

Title	子宮体癌におけるDNA ミスマッチ修復遺伝子異常とマイクロサテライト不安定性の解析
Sub Title	
Author	阪埜, 浩司(Banno, Koji) 野澤, 志朗
Publisher	慶應医学会
Publication year	2004
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.81, No.2 (2004. 6) ,p.T87- T100
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	学位論文
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20040601-0087

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

学位論文

子宮体癌における DNA ミスマッチ修復遺伝子異常と
マイクロサテライト不安定性の解析

慶應義塾大学医学部産婦人科学教室

(指導：野澤志朗教授)

ばん の こう じ
阪 埜 浩 司

(平成 15 年 12 月 15 日受付)

Key Words : Revised Amsterdam Criteria, DNA mismatch repair gene, *hMLH1*, *hMSH2*, Microsatellite instability

婦人科悪性腫瘍の中で子宮体癌は生活様式の欧米化と環境の変遷に伴い近年増加の一途をたどり、我が国においても子宮癌全体の約 40% に迫る勢いである。本邦において罹患実数および罹患率ともに増加傾向にあり、国際的にもさらに増加が予想されている。しかしながら、その発癌機構、進展形式はいまなお不明な点が多いのも事実である。以前より、子宮体癌では肥満や高エストロゲン状態などといった環境因子がその発癌に重要な役割を担っていると考えられていた。しかし、その一方で、子宮体癌患者には重複癌が多いこと、子宮体癌患者に家系内に癌集積性が認められる事実から、その発癌に環境因子ばかりではなく遺伝的素因も密接に関与していることが推測されていた。近年、家族性腫瘍である遺伝性非ポリポーシス大腸癌 (hereditary nonpolyposis colorectal cancer; HNPCC) の女性患者において、高率に子宮体癌が合併する事実が明らかとなり、家族性腫瘍としての子宮体癌が存在することが明らかとなってきた。

HNPCC は、1971 年に Lynch によりその概念が提唱された疾患で¹⁾、近年、分子遺伝学的にその病態の解析が進んでいる常染色体優性遺伝形式をとる家族性腫瘍の一つである²⁾。1990 年には HNPCC の International Collaborative Group (ICG)-HNPCC により、①家系内に 3 名以上組織学的に確認された大腸癌患者がおり、

そのうち 1 人は他の 2 名に対し第一度近親者であること、②大腸癌の発生が 2 世代にわたること、③少なくとも 1 人は 50 歳未満で大腸癌と診断されていることという古典的アムステルダムクライテリアといわれる HNPCC の臨床診断基準が示された³⁾。

その後、1999 年の ICG-HNPCC においてアムステルダムクライテリアが改訂され新アムステルダムクライテリア (アムステルダムクライテリア II) が成立した⁴⁾ (第 1 表)。この新アムステルダムクライテリアでは、それまで大腸癌のみが診断基準の対象癌であったのに加え、子宮体癌、小腸癌、尿管癌、腎臓癌なども HNPCC 関連腫瘍として診断の対象癌として含まれるように改訂された。この改訂により、子宮体癌の一部に家族性腫瘍として発症する症例が存在することが初めて国際的にも認識された。

また、1993 年にはこの HNPCC の原因遺伝子が DNA ミスマッチ修復 (DNA mismatch repair; MMR) 酵素をコードする遺伝子であることが判明した。この事実より、子宮体癌の一部は HNPCC 同様の MMR 遺伝子異常により発生すると推測され、子宮体癌の原因遺伝子の候補として特に MMR 遺伝子群が注目されてきた。

細胞における DNA の突然変異は放射線や変異原物質などの外的因子の影響ばかりでなく、細胞自身の DNA

本論文は、Banno K, Susumu N, Hirao T, Yanokura M, Hirasawa A, Aoki D, Udagawa Y, Sugano K, Nozawa S : Identification of germline *MSH2* gene mutations in endometrial cancer patients not fulfilling the new clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 146 : 58-65, 2003 の一部、および阪埜浩司, 進 伸幸, 平尾 健, 岩田 卓, 平澤 晃, 青木大輔, 野澤志朗 : 遺伝性非腺腫症性大腸癌 (HNPCC) と子宮内膜癌. *家族性腫瘍* 3 : 62-67, 2003 の一部を含む

