体優性遺伝形式をとること、などが知られています。

がん化に関する遺伝子と本来もっている機能については、がん遺伝子、がん抑制遺伝子、DNA 修復遺伝子と呼ばれている 3 つの遺伝子グループに分類されます(表 1)。

表 1 がん化に関係する遺伝子と本来持っている機能

がん遺伝子	細胞の分裂、増殖を促進する
がん抑制遺伝子	細胞の増殖を抑制する
DNA 修復遺伝子	ゲノム構造を安定に維持する

原因遺伝子が同定されている疾患の遺伝形式には、優性遺伝と劣性遺伝があります(表 2)。

家族性腫瘍における遺伝子検査の有用性に関して 3 つのグループに分類されており、それを表 3 に示します(表 3)。

表2 遺伝子が同定されている疾患

常染色体優性遺伝	原因遺伝子
網膜芽細胞腫	<i>RB</i>
Wilms 腫瘍	<i>WT1</i>
家族性大腸腺腫症	<i>APC</i>
家族性乳癌	<i>BRCA1, BRCA2</i>
多発性内分泌腺腫症 1 型(MEN1)	<i>MEN1</i>
家族性黒色腫	<i>p16^{INK4a}</i>
結節性硬化症	<i>TSC1, TSC2</i>
神経線維腫症 1 (Recklinghausen 病)	<i>NF1</i>
神経線維腫症 2(NF2)	<i>NF2</i>
von Hippel-Lindau 病	<i>VHL</i>
Li-Fraumeni 症候群	<i>TP53</i>
家族性皮膚基底細胞癌 (母斑性皮膚基底細胞癌症候群)	<i>PTCH</i>
Cowden 病	<i>PTEN</i>
多発性外骨腫	<i>EXT1, EXT2</i>
多発性内分泌腫瘍症 2 型(MEN2)	<i>RET</i>
遺伝性乳頭状腎細胞癌	<i>c-Met</i>
遺伝性非腺腫症性大腸癌	<i>MSH2, MLH1, PMS1, PMS2</i>
常染色体劣性遺伝	原因遺伝子
色素性乾皮症	<i>XP</i>
末梢血管拡張性運動失調症	<i>ATM</i>
Fanconi 貧血	<i>FA (FAA, FAC)</i>
Bloom 症候群	<i>BLM</i>
Werner 症候群	<i>WRN</i>

表3 がんの易罹患性検査を行なう上で考慮すべきカテゴリー

グループ1:原因遺伝子が明確に同定されており、検査の結果から医療方針を決めることができる疾患。	
疾患、症候群	検査すべき遺伝子
家族性大腸腺腫(FAP)	<i>APC</i>
多発性内分泌腫瘍症2型(MEN2)	<i>RET</i>
多発性内分泌腫瘍症1(MEN1)	<i>MEN1</i>
網膜芽細胞腫	<i>RB1</i>
Von Hippel-Lindou 病	<i>VHL</i>
グループ2:原因遺伝子と特定のがんへの易罹患性との関連がかなりの程度明らかになっているが、研究的側面を残す。	
家族性乳癌	<i>BRCA1</i> 、 <i>BRCA2</i>
Li-Fraumeni 症候群	<i>p53(TP53)</i> 、 <i>CHEK2</i>
Cowden 病	<i>PTEN</i>
グループ3:疾患と突然変異との関係が明らかでない場合。原因遺伝子の関係がごくわずかな家族でしか分かっていない。	
毛細血管拡張性運動失調症	<i>ATM</i>
家族性黒色腫	<i>p16</i>

がんが発生するメカニズムの一つとして、がん抑制遺伝子の場合、通常は一方の遺伝子に変異しても、もう一方の遺伝子が正常であるため見かけ上の変化は起きません。しかし、残ったもう一方の遺伝子にも変異が起こるとがん化に向け進行します(Knudson のツーヒット説)。

一般的に、体細胞で後天的に生ずるがんは、元々正常な体細胞の遺伝子に変異が起き(体細胞変異)、さらに2本目の遺伝子に変異が起きるので、おのずと高齢で発症する傾向にあります。しかし、生まれながらにして一方の遺伝子に変異している場合は、「ワンヒット」しただけで変化が起こるので若年でがんが発症する傾向があります(図1)。

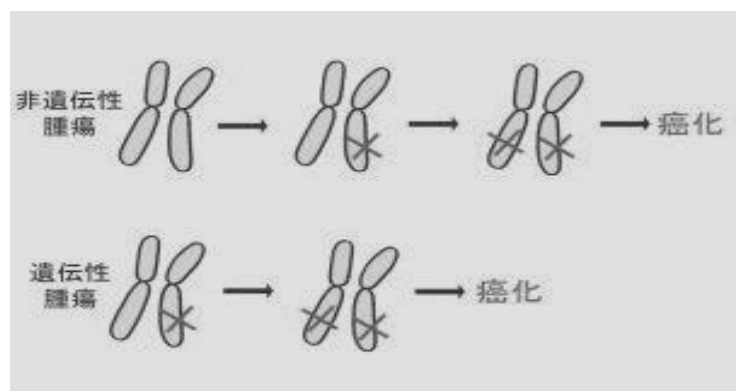


図1 Two hit 説と発がんの模式図

6. 検査の問題点と今後の展望

遺伝性がんの遺伝子診断を行なうに当たって、被験者と or や？私たち医療スタッフは、その背景にあるいくつかの問題点を正しく認識し、十分納得が得られたうえで検査を実施することが望ましいと思います。

私たちが持っている知識や情報を分かりやすく提示し、遺伝子診断の本来の目的である、患者および家族の皆さまの医療の充実に寄与できれば幸いと考えています。

参考図書

梶井英治 編：がん遺伝子とがん化，新人類遺伝学入門，171-175，南山堂，東京，1999

宇都宮譲二 監：家族性腫瘍カウンセリング各論，家族性腫瘍遺伝カウンセリング—理論と実際—，254-333，編集 恒松由記子，湯浅保仁，数間恵子，田村智英子，金原出版，東京，2000

第 2 章 6 節 家族性大腸がん

1. はじめに

悪性腫瘍は、遺伝疫学や分子生物学の進歩により遺伝子の構造変化と形質発現の関係が明らかになってきます。さらに、がん予防の見地から家族性腫瘍に関する研究が進み、その概念が明らかにされてきました。家族性腫瘍は、家族集積を示すことは明らかですが、臨床や遺伝子解析的にがん化の可能性がある場合も含まれる症候群と言えます。遺伝子異常としては、単一遺伝性の疾患と複数の遺伝子が関与している疾患の両者が存在します。家族性大腸がんの主なものに、家族性腺腫性ポリポーシス（familial adenomatous polyposis: FAP）と遺伝性非ポリポーシス大腸癌（hereditary non-polyposis colorectal cancer: HNPCC）が知られています。FAP の原因遺伝子は、*APC* (adenomatous polyposis coli) 遺伝子の異常が関与し、HNPCC には、*hMLH1*、*hMSH2*、*hMSH6* など複数の DNA 修復遺伝子の異常が知られています。特に *hMLH1* 遺伝子は遺伝子変異に加え、プロモーター領域¹のメチル化²による不活化（エピジェネティックな変化とも言う）も知られています。これらの DNA 修復遺伝子の異常は、マイクロサテライト³不安定性（microsatellite instability: MSI）として検出されます。遺伝性大腸がんの原因遺伝子を表 1 にまとめました。さらに、HNPCC の診断基準として、国際的研究グループによって提唱されたアムステルダム基準が広く用いられてきました（表 2）。しかし本邦の集計によると、アムステルダム基準を用いると、HNPCC は全大腸がんの 0.15 から 0.18% と極めて少ないことから、大腸がん研究会による臨床基準が提唱されました（表 3）。本邦ではこの基準をもとに臨床的に診断が試みられています。

