

細胞癌化の機構

清水 憲 二

岡山大学医学部病態遺伝子解析部門

はじめに

本邦における癌死は数年前に年間20万人を突破し、死因の第一位を占め続けている。癌研究はその意味でも最重要課題の一つであり、過去数十年にわたり少しずつではあるが進展してきた。世界的にも特に過去15年程の研究の進展は著しいものがある。その最大のポイントは、癌が複数の遺伝子異常の結果起こる、いわゆる「遺伝子病」のひとつであることが明確になったことである。このような進展の重要な契機となったのは、1980年代初頭に実現したヒト癌遺伝子の発見である。この研究に参画し、それ以降の進展を見届けて来た者のひとりとして、本稿では過去15年間の癌の遺伝子に関する研究の進歩と現状を、我々の成果も交えて紹介したい。

I. 癌と遺伝子

癌化の機構については昔から多くの学説があり、刺激説、ウイルス説、異常分化説、変異説などが各々の論拠を持って主張されていた。しかし1970年代までに、これらの中で変異説が最も有力な仮説として認められるようになった。変異説を支持する間接証拠は、表1に示すように数多いが、特に最後の2項はほぼ決定的なものであった。しかしながら実際のヒト癌において、どのような遺伝子がどのような変化を起こしているのかという点については、後述

するように1982年まで全く不明のままであった。また遺伝子に関する分子生物学も、主に大腸菌など原核生物で得られた知見がヒトを含む高等生物の系で威力を発揮するためには、1970年代後半の組換えDNA技術の発展を待たねばならなかった。ただし、遺伝子の重要性、即ち設計図として全ての蛋白質の構造・機能と発現を指令する全体像は確立しており、遺伝子が子孫を残すためだけでなく、個々の細胞の機能自体に最も重要な要素であることは理解されていた(図1)。遺伝子の異常は即ち蛋白質の質的・量的異常に直結することが明白である。しかしヒトゲノムは約30億塩基対ものDNAを含み、遺伝子の平均的サイズを30kbp(キロ塩基対)とすれば、最大10万種の遺伝子があることになる。この中から癌において変化を起こした極く少数の遺伝子を特定することは至難の技であり、遺伝子クローニングの技術なくしては果たし得なかったのである。

表1 変異説を支持する間接的証拠

1. 癌細胞の形質は安定しており、自然復帰しない
2. 大部分の発癌剤は突然変異誘起剤である
3. 動物においては、ウイルスなど外来の遺伝子が癌を起こす
4. DNAの障害修復に欠損をもつ遺伝病の多くは高発癌性である
5. 特定の腫瘍に特異的な染色体異常が見られることがある
6. 頻度は低いが、明らかに遺伝性の腫瘍が存在する

