

8 節 家族性乳がん

須貝 幸子 財団法人癌研究会有明病院遺伝子診断部

1. はじめに

家族性乳がんとは、表 1 に示すように定義されています。

表 1 家族性乳がんの定義

1. 第一度近親者に発端者を含め 3 人以上の乳がん患者がいる場合
2. 第一度近親者に発端者を含め 2 人以上の乳がん患者がおり、
2 名のいずれかが次の①～③のどれかを満たす場合
 - ① 40 才未満の若年者乳がん
 - ② 同時性あるいは異時性両側乳がん
 - ③ 同時性あるいは異時性多臓器重複がん⁷⁵

家族性乳がんの定義を示す表です。第一度近親者に 3 人以上の乳がん患者がいる場合と、第一度近親者に 2 人以上の乳がん患者がいて、いずれかが若年発症、両側性や重複がんなどの悪性度リスクが高い場合に家族性乳がんとして定義されています。家族歴がなくても、その患者が発端者となる場合もあるので、若年発症や重複がんを合併したら注意を要します。

Li-Fraumeni 症候群⁷⁶や Cowden 病⁷⁷などにみられる乳がんも遺伝性ですが、病気の特徴が特殊なために、一般の家族性乳がんには分類されていません(表 2)。

乳がんの発症には、遺伝的要因と環境要因が関与すると言われ、家族性に発症する乳がんはそのいずれも原因となります(図 1)。多くの家族性乳がんは遺伝子の異常を遺伝的に受け継い

⁷⁵重複がん:多重がんとも言い、原発と思われるがんが複数存在する場合をいう。同一臓器に複数のがんがあるときは、多発がんとして分けて呼ばれる。

⁷⁶ Li-Fraumeni 症候群:*p53* 遺伝子が原因遺伝子とされ、常染色体優性遺伝形式をとる。*p53* 遺伝子の生殖細胞変異が認められたがん多発家系を調べると、多くは家系内に肉腫、脳腫瘍、白血病、乳がん、肺がんのほか胃がんや悪性黒色腫、食道がん、膵臓がんなどを発症している。症候群という名のように、これらのがんを一人で重複発症する例も多く見られる。

⁷⁷ Cowden 病:*PTEN* 遺伝子が原因遺伝子とされ、常染色体優性遺伝形式をとる。中胚葉、外胚葉由来の組織に腫瘍性病変が発生する。特徴的な皮膚粘膜病変と消化管ポリープ、乳がん、甲状腺がん、胃がん、大腸がんなどの悪性腫瘍の合併が見られる。

で発症しますが、同一環境因子を共有することで発がんする場合があります。家族性乳がんのうち、遺伝性乳がんは *BRCA1* あるいは *BRCA2* 遺伝子の変異によって生じることが知られています。日本人に比べて乳がんの発生頻度が約 3 倍高いアメリカでは、患者の 10-15% が *BRCA1* あるいは *BRCA2* 遺伝子の変異による遺伝性の乳がんと推定されています。日本人の乳がんのうち、この遺伝子の変異によって生じた患者がどのくらいの割合であるかを調べる研究が現在進められています。アメリカでは未発症でもこの遺伝子の変異が見つかりと乳房を切除する人まで現れて社会的な問題になったことがあります。日本では定期的な診断によって早期発見、早期治療が可能であると考えられています。

表 2 家族性乳がんの分類

家族性乳がん (広義)	遺伝性乳がん	家族性乳がん (狭義)	家族性乳がん/卵巣がん (BRCA1)
			家族性乳がん(早発型) (BRCA2)
			家族性乳がん(晩発型) (ESR)
			家族性乳がん・第3の遺伝子？
	他の遺伝性 乳癌がん	Li-Fraumeni 症候群 (p53)	
		Cowden 病 (PTEN)	
		末梢血管拡張性運動失調症 (ATM)	
		がん多発家系における乳がん	
非遺伝性乳がん			

参考図書(1) Molecular medicine 別冊 (1998) 家族性腫瘍より一部改変

家族性乳がんは遺伝性・非遺伝性に分けられ、遺伝性乳がんの中でも、家族性乳がん・Li-Fraumeni 症候群や Cowden 病などその他の遺伝性乳がんへと分類されています。それは、Li-Fraumeni 症候群なども家族集積性に乳がんが現れますが、家系内に肉腫、白血病、肺がん患者が見られ、本来の家族性乳がんとは異なるからです。

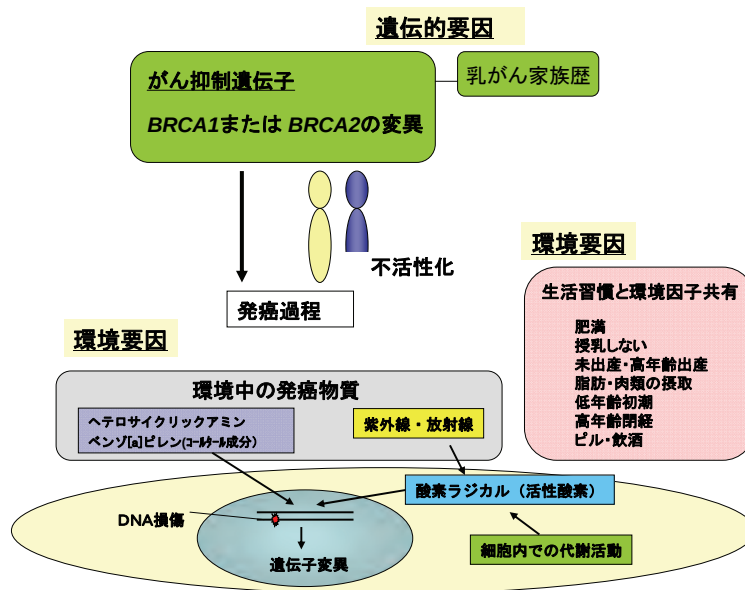


図1 乳がんのリスクファクター

家系にがんの集積が認められる場合、「遺伝性」と「環境因子」の2つの要因が考えられます。1つは、がんの易罹患性に関与する遺伝的素因(遺伝子変異など)を家系内で共有している場合、もう一つは食事などの生活習慣や、生活環境などの環境要因を共有している場合です。家族性乳がんの多くは遺伝的要因による発がんと考えられていますが、肥満、脂肪摂取などの他に、未出産、授乳しない、初潮や閉経などの女性ホルモンに関連した因子も乳がん発症のリスクに含まれます。

2. 原因遺伝子

全乳がんの 5~10%の症例は家族性に発症しています。その原因遺伝子として *BRCA1* と *BRCA2* があり、家族性乳がんの遺伝子検査はこの2つの遺伝子を解析します。遺伝性の乳がんは常染色体優性遺伝形式を示します。この遺伝形式はメンデルの法則に従い、親の遺伝子異常が 50%の確立で子供に受け継がれます。また *BRCA1* と *BRCA2* は家族性卵巣がんの原因遺伝子とも言われています。

米国では遺伝子検査の臨床的有効性を図2のように表しています。症状を現す人が検査陽性となる確率(感度)、症状が現れないと予想される人の検査結果が陰性となる確率(特異度)、および、陽性結果の人が疾病を発症する確率「(陽性的中率)、陰性結果の人が疾病を発症しない確

率「(陰性的中率)を推測するものです。これらは集団の有病率⁷⁸や浸透率の影響を受けるため、実際には真の陽性 A と真の陰性 D を完全に鑑別することができないのが遺伝子検査の現状です。

		疾病	
		有	無
検査結果	陽性	A: 真陽性	B: 偽陽性
	陰性	C: 偽陰性	D: 真陰性

図 2 遺伝子検査の臨床的有効性

A: 検査結果が陽性で、疾病を発症する人

B: 検査結果陽性で、疾病を発症しない人

C: 検査結果が陰性で、疾病を発症する人

D: 検査結果が陰性で、疾病を発症しない人

感度=A/A+C, 特異度=D/B+D, 陽性率=A/A+B, 陰性率=D/C+D

参考図書(5) 遺伝子検査ガイドラインより

また、*BRCA1* 遺伝子と *BRCA2* 遺伝子は、遺伝子検査の有用性の分類における 3 つのグループ中の第 2 グループに属しています(「がんの遺伝子変異」の表 3 を参照)。これは他の原因遺伝子の存在など、まだ研究的要素を残し、診断的有用性が確立されていないことを示しています。

1) *BRCA1* 遺伝子

BRCA1 遺伝子は第 17 番染色体長腕(17q21)に位置し、24 個のエクソンからなるがん抑制遺伝子⁷⁹です。ゲノム全長が 100kb と巨大な遺伝子で、エクソン 11 が非常に長く、翻訳⁸⁰領域の半分以上を占めるという特徴があります。*BRCA1* の遺伝子産物は 1,863 個(220 キロダルトン⁸¹)の

⁷⁸有病率: 定められた時点における疾病者の単位人口に対する割合のこと。

⁷⁹ がん抑制遺伝子: がん遺伝子とは反対に、正常な細胞において細胞の無制限な増殖を抑制している遺伝子。これらの遺伝子が異常になることでがん細胞の増殖にブレーキがかからなくなる。がん抑制遺伝子は、家族性腫瘍の原因遺伝子の大部分を占めている。

⁸⁰翻訳: mRNA の塩基配列に従ってアミノ酸が作られ、タンパク質が合成されること。

⁸¹ キロダルトン: kDa. キロは 1,000. ダルトンは分子量(g)を表す。

アミノ酸からなるリン酸化タンパク質です。*BRCA1* 遺伝子は細胞周期における DNA 修復⁸²に関与しています。また転写⁸³にも関わり、遺伝子の発現調節を行うことで細胞増殖を調節しています。欧米のこれまでの報告によると、家族性乳がん家系における生殖細胞変異には、ホットスポットと呼ばれる、遺伝子内に変異が集中する領域は認められていません。アミノ酸の読み枠⁸⁴がずれるフレームシフト変異⁸⁵や、一塩基の置換でストップコドン⁸⁶になってしまうナンセンス変異⁸⁷などの、タンパク質合成が中断する変異が大部分です。

2) *BRCA2* 遺伝子

BRCA2 遺伝子は、第 13 番染色体長腕(13q12-13)に位置し、27 個のエクソンからなり、全長 70kb の巨大ながん抑制遺伝子です。*BRCA1* 遺伝子と同様にエクソン 11 が非常に長いという特徴があり、3,418 個のアミノ酸(384 キロダルトン)からなる核内タンパク質です。*BRCA2* 遺伝子は、*BRCA1* 遺伝子と同様に細胞周期⁸⁸における DNA 修復などに関与しています。家族性乳がん家系における胚細胞変異には、ホットスポットは認められず、大部分がフレームシフト変異またはナンセンス変異です。*BRCA1* 遺伝子と同様に、これらの変異により蛋白の一部しか産生されず、本来の機能を失っていることが推測されます。

⁸² DNA 修復: DNA は種々の要因でいつもキズや変異を受けるので、生体には修復酵素が存在してこれらを修復する機能が備わっている。

⁸³ 転写: DNA の遺伝子情報を mRNA に写し取る過程のこと。

⁸⁴ 読み枠: 塩基配列が 3 個で 1 つのアミノ酸に翻訳される。その 3 個ずつ(コドン)の並び。フレームともいう。

⁸⁵ 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 3 個 1 組のコドンの読み枠にズレが生じる。その結果、遺伝子配列の途中にストップコドンができ、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。

⁸⁶ ストップコドン(終止コドン): ナンセンスコドン(3 種)とも言い、アミノ酸を規定していないコドンのこと。転写・翻訳終了の暗号で、その情報でタンパク質合成が完結する。

⁸⁷ ナンセンス変異: ストップコドンが生じるような塩基の突然変異。

⁸⁸ 細胞周期: 真核生物における細胞分裂のサイクルで、G1 期、S 期、G2 期、M 期の 4 期に分けられ、細胞分裂もこの順に進む。分裂をしていない細胞や老化した細胞のほとんどは、G1 期で停止している。

3. *BRCA1*, *BRCA2* の遺伝子検査

1) 検査の背景

前述のように, *BRCA1*・*BRCA2* 遺伝子の変異は, そのほとんどがタンパク質の合成が中断するものです. 遺伝子変異や遺伝子多型などのデータベースは, 欧米におけるデータを基に作られています. 最近, 日本でもデータが集積されてきました. 一般的に日本における遺伝性乳がんの変異の頻度は, 欧米に比べ低いと報告されています. また日本の報告では, ミスセンス変異⁸⁹の頻度が欧米に比べて高いようです. このことは, 人種による創始者効果⁹⁰も推測できます. また一部の民族では, ある特定の変異が集中するという報告もありますが, 大部分の人種ではホットスポットはなく, 変異は遺伝子の広い範囲に分布しています. そこで発端者の遺伝子検査を行う場合には, *BRCA1*・*BRCA2* 遺伝子それぞれの全領域を調べる必要があります.

しかし, DNA を用いた PCR 法からの解析では変異を検出できない場合があります. 1 個～数個のエクソン全体が欠失するような変異の場合, 一方の正常アレル⁹¹のエクソンは存在しているので, PCR 法で増幅する際に正常アレル側のエクソンのみが増幅されて, 正常なシーケンスとなります. 他に *BRCA2* 遺伝子のエクソン 22 に, 遺伝子全体に散在している *Alu* 配列⁹²と呼ばれる反復配列が挿入したために, エクソン 22 全体が欠失する変異を三木らは報告しています. 同様に *BRCA1* 遺伝子にも, *Alu* 配列が散在しているため, エクソン全体が欠失する“large deletion(広域に渡る欠失)”の報告も多くなっています. エクソン単位で解析して変異が検出されない場合は, cDNA⁹³を用いた解析や被験者の染色体を半数体にして片アレルずつ別々に解析する方法(コンバージョン法), また遺伝子の構造異常をエクソン単位で検出できる MLPA 法⁹⁴などを選択しなくてはなりません.

