

## 癌抑制遺伝子の研究

## 1. 目的

がんはがん遺伝子の変異だけでなく、がん抑制遺伝子の活性が失われることが重要な因子となっていることが最近わかってきた。このがんを抑制する遺伝子はそれぞれのがんに関して数種類あると考えられ、そのうちには幾つかのがんに共通しているものと、あるがんだけに特別のものがあることがわかっている。したがって、がん抑制遺伝子の単離は、正常な細胞ががん細胞に変化する機構を解明するために不可欠であるといえる。本研究の目的は、がんにおいて染色体の欠失している部位を多数の標識（プローブ）を用いて細かく調べることにより、それぞれのがんを抑制する遺伝子が何種類ぐらいあり、それぞれがどの染色体にあるかを決定し、さらに、がん抑制遺伝子を単離しようと試みるものである。染色体上の標識（プローブ）を開発し種々の研究に用いる研究は欧米では5年ほど前より活発に行われているが、わが国においてはこれらの基礎研究の遅れから欧米に比べて大きく立ち遅れている。これらの標識をとることやそれぞれの標識がどの染色体のどの部位にあるかを決定することは膨大な労力を要することであるが、がん研究（特にがん抑制遺伝子の研究）に対してはどのがんの研究にも応用できる道具として利用されることが期待されることから非常に重要である。また、がん抑制遺伝子は単にがんになる機序を解明するだけでなく、がん治療薬として利用しうることが期待され、さらにはがん患者の予後の指標やがんの危険因子を判定する材料となるものと考えられ、この意味においても本研究の必要性は大であると考えられる。

## 2. 組織

申請者：	中村祐輔	(財) 癌研究会癌研究所生化学部
共同研究者：	堀井 明	〃
	山川和弘	〃
	江見 充	〃
	佐藤孝明	〃
	松原謙一	大阪大学細胞生体工学センター

## 3. 計画及び材料と方法

## A. 肺がん・腎がん

40例の胃がん・67例の肺がんサンプルを用いて第3染色体の欠失領域を詳細に検討し、がん抑制遺伝子の存在している部位を明かにした。われわれの研究室で単離した第3染色体短腕に特異的な約100個のマーカーを利用して、患者の正常コントロールとがん組織から抽出したDNAを対比して、それぞれのがんで染色体のどの部位が欠落しているかを調べた。また、40種の肺がん細胞株を用いてがん抑制遺伝子をさらに小さい領域に限定できるかどうかを調べた。

## B. 大腸がん

家族性大腸ポリポーシス症の 160 家系における遺伝的な遺伝子異常を調べた。この原因となっている APC 遺伝子は 2843 個のアミノ酸をコードする大きな遺伝子であるため、一度に全領域を調べることはできず、31 個の領域に分割して RNase プロテクション法と PCR (polymerase chain reaction) 法を併用して異常をおこしている領域を探った。また、家族性大腸ポリポーシス症の発症前診断を効率よく簡単に行なうために、PCR 法によってサンプル入手から 24 時間以内に診断できる方法の開発を目指した。これまでに、検出した異常の約 50% に相当するものが DNA 断片の長さに変化をきたしたり、制限酵素で切断した場合の長さが増えることを利用して検討を加えた。この病気は常染色体性優性遺伝病であり、患者の子供は同じ病気にかかる可能性が 50% ある。したがって、可能性のある人は手遅れになって大腸癌で死亡することを防ぐために数十年にわたって毎年大腸内視鏡検査を受ける必要があったが、遺伝子レベルで簡単にしかも 100% の正確さで診断できれば、50% のヒトは 100% 確実に病気にならないと診断でき、検査から開放されると共に病気に対する不安もとり除くことができる。また、病気になると診断された人はがんを早く見つけてがんによって死亡することを確実に防げるものと考えられる。さらに、大腸ポリポーシスの発生に APC 遺伝子の不活性化がどのように関わるのか一両親から受け継いだ 2 個の遺伝子が共に不活性化されないといけないのか片方だけでよいのかを詳細に検討するため、6 人の家族性大腸ポリポーシス症患者からの 76 個のポリポーシス材料を入手して異常を調べた。APC に加えて K-ras, p53、第 8 染色体の欠失についても検討を加え、それぞれの遺伝子の腫瘍発生過程での役割についても調べた。APC 遺伝子が他のがんの発生に関係するかどうかを調べるため、肺癌・胃癌・膵癌・肝癌・脳腫瘍について異常の有無を調べた。

