

# 研究計画書

Ver. 1. 5 平成 27 年 1 月 31 日 作成

申請者（実施責任者）  
埼玉医科大学総合医療センター 消化管・一般外科  
石田秀行

## 1. 研究課題名

免疫染色・マイクロサテライト不安定性検査からリンチ症候群候補を同定する探索的研究

## 2. 研究の背景・目的

【研究の背景】リンチ症候群はミスマッチ修復遺伝子の *MLH1*, *MHS2*, *MSH6*, *PMS2* のいずれかの生殖細胞系列変異を主な原因とする常染色体優性遺伝性疾患である。近年では、*MSH2* 遺伝子の上流にある *EPCAM* 遺伝子の欠損<sup>1)</sup>による *MSH2* 遺伝子の転写抑制 (germline epimutation) もリンチ症候群の新たな原因として知られている。リンチ症候群では大腸癌以外に子宮内膜、卵巣、胃、小腸、胆道・膵癌、腎盂・尿管、脳（膠芽腫）、皮膚（皮脂腺腫、皮脂腺癌、皮脂腺上皮腫、角化棘細胞腫など、Muir-Torre 症候群）などに腫瘍性病変（関連腫瘍）を高率かつ若年（<50 歳）で発症する。また、リンチ症候群の大腸癌では高頻度マイクロサテライト不安定性 (MSI-H) を反映した組織像、すなわち粘液癌、印鑑細胞様分化、腫瘍内リンパ球浸潤、クローン様所見などを呈することが知られている。最近では乳癌、前立腺癌、膀胱癌もリンチ症候群の関連腫瘍と考えられるようになった。<sup>2)</sup>

2012 年に大腸癌研究会から遺伝性大腸癌診療ガイドライン<sup>3)</sup>が発刊され、リンチ症候群に対する関心が高まりつつあるが、わが国ではリンチ症候群の確定診断に必要な遺伝子検査の体制整備が不十分であり、リンチ症候群の実態については不明な点が多い。

リンチ症候群の診断・治療については欧米を中心に大腸癌に焦点を絞って研究が行われており<sup>4)</sup>、わが国からの研究成果はきわめて少ない。また、欧米においても大腸癌以外の関連腫瘍については子宮内膜癌を除いては、ほとんど詳しい検討がなされていない。

大腸癌患者からリンチ症候群のスクリーニングを行う場合、臨床病理学的特徴や家族歴から本疾患を疑い（第 1 次スクリーニング）、腫瘍のマイクロサテライト不安定性やミスマッチ修復タンパクに対する免疫染色を行って（2 次スクリーニング）、最終的に遺伝子検査を行って原因遺伝子の変異（あるいは欠損）を同定する必要がある。<sup>3), 4)</sup> また、子宮内膜癌でも大腸癌と同様の診断チャートが示されている。これらの癌腫を対象にした研究においても、①腫瘍のマイクロサテライト不安定性と免疫染色のどちらが有用か、②両方を行うべきか、③網羅的に（1 次スクリーニングを行わずに）マイクロサテライト不安定性あるいは免疫染色をすべきか、等についてはいまだ結論は出ておらず、大腸癌・子宮内膜癌以外の関連腫瘍からのアプローチはほとんど行われていない。

【目的】リンチ症候群の関連腫瘍である大腸癌、胃癌、小腸癌、子宮内膜癌、卵巣癌、腎盂・尿管癌、膀胱癌、前立腺癌、皮膚腫瘍（皮脂腺腫、皮脂腺癌、皮脂腺上皮腫、角化棘細胞腫）に対するミスマッチ修復関連タンパクの免疫染色と腫瘍のマイクロサテライト不安定性検査を網羅的に行い、hospital-based のリンチ症候群候補者の絞り込みの可能性について検討する。

