

ラジオNIKKEI ■放送 毎週木曜日 21:00~21:15

マルホ皮膚科セミナー

2013年5月2日放送

「第76回日本皮膚科学会東部支部学術大会① 会長講演

皮膚科領域における癌研究の歴史と展望」

札幌医科大学 皮膚科

教授 山下 利春

はじめに

癌の分子生物学は様々な新しい核酸解析法が開発された1970年代から活発な研究が始まりました。1980～1990年代にかけて遺伝子クローニングとシーケンス法によって研究が進み、2000年代以降はマイクロアレイ解析、エピジェネティクス、ゲノミクスによって発癌機構の詳細な解析が行われるようになりました。本稿では、私が関わって参りましたDNA腫瘍ウイルスの研究を中心に、この40年間における癌の分子生物学の進展を概説致します。

1970年代：遺伝子DNAの構造と発現の研究の幕開け

DNAが遺伝子であることが明らかにされたのはワトソンとクリックが二重らせん構造を明らかにした1953年ですが、医学部の実験室でDNAが扱えるようになるのは、1970年代の後半になってからです。1970年代は遺伝子研究に重要な方法が次々と開発された極めて希有な時代でした。1973年には最初の遺伝子クローニングとDNAトランスフェクション法が報告され、1975年にはEdwin M Southernによってサザンブロット法が開発されました。1977年にはマキサム・ギルバート法とサンガー法の2つのDNAシーケンス法が発表されました。長いDNAを適当なサイズに切る制限酵素がDNA解析に必須ですが、1970年代に市販されていた酵素の種類は限られており、当時は、自分たちで細菌を培養し制限酵素を精製しておりました。

1970年代の癌の分子生物学は、動物に癌をつくる小型DNAウイルス、すなわち、SV40、ポリオーマウイルス、アデノウイルスの時代でした。これらの小型DNAウイルスは培養細胞で大量に増やすことができましたので、ウイルスDNAを精製し、制限酵素でカットし、DNAトランスフェクションによってウイルス癌遺伝子を同定する、という一連の実験が可能でした。これらの研究によって、SV40とポリオーマウイルスの大型T抗原、アデノウイルス

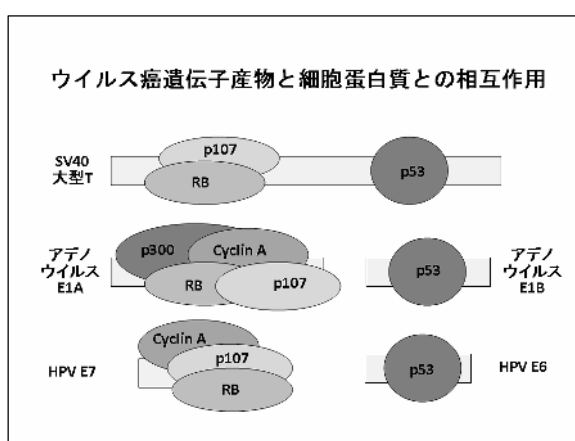
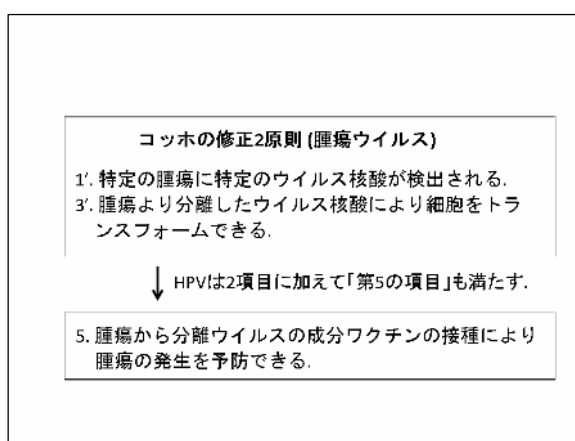
の E1A と E1B がウイルス癌遺伝子であることが明らかになりました。DNA 腫瘍ウイルスの発癌機構につきましては、後でもう一度触れさせていただきます。

1980 年代：遺伝子クローニングとシーケンスの時代

ヒトパピローマウイルス（HPV）は培養細胞で増殖しないため、他の DNA 腫瘍ウイルスに比べて研究が遅れておりました。しかし、zur Hausen 博士の研究グループが HPV16 DNA をクローニングした 1983 年以降、HPV の研究が急速に進みました。Zur Hausen 博士のグループを含むいくつかの研究グループが、HPV16 や HPV18 が、尖圭コンジローマからは検出されず、外陰癌や子宮頸癌から高率に検出されることを示しました。1988 年、NIH の Peter Howley 博士のグループが、HPV16 E7 遺伝子と活性型 ras 遺伝子が協同で初代ラット細胞をトランスフォームすることを初めて報告しました。