⁸⁹ ミスセンス変異:別のアミノ酸を規定するコドンに変わるような塩基配列の突然変異. 遺伝子の違いや遺伝子上の部位により, 病気の発生に関与する場合と, 多型(個人差)となる場合がある.

⁹⁰創始者効果:少数からなる集団を祖先として, 新たな遺伝子頻度を持つ集団が形成されること.

⁹¹ アレル(対立遺伝子):特定の染色体上, 遺伝子上の同一の位置を占める二つ以上の異なった遺伝子のうちの一つ. ヒトの場合は, 父親由来と母親由来のそれぞれが対立遺伝子となる.

⁹² *Alu* 配列:ヒトゲノムにみられる高頻度反復 DNA 配列で, ゲノム全体に散在している.

⁹³ cDNA(相補的DNA):メッセンジャーRNA 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.

⁹⁴MLPA 法: エクソンの欠失や, 増幅などのゲノム構造異常を検出するための方法. それぞれ標的となる領域に対して特異的に結合し隣接する2つの DNA 断片を用いる. その各断片には, PCR 増幅させる配列と, 特異的

また、*BRCA1* 遺伝子では、DNA の情報を mRNA に写し取る酵素が最初に認識するプロモーターと呼ばれる領域が、メチル化⁹⁵という現象によって不活化が起きることが知られています。これは不変的に塩基配列の異常を生じる生殖細胞変異とは異なり、遺伝子機能の発現に影響をもたらす生体のシステムで、可逆的な変化として区別されていて、一般の散発性乳がんにもメチル化が生じています。したがって、散発性乳がんでも *BRCA1・BRCA2* 遺伝子のメチル化が関与していることが考えられます。

さて、変異が認められた場合は、その変異が過去に報告されているのか、特にミスセンス変異の場合は、病的な変異として位置付けられているかなどをデータベースで検索します。乳がん専用の Breast Cancer Information Core(<http://research.nhgri.nih.gov/projects/bic/>)や The Human Gene Mutation Database の Web サイト(<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>) を参考にするとよいでしょう。

2) 検査方法

発端者の解析は、図 3 に示すように 3 つの方法が用いられます。①PCR 断片ごとの1本鎖 DNA の構造変化を検出することにより、変異をスクリーニングする PCR-SSCP 法、②フレームシフト変異による、遺伝子の読み枠の違いや、ナンセンス変異で生じたストップコドンを検出する PTT⁹⁶やストップコドンアッセイ法⁹⁷、③遺伝子の全領域の塩基配列を解析するシーケンス、など

に結合させる(ハイブリさせる)配列、さらに、サイズ調節塩基配列を融合させて異なる増幅断片長になるように設計してある。1つのチューブ内で一度に 45 領域の DNA 断片を PCR で増幅し、その PCR 産物を解析して欠失・増幅部位を定量的に捉えることができる。

⁹⁵ メチル化:DNA にメチル基が付加される反応のこと。DNA の特定な C・G 配列の C(シトシン)がメチル化され、5-メチルシトシンになる。転写を制御している領域のメチル化がクロマチンの立体構造に変化を生じ、その遺伝子の転写を抑制する。

⁹⁶ PTT 法:プライマーに翻訳開始の配列を付けて、mRNA から cDNA を合成し、試験管内で cDNA の情報を読み取り、アミノ酸を合成する反応を行ってタンパク質を作る。ナンセンス変異など、終止コドンが作られる変異を持つと、タンパク質合成が途中で中断した切断タンパク質が存在するので、放射性同位元素や蛍光色素等をタンパク質に標識して、タンパク質合成が途中で中断するような変異の有無を電気泳動で検出する。

⁹⁷ ストップコドンアッセイ法: 酵母の発現系を利用して、ナンセンス変異などのタンパク質合成が途中で中断するような変異を検出する方法。DNA 断片をアミノ酸合成が可能なベクターに組み込み、発育のために特定のアミノ酸が必要な酵母に導入する。正常な DNA は、ベクター内のアミノ酸を作る遺伝子と融合してアミノ酸を合成できるが、途中で終止コドンが作られる変異を持つと、合成が中断するためにアミノ酸を合成できない。そこで、

です。方法①②は変異をスクリーニングするための手法で、最終的な確認は③のシーケンスで塩基配列を読み取ることです。しかし、両遺伝子ともに巨大遺伝子なので、すべての塩基配列を読むのは多大な労力と時間、費用を要します。そこで、一般的には PCR-SSCP 法もしくは PTT、ストップコドンアッセイ法などで遺伝子全体から変異の存在が疑われる領域を限定します。次に、その疑わしい領域のシーケンスを行い、塩基配列を解読して変異を同定します。しかし、PCR-SSCP 法や PTT 法等を行なう場合は、PCR-SSCP 法の変異の検出感度は約 80～90% であることや、PTT 法やストップコドンアッセイなどの方法では、ミスセンス変異は検出できないなどの問題点を考慮しなければなりません。したがって、最終的にはすべての領域をシーケンスすることが必要な場合も多くなります。さらに、これまでに紹介した方法では検出できない異常が存在します。その時は、MLPA 法を用いて検索します。MLPA 法は、エクソンの欠失や、増幅などのゲノム構造異常を検出するための方法です。

3) 委託検査

2002 年から検査の特許を有している米国のミリヤド社(遺伝子解析センター)では、すべてシーケンス法で解析しています。診療として遺伝子解析を行う場合は、日本のファルコを通じてミリヤド社に委託しなければなりません。

必要とするアミノ酸が含まれない培地で、目的の DNA を導入された酵母を培養し、タンパク質合成が途中で中断するような変異を持つかどうかを検出する。

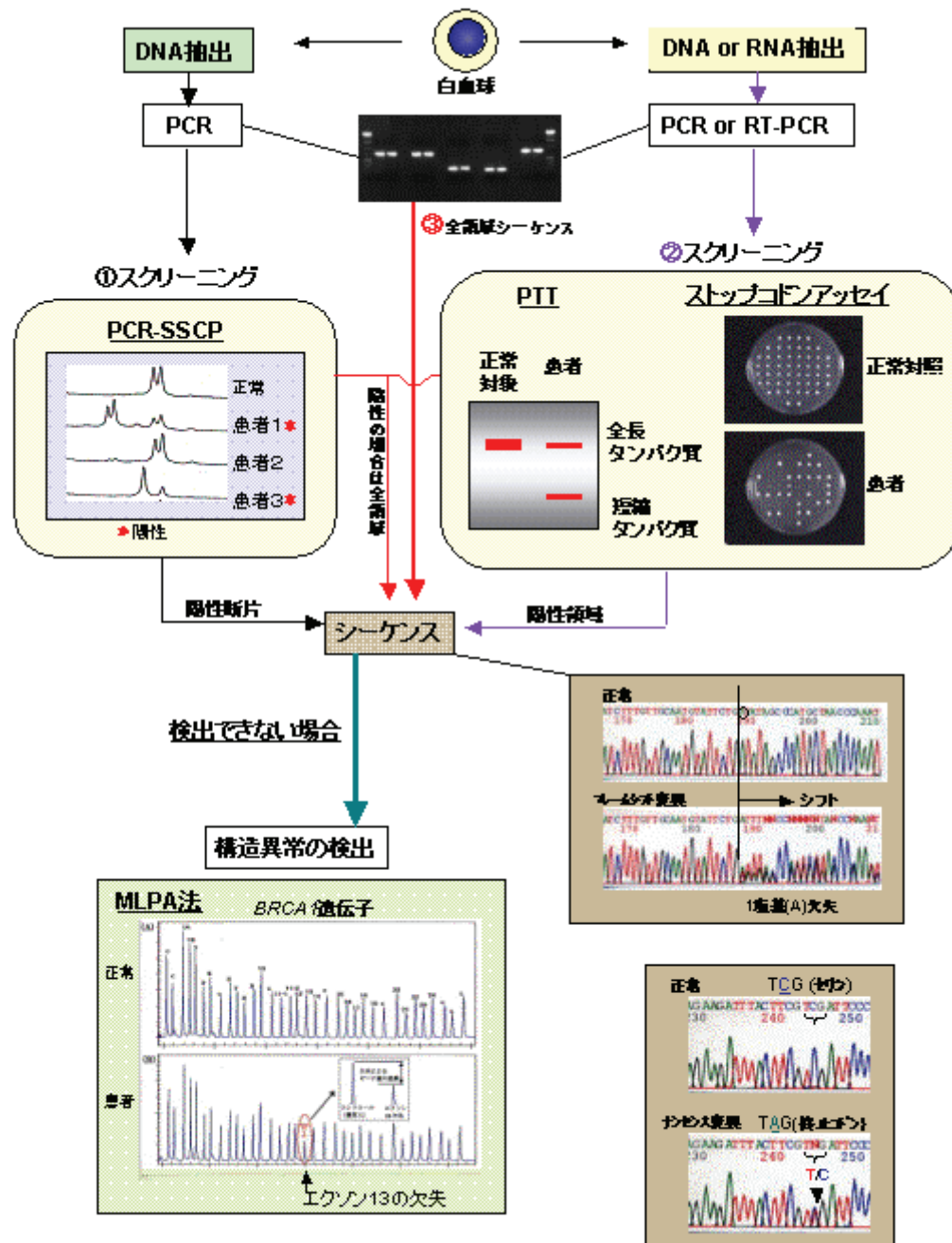


図3 家族性乳がん遺伝子検査の主な流れ

被験者DNAを①スクリーニングのPCR-SSCP法を用いて、どの断片に変異があるかを検出し、見つかった断片をシーケンスして変異部分の塩基配列を同定します。②のスクリーニングは、PTI、ストップコドン法などを用いて、BRCA遺伝子に多いナンセンス変異、フレームシフト変異などを検出します。異常が見つかった領域をシーケンスによって、変異部分の塩基配列を同定します。または赤い線の流れのように、PCRで増幅した断片を直接シーケンスして変異の有無を調べ、①②で検出できない場合に全領域をシーケンスします。家族歴などから家族性乳がんが疑われるものの、いずれの方法でも変異を検出できない場合は、MLPA法でエクソン全体の欠失などの構造異常を検索します。

4. 問題点と今後の展望

日本における家族性乳がんの頻度は、欧米に比べ低めですが、乳がんの増加に伴い、今後、増えてくることも予想されています。頻度が低いとはいえ、世代を経るごとに若年発症、両側乳がん発症の頻度が高くなるなどのリスクがあります。そこで乳がんの発生頻度が高い米国では、*BRCA1*, *BRCA2* 遺伝子の変異が認められると、予防的に乳房を切除する例があるようです。一方、日本では検診間隔を狭めるなどの対応が中心になっています。

全乳がん患者の 6%、全卵巣がん患者の 10%が *BRCA1*, *BRCA2* 遺伝子変異によるものと推定されていますが、それは人種や対象とする患者集団の特徴により異なっています。また浸透率(変異を持つ人が生涯がんになる確率)も国により 60~80%と差が認められます。日本人に多いミスセンス変異が、乳がん発生に関与する役割はまだ不明です。さらに *BRCA1*, *BRCA2* 遺伝子だけでなく、他の関連遺伝子の存在が推測されています。今後その究明とデータの蓄積、分子生物学的知見と臨床所見の検証によって、家族性乳がんの遺伝子診断が確立されることが望まれます。

参考図書

- (1) 野水整, 三木義男:家族性乳がん:BRCA1, BRCA2 遺伝子, MOLECULAR MEDICINE 別冊, 198-204, 宇都宮譲二監修, 中山書店, 東京, 1998
- (2) 野水整ほか:家族性乳がんの臨床, 家族性乳癌, 金原出版, 7-16, 東京, 1996
- (3) 矢野憲一, 三木義男:遺伝子診断-乳がんの診断と治療, 日本臨床増刊, 58, 527-532, 2000
- (4) 須貝幸子, 三木義男:悪性腫瘍-乳癌, 1079-1083, 宮地勇人ほか編, 検査と技術増刊 30, 医学書院, 東京, 2002
- (5) 濃沼信夫(監訳):遺伝子検査ガイドライン(アメリカ特別委員会最終報告書), 厚生科学研究所, 東京, 2000

9節 固形がんにおける分子標的治療薬と染色体遺伝子検査

柴田 典子 愛知県がんセンター中央病院臨床検査部遺伝子病理検査科

1. がんの特徴と良性腫瘍との比較

人間の体内の細胞は、1つの細胞が死ぬと新しい細胞が1つ生まれるというように一定のルールに従って分裂や増殖を行っています。ところが、ある細胞の遺伝子に傷が付くとそのルールが崩れ、突然異常な増殖を始めます。これが腫瘍と呼ばれるもので、悪性腫瘍と良性腫瘍があります。悪性腫瘍(がん)とは①ヒトの正常細胞のサイクルを無視して勝手に増殖を続ける(自律性増殖)、②周囲の組織に広がり(浸潤)、③血液やリンパ液を介して別の臓器へも移り(転移)、④他の正常細胞が必要とする栄養分も取って衰弱する(悪液質)という特徴を持つ腫瘍です。一方良性腫瘍では自律性増殖はありますが、悪性腫瘍に比べてスピードが遅く、浸潤と転移、悪液質を起こすことはありません。