この項では主に、家族性腺腫性ポリポーシス (FAP) と遺伝性非ポリポーシス大腸癌 (HNPCC) について述べます。

¹プロモーター領域

遺伝子が活性化する場合に、転写因子が特異的に結合する DNA 領域で、転写の開始位置や速度を決定している。ほとんどは遺伝子（構造遺伝子）の上流に存在している。

²メチル化

メチル基 (CH_3 -) が付加される反応をいう。メチル化酵素（メチラーゼ）によりさまざまな物質がメチル化される。一般にプロモーター領域のメチル化は転写活性が低く、抑制する（本文参照）。その理由はメチル化されるとクロマチンの立体構造に変化を生じ、転写因子が結合できなくなる。

³ マイクロサテライト

ヒトゲノム中には機能不明の単純な繰り返し配列が存在する。これらの配列をマイクロサテライトという（配列とその頻度については本文参照）。

表 1 遺伝性大腸癌とその原因遺伝子

疾 患	原因遺伝子	遺伝子座位
ポリポーシス症候群		
家族性腺腫性ポリポーシス (FAP)	<i>APC</i>	5q21
単純型	<i>APC</i>	5q21
髄膜芽細胞腫 (Turcot 症候群)	<i>APC</i>	5q21
Cowden 病	<i>PTEN</i>	10q23
Peutz-Jeghers 症候群	<i>STK11</i>	19p
遺伝性非ポリポーシス大腸癌 (HNPCC)		
Lynch I & Lynch II	<i>hMSH2</i>	2p21-22
	<i>hMSH6</i>	2p21
	<i>hPMS1</i>	2q31-33
	<i>hMLH1</i>	3p21
	<i>hPMS2</i>	7p22
Muir-Torre 症候群	<i>hMSH2</i>	2p21-22

家族性大腸癌は、その原因遺伝子からも多数のポリープ発生をみる FAP とポリープの発生をみない HNPCC に代表されます。また、ポリープ発生が特徴的な疾患は FAP だけでなく Cowden 病や Peutz-Jeghers 症候群があります。以前に HNPCC は Lynch 症候群と呼ばれ、大腸癌のみに発祥するものを Lynch I 型、大腸癌以外に胃癌、子宮癌、卵巣癌にも発症するものを Lynch II 型と呼んでいました。そして、HNPCC は FAP と異なり、複数の遺伝子が関与しています。

表 2 アムステルダム診断基準 (Minimum criteria for HNPCC, 1990)

- 1) 家系内に 3 名以上の組織学的に確認された大腸癌患者がおり、
そのうち 1 人は他の 2 人に対して第一度近親者(親、子、兄弟)であること。
- 2) 大腸癌の発生が 2 世代にわたっていること。
- 3) 少なくとも 1 例は 50 歳未満で診断されていること。

表 3 大腸癌研究会の臨床基準 (第 34 回大腸癌研究会、1991)

- A 群) 第一度近親者(親、子、兄弟)に発端者を含む 3 例以上の大腸癌患者を認める大腸癌。
- B 群) 第一度近親者(親、子、兄弟)に発端者を含む 2 例以上の大腸癌患者を認め、なお
かついずれかの大腸癌が次の a~b のいずれかの条件を満たす大腸癌。
- a) 50 歳以下の若年性大腸癌 b) 右側結腸癌脾彎局部より近位
- c) 同時性あるいは異時性の大腸癌 d) 同時性あるいは異時性の他臓器重複癌

2. 家族性腺腫性ポリポシス (FAP)

1) APC 遺伝子

FAP の原因遺伝子は APC 遺伝子です。この遺伝子は染色体の 5q21 に位置して、2843 のアミノ酸をコードし、15 のエクソンからなる大きながん抑制遺伝子⁴です。その役割は、細胞増殖に関与する Wnt シグナル伝達経路⁵において β カテニンを介して細胞増殖に抑制的に働く遺伝子です。散发性の大腸がん（非遺伝性）では多段階発がんモデルとして、正常粘膜から腺腫への移行期に関与するとされています（図 1）。遺伝形式は優性遺伝性であり、その発生頻度は 1/17000（日本人）とされています。

2) APC 遺伝子の遺伝子検査

遺伝性の異常を検出するためには、血液中の白血球を材料とします。通常は 4~8ml の血液を必要とし、ヘパリンや EDTA などの抗凝固剤入りの採血管を用います。採血後は、凝固しないように注意深く転倒混和します。その後、白血球を分離してその DNA または RNA を抽出して検査に使用します。また、手術や生検で得られた大腸の腫瘍組織も同じように検査材料になります。前述したように、APC 遺伝子は非常に大きな遺伝子であるため検査期間は通常 1 週間以上かかります。しかし、あらかじめ変異箇所がわかっているような家系内の患者の検査であればその箇所だけ検査をすれば済むので検査時間はかなり短縮されます。

3. 遺伝性非ポリポシス大腸癌 (HNPCC)

1) DNA 修復遺伝子

HNPCC 腫瘍のほとんどは、DNA 修復遺伝子⁶異常が原因で起こります。ヒト DNA 修復遺伝子には、*hMLH1*、*hMSH2*、*hMSH3*、*hMSH6*、*hPMS1*、*hPMS2* が知られています。これらの遺伝子産物は、細胞分裂時の DNA 複製が正確に行われるために非常に重要です。DNA 複製時にはいろいろな塩基対合の誤り（ミスマッチ）が起こりますが、その部分を検出し修復する役割を果たしています。特に、*hMLH1* と *hMSH2* 遺伝子の異常は HNPCC における生殖細胞変異⁷

⁴ がん抑制遺伝子

がん遺伝子とは反対に、細胞の増殖を抑制する遺伝子でこの遺伝子に変異を起こし、不活性化することはがんの発生や悪性を誘引する。現在までに約20種類が見つかった。

⁵ Wntシグナル伝達経路^{*5}：

胚発生とがんに関連する蛋白質のネットワークであり、多くの種においてよく保存されている。この経路は、他の転写因子と相互作用して特異的な遺伝子を発現する。

⁶ DNA修復遺伝子

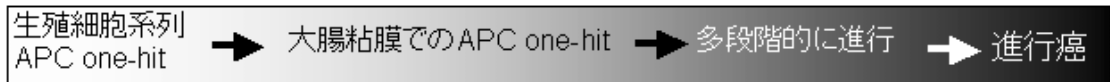
DNA はさまざまな要因により変化を受けている。これを修復するために生体は修復するための物質や酵素が用意されているが、その遺伝子群を DNA 修復遺伝子という。この遺伝子の破綻は、がん化を誘引することが考えられる