第1表 HNPCCの臨床診断基準

Amsterdam Minimum Criteria (1990)
1. At least 3 colorectal cancer in relatives (pathological verified)
2. One is a first degree relative of other two
3. At least two successive generations should be affected
4. One colorectal cancer diagnosed before the age of 50 years
5. FAP should be excluded
Revised Amsterdam criteria II (1999)
1. At least 3 relatives with an HNPCC-associated cancer (cancer of colorectum, endometrium, small bowel, ureter or renal pelvis)
2-5: same

1999年の改訂により子宮体癌を含む4種の癌がHNPCC関連腫瘍として診断の対象癌として追加された。(阪埜浩司, 他: 家族性腫瘍, 3: 62-67, 2003の表1より許可を得て転載)

複製時のエラーによっても生じることが知られている。このようなDNAの変異は蓄積すると細胞に癌化などの重大な変化を引き起こすと推測されている。DNA修復機構とはこのような細胞に生じたDNAの変異を細胞自身が取り除き修復させる機構である。細胞におけるDNAの修復には様々機構が存在すると考えられており、その一つがDNA複製時のエラーを検出し、修復を行うDNAミスマッチ修復(MMR)機構である。この機構を担うのはDNAミスマッチ修復酵素(MMR enzyme)群とよばれる蛋白である。MMR遺伝子の解析は大腸菌で最も歴史が長く、以前よりMut S, Mut LなどのMMR遺伝子が同定されていた。その後、これらの遺伝子が種を越えて保存されている事実がわかり、現在までに6種のMMR遺伝子(*hMSH2*, *hMLH1*, *hMSH3*, *hMSH6*, *hPMS1*, *hPMS2*)が同定され、このMMR遺伝子こそがHNPCCの原因遺伝子であることが明らかとされている⁵⁾。ヒトにおいてこれらのMMR蛋白は複合体を形成し機能すると推測されている。DNA複製時に生じた塩基のミスマッチを*hMSH2*蛋白が認識し、他のMMR蛋白と複合体を形成し修復を行う。その際、1および2塩基のミスマッチに対しては*hMSH2*蛋白と*hMSH6*蛋白の複合体が、2から4塩基の欠損、挿入には*hMSH2*蛋白と*hMSH3*蛋白の複合体が認識する。さらに*hMLH1*蛋白や*hPMS2*蛋白と結合しDNAの修復が行われると考えられている⁶⁾。

MMR遺伝子に異常があると、DNA複製時に生じた塩基のミスマッチを正しく修復することができず、長さの異なったDNA鎖が生じることになる。この現象は、ヒトゲノムの中の数塩基を1単位とする繰り返し配列の連続領域に特に生じやすく、マイクロサテライト不安定性(Microsatellite instability; MSI)と呼ばれる。

MSIが生じると発癌に関与する標的遺伝子異常の発生頻度が上昇し、その結果として細胞が癌化すると想定されている。このMSIは全大腸癌の約15%程度に認められている。このMSI陽性大腸癌の約25%程度に家族性腫瘍であるHNPCCが存在していると推測されており、MSI解析はHNPCCの有用なスクリーニング法として期待されている。6種のMMR遺伝子の中でも第3番染色体短腕の*hMLH1*遺伝子と第2番染色体短腕の*hMSH2*遺伝子の生殖細胞変異がHNPCCの原因の大部分(約60%)を占めると考えられているが、遺伝性腫瘍としての子宮体癌においても同様の機構や遺伝子異常がどの程度関与しているかについてはいまだ不明である。MMR機構異常の標的癌関連遺伝子の候補としては、現在までHNPCCにおいて細胞増殖抑制に関与する*TGF-βtypeII*R遺伝子やアポトーシス誘導に関与する*BAX*遺伝子などが報告されている^{7,8)}。これら遺伝子以外にも標的遺伝子の候補としては、*E2F*遺伝子⁹⁾ *MSH3*¹⁰⁾, *TCF-4*遺伝子¹¹⁾などの報告もあるが、子宮体癌における遺伝子異常の頻度はどれも低く、臓器によって発癌に関与するMMR機構異常の標的遺伝子が異なり子宮体癌独特の標的遺伝子が存在する可能性も示唆されている。