2. 分子標的治療薬

従来の抗がん剤はがん細胞の増殖及び生存を阻止し、これを死滅させることを目的として使用される薬です。しかし、その作用機序は「細胞分裂を阻止する」という共通のメカニズムを利用しているので、がん細胞のみならず正常細胞にも作用します。特にがん細胞が成長、分裂が速いという性質に対して細胞の増殖を抑えるように働く薬剤なので、生体内で比較的細胞分裂速度が速い骨髄、消化管上皮細胞、毛根細胞にも作用してしまいます。その結果、白血球減少(感染症になりやすくなる)、消化器症状(下痢、胃腸障害)、脱毛といった副作用が避けられませんでした。また、副作用を少なくする目的で使用量を抑えているため、多くの場合、限定的な効果でとどまっていました。

最近の分子生物学の発展により、がん細胞の増殖と進行を引き起こす分子経路(シグナル)の異常が同定され、がん細胞で特異的に、あるいは過剰に発現している分子というのが分かってきました。分子標的治療薬は、それらの分子をターゲットとして働くように作られ、がん細胞と正常細胞とを見分け、少ない副作用で高い効果を達成することを目的として開発された薬剤です(図1, 表1)。

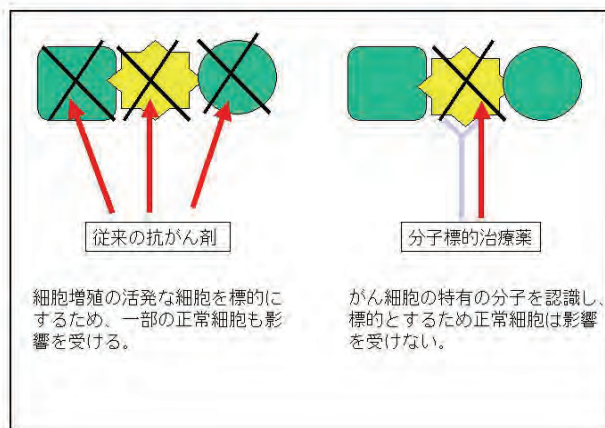


図1 分子標的治療薬のイメージ

緑は正常細胞，黄色はがん細胞を示す。分子標的治療薬はがん細胞特有の分子を認識し、標的とするため，正常細胞には影響を与えない。

表1 日本で承認されている分子標的治療薬
(2007.12月現在)

一般名(商品名)	適応疾患
ゲフィチニブ(イレッサ)	非小細胞肺癌
トレチニン(ベサノイド)	急性白血病
リツキシマブ(リツキサン)	ろ胞性悪性リンパ腫
イマチニブ(グリベック)	慢性骨髄性白血病 消化管間質性腫瘍
トラスツズマブ(ハーセプチン)	乳がん
ボルトゾミブ(ベルケイト)	多発性骨髄腫
ベバシズマブ(アバスタ)	結腸，直腸がん
エルロチニブ(タルセバ)	非小細胞肺癌

しかし，分子標的治療薬といっても副作用が無いわけではありません。例えば，分子標的治療薬がターゲットとする分子が，がん細胞以外の細胞にも発現し，かつその分子がその細胞において特定の役割を担っていた場合，その細胞の機能を抑制してしまい副作用が生じる可能性があります。また，分子標的治療薬が想定されていない分子にも働き，未知の作用を示す可能性があります。したがって，もしその薬が患者さんにとって有効であるかをあらかじめ予測できれば投与対象が限局でき，副作用の発生を少なくすることが可能になります。そこでこのような分子標的治療薬の効果を予測し，適切な治療法を選択するための遺伝子検査を概説します。

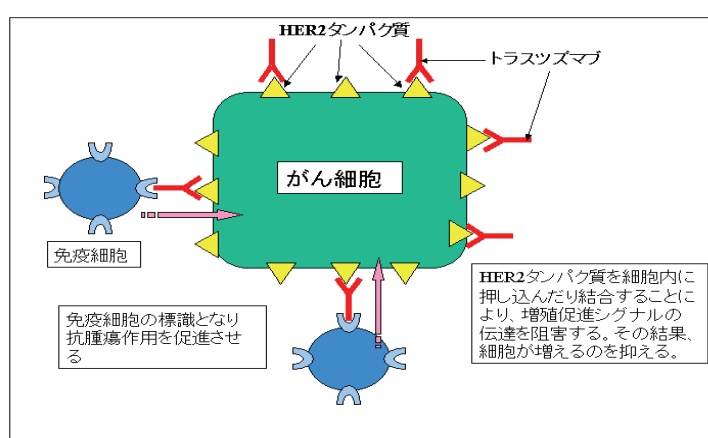
3. *Her2/neu* 乳がんの遺伝子発現検査

HER2(Human Epidermal Growth Factor Receptor Type2)は細胞の膜に存在する受容体⁹⁸タンパク質で，ここにリガンド⁹⁹が結合すると細胞増殖が進行するようなシグナルを細胞内に伝達します。乳がんにおいては約15～30%の症例でこのHER2タンパク質の合成を支配している*HER2/neu*遺伝子が通常の2倍以上に増え，同時にHER2タンパク質も増えていることが分かりました。この状態をHER2過剰発現といいます。また，このような乳がんでは増えていない

⁹⁸受容体:主に細胞膜に存在し，細胞外からの物理的，化学的刺激を受け，細胞内に伝えることにより一定の反応を引き起こすタンパク質。受容体に結合する物質はリガンドと呼ばれる。

⁹⁹リガンド:細胞膜表面に存在する受容体タンパク質と結合し細胞内部に信号を与える物質。

乳がん比べ、悪性度が高いことが知られています。トラスツズマブは HER2 タンパク質に特異的に結合するように作製されたヒト化モノクローナル抗体¹⁰⁰の一般名です。トラスツズマブが細胞表面の HER2 タンパク質に結合すると、ヒトが持っているがん細胞を除去しようとする“免疫細胞”がそのモノクローナル抗体を認識し、がん細胞を標的とする抗腫瘍作用を発揮します。また、HER2 タンパク質の数自体を減少させることにより、腫瘍細胞の増殖を抑制します。この 2 つの作用によってがん細胞の増殖を抑え、進行を防ぐ効果が期待されます(図 2)。現在、日本で承認されているトラスツズマブ投与の適応は、HER2 過剰発現が確認された転移性乳がんです。そこで投与対象の選択のために HER2 過剰発現の確認検査が必要とされています。



トラスツズマブががん細胞表面の HER2 タンパク質に結合すると、それを異物として認識する免疫細胞の働きによりがん細胞が攻撃される。また、HER2 タンパク質からの増殖促進シグナルの伝達を阻害し、がん細胞の増殖を抑える

図 2 トラスツズマブの作用機序

1) 検体及び検査法

HER2 過剰発現の有無を検査する方法には免疫組織化学(Immunohistochemistry: IHC)法、FISH 法、ELISA 法¹⁰¹などがあります。ELISA 法はこの検査のためにあらかじめ腫瘍組織を取り分け、 -20°C 以下で凍結保存しておく必要があります。一方、IHC 法、FISH 法は凍結組織

¹⁰⁰ ヒト化モノクローナル抗体:モノクローナル抗体とは単一の抗体産生細胞に由来するクローン細胞から作られた抗体のことで、高い特異性があり、通常はマウスやウサギなどの動物細胞を使用して作製する。しかし治療に使用する場合、動物由来では人間と動物との種の違いのため問題がある。そこで最近の遺伝子工学の技術を用い、動物細胞由来の抗体の一部を変え、ヒトの抗体のようにしたものがヒト化モノクローナル抗体。

¹⁰¹ELISA 法:反応原理は IHC 法と同じ抗原抗体反応を利用する。IHC 法ではガラスに貼り付けた組織に抗体を載せて結合させるが、ELISA 法では抗体があらかじめプレートに吸着させてあり、組織から調製した検体をそこに載せ、組織中に含まれる抗原物質とプレート上で結合させて検出する方法。この方法では組織に含まれる抗原量は分るが、どこに存在したかは分らない。

などの特別な検体を必要とせず、通常の病理診断に用いられるパラフィン包埋組織標本¹⁰²を使って検査が行われるため、現在広く行われています。以下、この二つの方法について説明します。

(1) IHC 法

IHC 法は、抗原抗体反応を利用し、組織中に存在する **HER2** タンパク質を視覚的に検出できるようにした方法です。図 3 には IHC 法の一つである高感度ポリマー法¹⁰³の模式図を示しました。**HER2** タンパク質そのものは非常に小さな分子なので、色素で色を付け顕微鏡で観察します。この方法は *HER2/neu* 遺伝子産物である **HER2** タンパク質を検出しています。染色の強さ、細胞のどこに染まっているかといったことでグレード分類し、0, 1+, 2+, 3+と判定します。実際の染色例を図 4 に示しました。

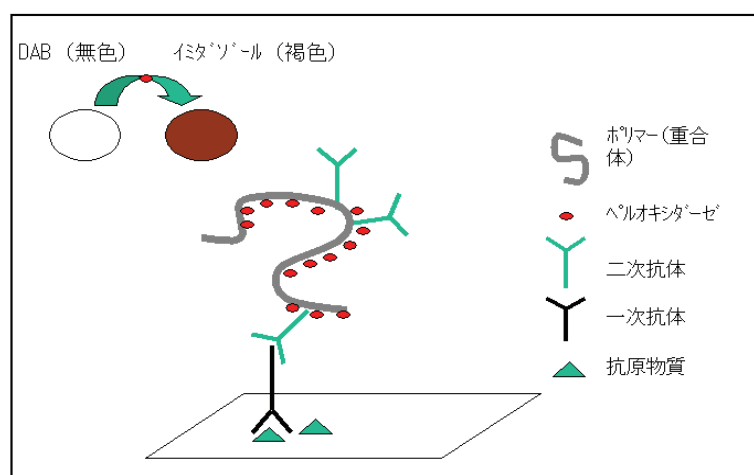


図 3 IHC 法の原理(高感度ポリマー法)

①特異性の高い免疫反応を利用し、目的物質(抗原物質)と1次抗体およびその反応を増強させるように設計された試薬(2次抗体, ポリマー, ペルオキシダーゼ)との複合体を標本上で形成させる。②この標本にジアミノベンチジン(DAB)を反応させるとペルオキシダーゼによって DAB は無色から褐色に変化するので目的物質のある部分のみ発色する。

¹⁰² パラフィン包埋組織標本:生検, 手術によって得られた組織を検査しやすいようにアルコールやホルマリンで組織の固定(構造維持)した後, 組織をパラフィン液に浸して固めた標本のこと。

¹⁰³高感度ポリマー法:IHC 法の一つで, 2次抗体にポリマーと呼ばれる重合体を用いて反応を増強させる方法のこと。

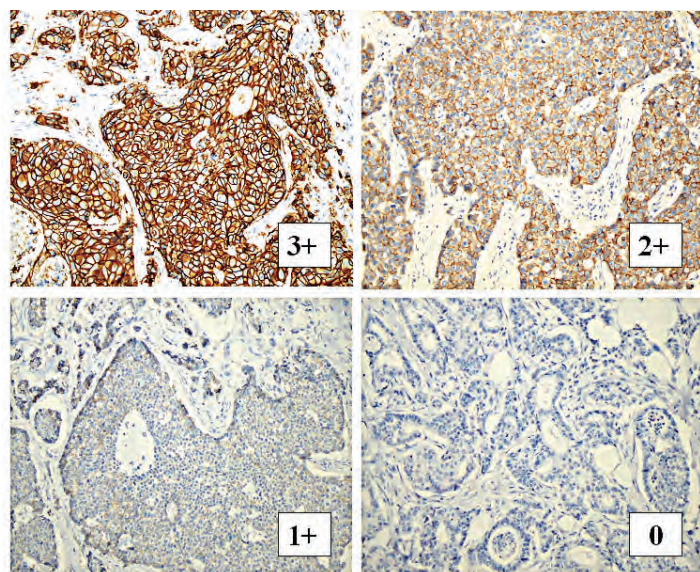


図4 IHC法によるHER2タンパク質染色像（ハーセプテスト:DAKO社使用）
浸潤部分のうち、陽性細胞が10%以下のものをスコア0とする。陽性細胞が10%以上の場合、細胞膜が部分的に弱く染色されている場合を1+, 細胞膜に限局した中程度の染色性を示すものを2+, 強度の染色性を示すものを3+と判定する。

(2) FISH法

FISH法ではHER2タンパク質ではなく、その過剰発現の原因である *HER2/neu* 遺伝子の増幅の有無を検査します。*HER2/neu* 遺伝子は17番染色体にある遺伝子で正常な細胞には1対、つまり2個あります。遺伝子の数が増えた状態には2つの場合があります、染色体の数そのものが増えている場合と、染色体の数は正常で遺伝子のみ増えている場合があります、後者の場合を遺伝子増幅と呼びます(図5)。

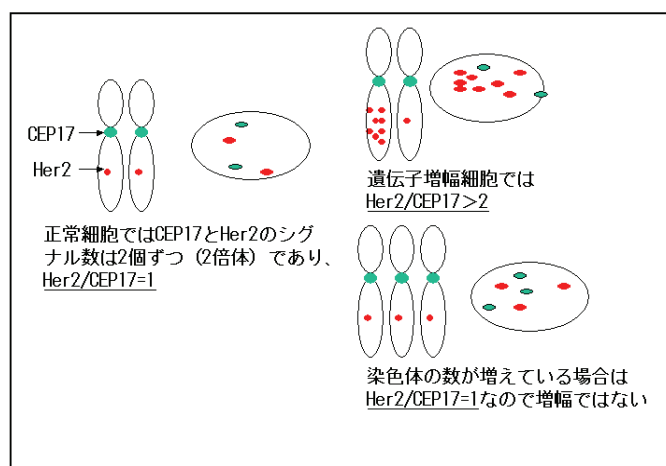


図5 遺伝子の増幅とは

17番染色体上の2種類のプローブ（*HER2/neu* 遺伝子:赤, CEP(セントロメア)特異的遺伝子:緑)を反応させると正常細胞では赤/緑=1, *HER2/neu* 遺伝子が増幅している細胞では赤/緑>2となる。なお、染色体そのものが増えている場合は赤, 緑の数はそれぞれ増えているが、赤/緑は1となるので増幅とは判定されない。