⁷生殖細胞変異

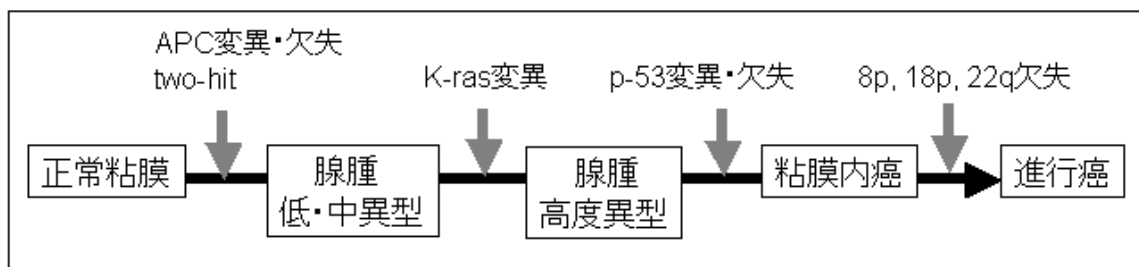
男性では精子、女性では卵子の遺伝子に変異が生じること。

の頻度が高いことが知られています。

FAP



散発性大腸癌



- 2) D 図1 大腸癌における多段階発癌モデル大腸正常粘膜が進行がんになるまでには数種類の遺伝子の異常が蓄積されることが必要です。APC 遺伝子はがん抑制遺伝子のため、その不活化のためには対立遺伝子の双方に異常が起こることが必要です。これは Knudson の 2 ヒット説(two-hit theory)に従っています。

ていより。解明は PCR-SSCP 法（ヘンリ・シーケンシング）を用いた塩基配列を決定します。また、RNA 材料から cDNA⁹を作成して、解析する方法も行われています。これらの方法で解析された変異は、フレームシフト変異¹⁰、ナンセンス変異¹¹、エクソンの欠損などであ

⁸PCR-SSCP 法

DNA を PCR で増幅した後、1 本鎖に変性すると遺伝子の 1 塩基並びの違いだけで立体構造に変化が起きる。この立体構造の違いが電気泳動の移動度の違いとして現れるので、遺伝子変異の検出が可能となる。ただしこの方法は、変異を見つけるために大量処理をするスクリーニング法であり、塩基配列の決定法が最終的な確定手段となる。

⁹cDNA

mRNA の DNA コピーのこと。エクソン(翻訳領域)が連結した DNA 配列になっている。mRNA 配列を鋳型にして、逆転写酵素によって合成されるので、イントロン(非翻訳領域)を含んでいない。

¹⁰フレームシフト変異

DNA に 1 個または 3 の倍数でない数の塩基が挿入または欠失する突然変異。この変異によって、DNA の遺伝情報を伝える正常なコドンの読み枠にズレが生じる。その結果、塩基配列の途中でストップコドン

り、ほとんどの場合その遺伝子産物は、短小の役に立たないタンパク質になります。検査材料や検査時間は、前述した APC 遺伝子とほぼ同様です。

(2) *hMLH1* 遺伝子のメチル化とその検出

hMLH1 遺伝子はプロモーター領域のメチル化による不活化が知られています。真核生物 DNA のメチル化は、特定 CpG 配列 (CG 配列、CpG アイランドと言う) の C (シトシン) が DNA メチラーゼによりメチル化され、メチルシトシンとなることです。CpG 配列は遺伝子のプロモーター領域に多く存在し、一般に転写¹²が活発に行われている領域はメチル化の程度は低く、転写が抑制されている領域は幅広くメチル化されています。つまり、遺伝子が高発現していればメチル化は少なく、発現していなければメチル化されている可能性が高くなります (図 2)。

C(シトシン)は Bisulfite で処理することにより、T (チミン) に変化することができます。しかし、C がメチル化を受けたメチルシトシンは、Bisulfite で処理しても T に変化することができず C は保たれます。これを利用してメチル化、非メチル化を検出します。現在行われているメチル化の検出方法は、Bisulfite-PCR-SSCP 法と MSP (Methylated DNA specific Primer)法¹³が多く行われています (図 3)。検査結果を図 4 に示しました。図 4 の A は、SSCP 法でメチル化と非メチル化のアレル¹⁴を分離した結果を示しています。B はそのシーケンス解析でメチル化した部分を確認した結果です。

ができ、翻訳が途中で中断されるため正常なタンパクが合成されない。

¹¹ナンセンス変異

ストップコドン (アミノ酸を規定していない 3 つの塩基の並び) ができる変異のことで翻訳終了を意味する。その情報でタンパク質合成が終了する。

¹²転写

DNA の遺伝子情報を mRNA に写し取る過程のこと。

¹³MSP (Methylated DNA specific Primer)法

特異的なプライマーを用いてメチル化 DNA を検出するためのメチル化検出法の一つ。特異的プライマーの設計は、メチル化した場合と非メチル化の両方を設計する必要がある。最近では専用の設計ソフトがメーカーから手に入れることができる

¹⁴ヘテロ接合性とアレル

両親由来の対立遺伝子の塩基配列がことなることをいう。対立遺伝子(アレル)とは、同一の遺伝子座に属して互いに区別される遺伝子を意味する。通常の実験では、AA, aa をホモ接合体、Aa をヘテロ接合体として表す

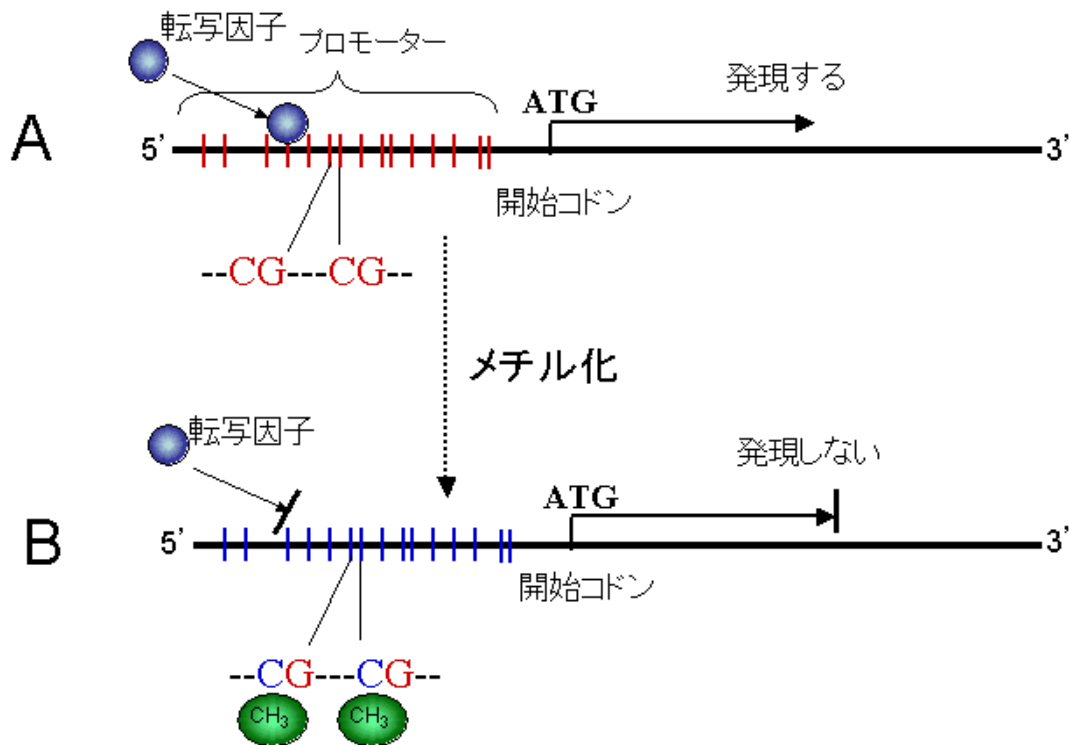


図2 プロモーター領域における CpG アイランドのメチル化正常なメチル化の意味するところは、標的遺伝子の発現の制御にあります。非メチル化プロモーターに転写因子が結合することにより標的遺伝子は発現を誘導されますが(A)、メチル化しているプロモーターには転写因子が結合できないため、標的遺伝子は発現されないことになります(B)。

