

15-16 がんの遺伝相談実施施設の連携による遺伝性腫瘍の解析及び診断の精度の向上に関する研究

主任研究者 国立がんセンター 吉田 輝彦

研究成果の要旨

多施設共同研究による遺伝性大腸がんの症例登録と、家系情報・遺伝子解析情報のデータベース化を継続することを核に、遺伝性腫瘍の適切な臨床を我が国に確立するための多様な課題を総合的に検討する。①FAPの鑑別診断として、MYH遺伝子解析が必要であった。HNPCC症例の約8%でMSH6遺伝子の変異が検出された。FAP及びHNPCCの原因遺伝子大領域欠失を検出する方法として、Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification法の有用性を示唆した。②大腸がん手術予定症例の便中生細胞からDNAを抽出、APC、ras、p53の遺伝子変異及びMSIの検索を行い、感度71%、特異度88%を得た。③過去13年間のFAP登録例について解析し、(a)死亡時平均年齢が42.5歳から46歳に改善、(b)大腸がん死亡が減少、(c)大腸術後デスマイド発生は10%以上、(d)直腸温存療法術後直腸がん発生は10年で12%、15年で23%、(e)大腸全摘が長期的には最も安定した生存曲線を示す、等を明らかにした。受診者の不安のアンケート調査を行った。

研究者名および所属施設

研究者名	所属施設および職名	分担研究課題
吉田 輝彦	国立がんセンター研究所 部長	家族性大腸腺腫症の遺伝子解析及び診断の精度の向上に関する研究、及び総括
岩間 毅夫	杏雲堂病院 副院長	生涯・世代を考慮した遺伝性消化管腫瘍の適正な診断・追跡・治療および遺伝相談のあり方の研究
内野 真也	野口病院 部長	家族性大腸ポリープ・Cowden病の甲状腺腫瘍における遺伝子常の解析及び診断の精度の向上に関する研究
菅野 康吉	栃木県立がんセンター 副主幹医長・特別研究員	遺伝性腫瘍の遺伝子診断の精度向上に関する研究
藤田 伸	国立がんセンター中央病院 医長	遺伝性大腸腫瘍の効率的サーベイランス法の確立
武田 祐子	慶應義塾大学 助教授	遺伝性腫瘍患者および家族への長期的支援を目指した遺伝相談のあり方と評価に関する研究
那須 淳一郎	*1国立病院機構四国がんセンター 医師	
赤木 究	*1埼玉県立がんセンター 専門研究員	

*1：平成15年4月1日～平成16年3月31日

総合研究報告

1 研究目的

現在、主たる家族性腫瘍症候群は臨床的にはほぼ把握さ

れており、その原因遺伝子の多くが連鎖解析等によりすでに同定されている。遺伝性腫瘍の研究は臨床現場で被検者への結果開示を含む研究の段階に入っており、商業化への動きも急速である。このような状況において、我

が国のがん臨床に家族性腫瘍症候群の遺伝子診断を適切に導入するためには、以下のような重要な検討課題が残されている。日本人における病像の把握と適切な臨床診断基準、高度な allele heterogeneity に基づく、多彩な genotype-phenotype 関係を精度良く臨床現場において予測するための基盤情報、不完全浸透に関する情報、一般集団中のアレル頻度、modifier gene に関する知見、適切な遺伝相談・カウンセリングの在り方と、それを確立するための根拠となる情報、生活習慣・環境因子が phenotype に与える影響、適切なサーベイランス及び予防法・治療法。本研究では、多施設共同研究による症例登録と、家系追跡情報・遺伝子解析情報のデータベース化を継続して実施することを中核に、上記に挙げた遺伝性腫瘍の臨床が抱える主たる問題点に回答を与えていくことを目的とする。具体的には、大腸がんをまず標的として、主として遺伝性非ポリポーシス大腸がん（HNPCC）と家族性大腸腺腫症（FAP）を対象とする全国に渡る多施設共同研究組織を構築し、研究を実施した。