本研究では、リンチ症候群の候補者の絞り込みまでを行う。

### 3. 研究の方法

1996年1月～2015年1月の間に総合医療センター消化管外科（旧外科を含む）、産婦人科、泌尿器科、皮膚科、あるいは形成外科で切除あるいは生検が行われ、ホルマリン固定された大腸癌、胃癌、小腸癌（消化管・一般外科）、子宮内膜癌、卵巣癌（産婦人科）、腎盂尿管癌、膀胱癌、前立腺癌（泌尿器科）、皮脂腺腫、皮脂腺癌、皮脂腺上皮腫、角化棘細胞腫（皮膚科）の標本からパラフィン包埋切片を作成し、ミスマッチ修復タンパクである *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* と、*MSH2* に関連する *EPCAM* の免疫染色<sup>9)</sup>を行う。また、*MLH1* 遺伝子の体細胞レベルでのメチル化に関連し、リンチ症候群以外の大腸癌では発現が見られないとされる（*PMS2* 遺伝子に生殖細胞系列変異がある場合には例外<sup>6)</sup>）*BRAF* (V600E)変異<sup>7),8),9)</sup>タンパクの免疫染色<sup>10)</sup>を行う（散发性大腸癌の5～10%が *BRAF* 変異陽性）。また、生検・切除組織（腫瘍部位と正常部位のペアで利用できる場合に限る）のパラフィン包埋切片からDNAを抽出し、PCR法を用いてマイクロサテライト不安定性を解析する。*MLH1* 染色陰性の場合には腫瘍組織を bisulfate 処理後、PCR（ダイレクト・シークエンス）法または COBRA（Combined bisulfite restriction analysis）法<sup>11)</sup>で調べる。*BRAF* 変異が免疫染色で疑われた場合にはPCRダイレクト・シークエンス法で調べる。免疫染色と付随する検査の手順を大腸癌で明らかになっている知見から示す（図1）。

図1 大腸癌に対する免疫染色・メチル化解析からリンチ症候群をスクリーニングするフローチャート

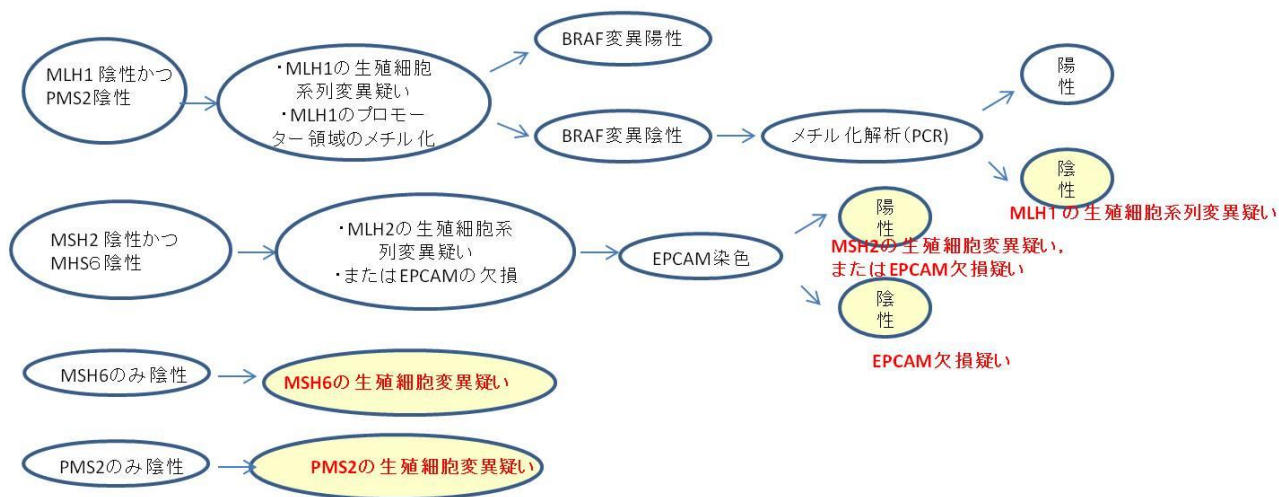


図1の概要：MLH1とPMS2、MSH2とMSH6はヘテロダイマーを形成する。また、MSH6はMSH2のみ、PMS2はMLH1とのみ結合するため、これらのタンパクが単独で欠失している場合には当該遺伝子の生殖細胞系列変異が疑われる。しかしながら例外も多数報告されており<sup>12)</sup>、またミスセンス変異ではタンパクの機能は失われるが、染色では陽性になることが十分考えられるなど、タンパクの欠失パターンから生殖細胞系列の変異を確定することはできない。MSH2とMSH6が同時に欠失している場合には、*MSH2* 遺伝子の生殖細胞系列変異または *EPCAM* 遺伝子の欠損が疑われる。*EPCAM* に対する免疫染色は *EPCAM* 遺伝子の欠損の有無の推定に有用なことがあるが、*EPCAM* の発現は臓器によって異なることや、*EPCAM*—*MSH2* 遺伝性の広範囲の欠損の場合にはタンパク発現の評価が難しい。MLH1とPMS2の同時欠失の場合には、*MLH1* の生殖細胞系列変異、*MLH1* 遺伝子のプロモーター領域の後天的な（体細胞レベルでの）メチル化、あるいは *MLH1* 遺伝子の生殖細胞系列変異と対側アレルの後天的なメチル