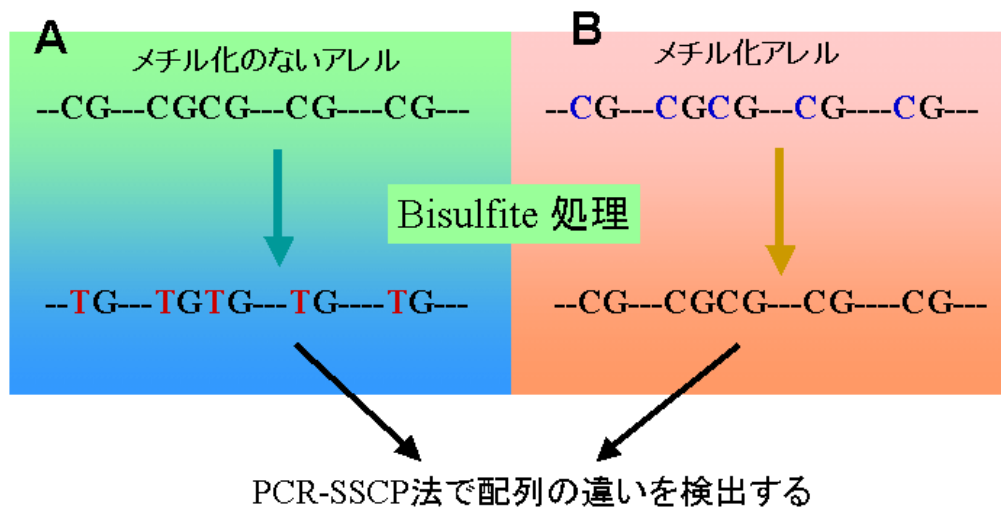


図 3Bisulfite-PCR-SSCP 法によるメチル化アレルの検出原理

CpG アイランドにメチル化のないアレルは Bisulfite 処理によりシトシンはチミンに変化します(A)。しかし、メチル化しているシトシンはチミンに変化することができません(B)。この配列の変化を利用して、Bisulfite 処理後 PCR で増幅し SSCP 法でそれぞれのアレルを分離することが可能になります。

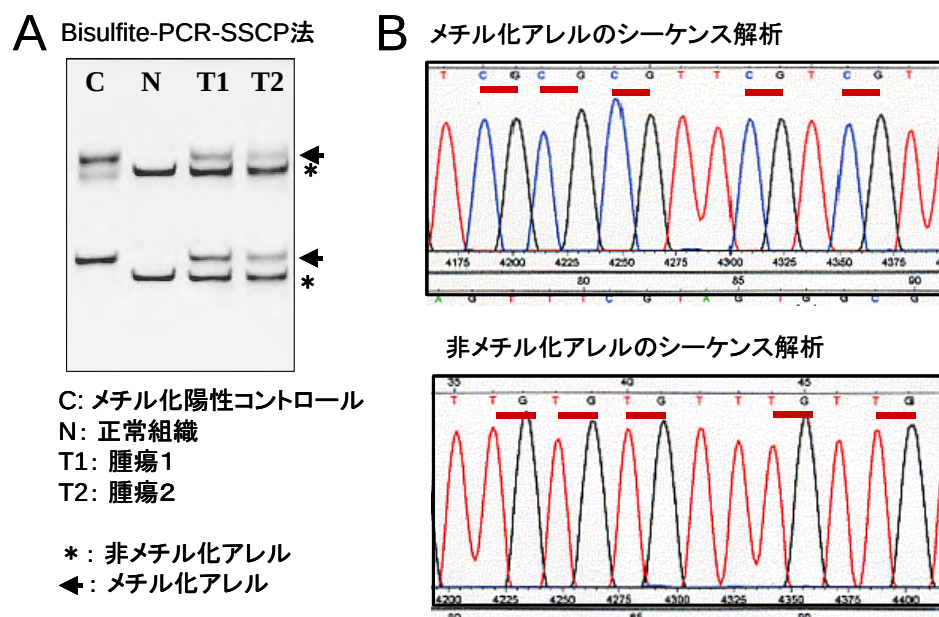


図 4SSCP 法によるメチル化アレルの検出とシーケンス解析 SSCP 法の結果を示しています(A)。メチル化コントロールのバンドはメチル化のあるアレルであり、正常組織のバンドは非メチル化アレルの位置にあります。腫瘍組織中にメチル化アレルが存在すれば、正常組織も多少混在してしまうためにメチル化と非メチル化の両方のバンドが検出されます。腫瘍組織のそれぞれのバンドからシーケンス解析を行った結果を B に示してあります。B 上段の CpG アイランドの配列は「CG」で変化しませんが、下段の非メチル化は、「CG」の配列が「TG」に変化しています(CpG アイランドは赤線で示しています)。

3) マイクロサテライト不安定性 (MSI) と検査

(1) HNPCC と MSI

マイクロサテライト DNA は、単純な縦列繰り返し単位 (1 から数塩基) からなる短い配列でヒトゲノム全体に存在します。1 塩基の繰り返しは

A または T の連続が一般的で、ゲノム全体の 0.3% を占めます。2 塩基の繰り返しは、CA および AG の連続でゲノム全体の 0.8% を占めます。そして、3 塩基および 4 塩基の繰り返しは比較的低頻度ですが、ヘテロ接合性¹⁵の高い多型マーカーとして使用されています。MSI の検出は、これらマイクロサテライトの反復回数異常の検出ということになります。大腸がん、子宮がん、胃がんなどの各種固形腫瘍の約 10~20% 程度に認められることが知られています。MSI の発生機序は、前述した DNA 修復遺伝子の破綻により引き起こされるものと考えられ、*hMSH2*、*hMLH1* などの遺伝子異常を強く予想することができます。したがって、MSI は HNPCC 患者で多く検出されています。MSI の発生機序を図 5 に示しました。