#### C. 多発性内分泌腫瘍症 1 型 (MEN1)

MEN1 は内分泌臓器に多発性のがんをひきおこす遺伝性の病気であり、主に下垂体・副甲状腺・膵臓の内分泌腺に良性・悪性の腫瘍が発生する。この病気の原因はがんを抑制する遺伝子が遺伝的に変異をおこして機能を失っているためであると考えられており、この原因遺伝子産物はがんを抑えるものと期待されている。第 11 染色体の長腕 q13 領域に原因遺伝子が存在することが明かであり、遺伝子を追いつめる目的で、この領域の詳細な遺伝的・物理的染色体地図を作製し、これをもとに MEN1 の家系を利用して解析を行った。

#### 4. 成果

A. 肺がん・腎がん 腎がんの約半数、肺がんの約 1/3 の症例 (すべて腺がん) において第 3 染色体の一部だけが欠失していることが明かとなった。共通して欠失している領域を染色体地図にもとづいて割り出したところ、腎がん・肺がん共に p14.1-21.1 と p21.3 の 2 領域が複数のがんにおいて欠けていることが解った。この結果から、腎がん・肺がん共通したがん抑制遺伝子のある可能性が示されると共に、第 3 染色体短腕上には少なくとも 2 種類のがん抑制遺伝子の存在することが強く示唆された。また、肺がん細胞株の検討により、抑制遺伝子を約 1000kb の領域まで追いつめ、さらに、この領域から癌抑制遺伝子の候補遺伝子を複数単離した。

B. 大腸がん 106 例について遺伝子上に APC 蛋白の合成に重要な影響を及ぼすと考えられる変異を見いだした。このうち 90%以上のものは、蛋白の合成が途中で中断してしまう異常をおこしていた。この 106 家系については、血縁関係のある人たちについての発症前診断を 100%の正確さで行うことが可能となった。また、APC 遺伝子の 2 コピーの機能が共に失われることによってポリープの生ずることを証明した。また、K-ras 遺伝子の異常がポリープ発生には関係なく、ポリープを大きくして病理学的に悪性度を増す過程に関わっていることも明らかにした。p53 遺伝子第 8 染色体の抑制遺伝子はポリープ段階では全く無関係であることも明らかにした。さらに APC 遺伝子の不活性化が胃癌・膵癌でも起こっていることを明らかにした。胃癌では前癌病変である腺腫でもすでに APC 遺伝子の異常が認められ大腸と同様に発癌過程に早期に APC の不活性化が重要な役割を果たしているものと考えられる。

C. 多発性内分泌腫瘍症 1 型 (MEN1) MEN1 の家系を利用して解析をおこなった結果、遺伝子を約 2000Kb という小さい領域まで追いつめることができた。

## 5. 考察

家族性大腸ポリポーシス症は常染色体優性遺伝病であり、患者の子供は同じ病気にかかる可能性が 50%ある。したがって、可能性のある人は手遅れになって大腸癌で死亡することを防ぐために数十年にわたって毎年大腸内視鏡検査を受ける必要があったが、遺伝子レベルで簡単にしかも 100%の正確さで診断できるようになり、50%のヒトは 100%確実に病気にならないと診断でき、検査から開放されると共に病気に対する不安もとり除くことが可能となった。また、病気になると診断された人はがんを早く見つけてがんによって死亡することを確実に防げる。これらの進歩は約 10,000 人に一人で発生するこの疾患をもつ家系にとっては非常に有用なことである。また、APC 遺伝子は一般の大腸癌のみならず、胃癌や膵癌においても重要な役割を果たしていることがわかり、これらの腫瘍の発生機序の解明にも大きく寄与したと考えている。

## 6. 発表

1. K. Yamakawa, R. Morita, E. Takahashi, T. Hori, J. Ishikawa, and Y. Nakamura: A detailed deletion mapping of the short arm of chromosome 3 in sporadic renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 51:4707-4711, 1991
2. M. Fujimori, S. A. Wells Jr, Y. Nakamura: Fine-scale mapping of the gene responsible for multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN). *Am. J. Hum. Genet.* 50:399-403, 1992
3. S. Yokoyama, K. Yamakawa, E. Tsuchiya, M. Murata, S. Sakiyama, Y. Nakamura: Deletion mapping on the short arm of chromosome 3 in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung. *Cancer Res.* 52:873-877, 1992
4. Y. Miki, I. Nishisho, A. Horii, Y. Miyoshi, J. Utsunomiya, K. Kinzler, B. Vogelstein, Y. Nakamura: Disruption of the APC gene by retrotransposal insertion of L1 sequence in a colon cancer. *Cancer Res.* 52:643-645, 1992
5. Y. Miyoshi, H. Ando, H. Nagase, I. Nishisho, A. Horii, Y. Miki, T. Mori, J.