化の場合が考えられる。PMS2 遺伝性の生殖細胞系列変異以外のリンチ症候群では BRAF の変異が起きないことが知られているので、まず BRAF 染色を行い (PCR 法で確認が必要)、BRAF 変異陰性の場合は後天的なメチル化の有無について腫瘍組織を bisulfate 処理後、PCR 法または COBRA 法で検索する必要がある。

大腸が癌以外の関連腫瘍の検索においては、必ずしも大腸癌と全く同様の手順になるとは限らない (特にメチル化の頻度・程度、BRAF 変異率、EPCAM の発現程度が臓器ごとに異なる可能性があるため)。

免疫染色単独、あるいは MSI 検査の結果を総合して、患者の臨床病理学的特徴や家族歴・臨床基準 (アムステルダム基準 I<sup>13)</sup>, II<sup>14)</sup>, 改訂ベセスダ基準<sup>15)</sup>) (表 1 A, 1 B, 1C) と対比することで、リンチ症候群の可能性について検討する。本研究は、切除 (生検) 検体からリンチ症候群患者・家系をどの程度絞り込むことができるかを腫瘍が発生する臓器別に検討するものである。

### 表 1A アムステルダム基準 I

---

少なくとも3人の血縁者が大腸癌に罹患しており、以下をすべて満たしている。

1. 1人の罹患者は他の2人に対して第一度近親者である。
  2. 少なくとも連続する2世代で罹患している。
  3. 少なくとも1人の大腸癌は50歳未満で診断されている。
  4. FAPが除外されている。
- 

### 表 1B 改訂アムステルダム基準 (アムステルダム診断基準 II)

---

少なくとも3人の血縁者がリンチ症候群関連癌 (大腸癌, 子宮内膜癌, 腎盂・尿管癌, 小腸癌) に罹患しており、以下を満たしている。

1. 1人の罹患者は他の2人に対して第一度近親者である。
  2. 少なくとも連続する2世代で罹患している。
  3. 少なくとも1人の癌は50歳未満で診断されている。
  4. FAPが除外されている。
  5. 腫瘍は病理学的に癌であることが確認されている。
-

## 表1c 改訂ベセスダガイドライン

次のような状況にある患者の腫瘍ではMSIを検査すべきである。

1. 50歳未満の患者で診断された大腸癌。
2. 年齢に関わりなく、同時あるいは異時大腸癌あるいは他のリンチ症候群関連腫瘍\*がある。
3. 60歳未満の患者で診断されたMSI-Hの組織学的所見\*\*を有する大腸癌。
4. 第一度近親者が1人以上リンチ症候群関連腫瘍に罹患しており、うち1つは50歳未満で診断されている患者の大腸癌。
5. 年齢に関わりなく、第一度あるいは第二度近親者に2人以上HNPCC関連腫瘍の罹患者がいる患者の大腸癌。

リンチ症候群関連腫瘍\*：大腸癌，子宮内膜癌，胃癌，卵巣癌，膀胱癌，腎盂・尿管癌，胆道癌，脳腫瘍（通常はTurcot症候群にみられるglioblastoma），Muir-Torre症候群の脂腺腫や角化棘細胞種，小腸癌

MSI-Hの組織学的所見\*\*：リンパ球浸潤，クローン様リンパ球反応，粘液癌・印環細胞癌様分化，髓様増殖

研究を行う場所：実験的研究は原則的に総合医療センター 消化管・一般外科の研究室で行うが、免疫染色の一部あるいはマイクロサテライト不安定性検査の一部は検査会依頼する予定である。また、マイクロサテライト不安定性検査とメチル化解析の一部は埼玉県立がんセンター腫瘍診断・予防科でも行う予定である。

### 4. 研究期間

倫理委員会における審査通過後，2018年3月31日まで

### 5. 症例数

1996年1月～2015年1月の間に総合医療センター消化管外科（旧外科を含む）、産婦人科、泌尿器科、皮膚科あるいは形成外科で切除あるいは生検が行われ、ホルマリン固定された大腸癌 2300例、胃癌 1200例、小腸癌 50例、子宮内膜癌 700例、卵巣癌 800例、腎盂尿管癌 320例、膀胱癌 800例、前立腺癌 1200例、脂腺腫、脂腺癌、脂腺上皮腫、角化棘細胞腫合計 130例（各々最大数を示した）。