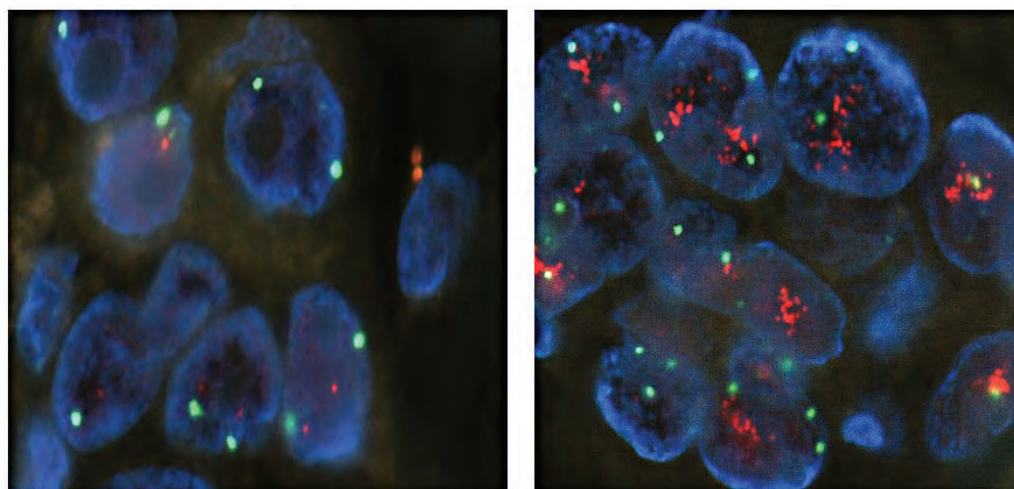


図 6 HER2/neu 遺伝子 FISH 像

17 番染色体のセントロメアを緑, HER2/neu 遺伝子を赤で標識. 写真左は緑と赤のシグナルの数がほぼ同じであり増幅(－), 写真右は明らかに赤のシグナルの数が多く, 赤／緑 >2 であり, 増幅(+)と判定する.

HER2/neu 遺伝子の増幅があるかどうかを観察するため, 検出用試薬は *HER2/neu* 遺伝子部分には赤色, 染色体のセントロメア(動原体)には緑色の蛍光色素が付くように設計されています. ひとつの細胞内の赤のシグナル数, 緑のシグナル数をカウントし, 腫瘍細胞 20 個以上を観察します. そしてその比(赤のシグナル数/緑のシグナル数)を算出し, 2.0 以上であれば *HER2/neu* 遺伝子増幅と判定します(図 6).

2) 結果の解釈

IHC 法にて 3+と判定された症例はほとんどの場合, *HER2/neu* 遺伝子の増幅を伴っており, トラスツズマブ投与適応症例と判定され, 0, 1+の場合は過剰発現が無いため非適応症例と判定されます. 注意が必要なのは 2+と判定された症例です. 2+と判定された症例ではおよそ 1/3 以下の症例でのみ遺伝子増幅が認められるだけで, 残りの症例は HER2 タンパク質は少し増えているが遺伝子の増幅は無い症例です. また, トラスツズマブの治療感受性を 2+の症例と 3+の症例で比較すると明らかに 3+の症例で有効です. 以上のことから, トラスツズマブ投与が有効な症例は *HER2/neu* 遺伝子の増幅がある症例と考えられるため, IHC 法で 2+と判定された場合は FISH 法で増幅の有無を確認する方法が広く行われています. 図 7 に HER2 検査の流れをまとめました. IHC 法を行わずに FISH 法を行う選択肢もありますが FISH 法は検査コストが高く, 時間も手間もかかるので IHC 法で必要な場合のみ FISH 法を実施するのが一般的です.

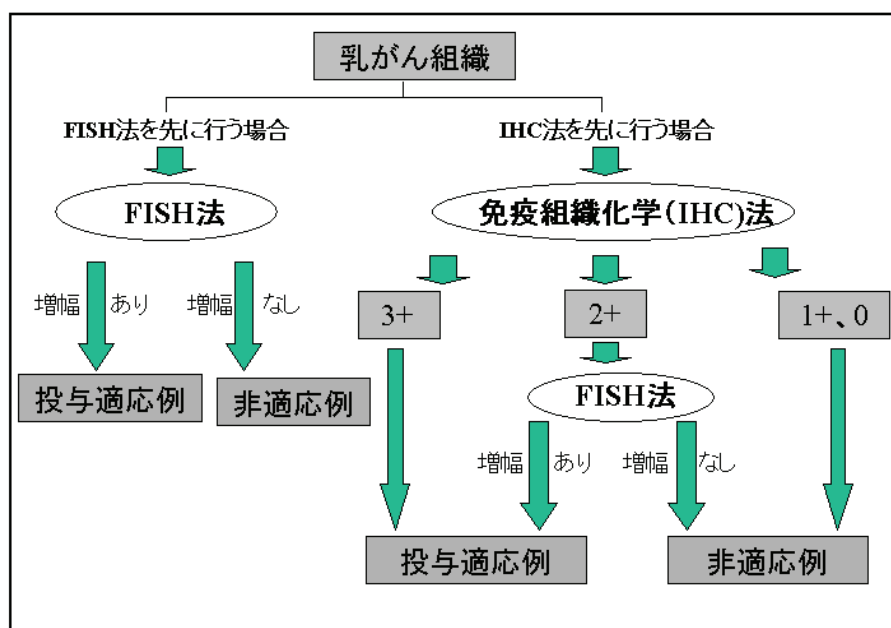


図 7 転移性乳がんを対象とした HER2 検査フローチャート

原則として HER2 検査は浸潤性乳がんを対象とする。最初 に IHC 法を行い、2+の場合のみ FISH 法で確認する方法と、最初から FISH 法で判定する方法がある。

3) 今後の展望

現在、日本で承認されているトラスツズマブ投与の適応は HER2 過剰発現が確認された転移性乳がんです。しかし、近年、原発性乳がんにも有効であることが分かってきました。また、転移性乳がん患者を対象とした術後補助療法の検討でも HER2 過剰発現の見られる乳がんではトラスツズマブを含む多剤投与による術後補助療法が再発防止に有効であることが示されています。さらに、再発の予後因子として HER2 過剰発現も重要な因子であると認められてきており、今後、予後因子、術前術後補助療法に対する感受性予測、トラスツズマブ治療適応決定の 3 つの側面から HER2 検査を行う必要性が高くなってくるでしょう。

4. *c-kit*, *PDGFRα* 消化管間質腫瘍の遺伝子発現検査

消化管間質腫瘍(gastrointestinal stromal tumor:GIST)は食道・胃・小腸・大腸などの消化管の壁にできる腫瘍で“粘膜下腫瘍”と呼ばれる腫瘍の一つです。GIST の腫瘍細胞は、消化管の粘膜の下にある筋肉層の特殊な細胞から発生したもので、粘膜から発生する胃がんや大腸がんとは発生の仕方や再発・転移の特性が異なります。

GIST の腫瘍細胞は、特徴的な KIT タンパク質及び CD34¹⁰⁴タンパク質を発現しています。KIT タンパク質は *c-kit* 遺伝子の支配を受け、特定の物質の刺激を受けたときにだけ細胞増殖のシグナルを伝達する働きを持っています。しかし、*c-kit* 遺伝子に突然変異が起こり、異常な KIT タンパク質が産生されると、刺激を受けなくても増殖促進シグナルを出し続けるため、細胞の異常な増殖が起こることが分かってきました。実際、約 90% の GIST では *c-kit* 遺伝子変異が認められ、異常な KIT タンパク質の発現が認められています。また、KIT タンパク質と同じような PDGFR α タンパク質の変異が原因となる場合も数%に見られます。これらの症例は、従来の化学療法や放射線療法に抵抗性が高く、特に転移の見られる場合や手術施行が不可能な症例は治療困難でした。最近、KIT タンパク質や PDGFR α タンパク質の働きを阻害する分子標的治療薬が開発され、臨床応用されています。イマチニブは元来、慢性骨髄性白血病に特異的に発現している異常タンパク質の働きを阻害し、増殖シグナルを止め、抗がん作用を発揮することを目的に開発された分子標的治療薬です。この薬が KIT タンパク質にも有効であることが示され、日本でも 2003 年に GIST の治療薬として承認されました。この投与の適応は IHC 法により KIT タンパク質陽性が確認された GIST 症例とされています。

1) 検体及び検査法

(1) IHC 法

KIT タンパク質の検査法は乳がんの遺伝子検査と同様に、生検、あるいは手術材料のパラフィン包埋組織標本を使用した IHC 法です。代表的な結果を図 8 に示しました。

¹⁰⁴ CD34:造血前駆細胞、未分化白血病細胞の表面マーカーで細胞の分化や接着に関与している物質のこと。

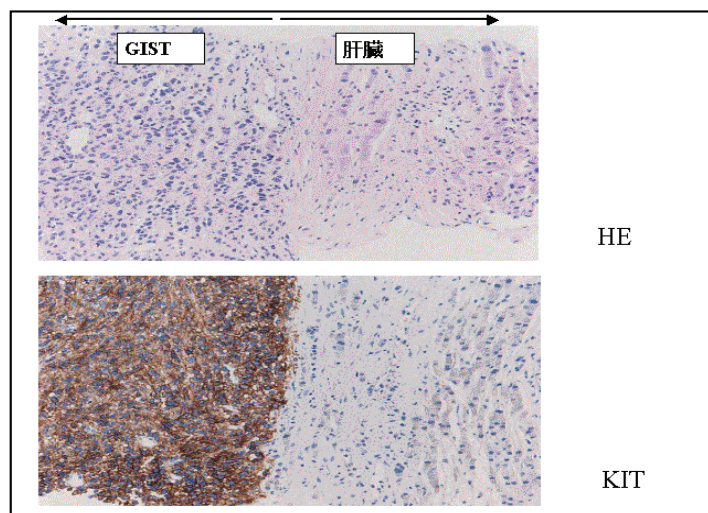


図 8 GIST 典型症例染色像

左半分が GIST 部分, 右半分は正常部分.
KIT タンパク質が GIST の部分のみ茶褐色
に濃染している (KIT 過剰発現).
HE:ヘマトキシリン・エオジン染色. 組織形
態観察のための最も一般的な染色法.

(2) PCR/ダイレクトシーケンス法

IHC 法で KIT タンパク質の発現が確認できない場合には *c-kit* 遺伝子や *PDGFRα* 遺伝子変異を検査します. 検査は IHC 法と同じパラフィン包埋組織標本から組織中の DNA を抽出し, PCR/ダイレクトシーケンス法で遺伝子の塩基配列を調べ, 遺伝子異常の有無を検索します. 実際の検査の流れを図 9 に示しました. 2 枚標本を作製し, 1 枚は染色して顕微鏡で観察し, がん細胞の多く含まれそうな部分をマーキングします. もう 1 枚の未染標本は, それと同じ部分の組織を掻き取り, 溶出液に入れて DNA を抽出します. 次に PCR 法で元の DNA を数百万倍に増やし, 直接塩基配列を調べ, 異常な配列があるかどうかを検索します. 図 10 に変異検出例を示しました.

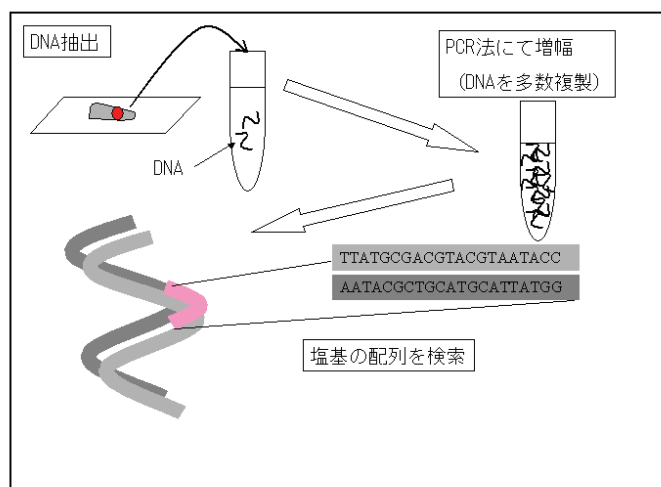
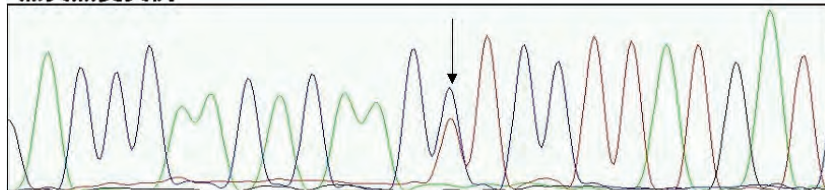


図 9 PCR/ダイレクトシーケンス法

パラフィン切片からがん細胞の DNA を取り
出し, その遺伝子の塩基配列を直接調べ,
変異の有無を調べる方法.