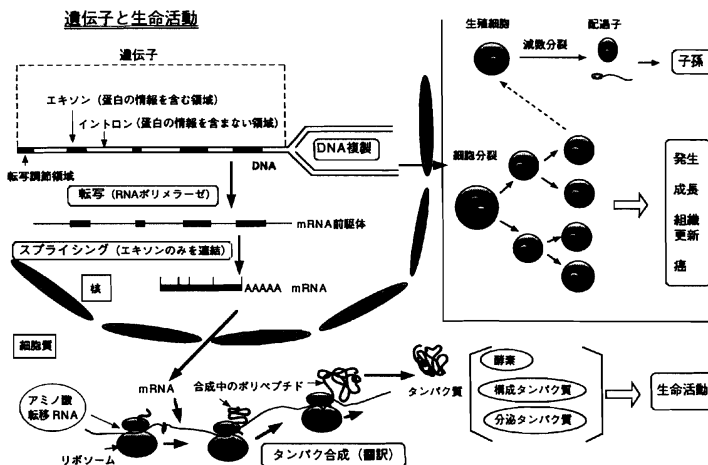


図1

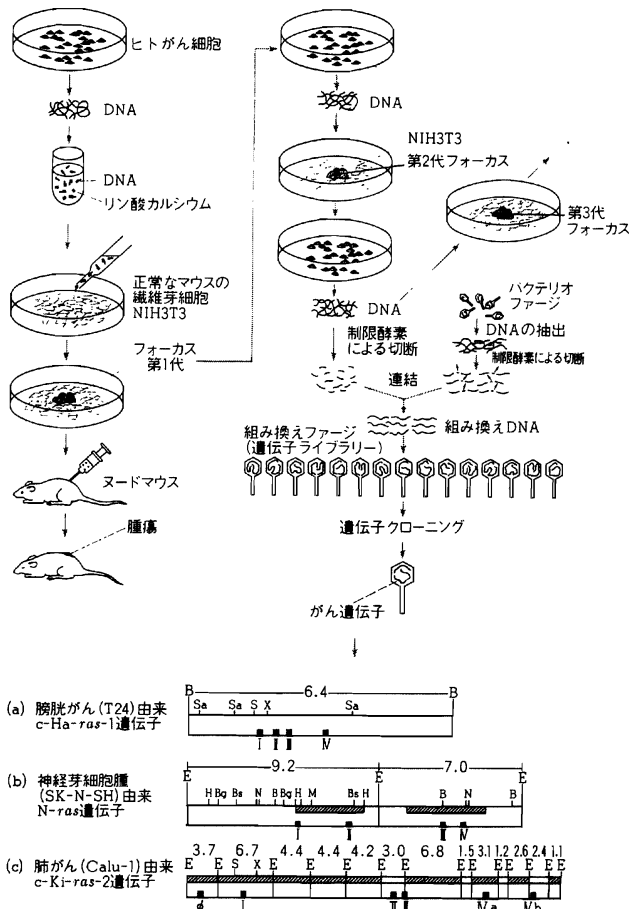
II. 癌遺伝子

1) ヒト癌遺伝子の発見

最初の突破口は実験動物で癌を起こすウイルスの研究からもたらされた。RNA腫瘍ウイルス(レトロウイルス)は高頻度に癌を発症させるウイルス性癌遺伝子(ψ -onc, 例えば ψ -src, ψ -Ha-ras, ψ -abl)を持ち、それらは元来宿主細胞が持っていた正常遺伝子(これをプロトオンコジーン, 原癌遺伝子と呼ぶ)のmRNAに由来することが、1976年に判明した¹⁾。ほとんど全ての原癌遺伝子は動物界に広く保存されており、ヒトでも染色体上の位置決定が行われた。その結果、パーキットリンパ腫ではc-myc, CML(慢性骨髄性白血病)ではc-abl, 各原癌遺伝子が腫瘍特異的染色体転座によって活性化されていることが1982~1983年にかけて判明した。

一方、これらとは別に、ヒト癌において変化している遺伝子を直接捉えようとする試みが1970年代末から始まっていた。即ちヒト癌のDNAをマウス培養細胞に導入し、癌化した細胞を分離してその中のヒ

ト遺伝子を特定しようとするもので、DNAトランスフェクション法と呼ばれる。この方法を開発したM.Wiglerをはじめ、米国東部の幾つかのラボが始めたこの研究に、筆者もWiglerのラボで1980年から参加する機会を得た。詳細は文献²⁾に述べたので、その後3年程の進展を要約すると、調べたヒト癌細胞株の15%程がこのような活性癌遺伝子を持っており、1981年夏から1983年にかけて、筆者らは3種の活性癌遺伝子を何れも最初にクローニングすることができた(図2)。最初に膀胱癌T24から分離されたものは ψ -oncとして知られていた ψ -Ha-rasに対応するヒト原癌遺伝子、c-Ha-rasの変異したものの、肺癌由来のものは ψ -Ki-rasに対応するc-Ki-rasのやはり変異したものであった。2番目に神経芽細胞腫から分離したものはそれまで ψ -oncとしては知られていなかった新しいras遺伝子でN-rasと命名した。何れも188~189アミノ酸残基の類縁蛋白質(RaSp21)をコードするが、癌遺伝子としてマウス細胞を癌化できるものは正常遺伝子の第12又は61番コドンにアミ