- Utsunomiya, S. Baba, G. Petersen, S.R. Hamilton, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, Y. Nakamura: Germ-line mutations of the APC gene in 53 familial adenomatous polyposis patients. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4452-4456, 1992
6. T. Sato, H. Saito, J. Swensen, A. Olifant, C. Wood, D. Danner, T. Sakamoto, K. Takita, F. Kasumi, Y. Miki, M. Skolnick, Y. Nakamura: The human prohibitin gene, located on chromosome 17q21, is mutated in sporadic breast cancer. Cancer Res. 52:1643-1646, 1992
  7. M.H. Jones and Y. Nakamura: Deletion mapping of chromosome 3p in female genital tract malignancies using microsatellite polymorphisms. Oncogene 7:1631-1634, 1992
  8. A. Horii, S. Nakatsuru, Y. Miyoshi, S. Ichii, H. Nagase, Y. Kato, A. Yanagisawa and Y. Nakamura: The APC gene, responsible for familial adenomatous polyposis, is mutated in human gastric cancer. Cancer Res. 52:3231-3233, 1992
  9. Y. Miyoshi, H. Nagase, H. Ando, A. Horii, S. Ichii, S. Nakatsuru, T. Aoki, Y. Miki, T. Mori and Y. Nakamura: Somatic mutation of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. Human Molec. Genetics 1:229-233, 1992
  10. S. Ichii, A. Horii, S. Nakatsuru, J. Furuyama, J. Utsunomiya and Y. Nakamura: Inactivation of both APC alleles in an early stage of colon adenomas in a patient with familial adenomatous polyposis (FAP). Hum. Mol. Genet. 1:387-390, 1992
  11. A. Horii, S. Nakatsuru, Y. Miyoshi, S. Ichii, H. Nagase, H. Ando, A. Yanagisawa, E. Tsuchiya, Y. Kato, and Y. Nakamura: Frequent Somatic mutation of the APC gene in human pancreatic cancer. Cancer Res. 52:6696-6698, 1992
  12. S. Nakatsuru, A. Yanagisawa, S. Ichii, E. Tahara, Y. Kato, Y. Nakamura, and A. Horii: Somatic mutation of the APC gene in gastric cancer: Frequent mutations in very well differentiated adenocarcinoma and signet-ring cell carcinoma. Hum. Molec. Genet. 1:559-563, 1992
  13. H. Ando, Y. Miyoshi, H. Nagase, S. Baba, and Y. Nakamura: Detection of twelve germ-line mutations in the adenomatous polyposis coli (APC) gene by PCR. Gastroenterology 104:989-993, 1993
  14. A. Horii, S. Nakatsuru, S. Ichii, H. Nagase, and Y. Nakamura: Multiple forms of the APC gene transcripts and their tissue-specific expression. Human Molecular Genetics 2:283-287, 1993
  15. H. Ohata, M. Emi, Y. Fujiwara, K. Higashino, K. Nakagawa, R. Futagami, E. Tsuchiya, and Y. Nakamura: Deletion mapping of the short arm of chromosome 8 in non-small cell lung carcinoma. Genes, Chromo. Cancer 7:85-88, 1993
  16. T. Mori, H. Nagase, T. Aoki, H. Arakawa, T. Nishihira, S. Mori, and Y. Nakamura: The APC (adenomatous polyposis coli) gene: a novel mutation in an FAP patient and a DdeI polymorphism in the 5' non-coding region. Human Mutation 2:240-243, 1993

17. S. Ichii, H. Nagase, T. Mori, S. Baba, and Y. Nakamura: A novel mutation of the APC (adenomatous polyposis coli) gene in a familial adenomatous polyposis (FAP) patient and presymptomatic diagnosis using PCR. *Human Molecular Genetics* 2:597, 1993
18. S. Ichii, S. Takeda, A. Horii, S. Nakatsuru, Y. Miyoshi, M. Emi, Y. Fujiwara, K. Koyama, J. Furuyama, J. Utsunomiya, and Y. Nakamura: Detailed analysis of genetic alterations in colorectal tumors from patients with and without familial adenomatous polyposis (FAP). *Oncogene*, 8:2399-2405, 1993
19. S. Nakatsuru, A. Yanagisawa, Y. Furukawa, S. Ichii, Y. Kato, Y. Nakamura, and A. Horii: Somatic mutations of the APC gene in precancerous lesion of the stomach. *Hum. Mol. Genet.* 2:1463-1465, 1993
20. T. Tokino, N. Davidson, K. Helzlsouer, B. Zehnauer, Y. Nakamura, B. Vogelstein, and D. Sidransky: Absence of germline prohibitin mutations in early onset breast cancer. *Int. J. Oncol.* 3:769-772, 1993