HNPCCと同様の発癌機構により生じる子宮体癌には、通常の子宮体癌の自然史とは異なる発癌機構と、独特な生物学的特性の存在が推測される。すでにHNPCCに関しては、北欧諸国や米国を中心に国家レベルでの多施設共同研究のための組織が構築され、質の高いデータの蓄積が進み¹²⁻¹⁸⁾、全大腸癌の約5%程度にHNPCCが存在すると推測されている。さらにHNPCCに関しては臨床病理学的に①若年発症である、②右側大腸に好発する、③低分化腺癌、粘液性腺癌が多い、④予後が良好である、等の特徴が明らかとされている。これに対し、家

族性腫瘍としての子宮体癌に関する解析は世界的にも報告が極めて少なく、遺伝浸透率も含めその病態や臨床病理学的特徴は全く不明である。家族性腫瘍としての子宮体癌の病態解明には我が国における疾患の頻度や家族歴といった詳細な疫学的調査のみならず、分子レベルの病態機構の解析、いわゆる分子疫学的解析が不可欠と考えられる。

本研究では、HNPCC の関連腫瘍としての視点で子宮体癌をとらえ、家族性腫瘍としての子宮体癌の病態を我が国で初めて分子疫学的に解析することを目的とした。当科にて 1991 年?2002 年の間に治療を行った子宮体癌 385 例に対し、詳細な家族歴、既往歴等の疫学的調査を実施した。さらに、その中で同意を得られた 39 例に対し、DNA ミスマッチ修復 (MMR) 遺伝子である *hMLH1* 遺伝子と *hMSH2* 遺伝子の異常に着目し MSI 解析を含む分子生物学的解析を実施し、家族性腫瘍としての子宮体癌の病態と MMR 遺伝子異常の関連性を検討した。

本研究は、文部科学省ら 3 省庁合同の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、8 学会合同の「遺伝学検査に関するガイドライン (案)」および家族性腫瘍研究会の「家族性腫瘍における遺伝子診断研究とこれを応用した診療に関するガイドライン」を遵守して実施した。本研究計画は施設内倫理委員会にて審査され、承認を受けている。

実験方法

1. 子宮体癌症例における家系調査および既往歴調査

慶應義塾大学病院産婦人科において 1991 年から 2002 年までの間に治療を実施した子宮体癌患者 385 例より、同意を得た上で詳細な家族歴・既往歴を面接により聴取した。発端者から第 3 度近親者までの血縁者について、性別・悪性腫瘍の罹患部位および罹患年齢・現

年齢・生存期間等について調査した。ただし、不確定な内容は除外し家系図を作成した。家族性腫瘍である HNPCC の新アムステルダムクライテリアを満たす症例を子宮体癌 385 例から抽出し、子宮体癌における家族性腫瘍の頻度を調査した。

2. 子宮体癌組織および正常組織からの DNA の抽出

患者の同意のもと、当科にて手術的に摘出した子宮体癌組織 39 例を無菌的に液体窒素中に保存した。また正常組織は、同一症例の末梢血を採取し、ロイコプレップを用いて白血球を単離し、マイナス 20℃で保存した。DNA の抽出については、子宮体癌組織および末梢血中の白血球を Proteinase K で処理した後、SS-phenol/chloroform にてフェノール抽出し、3M酢酸ナトリウムおよびエタノールを加えて DNA を沈殿させ、ペレットを乾燥させた後 TE buffer に溶解し 4℃で保存し実験に使用した。

3. マイクロサテライト不安定性 (MSI) 解析

同意が得られた子宮体癌 39 例において、末梢血から抽出した DNA と子宮体癌組織から抽出した DNA を、それぞれ *D2S123*・*D3S1284*・*D5S404*・*D9S162*・*hMSH2 intron12* の 5 領域で PCR 増幅した(第 2 表)。*D2S123*・*D3S1284*・*D5S404*・*D9S162* は CA リピートを含むマイクロサテライト領域である。プライマーは Research Genetics 社製のものを使用し、アンチセンス鎖用のプライマーの 5' 端を Cy5 amidite (indodicarbocyanine) で蛍光標識した。PCR では、Taq Polymerase および buffer はすべて Parkin Elmer 社の ampliTaq を用いて、以下のプロトコールで実験を行った。*D2S123*・*D3S1284*・*D5S404*・*D9S162* に関しては、Premixture 液 24 μl (蒸留水 16.125 μl, 1.25 mM dNTP 4 μl, 10×buffer 2.5 μl, OD2.2 forward Primer 0.625 μl, OD2.2 Reverse Primer 0.625 μl, Taq