DNA移入によるフォーカス形成は図のように何代もくり返すことができるので1個の遺伝子に担われることが分かる。第2代以降の転換細胞に極く微量含まれるヒトDNA由来の部分をクローニングして解析すると下の枠内に示す様な遺伝子であることが分かった。数字はkbp(キロ塩基対)、スケールが異なる。欧字は塩基配列に特異的な制限酵素による切断部位、斜線部にヒト特異的な反復配列が、■I~IVに蛋白の情報を指令するエクソンが含まれる。病態生理Vol.4 No.12(1985)より

図2 DNAトランスフェクションによるヒトがん遺伝子の分離

表2 ヒト腫瘍組織におけるras突然変異

腫瘍	報告数	a)陽性数/検体数	陽性率(%)	b)遺伝子	備考	
乳癌	6	17/266	6	K		
卵巣癌	11	41/201	20	K		
子宮癌	10	72/387	19	K>N		
食道癌	1	0/25	0	—		
グリオーマ	1	0/30	0	—		
神経芽腫	2	5/44	11	N		
胃癌	10	12/441	3	K>N	低分化型0%	
皮膚癌	8	71/277	26	H>N	良性26%,悪性12%	
肺	肺癌	11	166/658	25	K>H,N	小細胞癌0%
	その他	6	46/309	15	K>H,N	
大腸癌	10	208/497	42	K		
大腸腺腫	8	145/537	27	K		
膵臓癌	14	433/553	78	K		
甲状腺癌	7	17/106	16	H,K,N		
甲状腺腫	2	8/26	31	N,H,K		
睾丸腫瘍	2	10/58	17	K,N		
メラノーマ	4	37/175	21	N>H		
肉腫	3	7/47	15	N, K	胎児性横紋筋肉腫35%	
胆道癌	4	48/82	59	K		
口腔癌	3	37/115	32	H>K		
膀胱癌	7	60/299	20	H>K,N		
肝癌	3	3/45	7	N		
腎臓癌	3	3/46	7	H		
前立腺癌	2	14/61	23	H>K		
骨髄球系	MDS	8	50/170	29	N>K	骨髄異型形成症
	IMF	1	2/9	22	N	骨髄纖維症
	AML	14	165/549	30	N>K>H	急性骨髄性白血病
	CML	6	8/86	9	N	慢性骨髄性白血病
	MM	2	6/27	22	N>K	多発性骨髄腫
リンパ球系	ALL	4	21/130	16	N	急性リンパ球性白血病
非ホジキン病	非ホジキン病	2	0/132	0	—	
	ホジキン病	1	0/20	0	—	
	ホジキン病	2	2/28	7	N	
総計	178	1714/6436	27	K>N>H		

a) いずれかのrasに変異の検出されたもの
 b) 主なras遺伝子の種類, >で示したものは差が大

ノ酸置換を伴う点突然変異が生じて活性化されたものであった。1982～1983年に複数のラボから相次いで報告されたこれらの知見は、癌の変異説を分子レベルで初めて証明したものであり、その後の癌研究に大きなインパクトを与えた。

3種のras遺伝子におけるコドン12, 61, 13の活性化変異はPCR法の確立によって、これまでに膨大なデータが蓄積し、表2に示すように全体として約6,500検体中1,700例(27%)のヒト腫瘍が陽性となっている。これはヒト癌遺伝子の中では最も高頻度で広汎に分布しているが、高頻度(膵癌～80%)のものから0%(リンパ腫, 食道癌, グリオーマ)まで、臓器による差異が著しい。

2) 癌遺伝子産物と細胞増殖制御機構

ras遺伝子群に続いて多数のヒト癌遺伝子がトランスフェクション法, *v-onc*との同源性、遺伝子の増幅や再配列などによって見出され、今日までに既に80種を超えている。それらの代表的な例を表3に列挙したが、一見して明白なように、癌遺伝子となりうる遺伝子は増殖因子、その受容体、細胞内信号伝達因子群、核内転写調節因子群の4つに大別することができる。

