

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861342

研究課題名(和文) 婦人科悪性腫瘍患者における生殖細胞遺伝子変異のシーケンス解析

研究課題名(英文) Analysis of germline gene mutation in gynecologic cancer patients with next generation sequencer.

研究代表者

飯塚 千祥 (Iitsuka, Chiaki)

昭和大学・医学部・助教

研究者番号：70465128

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝性婦人科癌には遺伝性乳癌卵巣癌症候群とLynch症候群があり、子宮体癌と卵巣癌を発症します。それらの癌患者から血中DNAを138例採取しました。

背景から遺伝性腫瘍を疑う4症例を選択し、腫瘍関連遺伝子領域の変異を次世代シーケンサーで検査したところ、1例のみにBRCA2遺伝子のVariant of Uncertain Significance(VUS)を認めました。

遺伝性腫瘍は全悪性腫瘍の10%以下と少ないため、遺伝性背景を有する61症例に絞り込み、それらのマイクロサテライト不安定性(MSI)検査を行い、MSI陽性検体に次世代シーケンサーを用いて腫瘍関連遺伝子の網羅的検索をする予定です。

研究成果の概要(英文)：Hereditary gynecologic cancers include hereditary breast and ovarian cancer syndrome (HBOC) and Lynch syndrome, which develop endometrial cancer and ovarian cancer. We collected 138 blood DNA samples from the two cancer patients.

We selected 4 cases strongly suspected of hereditary tumor from the background from 138 cases, and searched for mutations in the tumor-associated gene region using the next generation sequencer. We found Variant of Uncertain Significance (VUS) of BRCA2 gene only in one case.

Since hereditary tumor is as small as 10% or less of all malignant tumors, we decided to select 61 cases with hereditary background and conduct microsatellite instability (MSI) examination on them. We are planning to examine gene mutations in tumor-associated genes using next generation sequencers against those positive for MSI tests.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：遺伝性腫瘍 生殖細胞遺伝子変異 子宮体癌 卵巣癌 MSI不安定性検査

1. 研究開始当初の背景

婦人科における遺伝性癌症候群としては、遺伝性乳癌卵巣癌症候群 HBOC (変異遺伝子: BRCA1, BRCA2) と Lynch 症候群 (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) が重要である。HBOC では 70 歳までに卵巣癌を発症するリスクが BRCA1 に変異を有する場合 30~40%、BRCA2 の変異では 10~20% と報告されている。乳癌の発症はいずれも高く 70~80% である。Lynch 症候群は従来、遺伝性非ポリポーシス大腸癌と呼ばれ大腸癌の発生が代表的だが、子宮体癌のリスクも高く 70 歳までに 42~60%、卵巣癌は 9~12% に発生すると報告されている。その他頻度は低いが BRCA 関連の Li-Fraumeni 症候群 (TP53)、Cowden 症候群 (PTEN) や、Peuts-Jeghers 症候群 (STK11/LKB1) も婦人科癌に関連する遺伝性腫瘍である。

ところが、例えば乳癌卵巣癌家系をみると、日本乳癌学会・日本人類遺伝学会・日本婦人科腫瘍学会の 3 学会が管理する日本人の BRCA 陽性患者データベースからは、BRCA 遺伝子検査を受けた患者のうち BRCA1 または 2 に遺伝子変異を認めたものは 28.3% にすぎない。イギリスおよびアメリカの卵巣癌家系 283 例のシーケンス解析では BRCA1 変異が 37%、BRCA2 は 9% と報告されている。このことから、家族性腫瘍素因を有するハイリスク患者群であってもその半数以上は変異遺伝子が特定されていないと考えられる。

変異遺伝子を特定することには以下のメリットがある。

発生する癌の種類およびその頻度が明確になる。

癌患者本人 (発端者) に対して、新たに罹患する可能性のある癌腫ごとにスクリーニングによる早期発見や予防を行うことができる。

血縁者に対しても未発症の段階でスクリーニングや予防を行うことができる。

変異遺伝子を標的とした、化学療法 (分子標的治療) に応用することが可能である。

変異遺伝子を特定する最大の目的は、未発症の癌のコントロールである。Lynch 症候群に発生する子宮体癌のように前癌病変の子宮内膜増殖症の段階で発見して治療できる腫瘍もあるが、HBOC で発生する卵巣癌は腹膜進展形態をとるため、特異的な症状もなく、有用な検査方法も確立していないため、早期発見は不可能である。その場合、遺伝子を特定し、疾患発症リスクが明らかとなれば、癌発症前に予防的に臓器を摘出する予防手術がリスク低減に大きく寄与 (卵巣癌で 90% のリスク低減率) することがわかっている。

癌治療においても、最近、BRCA 変異陽性卵巣癌・乳癌患者に対する PARP 阻害薬や、MMR 陽性もしくは MSI 不安定性陽性の大腸癌など固形癌に対する penbrolizumab のように遺伝子変異をターゲットとした分子標的薬の開発が進み、原因遺伝子の特定は癌治療に直接影響するようになりつつある。

2. 研究の目的

本研究では、遺伝的関与が明らかにされていない子宮体癌、卵巣癌患者を対象として、血液細胞中の DNA を次世代シーケンサーで解析し、これまで明らかにされてきた Lynch 症候群や遺伝性乳癌卵巣癌症候群 (HBOC) を含めた遺伝性腫瘍に関連する 94 遺伝子について生殖細胞変異の有無を網羅的に調べることが目的である。これにより、家族性癌素因から遺伝性癌が疑われるが、これまでのカテゴリーに基づく遺伝子検査では、変異遺伝子が特定できなかった患者群から、新たな変異遺伝子を発見することを目指す。