### 6. 個人情報の取り扱い

「ヘルシンキ宣言（ソウル版）」、「臨床研究に関する倫理指針」に従って人権擁護の配慮に努める。研究に必要なデータベースの連結可能匿名化は本研究に参加しない消化管・一般外科教授（持木彫人）の監督のもとで、データマネージャーの資格を有する医局秘書が行なう（対応表はインターネットと接続されていないコンピューター内で厳重に管理する）。研究で得られたデータは、当院の個人情報保護責任者である 病理部 田丸 淳一 教授のもとで厳重に管理される。埼玉県立がんセンターにおける検体の扱いと結果の報告も当院で行った匿名化検体番号を通じて行う。

### 7. 患者に同意を得る方法

本研究は治療のために摘出された試料のホルマリン固定ブロックのみを用いるものであり、患者からの同意は必要としない。ミスマッチ修復関連タンパクの免疫染色は遺伝子変異を予想できるものの、

生殖細胞系列変異（あるいは germline epimutation）と 1 対 1 で対応するものではなく、体細胞レベルの変異の可能性も十分にある（特に MLH1 に異常がある場合）。また、BRAF 変異やメチル化の検索も DNA の体細胞レベルでの検討である。したがって、いずれの検討も個人の特定には至らない。マイクロサテライト不安定性検査はすでにリンチ症候群を疑う患者に対して保険収載されている検査であるが、体細胞レベルでの塩基の反復配列数の異常を検出するだけで、塩基配列そのものを解析するものではない。

しかしながら、本研究の概要については倫理委員会承認後、診療科のホームページに本研究の概要について公表する（別添資料）。

## 8. 研究等によって生じる個人への不利益及び危険性

データの解析は匿名化のもとで行われているため、個人情報漏洩する可能性はない。患者の金銭的利益、不利益はいっさい生じない。

## 9. 研究に関する費用

本研究に関する費用は消化管・一般外科または埼玉県立がんセンター腫瘍診断・予防科の研究費によって行われる。また、本研究に関する患者の費用負担はいっさい生じない。

## 10. 利益相反

本研究に関する利益相反は生じない。

## 11. 知的財産権

本研究における知的財産権は総合医療センターあるいは埼玉県立がんセンターにおける各研究実施者に帰属する。

## 12. 予想される結果と医学的貢献

・大腸癌においては、日本人大腸癌のマイクロサテライト不安定性は欧米の 15%程度に比べ 7-8%と想定されており、大腸癌のマイクロサテライト不安定性からリンチ症候群を絞り込む効率は欧米の報告より低い可能性がある。わが国からミスマッチ修復関連タンパクの免疫染色のまとまった報告はないので、今回の研究成果は日本人の大腸癌からリンチ症候群をスクリーニングする場合の貴重なデータになると思われる。

・大腸癌以外の関連癌では、子宮内膜癌・皮膚腫瘍において、リンチ症候群のスクリーニングとしてのミスマッチ修復関連タンパクあるいは MSI 検査の有用性が欧米から報告されているにすぎない。泌尿器系腫瘍や胃癌、小腸癌からの検討は国内外のいずれからもほとんど検討されていない。大腸癌・子宮内膜癌以外の関連腫瘍のマイクロサテライト不安定性についてはほとんど検討されていないので、当該腫瘍における MSI-H の腫瘍と MLH1 のプロモーター領域のメチル化、BRAF 変異との関係に関する知見は、大腸癌・子宮内膜癌以外の関連腫瘍からリンチ症候群をスクリーニングする上できわめて重要なデータを提供することが可能になると思われる。

・いずれにしても、本研究の結果、hospital-based でリンチ症候群の候補者が潜在的にどのくらいの頻度で存在しているかが明らかになることで、わが国のリンチ症候群の実態解明に寄与することが期