点突然変異例



欠失例

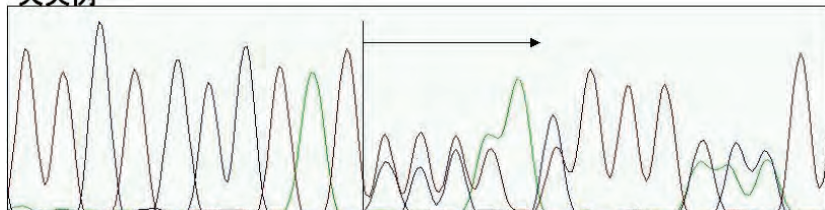


図 10 GIST 症例での遺伝子変異検出例

(上段)点突然変異例(1 塩基置換型):矢印の塩基が T(赤)から C(青)に変異している。(下段)欠失例:矢印の部分で塩基の欠失があるため、正常配列の波と欠損配列の波とが重なっている。

2) 結果の解釈

多くの GIST は組織学的に特徴的な像を示し、ほとんどの症例で KIT タンパク質の発現が認められるので診断は困難ではありません。しかし検体を採取した後の処理方法、あるいは保存状態などの影響を受けるため、中には KIT タンパク質の発現が陽性か陰性か確定診断に迷う場合があります。このような時、*c-kit* 遺伝子や *PDGFRα* 遺伝子変異の検索が有効となります。

3) 今後の展望

まれに *PDGFRα* タンパク質の異常も GIST の原因となりますが、イマチニブはこのタンパク質の異常に対してもある程度効果があることが分かっています。その一方で、*c-kit* や *PDGFRα* 遺伝子に変異を持たない GIST には、イマチニブが効きにくいことも分かってきました。さらに最近では、*c-kit* 遺伝子変異にもいくつかのパターンがあり、そのパターンによってイマチニブの効果に差が見られることが分かっています。イマチニブの効果予測という観点からすると、今後は KIT タンパク質の免疫組織学的検査だけでなく遺伝子変異検索の必要性が高まってくるかもしれません。

5. EGFR 肺がんの遺伝子変異の検査

肺がんでは、小細胞がんとそれ以外の非小細胞がんに分類されますが、これらは治療方法が大きく異なります。小細胞がんは、増殖が速く、転移をしやすいがんですが、抗がん剤、放射線治療が非常に効く症例が多いことも特徴です。一方、非小細胞がんは早期のものは手術が最善の治療法ですが、進行してしまった場合や再発の場合には、手術で病巣を切除することは困難で、

抗がん剤などの治療も効きにくい種類のがんです。非小細胞がんには腺がん、扁平上皮がん、大細胞がんが含まれ、腺がんは肺がんでもっとも頻度が高く、レントゲンで写りやすい肺野と呼ばれる肺の末梢に多くできます。次に多いのは扁平上皮がん、比較的太い気管支に出来ることが多い組織型です。

上皮成長因子受容体(Epidermal growth factor receptor:EGFR)は細胞表面に存在し、前述の HER2 などと同じ受容体タンパク質です。この受容体からの刺激は細胞増殖や転移を促進し、アポトーシス¹⁰⁵を回避する作用などが知られており、EGFR の発現は肺がんだけでなく、乳がん、膀胱がんなど多くの腫瘍で観察されます。ゲフィチニブはこの EGFR の活性を阻害し、そのシグナルが伝達されないように開発された薬剤です。細胞の増殖を抑え、縮小させる効果が認められていますが、その詳しい機序は分かっていません。

肺がんにおけるゲフィチニブの応答性は他の抗がん剤とは異なり、腫瘍が短期間で消滅するなど劇的に効果が現れる症例がある一方、効果がまったく認められない症例も少なくありません。また、他の分子標的治療薬とは異なり、腺がんよりも扁平上皮がん、強い発現が認められるにもかかわらず、女性で非喫煙者の腺がん患者で有効な症例が多いことが知られています。この発現と効果の違いはゲフィチニブの標的となる *EGFR* 遺伝子変異の有無によるものであるとする論文が 2004 年に発表されました。その後の研究により、非小細胞がんの 20～40%に変異が検出され、日本人では変異が多く、変異のある人にゲフィチニブが効きやすい傾向があることが分かりました。また、ゲフィチニブに対する反応性が遺伝子変異のパターンによって大きく異なることも分かってきました。ただし、*EGFR* 遺伝子変異とゲフィチニブの臨床的効果との相関性が高く、薬剤感受性の重要な予測因子と思われる反面、遺伝子変異とゲフィチニブの応答性が完全には一致しないこと、変異の検索方法について一定の基準や方法が無いことなどの理由で、必ずしも投与前にこの遺伝子変異を検査しなければならないものではありません。また、ゲフィチニブ投与による腫瘍縮小効果は認められていますが、生存期間の延長は認められていません。

新聞などでも大きく報道されたように致死的な副作用(間質性肺炎)を引き起こすことも知られています。そのようなリスクを回避するためにも喫煙者や肺線維症のある患者さんの治療選択の

¹⁰⁵ アポトーシス:細胞の死に方の一種で、個体をより良い状態に保つために、不要となった細胞や害となる細胞を自ら積極的に取り除くために引き起こされる管理・調節された(プログラムされた)細胞死のこと。これに対して、血行不良、外傷などによる細胞内外の環境の悪化によって起こる細胞死は、ネクローシス(壊死)と呼ばれる。

際に *EGFR* 遺伝子変異を検査することは大きな意味があります。ここでは効果予測法として行われている検査方法について説明します。

1) 検体および検査法

現在、ゲフィチニブは術前術後の補助療法としての効果は認められないため、投与の適応は、再発の非小細胞がんと病期進行のため手術不能な症例となっています。したがって使用する検体は過去の手術時あるいは生検時のパラフィン包埋組織標本を使用します。また、再発時の胸水、リンパ節の穿刺細胞診を実施する際の標本を使用することができ、その場合は、RNAを抽出し、RT-PCR/ダイレクトシーケンス法¹⁰⁶で塩基配列の異常の有無を検索することもあります。

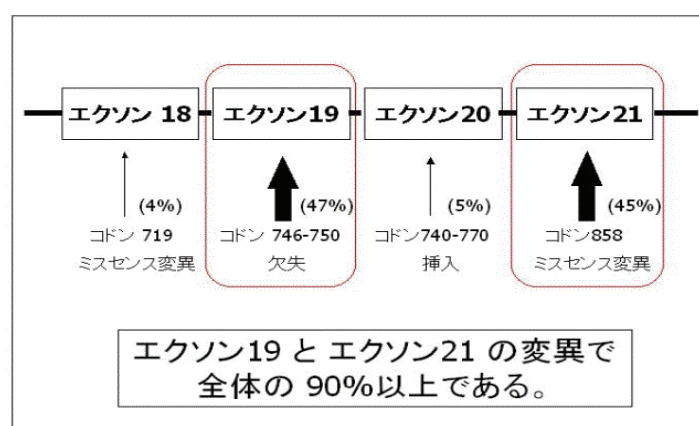


図 11 肺がんにおける *EGFR* 遺伝子変異の部位別頻度

肺がんにおいて *EGFR* 遺伝子の変異の起きる位置は、ほぼこの 4 箇所を集約され、中でもエクソン 19 における欠失、エクソン 21 のコドン 858 におけるミスセンス変異の 2 箇所の変異全体の 90% 以上を占める。

パラフィン包埋組織標本を使用する場合は組織中の DNA を抽出します。肺がん、特に *EGFR* 遺伝子変異がある組織型の場合、腫瘍細胞と正常細胞が混在しやすく、さらに生検検体のように小さな組織しかない場合は腫瘍細胞と正常細胞とを分離することは不可能です。そのため、GIST で実施しているような PCR/ダイレクトシーケンス法では遺伝子変異を同定することは非常に困難です。また、肺がんにおける *EGFR* 遺伝子変異は図 11 に示すようにキナーゼドメインと呼ばれる部分の一定の位置に起きることが知られており、エクソン 19 における欠失¹⁰⁷、エクソン

¹⁰⁶RT-PCR/ダイレクトシーケンス法: RNA の塩基配列を調べる方法。RNA は直接 PCR 法で増幅することは出来ないため、RNA から DNA に変換し(逆転写反応: RT), その DNA を PCR で増幅後、塩基配列を解析する。

¹⁰⁷遺伝子欠失: 遺伝子の塩基が欠失する遺伝子変異のこと。欠失する塩基の数は様々だが、*EGFR* 遺伝子変異の場合は 3 の倍数(コドン単位)で欠失する。

21 にあるコドン 858¹⁰⁸のミスセンス変異¹⁰⁹の2つで変異の約 90%を占めます。そこで検査方法の一例として、遺伝子の欠失、挿入を調べる PCR/フラグメントアナリシス法と、1 塩基置換型の変異を検出するサイクリングプローブ法の二つの方法を使用します。

(1) PCR/フラグメントアナリシス法

遺伝子変異のうち塩基の欠失、挿入がある場合、その部分を PCR 法で増幅すると正常よりも短い DNA 断片、あるいは長い DNA 断片が得られます。この増幅産物の分子量の違いを精密に機械で検索する方法が PCR/フラグメントアナリシス法です。

(2) サイクリングプローブ法

EGFR 遺伝子変異のうち、コドン 858, 719 の変異は 1 つの塩基が置き換わる変異です。その塩基に注目して変異の検出を行う方法がサイクリングプローブ法です。リアルタイム PCR 法¹¹⁰の 1 種で、ある塩基が正常の場合は FAM という蛍光色素が発光し、塩基が置換された場合は ROX という別の蛍光色素が発光するように設計された試薬を用いて、遺伝子変異の有無を検査します。*EGFR* 遺伝子は 1 つのアレル¹¹¹に変異が起きただけで腫瘍化するため、変異が認められる場合でも通常は正常な塩基パターン(野生型)と置換されたパターン(変異型)の両方が検出されます。検査の流れと代表的な変異検出例を図 12 に示しました。

¹⁰⁸ コドン:タンパク質の設計図として機能する mRNA 上の各アミノ酸に対応する 3 つずつの塩基配列のこと。mRNA が持つ遺伝情報は開始コドン(AUG)から翻訳され、3 塩基ごとに一つのアミノ酸に翻訳される。コドン 858 というのは開始コドンから数えて 858 番目のコドンを指す。

¹⁰⁹ ミスセンス変異:塩基が変化することでコードするアミノ酸が変わる遺伝子変異のこと。

¹¹⁰ リアルタイム PCR 法:PCR で標的遺伝子を増幅しながら、蛍光物質を使用してその DNA 濃度を定量する方法のこと。蛍光物質を用い、専用の機器で測定するため感度がよく、微量な DNA も検出することができる。

¹¹¹ アレル(対立遺伝子):染色体上の同じ位置にある二つ以上の遺伝子のうちの一つを指し、人の場合は、母親由来のものと父親由来のもの二つ(一対)を受け継いでいる。

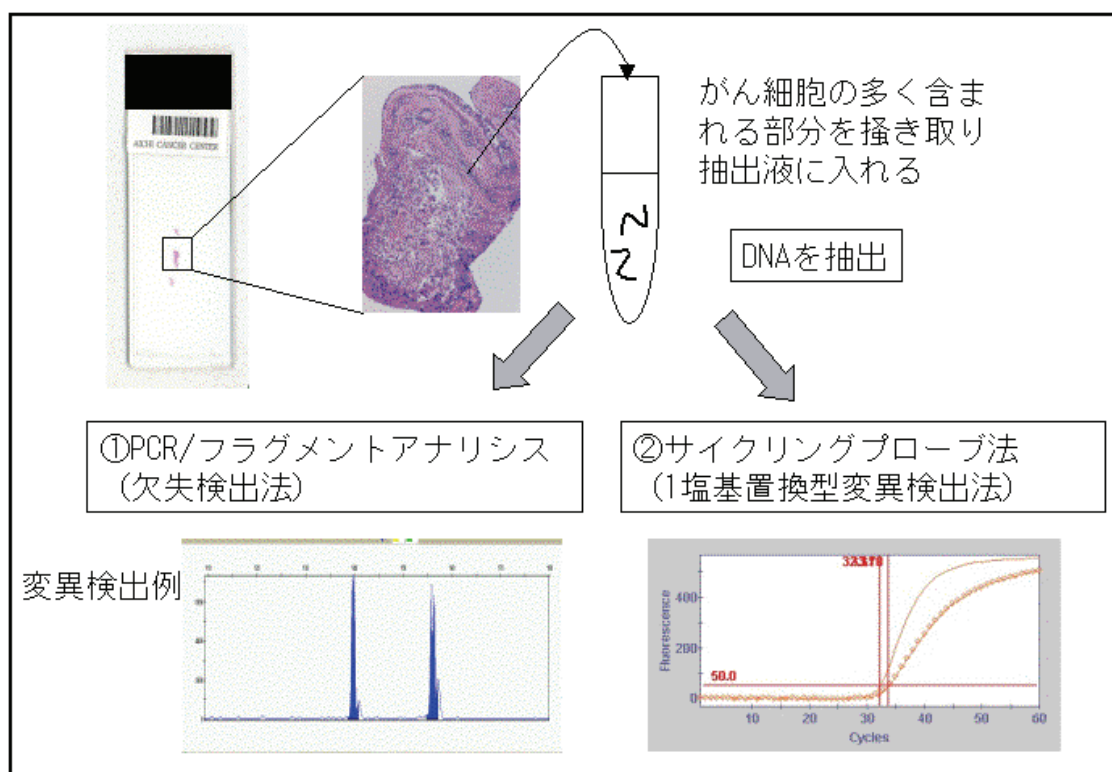


図 12 パラフィン包埋組織からの EGFR 遺伝子変異検出法

パラフィン包埋組織から DNA を取り出し、①PCR/フラグメントアナリシス(欠失検出法)、②サイクリングプローブ PCR 法(1 塩基置換型変異検出法)にて検査を行う。EGFR 遺伝子はがん遺伝子であるため、1 対の遺伝子のうち、1 方のアレルに変異が起こることにより腫瘍化する。したがって変異のある DNA を検査すると1つの検体から野生型と変異型の両方が検出される。