第 2 表 マイクロサテライトマーカーのプライマー配列

Locus	Forward primer Sequence	Reverse primer Sequence	Size (bp)
D2S123	5'AAACAGGATGCCTGCCTTTA 3'	5'GGACTTTCCACCTATGGGAC 3'	197-227
D3S1284	5'GGAATTACAGGCCACTGCTC 3'	5'GGAATTACAGGCCACTGCTC 3'	155-177
D5S404	5'GATCACCACATTCCACCTAAT 3'	5'GATCACCACATTCCACCTAAT 3'	180-198
D9S162	5'GCAATGACTTAAGGTTC 3'	5'GCAATGACCAGTTAAGGTTC 3'	172-196
<i>hMSH2 intron12</i>	5'GATGTTCCACATCATTACTG 3'	5'GTGGTTCCACATCATTACTG 3'	182

実験に使用した 5 種のマイクロサテライトマーカーのプライマー配列とその PCR 産物を示す。*hMSH2 intron12* はモノヌクレオチドマーカー、それ以外の 4 種のマーカーはダイヌクレオチドマーカーである。(Banno K et al : Cancer Genet Cytogenet 146 : 58-65, 2003 の Table1 より許可を得て転載)

Polymerase 0.125 μ l) に 0.1 μ g/ μ l の検体 DNA (鋳型) 1 μ l を加えて計 25 μ l とし, 95°C5 分で一本鎖に解離させた後, 95°C30 秒, 55°C40 秒, 72°C40 秒を計 40 サイクル行って増幅し, 更に 72°C で 7 分加熱した後 4°C に冷却し保存した。

hMSH2 intron12 は, PolyA 配列を含むマイクロサテライト領域であり, プライマーは, DNA 合成機にて作成し, センスおよびアンチセンス鎖用のプライマーの 5' 端を Cy5 amidite (indodicarbocyanine) で蛍光標識した。PCR 条件は, Premixture 液 24 μ l (蒸留水 16.125 μ l, 1.25 mM dNTP 4 μ l, 10 \times buffer 2.5 μ l, OD2.2 forward Primer 0.625 μ l, OD2.2 Reverse Primer 0.625 μ l, Taq Polymerase 0.125 μ l) に 0.1 μ g/ μ l 検体 DNA (鋳型) 1 μ l を加えて計 25 μ l とし, 95°C 5 分で一本鎖に解離させた後, 95°C30 秒, 55°C40 秒, 72°C40 秒を計 40 サイクル行って増幅し, 更に 72°C で 7 分加熱した後 4°C に冷却して保存した。

マイクロサテライト領域の複製エラーをみるため, *D2S123*・*D3S1284*・*D5S404*・*D9S162* については増幅 DNA をホルムアミド変性後 7 M 尿素入り 8% アクリルアミドゲルを用いて ALFred DNA Sequencer (Pharmacia) で電気泳動し, 正常組織(白血球)由来 DNA と子宮体癌組織由来 DNA の各領域の波形の違いを比較した。泳動結果の解析には, 同社の解析ソフトウェア, Fragment manager を用いた。*hMSH2 intron12* については増幅 DNA をホルムアミド変性後 12% アクリルアミドゲルを用いて ALFred DNA Sequencer で電気泳動し, 正常組織(白血球)由来 DNA と子宮体癌組織由来 DNA の波形の違いを比較した。泳動結果の解析には同様に Fragment manager を用いた。

以上のように 1 症例につき最大 5 種のマイクロサテライト領域においてマイクロサテライト不安定性 (MSI) を解析し, 1 領域でも複製エラーを認めたものは MSI 陽性 (MSI+) と判定した。解析したすべての領域で複製エラーを認めない症例は MSI 陰性 (Microsatellite stability ; MSS または MSI-) と判定した。

4. MSI 陽性子宮体癌と臨床病理学的情報との関連性の検討

MSI 陽性子宮体癌と MSI 陰性子宮体癌において発症年齢, 分化度, 臨床進行期, 重複癌の有無の各事項について統計学的手法 (Fisher の直接確率計算法) を用いて関連性があるか検討した。更に予後との相関を解析するために生存率に差異があるかについて検討した。