表3 プロトオンコジンの種類

群	遺伝子
I. 増殖因子	sis (PDGF), FGF 群 (hst, int-2), TGF α , IL-6,
II. 増殖因子受容体	
IIa. チロシンキナーゼ型受容体	erbB (EGFR), erbB-2, <u>fms</u> , kit, flt, K-sam, <u>ret</u> , <u>met</u> , <u>trk</u> , <u>Alk</u> ,
IIb. 非チロシンキナーゼ型受容体	mpl, mas-1,
III. 細胞内信号伝達因子	
IIIa. 非受容体チロシンキナーゼ	src, lyn, <u>lck</u> , hck, fps/fes, <u>abl</u> , jak, csk,
IIIb. アダプター因子	shc, ash/grb-2, nck, crk,
IIIc. RAS 制御因子	sos, vav, dbi, ect-2, C3G
IIId. GTP 結合蛋白質(RAS)	<u>H-ras</u> , <u>K-ras</u> , <u>N-ras</u> , <u>TC21</u> , <u>Gα</u> ,
IIIe. セリン・スレオニンキナーゼ	raf, mos, akt, PKC, MAPKK, JNK,
IV. 核内蛋白質	
IVa. 転写調節因子	<u>c-myc</u> , <u>N-myc</u> , myb, fos, jun, <u>ets</u> , <u>RAR</u> , E2F
IVb. その他	<u>cycD1</u> , <u>mdm-2</u> ,

*下線はヒト腫瘍と明白な関連があるもの

即ち、癌遺伝子産物は細胞外から核に至る信号伝達経路に沿って分布することになる(図3)。これらの経路のうち、最近めざましい進展を遂げたのは増殖因子受容体チロシンキナーゼからRAS, RAF, MAPKカスケードを経て核内に至る蛋白質リン酸化経路である⁹⁾。受容体にリガンドが結合しておこるリン酸化チロシンを認識してSH2, SH3領域を含むアダプター因子群がRASp21活性化因子SOSを動員し、RASp21をGDP

結合型からGTP結合型に励起する。励起されたRASp21はRAF-1キナーゼと相互作用してこれを活性化し、MAPKK (MEK) → MAPK (ERK)カスケードを活性化する。活性化されたMAPKは核内に至り、種々の転写因子群を活性化することにより、細胞増殖がひきおこされることになる(図4)。RAF-1キナーゼは1985年に我々がヒト胃癌から初めて分離した活性癌遺伝子の産物であり¹⁾、図中の他の因子の遺伝子も多くが癌遺伝子となり得るものである。

また前述した変異による活性化RASp21は、GTP型からGDP型に復帰させる因子、GAP (RASp21-GTPase活性化因子)の作用に非感受性となるため、励起状態を持続することになることが判明している⁹⁾。さらに、図4とほぼ同様の信号伝達経路は酵母、ショウジョウバエ、線虫にも保存されており、細胞の増殖や分化の制御に中心的な役割を果たすことが明らかになった⁹⁾。

以上のように、細胞癌化におけるポジティブな遺伝子変化は、正常細胞の増殖や分化の制御機構の脱制御をもたらすものとして大きく捉えることができる。詳細な分子機構や具体的なヒト腫瘍におけるポジティブ因子についてまだ未解明の部分が多いものの、大要についてはほぼ推察できる段階に達している。

Ⅲ. 癌抑制遺伝子

1) 癌抑制遺伝子の発見

癌遺伝子の発見は大きなインパクトをもたらしたものの、ヒト癌の発症機構をこれだけでは説明できないことがまもなく明白になった。即ち、①活性ras遺伝子は全腫瘍の約1/4にしか検出されない。