2) 結果の解釈

EGFR 遺伝子変異は、図 11 に示したような 4 箇所の変異が検査の対象となりますが、変異の部位によってゲフィチニブの反応性に違いがあることが知られています。また、*EGFR* 遺伝子変異が無くてもゲフィチニブが有効である場合もあります。従って実際には *EGFR* 遺伝子変異の結果だけではなく、喫煙歴、性別、組織型等を総合的に考慮し、投与適応の判定がされています。

3) 今後の展望

EGFR 遺伝子変異とゲフィチニブ反応性との関連性については、まだ臨床試験が始まった段階であり、有用性については検討中です。*EGFR* 遺伝子変異が無くてもゲフィチニブが有効である症例があること、遺伝子変異よりも遺伝子増幅が関係するといった報告もあることなど、まだ不明な点もあることに留意すべきです。したがって、現段階では必ずしも投与前に遺伝子変異の検

索を行う必要はありません。しかし、最近の研究の結果、*EGFR* 遺伝子変異のうち、変異パターンによってゲフィチニブ反応性に差があり、エクソン 19 の遺伝子欠失、コドン 858 のミスセンス変異の順で反応性が高いこと、ゲフィチニブ投与中に再発した症例において別の位置のミスセンス変異が検出されるという報告や、*EGFR* 遺伝子変異はなく、*KRAS* 遺伝子¹¹²変異のある症例に投与すると予後が悪くなるといった報告も出ています。したがって、今後、臨床試験の結果にもよりますが、投与対象の限定、効果予測、副作用を防ぐ、という観点からも *EGFR* 遺伝子変異の検索の必要性は高まるのではないかと考えます。

6. 検査の問題点と今後の展望

分子標的治療薬は、がん細胞と正常細胞とを区別し、がん細胞にだけ作用する画期的な薬として開発が進められ、実際、今までは治療法の選択肢が少なかった転移性の乳がんや進行期の GIST、そして非小細胞肺癌において非常に有効な薬剤となっています。また、現在、臨床試験に入っているものも少なくないため、今後さらに増えていくものと思われます。しかし一方で肺癌における強い副作用の報告例など、その投与対象に注意が必要とされることも分かってきています。したがって、それぞれの薬剤、あるいは標的とする分子ごとに投与対象を限定するため、ますます遺伝子検査の重要性は高まるものと思われます。

参考図書

- (1) 黒瀬等, 他: 特集-分子標的薬の基礎知識を理解する, 薬局, 56(4):1706-1789, 南山堂, 東京, 2005
- (2) 曾根三郎, 他: 分子標的治療, 癌と化学療法, 31(7):1034-1040, 癌と化学療法社, 東京, 2004
- (3) 福井朋也, 他: 特集-分子標的治療と病理, 病理と臨床, 24(6):578-633, 分光堂, 東京, 2006
- (4) 鶴尾隆: 分子標的治療薬の現状と展望, 医学のあゆみ, 215(7):601-605, 医歯薬出版, 東京, 2005
- (5) 幸田久平, 他: 増殖因子阻害剤, 医学のあゆみ, 215(7):613-616, 医歯薬出版, 東京, 2005
- (6) 長谷川喜一, 他: 特集-分子標的療法の実践, 総合臨床, 55(6):1635-1702, 永井書店, 大阪, 2006

¹¹² *KRAS* 遺伝子: *RAS* 遺伝子と呼ばれる細胞増殖に関与するがん遺伝子の一つであり、点突然変異によって活性化され、細胞の異常増殖を引き起こす。大腸がん、膵臓がん、肺癌など様々な悪性腫瘍で変異が認められている。

10 節 血友病

篠澤圭子 東京医科大学血液凝固異常症遺伝子研究寄附講座講師

天野景裕 東京医科大学臨床検査医学講座講師、同血液凝固異常症遺伝子研究寄附講座

福武勝幸 東京医科大学臨床検査医学講座主任教授、同血液凝固異常症遺伝子研究寄附講座

1. はじめに

出血とは、血管の壁に穴があき血管から血液がもれ出ていくことです。出血を止めるためには、まず血管が収縮して穴を小さくし、その後、血小板が穴をふさぐように集まり、その周りを血液凝固因子がセメントのように固めることで止血が行なわれます。血友病(hemophilia)は、古くから知られている遺伝性の疾患で、一つの血液凝固因子が足りず、止血がスムーズに行なわれないために出血しやすくなる疾患です。血友病には、血友病 A と血友病 B があり、それぞれ血友病 A は血液凝固第Ⅷ因子が、血友病 B は血液凝固第Ⅸ因子が、足りないために、出血すると血液が固まりにくく、出血が止まりにくくなります。血友病の原因は、血友病 A では第Ⅷ因子遺伝子(*F8*)に、血友病 B では第Ⅸ因子遺伝子(*F9*)に遺伝子異常(遺伝子変異)が発生し、第Ⅷ因子や第Ⅸ因子の欠乏や、機能が不完全となることであり、その結果として血液凝固障害が惹き起こされます。血友病の治療は患者に不足している第Ⅷ因子または第Ⅸ因子を補充します。かつて、血液から作られた凝固因子製剤を通じて、肝炎や HIV の感染が起こり大きな問題となりましたが、その後は安全な血液製剤を作ることが出来るようになり、また、ヒトの血液を使わない遺伝子組換え型製剤も使われるようになり、治療の安全性は飛躍的に向上しました。定期的な補充により慢性的な関節障害の発生も少なくなり血友病患者の QOL は向上しつつあります。

通常、血友病の診断は、出血症状、家族歴と凝血学的検査による第Ⅷ因子(第Ⅸ因子)活性の低下を確認することで診断が可能ですが、遺伝子診断(遺伝学的検査)は、血友病の原因である患者さんの遺伝子異常を直接検出することができます。さらに患者さんの遺伝子異常を同定することで、その家系における未発症者や保因者の遺伝子診断に応用できるため、従来の臨床検査に比べてより正確に診断することが可能になります。このように、血友病の遺伝子診断には多くの利点がありますが、その一方、遺伝子診断の実施にあたっては多くの注意が必要であり、それらのことを十分把握し考慮して慎重に行わなければならないと考えられます。本稿では、血友病の診断、方法や注意点を中心に、血友病の遺伝子診断について概説します。

2. 血友病の診断

1) 出血症状

血友病の臨床的な出血症状の重症度は、血漿中の第Ⅷ因子(第Ⅸ因子)の活性と良く関連します。活性が1%未満は重症、1~5%は中等症、5~40%は軽症に分類されています(表1)。

表1 血液凝固第Ⅷ因子あるいは第Ⅸ因子凝固活性による分類

重症	<1%
中等症	1%~5%
軽症	>5%~40%

重症型では、乳児期から四肢や臀部を中心に血腫を伴った皮下出血が反復して出現しますが、幼児期以降は関節や筋肉内などの深部出血が多くみられるようになります。他にも口腔内出血や鼻出血などもみられ、頭蓋内や腹腔内出血などの重篤な出血もおこることがあります。一方、軽症例では出血症状はほとんど認められず、抜歯や外傷後の止血困難や異常出血、スポーツによる筋肉内出血や手術前などの凝血的スクリーニング検査の異常から診断される場合が多いようです。

2) 凝血的検査

スクリーニング検査では、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)は延長しますが、プロトロンビン時間(PT)、血小板数や出血時間は正常です。血友病 A では、血漿第Ⅷ因子活性が低下し、血友病 B では、第Ⅸ因子活性が低下しています。先天的に第Ⅷ因子や第Ⅸ因子活性が低下していることを確認するために、それぞれの因子に対する抗体(インヒビター)の存在を否定することが必要です。

3) 家族歴

血友病 A の頻度は、出生男子 10 万人あたりおよそ 7~10 人で、血友病 B は血友病 A の約 1/5 の割合です。血友病患者は通常男性であり、女性血友病患者はきわめて稀です。血友病は A, Bともに、X連鎖劣性遺伝形式をとります(図1)。診断には家族歴の聴取が大切ですが、すべての症例に家族歴が認められるというわけではありません。全体の約 1/2~1/3 の症例が、家系内に出血者のみられない孤発例(*de novo*)であると報告されています。ただし、報告されている孤

発例の中には、たまたまその家系内に男性患者が認められなかっただけで、出血症状が現れない女性(母親)に遺伝子異常が受け継がれていたという場合も含まれています。

3. 遺伝子診断（遺伝学的検査）

1) 責任遺伝子と遺伝子変異

血友病 A の責任遺伝子の **F8** は, X 染色体長腕末端 (Xq28) に約 186 kb の大きさで存在し, 26 個のエクソンと介在するイントロンから構成されています (図 2).

血友病 A の **F8** 変異の中の特徴的なものには, 逆位 (inversion) と呼ばれる遺伝子変異があり, この逆位は重症型の血友病 A 症例のうち, 約 40% にもみられます. これは, イントロン 22 内の遺伝子 (int22h-1) と同様の配列が **F8** の 500kb 以上離れた遺伝子 (int22h-2, int-22h-3) にあり, これらの間で組換えが起こり, 一部の DNA 配列が逆になってしまったものです. 逆位の解析には, 当初, イントロン 22 の一部をプローブとしたサザンブロッティング法が行われてきましたが, 現在では 10 kb 以上の塩基の増幅を行う Long-PCR 法で解析が可能となりました. 逆位以外の遺伝子変異は, ミスセンス変異, ナンセンス変異, 小さい欠失や挿入, 大きい欠失, スプライシング部位の変異などの, 多種類の変異が検出されています (表 2).

血友病 B の責任遺伝子の第 IX 因子遺伝子 (**F9**) は, X 染色体長腕末端 (Xq27.1-27.2) に約 33.5kb の大きさで存在し, 8 個のエクソンと 7 個のイントロンから構成されています (図 2). **F9** 変

異のタイプも多種類が検出されていますが、変異の検出されている全体症例の約 70%がミスセンス変異に相当します。

表2 遺伝子変異の種類

点変異(一塩基置換)
ミスセンス変異
ナンセンス変異
スプライシング部位の変異
欠失
挿入
逆位 (血友病A)

2) 遺伝子診断 (遺伝学的検査)

(1) 方法

これまでは、RFLP(制限断片長多型; Restriction Fragment Length Polymorphism)などの遺伝マーカーの検出を利用した間接的な手法により、遺伝子診断は実施されてきました。しかし、現在では、以前に比べて格段とシーケンス法が簡便で迅速に行えるようになってきたことから、ダイレクトシーケンス法によりDNAの塩基配列を決定し、遺伝子異常を直接検出することにより遺伝子診断が行われています。

また、多数の検体を解析するには、シーケンスで塩基配列を決定する前に、1つの塩基の違いを検出するPCR-SSCP(Polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism)法などの遺伝子の特定領域を検出するスクリーニング法を実施し、変異の存在する領域を決めてから、その部位の塩基配列決定法を行うこともあります。検出した変異が既に報告され解明されている病因遺伝子変異であった場合には、スクリーニングは有用であると考えられます。しかし、まだ報告のない未知の遺伝子変異を検出した場合には、変異の検出された部位のみならず、責任遺伝子のそれ以外のエクソン、スプライシング部位やプロモーター領域などの塩基配列を決定し把握しておくことが大切です。また、責任遺伝子上に2つ以上の変異が存在する場合があることも、忘れないようにしておくことが大切です。

直接に塩基配列決定法を行う解析手順を、図3に示しました。

概略は①末梢血の採血, ②白血球核から DNA を抽出, ③目的の遺伝子領域に対するプライマーを用いて, DNA を鋳型とし PCR 法で増幅, ④残存しているプライマーや dNTP を取り除き, PCR 産物を精製, ⑤シーケンス法により塩基配列を決定, ⑥シーケンス結果と GenBank や Ensembl データベースなどの塩基配列と比較, ⑦検出した変異について, 変異やポリモルフィズムのデータベースを確認, ⑧変異の頻度を, 多数の健常者群の対立遺伝子を用いて, PCR-制限酵素消化法やシーケンスを行い確認するという手順です.