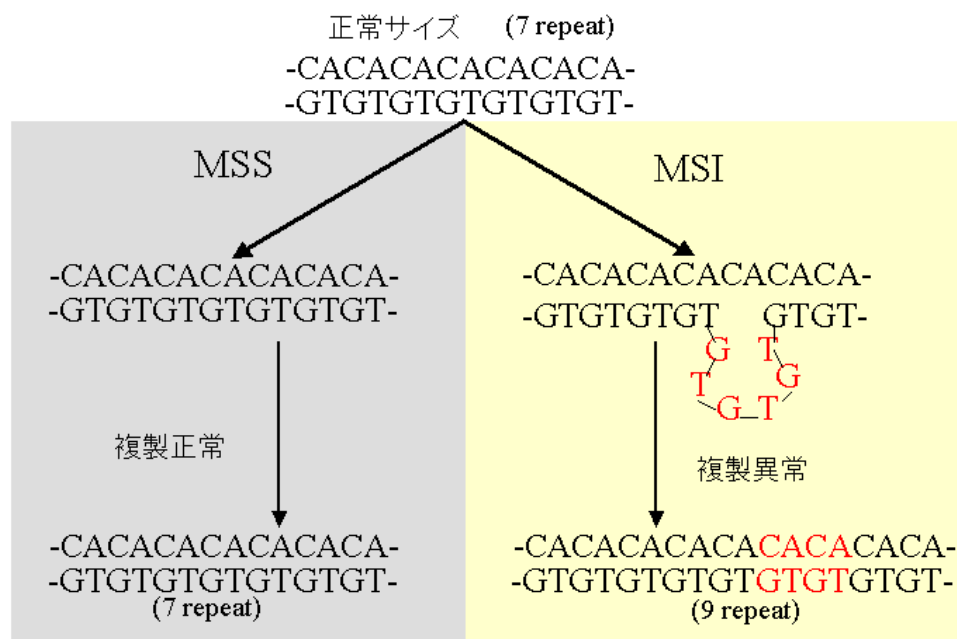


図 5 マイクロサテライト不安定性と安定性

MSI のできる過程の模式図を示します。CA の 2 塩基が 7 回繰り返されている正常配列をモデルにしています。右側のようにループ状に相補配列が起き、そして DNA 修復遺伝子の異常があった場合、これらを修復することができません。したがって、9 回の繰り返し配列が形成されることになります。これをマイクロサテライト不安定性と言います (MSI)。正常であれば左側のように、7 回繰り返し配列が同じように複製されます (MSS)。

MSI 検査は、特に 2 塩基繰り返し部分の検出では、正常組織との比較が必須となるため、採取する検体は手術や生検で得られた正常部分と腫瘍部分の組織が必要となり、両者のコンタミネーションに注意して採取する必要があります。使用するマイクロサテライトマーカーの選択は、施設により異なりますが、マーカー例を表 4 に示しました。表の中で、

D5S346、D2S123、D17S250、

BAT25、BAT26 の 5 つのマーカーは、米国がんカーです。MSI 判定基準は、マーカーのうち 1 つ安定 (MSS: Microsatellite stable) とすれば 4 マーカー以上) が陽性の場合を MSI-H (下、すなわち、1 つか 2 つのマーカーで陽性)

表4 マイクロサテライト解析のためのマーカー

Maker	Nucleotide repeat	Locus	PCR size (bps)
D5S346	(CA)26	5q21-5q22	130
D2S123	(CA)13 TA (CA)15	2p16	217
D17S250	(CA)24	17q11.2-17q12	163
BAT25	(A)25	4q12	125
BAT26	(A)26	2p16	120
TGFβIIIR	(A)10	3p22	118
hMSH3	(A)8	5q11.2-q13.3	153
hMSH6	(C)8	2p21	94
BAX	(G)8	19q13.3-q13.4	94
MBD4	(A)10	3q21	140
MBD4	(A)6	3q21	50

いるマ
ロサテラ
一であれ
、それ以

② 検査方法と結果

塩基配列 (シーケンス) 決定法¹⁶

には、シーケンスゲル解析と蛍光オートシーケンサーを用いた方法があります。前者は用手法で、後者は機械を用いた方法です。

前者のゲルを用いた方法は、簡単な器具で行うことができますが、手

順が複雑なため時間と経験が必要となります。一方後者の場合は、大量の検体を短時間での処理が可能であり結果にも客観性がありますが、機械や高価なランニングコストになります。両者の方法で解析した結果を図 6 に示しました。図は同じ検体を両方法で行った例を示しました。それぞれのマイクロサテライトマーカーに MSI のアレルが検出されています。BAT26¹⁷はアデニン(A)が 26 回繰り返された部分ですが、腫瘍部では短縮された約 18

表4 マイクロサテライト解析のためのマーカー

Maker	Nucleotide repeat	Locus	PCR size (bps)
D5S346	(CA)26	5q21-5q22	130
D2S123	(CA)13 TA (CA)15	2p16	217
D17S250	(CA)24	17q11.2-17q12	163
BAT25	(A)25	4q12	125
BAT26	(A)26	2p16	120
TGFβIIIR	(A)10	3p22	118
hMSH3	(A)8	5q11.2-q13.3	153
hMSH6	(C)8	2p21	94
BAX	(G)8	19q13.3-q13.4	94
MBD4	(A)10	3q21	140
MBD4	(A)6	3q21	50

¹⁶塩基配列 (シーケンス) 決定法

文字通り、遺伝子を構成する DNA の並び方 (塩基配列) を解析すること。調べたい遺伝子の部分を純粋に抽出し、DNA ポリメラーゼの反応を利用して、端から決定していく

¹⁷BAT26¹⁷、BAX¹⁸ :

多型マーカーで、マイクロサテライトマーカーに分類される。BAT26 はアデニン(A)が 26 個、BAX は

回の繰り返し部分が検出されています。BAX¹⁸は正常ではグアニン(G)が 8 回の繰り返しですが、腫瘍部ではそれより 1 塩基少ない 7 回の繰り返しが見られます。そして、hMSH6 はシトシン(C)の 8 回の繰り返しですが、この症例では 1 塩基少ない 7 回の繰り返しアレルと 1 塩基多い

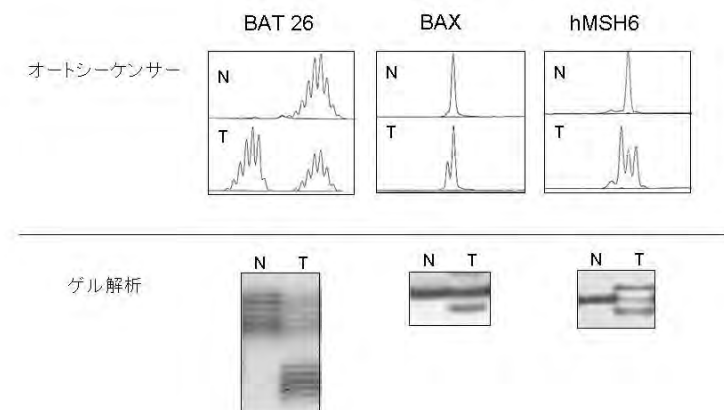


図6 MSIの解析例

4. 検査の問題点と今後の課題

大腸がんのうち、家族性と診断されるものは2~3%と言われています。家族性大腸がんには、主に FAP と HNPCC があり、FAP は *APC* 遺伝子が原因遺伝子であり、HNPCC は DNA 修復遺伝子の異常やそのメチル化など、複数の遺伝子が関与していることはこれまで述べた通りです。一方、散発性大腸がんの約 80~90%に *APC*、*p53*、*K-ras* 遺伝子の異常が検出され、これらの遺伝子変異の蓄積が、がん化へとつながることが知られるようになりました。また、その大部分の症例は Loss of Heterozygosity (LOH)¹⁹ という遺伝子欠失（消失）によっても活性を失うことが知られています。これらの散発性大腸がんの発がん機序は、家族性大腸がん、特に FAP 患者の遺伝子変異を研究することによりしだいに明らかになってきました。

家族性大腸がんの遺伝子診断には、家系調査やその診断基準などの臨床的診断が重要です。臨床情報から振るい分けられた数%の家族性大腸がんを疑う患者について遺伝子診断が行われます。しかし遺伝子診断は、これら臨床的に疑われた全ての患者に陽性になるとは