これらの結果は、特定の HPV 型が、① 特定のヒト癌から分離され、② 分離されたウイルスがトランスフォーム活性を有するという、腫瘍ウイルスに適用される「コッホの修正 2 原則」を満たすことを意味します。zur Hausen 研究室の De Villiers 博士は、ウイルスゲノムの相同性から HPV の新しいゲノム型を分類する作業をコツコツと続けました。最終的に、HPV の分離される腫瘍（粘膜型、皮膚型、悪性、良性）に基づく疫学的分類と DNA の相同性に基づく系統分類が一致することが示されました。最近になりまして、HPV ワクチン（サーバリックス、ガーダシル）によって子宮頸部異形成が抑制されることが報告され、HPV とヒトの悪性腫瘍は、「コッホの 5 番目の原則」とも言うべき ”ウイルスなければ腫瘍なし” のレベルまで証明されました。

話は少し戻りますが、1981 年、3 つの研究グループが、NIH3T3 細胞を用いた DNA トランスフェクションによって、複数の癌細胞株から点変異のある活性型 ras 遺伝子を同定しました。これらの報告はヒトの癌が体細胞の遺伝子病であることを証明した画期的な研究でした。一方、癌抑制遺伝子 RB1 が報告されたのは 1986 年、p53 が癌抑制遺伝子であることが証明されたのは 1989 年でした。これら癌抑制遺伝子の発見から間もなく、SV40、マウスポリオーマウイルス、アデノウイルス、HPV の癌遺伝子産物が RB と p53 に結合し両蛋白質を機能的に不活性化する



ことが明らかにされました。われわれも少し遅れて、疣贅状表皮発育異常症に関係する HPV5、HPV8 の E7 蛋白質が RB 蛋白質と結合することを報告しました。

1980 年代は PCR が一般化し、多くの研究室がサーマルサイクラーと呼ばれる PCR の機器を使用して実験を開始した年代です。HPV は 150 以上のゲノム型が存在しますが、高リスク型の HPV16、18、31、33、45、51、52、58 の DNA を一度に増幅できるコンセンサス PCR が便利です。Manos の考案した L1 コンセンサスプライマーとわれわれが考案した E6E7 コンセンサスプライマーが現在でも HPV の検出に使用されています。

1990 年代以降：遺伝子治療、エピジェネティクスとゲノミクスの時代

1990 年代には各種のウイルスベクターによる遺伝子導入実験が行われるようになり、効率的な遺伝子導入が可能になったことから、実験的な遺伝子治療が多数報告されました。われわれもアデノウイルスベクターを用いた研究をいくつか行いました。p53 ファミリーである p63 と p73 の発現ベクターを作製し、メラノーマ細胞株へのアポトーシス誘導能を検討した結果、p63 がメラノーマ細胞に最も強いアポトーシス誘導能があり、p53AIP1 を転写活性化することが示唆されました。また、われわれはアデノウイルスベクターを用いてメラノソーム関連遺伝子の機能解析と色素性乾皮症の相補群診断を行っています。

DNA のメチル化やヒストン修飾異常などのエピジェネティックな変化は癌における遺伝子発現抑制に重要な役割を果たしています。癌抑制遺伝子は、機能喪失変異ではなく、プロモーター領域のメチル化によって発現抑制される腫瘍が多く報告されています。2000 年代以降になると microRNA の研究が多く見られるようになり、メラノーマにおける発癌、進展、転移に関する microRNA の報告が目立つようになりました。microRNA 解析の利点はパラフィンブロックから容易に精製することができる点であり、新たなバイオマーカーとして期待されています。

さらに、2010 年を過ぎる頃より、皮膚科領域におきましても全ゲノムシーケンスと蛋白質コード領域をシーケンスするエクソームシーケンスの報告が発表されるようになりました。悪性腫瘍の原発巣と転移巣における点変異や欠損変異を解析することは、分子標的治療薬の選択、特異的 T 細胞療法、予後予測に役立ちます。2010 年代に入りまして、ゲノミクス研究が一般化し、癌の分子生物学は急速な進展を見せています。

おわりに

SV40 やアデノウイルスに遅れて始められた HPV 研究でしたが、現在では、VLP ワクチンによる子宮頸癌の予防が可能になりました。また、尖圭コンジローマと日光角化症に保険適用されたイミキモドクリームは TLR7 に結合し免疫応答を誘導する新しいタイプの治療薬です。ゲノミクスに基づく先進的な個別化療法とイミキモドのような「万屋」

的な免疫療法が現れ、患者背景と腫瘍の形質に応じて皮膚癌治療に適用される新しい時代を迎えました。