2 研究成果

①FAP、HNPCC、及び関連疾患の遺伝子検査法の改良：

当研究組織の FAP またはそれを疑われる症例に対する、従来の PTT 法による APC 遺伝子変異の検索での変異検出率は 102 人中 58 人（約 57%）である。APC 変異が同定されなかった症例のさらなる解析のために、MYH 遺伝子の全エクソンを網羅する WAVE 解析と塩基配列解析系を構築した。16 例の APC 変異の認められない大腸ポリポーシスの症例と、7 例の健常人について解析したところ、臨床的には典型的 FAP であった 1 例において MYH 遺伝子変異を homozygous に認めた。この症例の両親については FAP が診断されていないが、同胞 5 人中 4 人が FAP と診断されていた。ポリープ数は 34~259 個であり、劣性遺伝様式をとる MYH 変異によるポリポーシスと一致する表現型であった。現在のところ、MYH 変異がヘテロの症例については臨床的に異常を認めていない。

APC・MYH の変異が検出できなかった 39 例に遺伝子大領域欠失を検出する Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification 法（Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, Schouten JP, et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification. NAR 30:e57, 2002）を導入・評価した。MLPA では 100ng のゲノム DNA に対して、各エクソンに特異的に結合し、末端に共通の PCR プライマー結合配列を持つ 5' 端及び 3'

端プローブをハイブリダイズさせて、ライゲースにより連結させた後、そのプローブ配列を PCR で増幅する。各エクソンからの PCR 産物を区別できるよう、3' 端プローブには特定の長さの stuffer 配列が挿入されている。PCR 自体は共通のプライマーで行われるので、定量性良く、PCR template の、すなわちエクソンのコピー数が比較定量できる。APC 遺伝子の MLPA 用解析試薬はオランダの MRC-Holland 社から購入した。従来の PTT 法+塩基配列解析法では変異が検出できなかった 39 名の FAP 症例に MLPA 法を適用し、6 人（15%）に大領域欠失を同定できた。その結果、全体の変異検出率は、他の検索法もあわせて 102 名中 66 名、65%となった。

FAP においても大領域欠失例が 6%程度存在することがわかり、MLPA 法はその有力なスクリーニング法であると考えられる。APC においては、MLPA で欠失が同定された 6 例のうち、1 例を除いて全例が、検索した全エクソンが欠失していた。これは次に記載する MSH2 及び MLH1 に関する検討では一部のエクソンが欠失していることが多いという結果と対照的であるように思える。APC については FISH 等の臨床検査導入も今後検討すべきであると考え。一方、PTT+塩基配列決定法に MLPA 法を加えても変異が同定できない例がまだ 30%程度残り、APC 検査法についてはさらなる検討が必要である。APC については FISH 等の臨床検査導入も今後検討すべきであると考え。HNPCC 症例についても、これまでの解析から MLH1 および MSH2 に大領域欠失あるいは重複が証明されている 4 家系より得られたゲノム DNA を用いて解析を行ったところ、MLH1 遺伝子の Exon5 の欠失、Exon12-13 の欠失、Exon 3-7 の重複について MLPA 法で該当するエクソン由来のシグナルの減少あるいは増幅等を生じることが確認され、血縁者由来のゲノム DNA を用いた解析でも、変異の有無に一致して異常が認められ、家系内の segregation の判定にも応用可能であった。さらに RT-PCR 法でスプライシング異常が認められたが当該エクソンに変異が認められなかった症例（n=3）あるいはアムステルダム基準等の診断基準に合致するが従来の解析で変異が認められなかった症例（n=5）を対象として MLPA 法を実施したところ、8 例中 5 例で異常を検出した。MLPA 法は HNPCC においても、ゲノム大領域欠失を検出するためのスクリーニング法として有用と考えられた。

HNPCC の原因遺伝子としてこれまでにミスマッチ修復に関わる 5 種類の遺伝子の生殖細胞系列変異が知られている。それらのうち、MSH2、MLH1 が過去の報告例の 95% 以上を占める。HNPCC が疑われる 105 家系（アムステル

ダム基準合致例 26 例、Japanese criteria A 群 12 例、B 群 26 例、その他 41 例) について末梢血リンパ球 DNA を鋳型とし MSH6 遺伝子の各エクソンを PCR 増幅後、WAVE 法により解析し、異常なピークの出現を認めた症例について直接塩基配列決定を行い、変異の有無を確認した。MSH6 遺伝子のエクソン-イントロン接合部を含む翻訳領域内に明らかな遺伝子多型を含めて 8 種類の変異が認められた。これまでの解析でアムステルダム基準合致例ではその他に MSH2 あるいは MLH1 遺伝子の病的変異が 12 例 (46.2%)、明らかな遺伝子多型を除くミスセンス変異が 4 例 (15.4%) で認められており、今回新たに見いだされた MSH6 遺伝子の病的変異 2 例 (7.7%) を加えると、アムステルダム基準合致例の約 70% にミスマッチ修復遺伝子の異常が認められた。