同時に解析したコントロール対照やデータベースの塩基配列と比較して, 異なった塩基配列が検出されても, その塩基置換や変異が必ずしも疾患原因であるとはいえない場合があります. 一般的に, ポリモルフィズム (Polymorphism; 多型) は, 集団中に 1% 以上の頻度で存在し, 病的意義のない塩基配列の変異であると定義されています. 一方, 疾患原因となるいわゆる突然変

異 (mutation; 変異) の発生頻度は集団中に 1%未満です。しかし、集団中の頻度が非常に低く稀ではあるけれども病的意義のない変異や、一方、集団中においても頻度が高く認められるポリモルフィズムであるとはいえ発現産物、たとえば凝固因子活性などに影響を与えるものも多く存在します。これらは塩基配列決定だけでは不明であり、遺伝子変異による蛋白質の機能異常を明らかにするためには、組換え変異体蛋白質発現実験などの研究を行って、分子病態解明をしなければなりません。したがって、変異や塩基置換を検出した際の結果解釈は、十分慎重に行わなければならないと考えられます。

(2) 保因者診断

保因者 (carrier; キャリア) とは、2 本の X 染色体のうちの 1 つの **F8 (F9)** に血友病を惹き起こす変異を有している女性のことで、1 本の遺伝子に 1 つの変異を持っていますが、もう 1 本が正常であるので (図 4)、通常血友病は発症しません。その被検者女性が保因者診断を受ける意義は、将来に遺伝性疾患児が生まれてくる可能性を正確に知り、家族の心の準備を整えるためや、患児を出生した際に安全な管理を受ける用意のためなどが挙げられます。一方、保因者診断を基にして胎児の出生前診断による中絶の希望が生じることがありますが、日本の社会的背景と患児に対する医療水準の高さと血友病の予後から考えて、日本の血友病医療の専門家は中絶を視野に置いた保因者診断や出生前診断は実施しない立場をとっています。

保因者は、2 本の X 染色体のうちの 1 つに変異を有しているので、理論的には保因者女性の第Ⅷ因子 (第Ⅸ因子) 活性は 50%程度に低下するため、保因者の推定が可能と考えられており、臨床現場では凝血学的検査による保因者診断が多く行われています。しかし、実際の検査結果は①X 染色体の不均一な不活性化 (Lyonization) により活性が限りなく 0%に近い保因者から、逆に 100%に近い保因者までが存在すること②活性は妊娠、有酸素運動、慢性炎症などの影響で変動することなどにより、凝血学的検査での保因者診断の判定が困難な場合があります。血友病 A の保因者診断では血漿中で第Ⅷ因子と結合している von Willebrand 因子抗原量との比を利用する方法が実施されており、日差変動を考慮して複数回の検査のもとに判断することが大切になっています。しかし、この方法でも正常と診断された中の一部に保因者が混入することは完全には避けられません。血友病の家系内で、責任遺伝子が既に同定されている場合は、遺伝子診断で保因者診断を行なうことが出来、確定診断として臨床的意義が高いと考えられます。

ただし、このように直接的に診断できる血友病の遺伝学的な保因者診断においても、稀ですが、次のような事項で、判定ができない、もしくは不確定な結果を生じる場合があることを十分に留意

しなければいけません. ①保因者が生殖細胞モザイク(変異をもつ生殖細胞と持たない生殖細胞があり, 変異は白血球 DNA では検出できない)②家系内の変異のタイプが, 大きな欠失や挿入であった場合(野生型と変異型の 2 つの対立遺伝子を持つ保因者において, PCR 法で野生型のみが増幅されてしまう場合があり, PCR によるシーケンス法では検出できない).

4. おわりに

血友病の遺伝子診断は、従来の凝血学的検査の診断判定を補うだけではなく、患者さんの責任遺伝子異常を直接に検出することから臨床的有用性が非常に高いと考えられます。

しかし、大事なことは、遺伝子診断を行い特定の遺伝子に変異が検出されなかったという理由のみで、疾患への罹患を否定することはできないという点を、十分に理解しておかなければなりません。たとえば、血友病 A 患者の遺伝子解析において、**F8** の 26 個の全部のエクソン、スプライシング部位や非翻訳領域をダイレクトシーケンス法により解析しても、これらの部位から遺伝子変異が検出できなかった症例が全体の症例数の約 2% 存在しました。このような症例では mRNA の合成障害や分解亢進、翻訳障害、第Ⅷ因子の細胞内修飾や分泌障害、血中でのクリアランス亢進などが病因として推測されます。また、責任遺伝子のみの塩基配列を決定しているのでその他すべての遺伝子の変異の情報や塩基配列の決定を行っているわけではないということも考慮しなければなりません。つまり、一般的に遺伝子診断で行っている DNA の塩基配列決定だけでは、疾患の原因の解明には十分ではないと考えられます。したがって、遺伝子診断は確定診断ではありますが、その結果や解釈は必ずしも単純ではなく、結果がでない場合や不確定な結果となる場合があることを十分に認識しておかなければなりません。

分子生物学的な技術の進歩に伴い遺伝子診断は従来に比べて簡便で容易に実行することが可能となってきましたが、個々の結果に対しては正確な解釈をするための解析技術の技量が必要であり、その分析妥当性や精度管理についても検討しなければならない課題があります。

血友病の遺伝子診断は、患者さんにとって生涯不変の個人情報であると同時に、患者さんの家系の共有情報となるので、まず遺伝子診断の目的を医療者と被験者が慎重に確認し合い、遺伝子診断に対する十分な理解を得るためのインフォームドコンセントを丁寧に行い、診断前後の遺伝カウンセリングなどの診療体制は倫理的配慮を持って整備しなければなりません。さらには、経済的な検査経費負担の問題や医療制度の問題もあります。現在、血友病の遺伝子診断の多くは大学の研究レベルで実施されているのが実状ですが、今後はこれらの課題を検討して、患者さんの生活の質の向上に反映できるような遺伝子診断が行える包括的な診療システムを構築する必要があると考えられます。

第4章 遺伝病や遺伝素因による病気の染色体遺伝子検査

1 節 代謝異常

伊藤道徳 国立病院機構香川小児病院副院長

1. はじめに

代謝異常は、生体に何らかの異常がおこって糖質やアミノ酸、脂肪などの代謝が障害された状態を言いますが、遺伝子の異常によっておこるものは、先天代謝異常症といわれます。先天代謝異常症は、特定の遺伝子の異常によりその遺伝子に支配されているタンパク質の生合成に異常が生じて、生体の恒常性が崩れて何らかの症状を呈する疾患と定義されています。検査技術の進歩とともに先天代謝異常症の種類は増加し、現在では 400 以上の疾患が知られています。今後の技術の発展により現在原因不明の疾患が先天代謝異常症であることが明らかとなり、この数はさらに増加する可能性があります。

2. 先天代謝異常症

1) 分類と頻度

先天代謝異常症はその異常をおこすタンパク質によって表 1 に示すように分類されますが、最も多いのが酵素欠損(異常)症です。また、その異常のある代謝経路や細胞内小器官などにより表 2 に示すようにも分類されます。

表 1 先天代謝異常症の原因による分類

- 1) 酵素欠損(異常)症
- 2) 転送障害
- 3) 受容体異常症
- 4) 構造蛋白質異常症

表 2 先天代謝異常症の代謝経路や細胞内小器官などによる分類

- | | |
|-------------------|--------------|
| 1) 糖質代謝異常症 | 7) 金属代謝異常症 |
| 2) アミノ酸代謝異常症 | 8) ビタミン代謝異常症 |
| 3) リポタンパク・脂質代謝異常症 | 9) ペルオキシゾーム病 |
| 4) 有機酸代謝異常症 | 10) ライソゾーム病 |
| 5) 脂肪酸代謝異常症 | 11) ミトコンドリア病 |
| 6) プリン・ピリミジン代謝異常症 | 12) その他 |

先天代謝異常症のひとつひとつの疾患の頻度はまれなため、あまり一般的ではありません。しかし、先天代謝異常症全体としてみた場合、その頻度は約 4,000 人に 1 人以上といわれておりそれほどまれな疾患ではありません。

2) 先天代謝異常症の症状

先天代謝異常症の症状は、障害されている代謝経路の前の代謝物質の蓄積、その後の代謝産物の減少や代謝経路が障害されるために障害がない場合には認められない代謝産物の出現・蓄積により引き起こされます(図 1)。

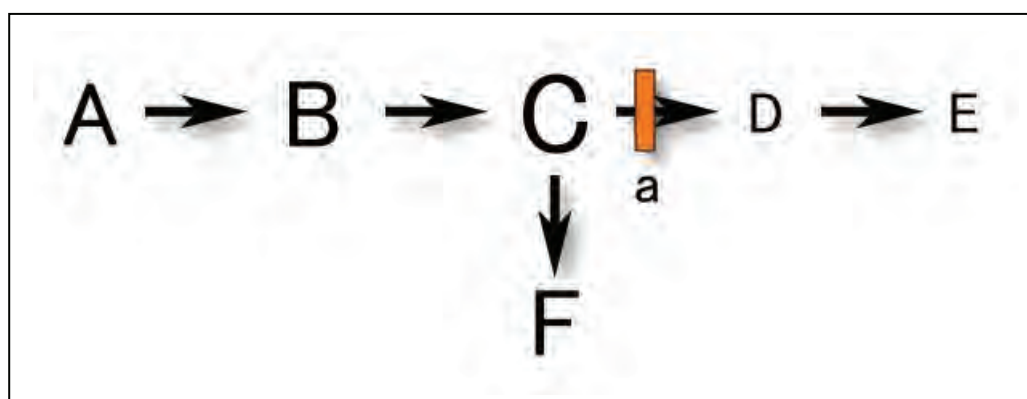


図 1 酵素欠損(異常)による代謝障害

代謝経路で酵素 a の欠損(異常)によりその前の代謝物質 A, B と C が蓄積しその後の D, E が減少する。また、正常では存在しない物質 F が出現・蓄積する。これにより症状が出現する。

表 3 先天代謝異常症で認められる症状

- 1) 家族歴：両親が血族結婚，同胞に死亡例・同様症状，家系内に特定の代謝異常症がある。
- 2) 身体の発育遅延
- 4) 度重なる痙攣や他の神経症状
- 5) 反復する嘔吐や下痢
- 6) 肝，脾臓，心臓などの臓器肥大
- 7) 奇形や毛髪，皮膚，粘膜の色素異常
- 8) 尿，汗，体臭，便，体液の異常
- 9) 眼科的，耳鼻科的異常：水晶体脱臼，白内障，視力・聴力障害など

先天代謝異常症に認められる症状には、ムコ多糖症の顔貌異常の様に疾患特有の症状もありますが、多くの疾患にみられる症状は表 3 に示すような非特異的な症状が多く、その症状からだけで診断することは困難です。また、先天代謝異常症の発症年齢は新生児期早期から成人までと

幅広く、同じ疾患でも新生児早期に発症した例や 50 歳代になって発症した例もあることが報告されています。

3) 先天性代謝異常症の診断と治療

先天代謝異常症の症状は非特異的なものが多いため、先天代謝異常症が疑われる症状が認められる場合には、まず先天代謝異常症を疑い検査を行うことがその診断のためには重要です。先天代謝異常症を鑑別するために行うべき検査には表 4 に示すような検査があります。これらの検査により先天代謝異常症と診断された場合には、その疾患に特異的な異常タンパク質(酵素)の分析による診断や遺伝子の分析による遺伝子診断により確定診断が行われます。

表 4 先天代謝異常症が疑われる場合に行われる主な検査

- 1) 検血一般, 肝機能検査, 腎機能検査
- 2) 血糖, 乳酸, ピルビン酸, 血中アンモニア測定
- 3) 血液ガス分析
- 4) 骨X線検査
- 5) 尿代謝異常症スクリーニング検査
- 6) 尿・血液・髄液アミノ酸分析
- 7) 尿有機酸分析
- 8) 血液カルニチン分析
- 9) 骨髄検査

また、先天代謝異常症では早期発見し早期に治療することが重要であり、一部の疾患では症状が出現する前に診断し治療を開始するために新生児マススクリーニング検査が行われています。

先天代謝異常症では、これまで多くの疾患で対症療法しかありませんでした。しかし、近年医学の進歩により種々の疾患で治療法が確立されてきています。先天代謝異常症で初めに確立された治療法は蓄積する物質の摂取を制限し、不足する物質を補充する食餌療法です。その後、蓄積する物質の体外への排泄を促進する薬物療法や骨髄移植・肝臓移植による治療が行われるようになりました。最近では、欠損する酵素を投与する酵素補充療法が実用化され、また正常な遺伝子を細胞に取り込ませて治療する遺伝子治療が検討され、一部の疾患でその有効性が検討されています。

3. 先天代謝異常症の遺伝子診断

1) 遺伝子診断法

これまで先天代謝異常症の診断は、その病因酵素の活性を測定してその異常の存在により診断されていましたが、最近ではより簡便にまた正確に異常の存在を明らかにすることができる遺伝

子診断が主体になってきています。先天代謝異常症の遺伝子診断には多くの方法(表5)がありますが、分析を行う遺伝子を大量に試験管内で増幅するポリメラーゼ連鎖増幅法(polymerase chain reaction; PCR 法)を用いた変異遺伝子検出法がよく用いられています。

表 5 遺伝子診断法

1) サザンブロッティング法を用いた遺伝子診断法
a) 直接的診断法 制限酵素認識部位を変化させる塩基置換 サザンブロッティング法で検出できるほど大きな塩基の挿入・欠失 サザンブロッティング法で検出できる反復配列数の変化 b) 間接的診断法 多型マーカーの利用 制限酵素断片長多型(restriction fragment length polymorphism; RFLP) 超可変的反復配列数(variable number of tandem repeat; VNTR) マイクロサテライト多型
2) PCR を用いた遺伝子変異の検出
a) 既知の遺伝子変異の検出 対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーション法 対立遺伝子特異的増幅法 制限酵素切断法 ミスマッチプライマーを用いた制限酵素切断法 b) 未知の遺伝子変異の検出法 RNase 切断法 PCR-SSCP(PCR-single strand conformation polymorphism)法 塩基配列決定法

患者さんにおける遺伝子変異を最も確実に同定し診断する方法は、核酸塩基配列決定法です。PCR 法で病因遺伝子を増幅し、患者さんの遺伝子の塩基配列を決定して正常な遺伝子の塩基配列と比較することにより変異の有無を同定します(図 2)。