待される

### 13. 研究組織と役割分担

#### 研究代表者

埼玉医科大学総合医療センター 消化管一般外科 教授 石田 秀行

#### 研究実施分担者

埼玉医科大学総合医療センター	消化管・一般外科	客員教授	岩間毅夫
埼玉医科大学総合医療センター	消化管・一般外科	准教授	石橋敬一郎
埼玉医科大学総合医療センター	消化管・一般外科	講師	福地 稔
埼玉医科大学総合医療センター	消化管・一般外科	非常勤講師	隈元 謙介
埼玉医科大学総合医療センター	消化管・一般外科	助教	松澤岳晃
埼玉医科大学総合医療センター	消化管・一般外科	助教	田島 雄介
埼玉医科大学総合医療センター	消化管・一般外科	助教	鈴木 興秀
埼玉医科大学総合医療センター	消化管・一般外科	助教	近 範泰
埼玉医科大学総合医療センター	消化管・一般外科	助教	山本 梓
埼玉医科大学総合医療センター	消化管・一般外科	非常勤医師	伊藤 徹哉
埼玉医科大学総合医療センター	消化管・一般外科	非常勤医師	近谷 賢一
埼玉医科大学総合医療センター	消化管・一般外科	非常勤医師	平岡 優
埼玉医科大学総合医療センター	産婦人科	教授	関 博之
埼玉医科大学総合医療センター	産婦人科	准教授	高井 泰
埼玉医科大学総合医療センター	産婦人科	講師	長井智則
埼玉医科大学総合医療センター	泌尿器科	教授	山田拓己
埼玉医科大学総合医療センター	泌尿器科	准教授	川上 理
埼玉医科大学総合医療センター	泌尿器科	講師	岡田洋平
埼玉医科大学総合医療センター	病理部	准教授	東 守洋
埼玉医科大学総合医療センター	皮膚科	教授	伊崎誠一
埼玉医科大学総合医療センター	形成外科・美容外科	教授	三鍋俊春
埼玉県立がんセンター	腫瘍診断・予防科	部長兼科長 (埼玉医科大学総合医療センター)	
消化管・一般外科	非常勤講師		赤木 究

#### 役割分担

**研究統括：**石田秀行（消化管・一般外科）

**研究全体に関する助言と提案：**岩間毅夫（消化管・一般外科），赤木 究

**免疫染色の評価：**隈元謙介，鈴木興秀，近 範泰，田島雄介（消化管・一般外科），東 守洋（病理部）

**MSI 検査の評価：**隈元謙介，鈴木興秀，近 範泰，赤木 究

臨床病理学的項目の評価：石橋敬一郎，福地 稔，松澤岳晃，伊藤徹哉，山本 梓（消化管・一般外科）関博之，高井 泰，長井智則（産婦人科），山田拓己，川上 理，岡田洋平（泌尿器科），伊崎誠一（皮膚科），三鍋俊春（形成外科）

病理組織学的解析：東 守洋，鈴木興秀

## 文献

1. Huth C, et al. The molecular basis of EPCAM expression loss in Lynch syndrome-associated tumors. *Modern Pathol* 25: 911-916, 2012
2. Vasen HF, et al. Revised guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (HNPCC): recommendations by a group of European experts. *Gut* published online Feb 13, 2013
3. 遺伝性大腸癌診療ガイドライン（2012年版）. 金原出版，東京，2012.
4. Vasen HF, et al. Guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (hereditary non-polyposis cancer). *J Med Genet* 44: 353-362, 2007
5. Kloor M, et al. Analysis of EPCAM protein expression in diagnosis of Lynch syndrome. *J Clin Oncol* 29: 223-277, 2010
6. Senter L, et al. The clinical phenotype of Lynch syndrome due to germ-line PMS2 mutations. *Gastroenterology* 135: 419-428, 2008
7. Bouzourene H, et al. Selection of patients with germline MLH1 mutated Lynch syndrome by determination of MLH1 methylation and BRAF mutation. *Fam Cancer* 9: 167-172, 2010
8. Parsons MT, et al. Correlation of tumor BRAF mutations and MLH1 methylation with germline mismatch repair (MMR) gene mutation status: a literature review assessing utility of tumor features for MMR variant classification. *J Med Genet* 49: 151-157, 2012
9. Loughrey MB, et al. Incorporation of somatic BRAF mutation testing into an algorithm for the investigation of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Fam Cancer* 6: 301-310, 2007
10. Capper D, et al. BRAF V600E-specific immunohistochemistry for the exclusion of Lynch syndrome in MSI-H colorectal cancer. *Int J Cancer* 133: 1624-1631, 2013
11. Rahner N, et al. Coexisting somatic promoter hypermethylation and pathogenic *MLH1* germline mutation in Lynch syndrome. *J Pathol* 214: 10-16, 2008
12. Shia J, et al. Secondary mutation in a coding mononucleotide tract in MSH6 causes loss of immunoeexpression of MSH6 in colorectal carcinomas with MLH1/PMS2 deficiency. *Modern Pathol* 26: 131-138, 2013
13. Vasen HF, et al. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 34: 424-425
14. Vasen HF. Clinical diagnosis and management of hereditary colorectal cancer syndromes. *J Clin Oncol* 18: 815-925, 2000
15. Umar A, et al. Revised Bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl cancer Inst* 24: 96 261-268, 2004