②遺伝性大腸がん症候群におけるがんのサーベイランス法の開発：

国立がんセンター研究所支所の松村保広先生が開発した便から効率良く生細胞を分別する方法を応用して、大腸がん手術予定の症例 116 名と、健常対照 83 名の便中生細胞から DNA を抽出、APC、ras、p53 の遺伝子変異及び MSI の検索を行った。その結果、がん患者 93 例に遺伝子異常があり、そのうち 82 例に便中に遺伝子異常を検出した。感度は検討症例に対しては 71% であるが、遺伝子異常がある症例に限れば 88% であった。一方、健常者 83 例中 10 例の便中に遺伝子異常があり、特異度は 88% であった。現在さらに検討症例を増やすとともに、さらに効率的な遺伝子変異の検出法を検討中である (松村先生との共同研究)。

③患者及び家族への長期的支援を考慮した遺伝相談のあり方の検討に関する研究：

FAP は放置すればほぼ 100% 大腸がんを発生する疾患であり、大腸切除が適応であるが、その時期と術式、その術後の管理のあり方は確立していない。FAP は大腸術後も残存大腸のみでなく、大腸外臓器においてもがんの危険が高いためである。この疾患についてがんの予防と良好な QOL を得るためには、FAP の自然史を理解し、適正な治療管理を確立することが必要で、生涯・世代を視野に入れた適正な遺伝子診断、治療、追跡、カウンセリング、自助組織等を含めた医療戦略確立の基盤となる。FAP の自然経過・治療経過を調査し、時代による推移を明らかにする目的で過去 13 年間の FAP 登録例の臨床的事項について解析し、(a) 男女比は一般人口と差が無くなった、

(b) 死亡時平均年齢が 42.5 歳から 46 歳に改善した、(c) 大腸がん発生部位は一般大腸癌における大腸内分布とほぼ等しい、(d) 大腸がん死亡が減少した、(e) 大腸術後デスモイド発生は 10% であったが、把握されないものを含めると更に多い、(f) 直腸温存療法術後直腸がん発生は 10 年で 12%、15 年で 23%、(g) 大腸全摘が長期的には最も安定した生存曲線を示した。

慶應義塾大学病院における遺伝相談記録の解析を行い、受診に至る過程の受けとめ方は (i) 肯定的・積極的、(ii) 迷い・不安、(iii) 否定的・拒否的の 3 つに分けられた。診療科の医師から遺伝相談の受診を勧められたことに疑問や不安を感じていたり、受診までの期間を不安定な気持ちで過ごしていたり、迷いが生じていることが明らかとなった。本来は自発的意思による受診が望ましいが、遺伝性腫瘍に関する認知度の低い状況では、ほとんどが臨床的特徴から遺伝性を疑う医師により受診を勧められているのが現状である。また、遺伝性であることが診断された後に、その情報を配偶者や家族と共有していくことに困難を感じる場合もある。一度の説明では時間の経過と共に内容が不明確になってしまい正確な情報が伝わりにくいことが推察される。そこで集団を対象とした効果的な情報提供法の確立を目的として、FAP 患者会において情報に関するアンケート調査を実施した。アンケートは FAP の情報等に関する 12 項目であり、27 名から回答が得られた。情報に対する要求は高いが、診断時に十分な説明が得られているとは限らず、患者会から発信される情報が有用であった。一方、インターネット活用についてはバラツキがある現状が示された。また、情報量によって不安を感じる程度は様々であり、家族に情報をもっと知って欲しいかどうかについても「どちらともいえない」が多く、個別の状況を十分にアセスメントしながら情報提供していく必要性が示された。

3 倫理面への配慮

本研究班では、遺伝性腫瘍が疑われる全ての症例とその血縁者に対して、各施設の倫理審査委員会の審査・機関長の承認を得た研究計画に従って、説明を行い同意を得、必要かつ十分な遺伝相談を実施した上で遺伝子解析や質問紙による調査等を行うことを原則とする。また、研究報告においてはクライアントやその家族のプライバシーや人権の保護に厳重な注意をはらいつつ行う。