3. 研究の方法

(1) DNA サンプル採取・保存

対象:

子宮体癌、子宮頸癌、卵巣癌 を発症した患者の中で、家族性癌素因を以下に定義。下記条件を 1 つでも満たす患者を対象とする。研究開始後に新規に癌と診断される患者、および、治療開始後 (過去に手術を受けている) で外来通院中の患者も対象に含める。

a) 患者本人の発症年齢が 50 歳以下

b) 特徴的な組織型 (子宮体部漿液性腺癌、卵巣低分化漿液性腺癌、子宮頸部高分化腺癌)

c) HBOC や Lynch 症候群のリスク評価基準を参考に遺伝的癌リスクを有すると考えられる患者 (第 3 度近親者までに子宮体癌、頸癌、卵巣癌、乳癌、大腸癌、その他関連癌)

方法:

治療開始後の子宮体癌、子宮頸癌、卵巣癌患者に対し家族歴の詳細な聴取を行う。本研究の対象条件を満たす患者に対し、遺伝性癌の可能性について担当医より説明、当院 IRB の承認を得た説明同意書に基づき研究への参加の同意を得る。本人が希望すれば認定遺伝カウンセラーのカウンセリングを行う。

研究開始後の新規癌患者は、産婦人科初診時に家族歴を詳細に聴取。対象条件を満たす可能性のある患者に対して、担当医から本研究への参加の同意を得る。患者が希望すれば認定遺伝カウンセラーによるカウンセリングを行う。

本研究参加の同意が得られた患者から、末梢静脈血を 7cc 採取し、血液中の白血球 DNA を抽出して保存（当科研究室において凍結保存）する。

(2)DNA の解析

保存した DNA は次世代シーケンサーを用いて遺伝性腫瘍に関連する 94 遺伝子領域の遺伝子変異を検出し、得られた遺伝子変異が、疾患特有であるか、病的であるかを公共の遺伝子データベースに照合して判定する。また、データベース上では病的と判断されない変異 (Variant of Uncertain Significance: VUS) も統計学的に解析することで疾患特有であるか検討する。

使用機器：デスクトップ型次世代シーケンサー MiSeq (イリミナ株式会社)

使用する遺伝子パネル：TruSight 癌パネル (遺伝性/家族性腫瘍：乳癌、卵巣癌、大腸癌、白血病などに関連する 94 遺伝子を搭載)

利用形態	遺伝子数	ターゲット領域	リード長	ランあたりの解析サンプル数
生殖細胞変異	94	255kb	150bp × 2	48 サンプル

*しかし、予定していた上記遺伝子解析パネル (下記 4 症例の解析に使用) が後日、当初の価格では入手困難となり、研究費が予定を大幅に上回る計算となった。DNA を保存した全対象患者から、遺伝性リスク因子 (家族歴、発症年齢、重複がん、癌の病理組織型など) を基に絞り込んでも解析可能数を超過してしまうことと、少数の解析では、全癌患者の 10% 以下と考えられる遺伝性癌患者を特定し、その責任遺伝子を検出することは困難が予想されるため、解析方法を変える必要性が生じた。

大腸癌、子宮体癌、卵巣癌を発症する Lynch 症候群では、その原因遺伝子である MMR 遺伝子変異、その特徴である MSI 不安定性を有する大腸癌患者に対して分子標的治療 (penbrolizumab) の開発が進み、FDA が承認する運びとなっているが、Lynch 症候群の主要な癌に含まれるにもかかわらず子宮体癌と卵巣癌に関する研究は未だ少ない。

Lynch 症候群の関連遺伝子にターゲットを絞ることでコストダウンを計り、さらに遺伝子変異解析をする前段階としてマイクロサテライト不安定性検査 (MSI 検査) を行う。MSI 陽性検体で次世代シーケンサーを用いた変異遺伝子を検索することにより、婦人科癌 (子宮体癌、卵巣癌) 特徴的な遺伝子変異の発見を目指し、今後結果を報告する。

4 . 研究成果

家族歴と発症年齢、組織型から遺伝性腫

瘍を疑う 4 症例 (37 歳卵管癌、38 歳卵管癌、33 歳子宮体癌、41 歳子宮体癌) を選択し、腫瘍関連遺伝子領域の変異を次世代シーケンサーで検査した。

解析対象：

No	病理組織型	進行期	年齢	家族歴
1	Serous	IIC	37	あり
2	Serous	IIIC	38	あり
3	Endometrioid	IA	33	なし
4	adenosarcoma	IA	41	なし

結果：

症例 No.2 の結果

Gene	Variant	Chr	Coordinate	Type	Consequence
BRCA2	GC>GC/G	13	32906627	deletion	frameshift_variant, feature_truncation

1 例のみに BRCA2 遺伝子のフレームシフトを認め、現時点での公共遺伝子データベースとの照合では Variant of Uncertain Significance (VUS) と判断された。

このような VUS が集積されることで病的変異と解釈が変わる可能性があり症例数を増やして検討することが望まれる。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯塚 千祥 (IITSUKA Chiaki)
昭和大学・産婦人科学講座・助教
研究者番号：70465128

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()