図 3

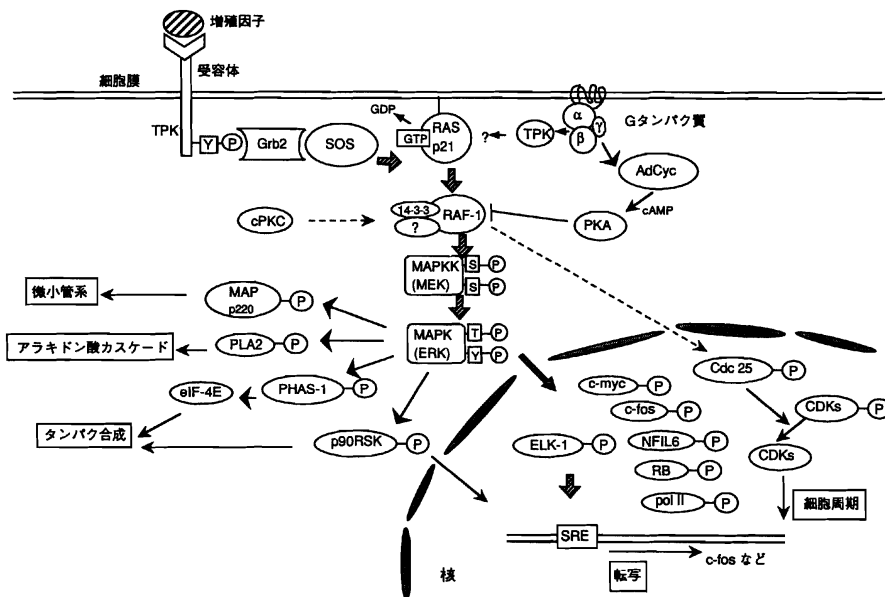


図 4 RASp21 信号伝達の主経路 (MAPキナーゼカスケード)

表4 ヒト癌抑制遺伝子

遺伝子	染色体部位	蛋白質(KD)	局在	機能	関係するヒト癌	遺伝病
RB	13q14.2	105	核	転写制御	RB, 骨肉腫, 肺癌	家族性 RB
p53	17p13.1	53	核	転写制御	大腸癌, 乳癌, 肺癌	Li-Fraumeni 症候群
WT-1	11p13	50	核	転写制御	腎芽腫	ウィルムス腫瘍 Denys-Drash 症候群
DCC	18q21.3	>80	膜	接着因子?	大腸癌	?
APC	5q21	310	膜	細胞骨格	大腸癌, 胃癌	家族性大腸ポリポーシス
IRF-1	5q31.1	36	核	転写制御	白血病, MDS	?
VHL	3p26	>31	膜?	?	腎癌	von-Hippel-Lindau 病
NF-1	17q11	300	細胞質	RAS 制御	黒色腫, 神経芽腫	神経線維腫症 I 型 (von Recklinghausen 症候群)
NF-2	22q12	65	細胞骨格	?	髄膜腫, 神経鞘腫	神経線維腫症 II 型
MTS-1	9p21	16	核	細胞周期	脳腫瘍, 黒色腫, 膀胱	多重癌
MTS-2	9p21	15	核	細胞周期	?	?
Waf/Cip	?	21	核	細胞周期	?	?
Kip-1	?	27	核	細胞周期	?	?
BRCA-1	17q21	200	核	転写調節	乳癌, 卵巣癌	遺伝性乳癌

②ヒト細胞は単一の活性癌遺伝子のみでは癌化しない。③癌細胞と正常細胞との融合細胞は癌細胞の形質を失う。などの知見から、正常細胞には癌化を抑える因子が存在すると考えられ、癌抑制遺伝子の概念が生まれた。1986年に遺伝性網膜芽細胞腫 (RB) の原因遺伝子 (染色体13q¹⁴) が分離され、最初の突破口が開かれた⁶⁾。RB遺伝子の異常座位をヘテロに持つ保因者からの腫瘍では正常RB遺伝子が失われており、正常なRB蛋白質が存在しない状態になっている。このようなヘテロ接合性の消失 (Loss of Heterozygosity, LOH) が癌抑制遺伝子の大きな特徴で、また多くの場合、遺伝性高発癌症候群と関連する。RB遺伝子異常はRBのほか乳癌、骨肉腫、肺癌等でもみられ、非遺伝性の場合も多い。

p53は最初DNA腫瘍ウイルスSV40のLT抗原と結合する蛋白質として発見され、癌で発現の亢進が見られたり、rasと協調して癌化を促進することなどから、癌遺伝子として分類されていた。しかし1987年頃からこれらの性質は全て変異型p53によるもので、正常p53はむしろ癌抑制効果を示すことが判ってきた。更に、p53遺伝子の位置する染色体17p¹³は多様なヒト腫瘍において高頻度にLOHが見られ、残った座位にも特にエキソン5~8における点変異が高頻度に検出される。p53遺伝子は大腸癌、肺癌をはじめほとんどの腫瘍において、最も高頻度に異常を示す遺伝子である。また高発癌家系Li-Fraumeni症