グアニン(G)が 8 個繰り返している。これらは MSI の検出に有用で、MSI の 80%以上に繰り返しの異常が検出される

¹⁸

¹⁹Loss of Heterozygosity (LOH)

邦訳ではヘテロ接合性喪失と言う。ヘテロ接合体の遺伝子で、正常な方の対立遺伝子の一部に欠失が起こり、結果的にその遺伝子は機能しなくなる。がん抑制遺伝子機能異常のメカニズムとして注目されている。

限りません。その理由として考えられることは、スプライシング²⁰異常など検出されない変異の存在、知られていない発がん遺伝子やその経路の存在、技術的な問題などが考えられます。このような臨床診断と遺伝子診断との不一致例をできるだけ減らすには、家族性腫瘍疾患の専門医師や看護師、検査技師の養成、専門外来の設置などが必要と思われます。

参考図書

1. 湯浅保仁ほか：家族性腫瘍，*Molecular Medicine* 別冊，中山書店，東京，1998
2. 緒方宣邦ほか：遺伝子工学キーワードブック，羊土社，東京，2004
3. 菊池韶彦ほか：遺伝子，東京化学同人，東京，1999

²⁰ スプライシング

真核細胞の DNA には、イントロンと呼ばれる介在塩基配列が存在している。エクソンだけのメッセンジャーRNA (mRNA) になるためには、イントロン部分を除かなくてはならない。イントロンを除いてエクソン同士を結合させることをスプライシングという

表 4

代表的な 11 種類のマイクロサテライトマーカーを示しました、判定基準は MSS: 0/11(全て陰性)、MSI-L: 3/11 以下陽性、MSI-H :4/11 以上陽性としています。通常の MSI 検出には、アメリカ癌学会で推奨した 5 種類のマーカーで十分です。また、1塩基繰り返しマーカーはコドン内に存在していることが多く、それらの異常は直ちにその遺伝子に影響があることを意味しているので有用であると考えられています。

図 6

実際の MSI 解析結果を示しています。シグナル検出方法は、蛍光オートシーケンサーを用いた方法(上)とシーケンスゲルを用いた方法(下)の 2 種類があります。マーカーは、それぞれ BAT26、BAX、hMSH6 を用いました(N: 正常組織、T: 腫瘍部組織)。

第 2 章 7 節 多発性内分泌腫瘍症 2 型・家族性甲状腺髄様がん

1. はじめに

多発性内分泌腫瘍症 2 型 (multiple endocrine neoplasia type 2: MEN 2) は、甲状腺髄様がん
と副腎の褐色細胞腫をはじめとして、いくつかの病変を合併します。MEN 2 は常染色体優性遺
伝による遺伝性の腫瘍で、構成病変によって MEN 2A と MEN 2B に分類されています。家族性甲
状腺髄様がん (familial medullary thyroid carcinoma: FMTC) は、遺伝的に甲状腺髄様がんの
みを発症しますが、MEN 2 は甲状腺髄様がんと副腎の褐色細胞腫を中心にいくつかの病変を合
併します (表 1)。

表 1 MEN, FMTC の分類と構成疾患

分類	局在	家族性	髄様がんの随伴疾患	悪性度
散发性	片葉	なし	なし	+++
MEN 2A	両葉	有	褐色細胞腫 上皮小体機能亢進症	++
MEN 2B	両葉	有	褐色細胞腫 粘膜神経腫 巨大結腸症 Marfan 様体型 ¹ 副腎褐色細胞腫 大腸憩室	++++
FMTC	両葉	有	なし	+

FMTC: 家族内に 4 人以上の髄様がん患者があり、褐色細胞腫・副甲状腺病変がない

(Molecular medicine 別冊(1998) 家族性腫瘍より一部改変)

2. 原因遺伝子: RET

RET 遺伝子は、受容体²型チロシンキナーゼ³をつくる「がん遺伝子⁴」として同定され、多発性
内分泌腫瘍症 2 型 (MEN 2)、家族性甲状腺髄様がん (FMTC) の原因遺伝子です。一般的には、生殖
細胞でシグナル伝達や増殖に関わるがん遺伝子の異常が起きると、体細胞変異とは異なり本来

¹Marfan 様体型

クモ指症とも呼ばれる Marfan 症候群の体型の特徴が、四肢が細く長いことから同様の体型を示す場合に用いられる。

²受容体

細胞外に面して細胞膜に存在し、生体物質や外部刺激等の信号を認識して、細胞に応答を引き起こすための構造。

³受容体型チロシンキナーゼ

上皮増殖因子、血管内皮増殖因子など各種の増殖因子自身がチロシンキナーゼ活性を有し、*erbB1*、*KIT*、*MET* などのがん遺伝子によって作られる。

⁴がん遺伝子

本来は発がんのために存在するのではなく、細胞の増殖や細胞分化の制御に重要な役割を担っているが、その異常や過剰な発現によりがん化を促進する性質を持つようになる。

は個体として成長できません。しかし、*RET* 遺伝子の生殖細胞変異があっても変異がない健常者と同様に成長できるのは、*RET* 遺伝子が受容体タンパクとして、限定された細胞分化⁵・増殖を制御しているからと考えられます。現在同定されている家族性腫瘍の原因遺伝子の大部分は、がん抑制遺伝子や DNA 修復遺伝子で、がん遺伝子が原因遺伝子として診断に用いられているのは、今のところ *RET* 遺伝子だけです。なお、遺伝性乳頭状腎細胞がん⁶の原因遺伝子である *MET* 遺伝子もがん遺伝子ですが、一般的な診療として用いられていません。

遺伝子異常の特徴として、ある一つの塩基が他の塩基に置き換わり、異なるアミノ酸が作られるミスセンス変異⁷であること、異常が限局していることが挙げられています。

3. 遺伝子診断

2001 年に国際グループによりコンセンサス・ガイドラインが出されました。表 2 は *RET* 遺伝子の変異部位により、甲状腺髄様がんのリスクレベルを 3 段階に分けたものです。

表 2 コンセンサス・ガイドライン(甲状腺髄様がんのリスクレベル)

レベル 1: コドン 609, 168, 790, 791, 804, 891 の変異

5 才までに甲状腺全摘出を勧める者と 10 才までに全摘出をすればよいという 2 つの見解に分かれている。

カルシトニン負荷試験を行い異常値が得られたら全摘出を勧める場合もある。

レベル 2: コドン 611, 618, 620, 634 の変異

5 才までに甲状腺全摘出をすべきである。

レベル 3: コドン 883, 918, 922 の変異あるいは MEN 2B

生後 1 ヶ月までに甲状腺全摘出を行うのが望ましいが、生後 6 ヶ月までに甲状腺全摘出を行うべきである。

RET 遺伝子変異の部位により、甲状腺髄様がんのリスクレベルを 3 段階に表したガイドラインです。

リスクレベルは 1 から 3 へと高くなり、3 では、乳児の段階で甲状腺の全摘出を推奨されています。

前述したように、*RET* 遺伝子の変異は限局したミスセンス変異なので検出も容易です。また浸透率⁸は 100%なので、遺伝子診断の意義が高いといえます。そこで欧米では、甲状腺髄様がん、褐色細胞腫などの患者には積極的に遺伝子診断を行い、患者家族の保因者⁹（発症前）診断を取

⁵細胞分化

多細胞生物は 1 個の受精卵より発生し、分裂増殖と細胞の分化を繰り返し個体となるが、この過程で細胞が形態的、機能的な特徴を獲得していくこと（骨、皮膚、各種臓器などに変化）。