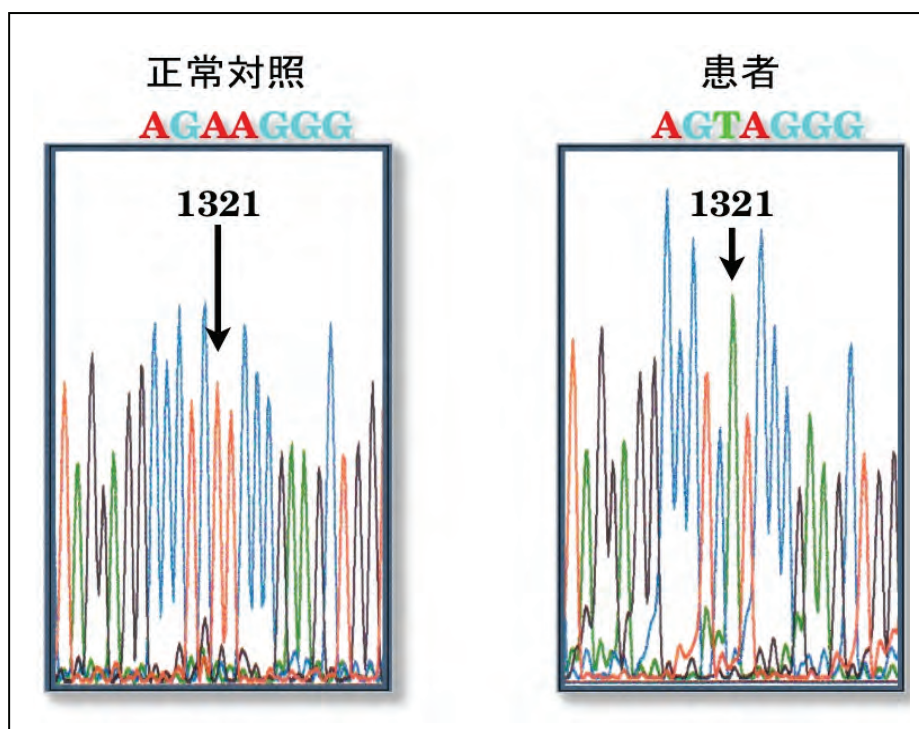


図 2 塩基配列決定法による遺伝子変異の同定

正常対照と患者の病因遺伝子を PCR 法で増幅したあと、塩基配列を決定した。正常対照では、1321 番目の塩基が A であったが、患者では T であった。この塩基置換により正常対照でのアミノ酸がリジン (AAG) であったが、患者では停止コドン (TGA) に変異しタンパク質の合成がここで停止していた。

しかし、この方法では病因遺伝子全体の塩基配列を決定する必要があるため、最近では塩基配列を解析する前に、1 つの塩基の異常の有無を検出できる SSCP 法などにより、遺伝子変異のある部位をスクリーニングして、その部位の塩基配列を決定する方法も行われています (図 3)。

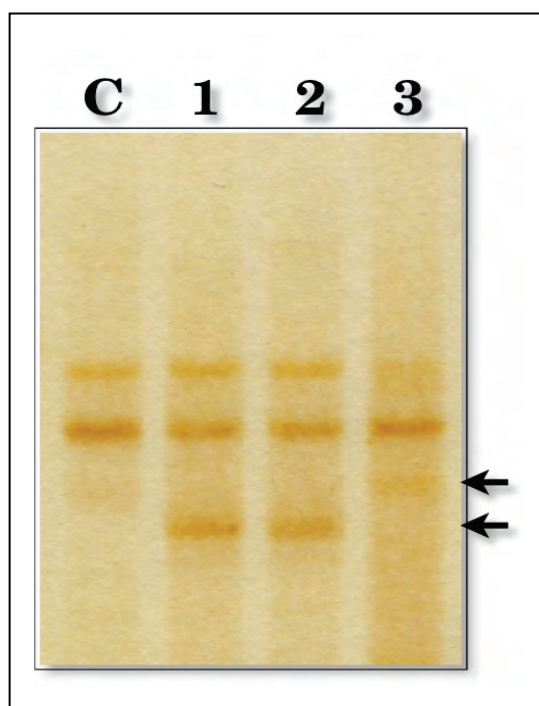


図 3 SSCP 法による遺伝子変異部位のスクリーニング

PCR 法で遺伝子の一部を増幅し、それを熱変性後、非変性ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、単鎖 DNA の電気泳動移動度の差により変異遺伝子の有無を検討した。正常対照 (C) では認められないバンド (←) が患者 1~3 で検出され、この部位に遺伝子変異が存在すると考えられる。

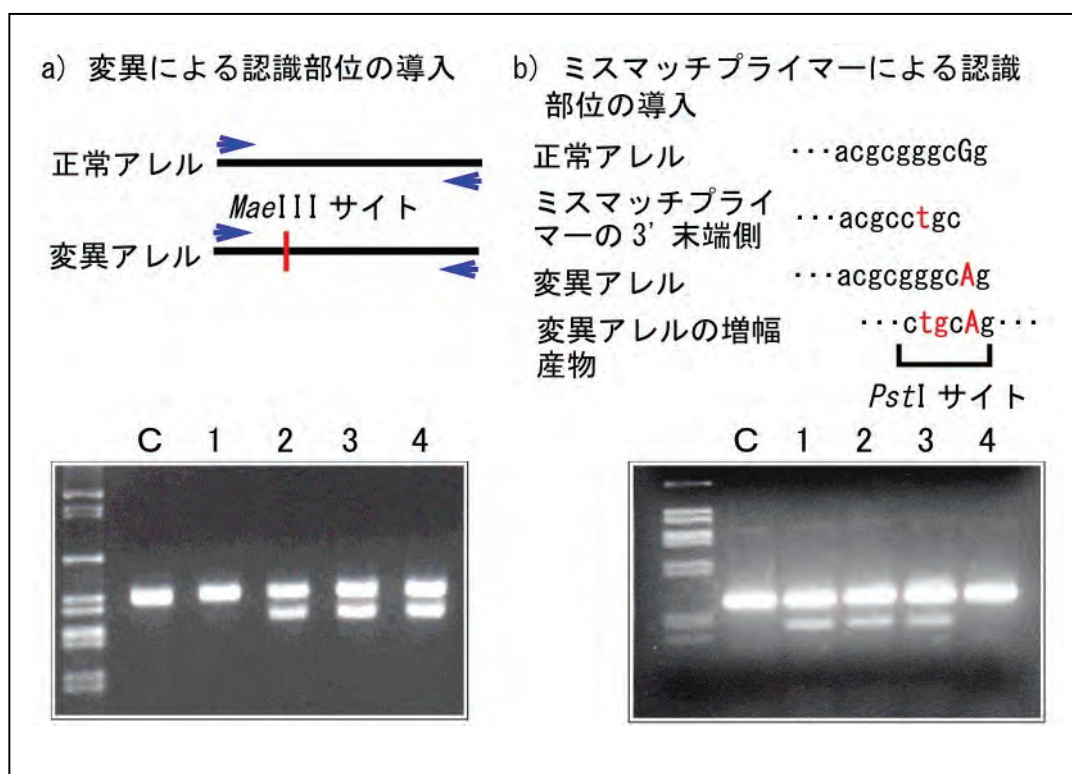


図4 制限酵素切断法による遺伝子変異の同定(CBS 遺伝子)

遺伝子変異により制限酵素 *MaeIII* の認識部位が作成されたため、PCRでの増幅後、PCR産物を制限酵素 *MaeIII* で切断した。正常対照(C)と1では切断されなかったが、2、3と4では *MaeIII* で切断されたバンドが認められ、この変異を持っていると診断された(ヘテロ接合体)。b) 変異遺伝子によりPCR産物に制限酵素 *PstI* の認識部位ができるようにミスマッチプライマーを作成し、そのプライマーを用いてPCRを行った。PCRで増幅後、PCR産物を制限酵素 *PstI* で切断した。正常対照(C)と4では切断されなかったが、1、2と3では *PstI* で切断されたバンドが認められこの変異を持っていると診断された(ヘテロ接合体)。a)、b)の結果から、1と4はそれぞれの変異の保因者であり、2と3は2ヶ所の変異を持つ複合ヘテロ接合体であると診断された。このほか、既知の遺伝子変異を検出する方法としては、対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーション法や対立遺伝子特異的増幅法などがありますが、これらの方法はやや煩雑であり、多量の検体を検査する場合などその状況に応じて用いられています。

塩基配列決定法では、その遺伝子の解析した場所に存在する遺伝子変異をすべて同定することができますが、これまでにその疾患で同定された遺伝子変異の有無の検索、変異遺伝子が同定されている患者家系内での同胞例の診断や保因者の検索、塩基配列決定法により同定された遺伝子変異の確認などのためによく用いられるのが、簡便な制限酵素切断法です。遺伝子変異により制限酵素の認識部位が変化する場合には、まずPCR法により目的とする遺伝子変異を含む遺伝子を増幅した後に、PCR産物を適当な制限酵素で切断し電気泳動を行います。遺伝子変異により制限酵素の認識部位が変化する場合には、まずPCR法により目的とする遺伝子変異を含む遺伝子を増幅した後に、PCR産物を適当な制限酵素で切断し電気泳動を行います。遺伝子

子変異により制限酵素認識部位が存在するようになる場合には、PCR 産物は切断されます(図 4a)。遺伝子変異により制限酵素認識部位が存在しなくなる場合には切断されません。ホモ接合体の場合には、すべての PCR 産物が切断されるか全く切断されなくなります。

ヘテロ接合体の場合には、半分の PCR 産物が切断されるだけで、保因者の診断も可能です。しかしながら、遺伝子変異によりいつも制限酵素認識部位が変化するわけではありません。実際、制限酵素認識部位を変化させる遺伝子変異の方がまれです。そこで、PCR 法で用いるプライマーを設計する時に、PCR 法で増幅されてできる遺伝子に変異塩基配列または正常塩基配列の場合に制限酵素の認識部位ができるように、プライマーにミスマッチ部分を導入します。このミスマッチプライマーを用いた PCR 法で増幅される遺伝子には人工的に制限酵素の認識部位が作り出され、遺伝子変異により制限酵素認識部位が変化する場合と同様、PCR 産物を制限酵素で切断することにより、遺伝子変異の有無を検出できるようになります(図 4b)。

2) 遺伝子診断の利点

遺伝子診断の最も大きな利点は、第 1 に極めて明確な結果が得られる点です。従来行われていた診断法では、正常と患者さんとの間には境界領域が存在するため診断が困難な場合があります。これに対して遺伝子診断では、疾患の病因あるいは関連遺伝子に変異が存在するかないかで診断が可能で、境界領域が存在しないために明確に判断することができます。第 2 の利点は、個体を形成する細胞はすべて同じ遺伝子構成であるため、検体として用いる組織や細胞は核さえあればその種類を問わないという点です。つまり、従来の診断法では患者さんに対して侵襲の大きい検査、例えば肝臓の生検が必要な疾患であっても、遺伝子診断では採血という極めて侵襲の少ない方法で診断することができます。PCR 法を用いれば、極めて微量な検体でも診断が可能なのも利点のひとつです。遺伝子診断の第 3 の利点は、個体のあらゆる時期において遺伝子構成は変化しないため、出生前診断や症状が出現する前でも診断(発症前診断)が可能です。また、遺伝子情報は 4 種類の核酸塩基からなり、遺伝子変異はこれらの塩基の欠失、挿入、置換のいずれかであるため、これらの組み合わせさえ検出できれば、対象疾患が何であれ同様の手技を用いて診断が可能で、遺伝子診断の手技・手法が疾患の種類を問わず普遍的であることも利点と考えられます。さらに、遺伝子診断の対象である DNA は非常に安定であるため、DNA が抽出可能な検体が残っていれば、後からでも検査の追加が可能なことも利点の一つに挙げることができます。

3) 遺伝子診断の問題点

遺伝子診断は、遺伝子の異常に基づく先天代謝異常症の診断法としては極めて理にかなった方法であり、多くの利点があることをこれまで述べてきましたが、その一方でいくつかの問題点も存在していることも忘れてはなりません。この中で一番問題となるのは、遺伝子診断ではすべての患者を診断することができない、すなわち、最も確実と考えられる塩基配列決定法でさえ病因遺伝

子変異のすべてを検出することはできないということです。現在、遺伝子診断において病因遺伝子全体が解析されているわけではなく、多くの場合タンパク質の構成を決める部分とその周辺が解析されているにすぎません。また、解析対象となっている遺伝子以外の遺伝子が、その疾患の発症に関連している可能性も否定することはできません。したがって、病因遺伝子変異が検出された場合には、確定診断することができますが、遺伝子変異が検出されない場合は、解析した範囲で遺伝子変異が検出できなかったにすぎず、患者さんがその疾患でないと断言することはできません。もうひとつの問題点は、新たな遺伝子変異が見いだされた場合には、それがタンパク質のアミノ酸置換を伴っていても、その遺伝子変異がタンパク質の機能に影響を及ぼさない正常多型である可能性を否定できないことです。この場合には、遺伝子変異によるタンパク質の機能異常を明らかにするための煩雑な発現実験なしにはそれが原因遺伝子変異であると断言できず、臨床の面から考えると非常に大きな問題です。実際、原因遺伝子変異と報告されていた遺伝子変異が正常多型であった例もあります。また、従来考えられていたように疾患と病因遺伝子とが必ずしも1対1で対応していない例が存在することが明らかになってきました。同一遺伝子の変異であっても変異の部位・種類によっては臨床的に異なる疾患であり、遺伝子変異が同定されてもその変異からはどの疾患であるか確定診断することが困難な場合が存在することも問題点としてあげることができます。

遺伝子診断には多くの利点が存在するものの、現時点では解決すべき問題点も多く存在しています。このような利点と問題点を考えあわせて遺伝子診断を実施してゆくことが重要です。