候群は、このp53変異遺伝子を代々伝える遺伝病であることも判明した。以上のほかにも、最近に至るまで各種の癌により選択的な癌抑制遺伝子が続々と分離されつつあり、それらの多くが遺伝性腫瘍の関連地図とポジショナルクローニングによって達成されたものである (表4)。

Vogelsteinらは、このような解析から特に大腸癌において、APC, K-ras, p53などの遺伝子異常が段階的に起こる多段階発癌の具体的モデルを提出し、ほぼ承認されつつある⁷⁾。

しかし、これらの遺伝子異常が各癌細胞に蓄積する確率は大きく見積もっても10⁻⁶以下であり、クローナルな増殖を考慮しても説明が困難であった。最近この難問を解く手がかりとして注目されているのがDNA修復機構である。遺伝性非ポリープ型大腸癌 (HNPCC, Lynch症候群) において、最初大腸菌で発見されたミスマッチ修復遺伝子 (MutS, MutL...) のヒトホモログに欠損があり、マイクロサテライトのコピー数異常などの変異頻度が上昇していることが明らかになった⁸⁾。同様の事実は紫外線障害修復欠損遺伝病であるXP (色素性乾皮症) で皮膚癌が多発する例でも知られていた。このように、変異を抑制する各種の修復遺伝子も広い意味で癌抑制遺伝子群に分類することができる。以上の知見を総合した癌の発症、進展についてのモデルを図5に示す。