⁶遺伝性乳頭状腎細胞がん

同一家系内に複数の腎細胞がん患者を認め、病理学的に乳頭状の組織構築をもつ腎細胞がん

⁷ ミスセンス変異

遺伝子のアミノ酸に対応する 3 つの核酸（コドン）のうち、突然変異によりそのいずれかが変化して別のアミノ酸になること。

⁸浸透率

ある遺伝子変異を持っている人が生涯のうち病気（ここではがん）を発症する頻度のこと。保因者が発症する頻度。または、遺伝子型が表現型となる頻度。

⁹保因者（キャリア）

病因となる遺伝子異常をアレルの一方に持っていて、発症していない人のこと。

り入れています。また家族に保因者が発見されると、積極的に甲状腺全摘手術を行う予防的処置が行われています。さらに甲状腺髄様がん患者の *RET* 遺伝子検査を行わないことで訴訟になる場合もあるといひます。家族歴がなく、一見散発性¹⁰と思われる甲状腺髄様がんにも *RET* 遺伝子変異が認められる症例がありますので、すべての髄様がん患者に *RET* 遺伝子検査を行うことを推奨されています。

甲状腺髄様がん患者は、臨床遺伝専門医がいる遺伝子診療外来などに紹介され、*RET* 遺伝子検査の説明を受けます。一般的には、遺伝子検査実施の同意が得られて遺伝子異常が発見されると、患者に未発症の家族の検査の意義を再度説明し、家族のカウンセリングに対する協力を依頼します。未発症の家族に十分なインフォームドコンセントを行なった後、保因者診断を施行します。患者家族のうち約半数は保因者で、患者の子供や孫の場合は発症が若年化するため、10 代、20 代で発症するケースが多くなります。文献的には、すでに 2 才や 6 才で微小ながんが認められたケースもあり、早期の検査と就学前の予防的全摘手術を行うべきとの意見もあります。しかし MEN 2A では、髄様がんが早く発育するものと、遅くて高齢までゆっくり発育する例もあり、後者のような場合は、小児期に全切除する必要がないという意見もありますが、臨床的な見極めをする基準が確立していません。

MEN 2 の発症前遺伝子診断によって、遺伝子異常が発見されて保因者になると、超音波検査、カルシトニン値測定などの定期的な検診を受けるよう勧められます。日本では、保因者の発症前甲状腺全摘手術は行わず、超音波などの画像診断とカルシトニン値でフォローアップするケースが多いようです。画像診断で腫瘍が発見されるか、カルシトニン値が上昇したときに全摘出をします。甲状腺の片葉にのみ腫瘍が検出されても、全摘出するという方針は日本においても変わらないようです(図 1)。

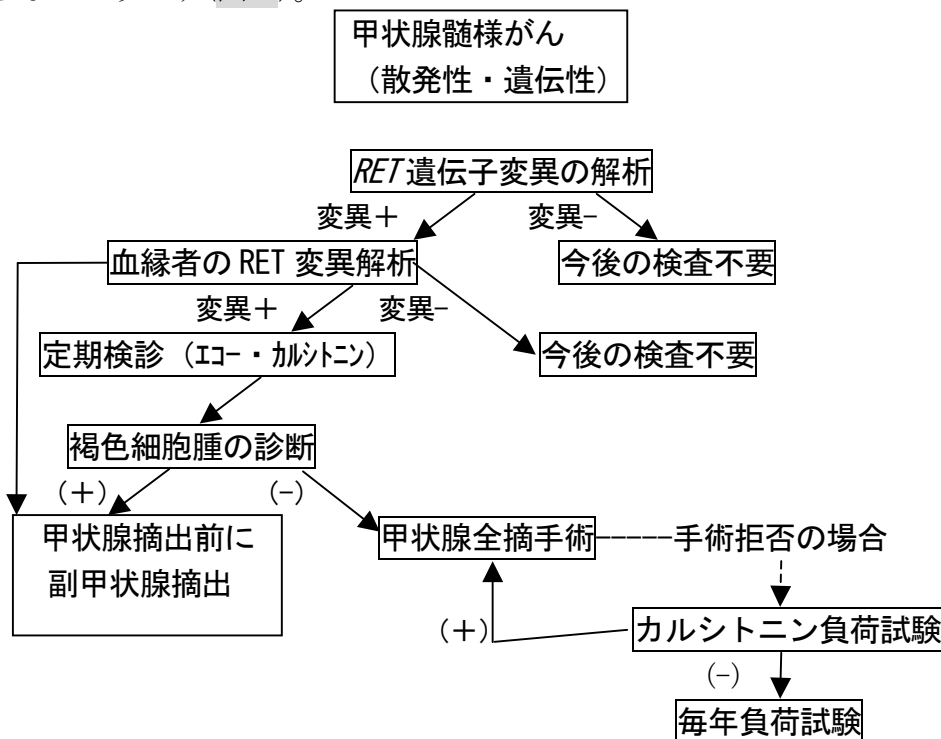


図 1 髄様がん患者と血縁者に対する診断・治療の流れ

参考図書 (1) Molecular Medicine 別冊(1998)の一部改変

¹⁰散発性のがん

遺伝的に伝播されて発症するのではなく、後天的に種々の原因で断続的に発症する一般的ながんのこと。

4. 遺伝子検査

RET 遺伝子の検査方法は、DNA の塩基配列を直接解読していくシーケンス（塩基配列決定法）や、特定の塩基配列のみを切断する制限酵素¹¹ を使い、塩基配列の切断の有無による断片の長さの違いから判定する、制限酵素断片長多型¹²（Polymerase Chain Reaction-Restriction enzyme Fragment Length Polymorphism: PCR-RFLP）などが使用されています。発端者¹³ の DNA をシーケンスで解析して変異の場所が決定したら、家族の保因者診断は PCR-RFLP で一括して行うという方法もあります（図 2）。