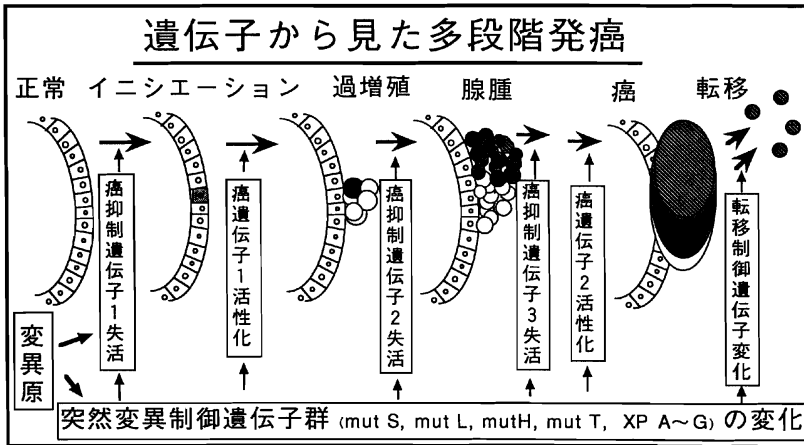


図5

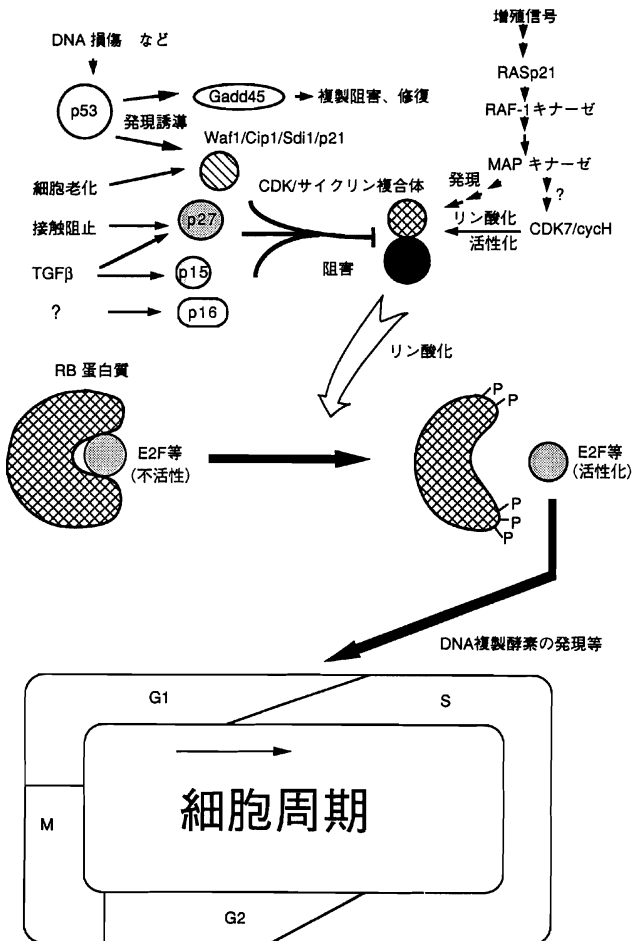


図6 癌抑制遺伝子産物と細胞周期制御

2) 癌抑制遺伝子産物の機能

癌抑制遺伝子の産物が正常細胞でどのような生理機能を果たし、結果的に癌化を防止することになるのかについても近年大きな展開があった。まず、pRB, p53およびp53によって調節されるCDK(サイクリン依存キナーゼ) 阻害因子群 (p21waf, p16/15, p27kipなど) が細胞周期制御に極めて重要な役割を果たすことが判明した⁹⁾。図6に示したように、p53は何らかの異常事態になった時、細胞周期を停止させる役目を持ち、修復やアポトーシスにも密接に関与する。pRBはCDK/サイクリンの標的として細胞周期制御に関わり、転写活性化因子E2F群の活性を通常は抑制していると考えられている。そのほかAPCやNF-2は細胞間相互作用や細胞骨格の制御を通して細胞増殖を制御するとされている。以上のように、癌抑制遺伝子産物も多様性に富み、核内や細胞間相互作用を統括して細胞増殖にブレーキをかける役割を果たすと考えられ、癌遺伝子をアクセルの異常にたとえると丁度好対称をなしているように思われる。

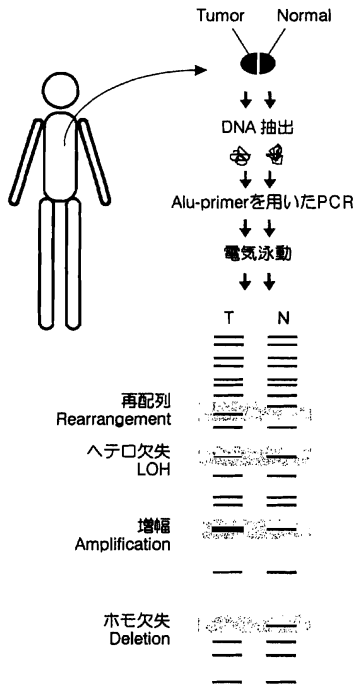
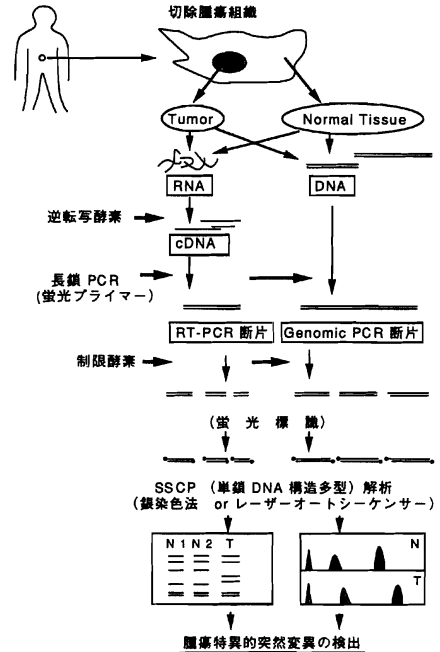


図7 ヒトがんのInter-Alu Long PCR

岡山大学 SBR (腫瘍バンク) による遺伝子診断法の概略



(岡大医療部遺伝子)