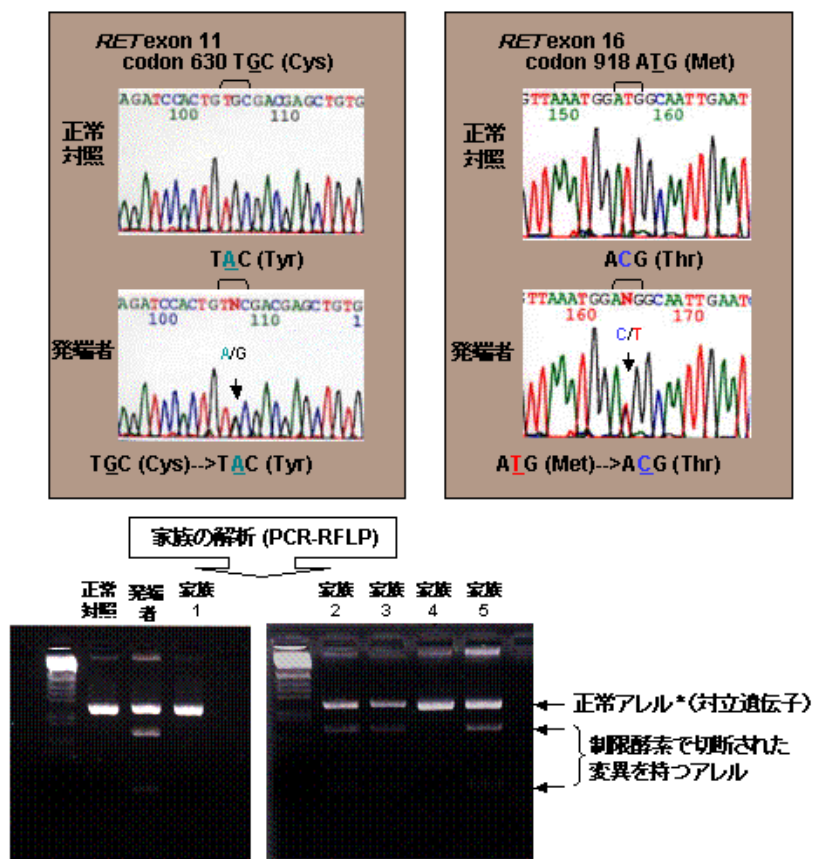


図 2 DNA シーケンス(上)と PCR-RFLP(下)の電気泳動パターン

図の左上は、ダイレクトシーケンスにより *RET* 遺伝子のエクソン 11, コドン 630 の TGC(システイン)が TAC(チロシン)に変わるミスセンス変異が認められた症例です。図の右上は、*RET* 遺伝子のエクソン 16, コドン 918 の ATG(メチオニン)が ACG(トレオニン)に変わるミスセンス変異が認められた症例です。下の写真は、PCR-RFLP 法を用いて、コドン 630 に変異が認められた発端者の家族の保因者診断を行った結果です。制限酵素 (*Afa* I) で片方のアレルを切断された家族 2, 3, 5 は、一方の正常なアレルを含む 3 本の断片が確認され、発端者と同じ変異を持つことが同定されました。

¹¹制限酵素

2 本鎖 DNA の特定の塩基配列 (4~8 塩基対) を認識して切断する酵素のこと。遺伝子工学の実験には 100 種類くらい使用されている。

¹²制限酵素断片長多型 (PCR-RFLP)

PCR で増幅した DNA 断片を制限酵素で処理し、点突然変異により塩基配列が変化した断片は切断される（またはその逆）ことで、断片長の違いを電気泳動で確認する手法のこと。多型とは、遺伝子の塩基配列に見られる個体差のこと。

¹³発端者：ある遺伝病の家系が見つかる発端となった遺伝形質を持つ人のこと。

以前はエクソン 10, 11, 16 を解析するのが一般的でした。*RET* 遺伝子の変異は、3 つのエクソンを解析することで遺伝子変異の検出が大部分カバーできるとされていたからです。しかし近年、エクソン 13~15 にもわずかですが変異が認められることが分かってきました (表 3)。

非常に少ない頻度であっても、変異が存在する可能性を無視することはできません。エクソン 13~15 に変異を認めるときは、FMTC の場合が多いようです。前述のように、発端者の場合は散発性の甲状腺髄様がん と FMTC との臨床的鑑別は困難なことから、エクソン 13~15 を含めた *RET* 遺伝子解析は重要といえるでしょう。

表 3 *RET* 遺伝子の変異部位

	エクソン	コドン	病型
	10	609, 611, 618, 620	MEN 2A, FMTC
	11	630	FMTC
細胞膜	11	634	MEN 2A, FMTC
↓	13	768	FMTC
細胞内	13	778	MEN 2B
	13	790, 791	MEN 2A, FMTC
	14	804	MEN 2A, MEN 2B, FMTC
	14	806 (804 と同時に)	MEN 2B
	14	844 (804 と同時に)	FMTC
	15	883, 904	MEN 2B
	15	891	FMTC
	16	918	MEN 2B

1) ダイレクトシーケンス

被験者末梢血液より DNA を抽出し、被験者 DNA とともに発端者 DNA と健常者 DNA を用いて、目的の 6 つのエクソン領域を PCR 法で増幅します。増幅された PCR 産物をサイクルシーケンス¹⁴ 反応の鋳型とします。この反応を用いたダイレクトシーケンスは、PCR 産物をクローニング¹⁵ する必要がなく、DNA 合成酵素¹⁶ のエラーを誤読する危険も少ないという利点があるので、遺伝子検査に多く用いられています。

手順は、EDTA 入りの採血管に採取した抹消血液中の有核細胞から DNA を抽出し、その DNA を鋳型として *RET* 遺伝子の 6 つのエクソン (10, 11, 13, 14, 15, 16) をそれぞれ PCR 法で増幅します。増幅されたエクソンごとにサイクルシーケンス反応を行い、その反応液をシーケンサー (塩基配列読み取り装置) で電気泳動して塩基配列を決定します (図 2)。

14 サイクルシーケンス

ジデオキシ法を基本原理とし、PCR を用いた塩基配列決定法のこと。微量の DNA から PCR を用いて蛍光標識した一本鎖 DNA を合成し、塩基配列を決定する。

15 クローニング

DNA の一部をベクター (プラスミドなど) に挿入し、目的の遺伝子を単一化すること。これにより、細菌を用い純粋な DNA 断片を多量に回収できる。

16 Taq DNA 合成酵素

耐熱性 DNA 合成酵素で、高熱に耐えられるので PCR による DNA の増幅反応に用いられる

2) PCR-RFLP

PCR-RFLP は、がん関連遺伝子の中では特に *RET* 遺伝子の解析に適しています。MEN 2 における *RET* 遺伝子変異は、前述の 6 つのエクソン内の、17 箇所の決まった部位に局限したミスセンス変異です。発端者のミスセンス変異の部位がシーケンスによって塩基配列上で同定され、その家族が同じ変異を持つかどうかを調べる際に、PCR-RFLP は精度よく、迅速に検出することが可能です。

手順は、DNA を鋳型として *RET* 遺伝子の 6 つのエクソンをそれぞれ PCR で増幅するのは、前記のシーケンスと同様です。その後、増幅した DNA を制限酵素処理して、アガロースゲル電気泳動を行います。一塩基の配列が異なる部位を特異的に認識する制限酵素は、認識部位で DNA を切断するため、長さの違う DNA 断片がアガロースの粒子で篩い分けされて、断片数と移動度が正常対象 DNA とは異なることが確認できます。保因者診断は、図 2 のように発端者の DNA 断片と正常対象 DNA 断片を並行して検査します。

5. 検査の問題点と今後の展望

診断上の問題点として、臨床的に明らかに MEN 2 であっても、遺伝子異常が検出されなかった症例が 1~2% あったという報告があります。この問題点は他の家族性腫瘍の原因遺伝子にもあり、遺伝子検査が陰性になった場合の説明には慎重を要します。

MEN 2 の遺伝子診断は、予防的治療効果の臨床的研究も進んでいて、家族性腫瘍の遺伝子診断中では最も確立されているといえます。しかし、先に述べたように解析面での問題点もあり、特に予防的治療に関する臨床側の見解もまだ統一されているとはいえません。患者やその家族に最適な医療を提供するためには、検出率向上のための研究や情報収集と共に、十分な遺伝カウンセリングなどによって、遺伝子診療に携わるチーム全体の努力が望まれます。

参考図書

- 1) 高見博, 岩田洋介: MEN2: *RET* 遺伝子, Molecular Medicine 別冊, 262-267, 宇都宮譲二監修, 中山書店, 東京, 1998
- 2) 松浦喜美夫ほか: 多発性内分泌腫瘍症 2 型, 特集遺伝性腫瘍 II, 日本臨床, 2000 ; 58, 1437-1441.