図8

IV. ヒト癌における遺伝子変化の総合的解析

最後に、我々の研究室で現在進めつつある新しい試みについて簡単に紹介したい。

これまで述べたように、ヒト悪性腫瘍で変化を起こしている遺伝子は既に100種を超えている。多段階説の通り、これらのうち3~6種の異常の組合せで癌の発症や進展が起こるとすると、その組合せは膨大な種類になると考えられる。つまり癌はそれぞれ個性があることを示唆する。そこで我々は、具体的なヒト腫瘍について、これらの異常を広汎に解析するプロジェクトを2年前から開始した。

まず重要な点は研究材料の確保であったが、これは幸いにも当医学部臨床各科の絶大な協力のもとに腫瘍バンクが設立され、同一患者の切除腫瘍および正常組織を対とした新鮮凍結標本が、これまでに約400例集積した。

次に重要な点は、遺伝子レベルの癌特異的異常を広汎に、しかも精確に検索する方法の開発であった。この2点は両立し難いので、以下に述べるように、マクロなレベルでのDNA変化とミクロなレベルでの遺伝子微小変異とを別個に解析することとなった。

1) マクロ異常解析—新しいゲノムスキャン法

ヒトゲノム上に30万コピー散在するAlu反復配列内にプライマーを設定し、Alu配列に挟まれる平均4

~6kbpの領域をRI存在下に長鎖PCRで増幅する。同一患者の癌部と非癌部のサンプルを並行して電気泳動することにより、DNAの欠失、増幅、再配列などを検索する方法である(図7)。1回の分析で16人分、各約500kbpの領域を比較することができる。これまでに腎癌、大腸癌、胃癌などにおける異常が検出され、幾つかについてはそれらの領域のクローニングも達成されつつある。これらの領域近傍には、既知又は未知の癌遺伝子、癌抑制遺伝子が存在すると期待される。

2) ミクロ異常解析—全領域マルチSSCP法

既知の遺伝子の点突然変異検出のために用いられるPCR-SSCP法(PCR-単鎖DNA構造多型法)は、これまで各エクソン毎に行われていたため、エクソン数が多い、又はエクソン構造が不明の遺伝子には適用が困難であった。そこで、長鎖PCRを活用し、一組のプライマーで遺伝子又はmRNAの全コーディング領域を一度に増幅してSSCP解析する方法を開発した(図8)。具体的には、PCR産物を適当な制限酵素で分断

し、銀染色によるSSCP解析、或いは各断片の3'末端を蛍光標識したのち、蛍光オートシーケンサーによるSSCP解析を行う。この遺伝子全領域マルチSSCP法は、部位不明の点突然変異を広く検索する一次スクリーニングの系として極めて有効である。これまで本法によりK ras遺伝子第22コドンにおける新しい活性化変異、RER⁺大腸癌におけるE2F-4転写因子遺伝子の変異、リンパ腫におけるc-mycや細胞周期制御遺伝子の変異などを見出している。

おわりに

以上、これまでの癌に関する遺伝子研究の進歩を紹介したが、詳細についてはまだ多くの疑問が山積しており、また紙面の都合で割愛したアポトーシス、免疫関連、不死化等も含め、この分野は今も急激な展開を遂げつつある。

最後にこの分野の判りやすい解説として、黒木東大名誉教授による文献¹⁰⁾を一読されることをお勧めしたい。

文献

- 1) Stehelin, D. Varmus, HE. Bishop, JM. Vogt, PK. Nature 260, 170-172, 1976
- 2) 清水憲二、現代化学(増刊2)癌遺伝子研究の展望、p3-8, 1985
- 3) Pawson, T. Nature 373, 573-580, 1995
- 4) Shimizu, K. et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 5641-5645, 1985
- 5) McCormick, F. Cell 56, 5-8, 1989
- 6) Friend, SH. et. al., Nature 323, 643-646, 1986
- 7) Vogelstein, B. et. al., N. Engl. J. Med. 319, 525-532, 1988
- 8) Aaltonen, LA. et. al., Science 260, 812-816, 1993
- 9) 実験医学(増刊) 13巻14号 癌と細胞周期 (田矢洋一 編)、1995
- 10) 黒木登志夫、がん遺伝子の発見 中公新書 1290, (中央公論社) 1996