5. 免疫組織化学的解析

MSI 解析を実施した子宮体癌 39 例中同意の得られた 28 例の子宮体癌手術検体パラフィン包埋ブロックを使用し, MMR 遺伝子がコードする hMLH1 および hMSH2 蛋白の発現を抗体による免疫組織化学染色により解析した。

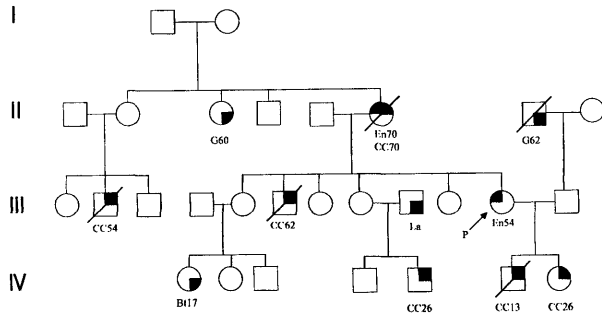
ホルマリン固定された子宮体癌部を含むパラフィン包埋ブロックを 3 μ m に薄切し, スライドガラスに貼り付けた後 60°C で一晚乾燥させた。キシレンにて 15 分間脱パラフィンし, 100% エタノールより段階的に脱キシレン処理後, クエン酸バッファー (pH 7.0) により 121°C 10 分間オートクレーブ処理し抗原性の賦活化を行った。さらに内因性ペルオキシダーゼ活性除去のため PBS に溶解した 3% H₂O₂ にて室温で 5 分間インキュベートした後, 一次抗体と反応させた。hMLH1 蛋白と hMSH2 蛋白に対する一次抗体として抗 hMLH1 抗体 (G168-15, Pharmingen 社, San Diego CA, USA) と抗 hMSH2 抗体 (Polyclonal, Santa Cruz Biotechnology 社, CA, USA) をそれぞれ 30 倍, 300 倍に希釈して実験に用いた。

染色は Vectastain ABC kit (Vector Laboratories 社, Burlingame CA, USA) を使用し, diaminobenzidine (SIGMA 社, St. Louis MO, USA) で発色させた。PBS で洗浄後, Mayer heatoxyline にて核染色を行った。

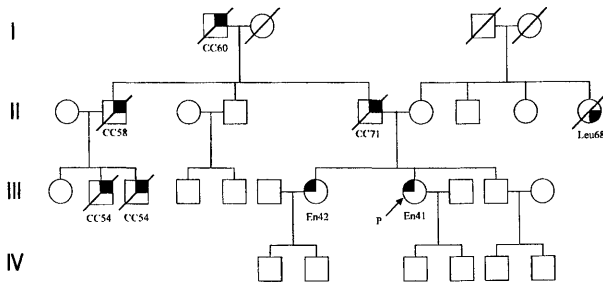
免疫組織化学的解析は 1 症例あたり複数回実施し, 周囲の正常子宮内膜腺や間質細胞の核の染色性をインターナルコントロールとして子宮体癌部の染色性を評価し, 陽性または陰性と判定した。hMLH1 蛋白および hMSH2 蛋白と MSI との関連性を統計学的に解析した (Fisher の直接確率計算法)。

6. hMLH1 遺伝子および hMSH2 遺伝子の生殖細胞変異解析 (PCR-SSCP 法)

12 例の MSI 陽性症例については HNPCC の主な原因遺伝子とされる MMR 遺伝子の *hMLH1* 遺伝子および *hMSH2* 遺伝子について生殖細胞変異の有無を PCR-SSCP 法にて検査した。本実験は施設内倫理委員会にて審査され, 承認の後に, 十分な説明と書面による同意のもと実施された。*hMLH1* 遺伝子および *hMSH2* 遺伝子の各エクソンについてプライマーを作成し, 末梢血白血球由来 DNA をそれぞれ PCR 増幅した。Premixture 液 24 μ l (蒸留水 16.125 μ l, 1.25 mM dNTP 4 μ l, 10 \times buffer 2.5 μ l, OD2.2 forward Primer 0.625 μ l, OD2.2 Reverse Primer 0.625 μ l, Taq Polymerase 0.125 μ l)



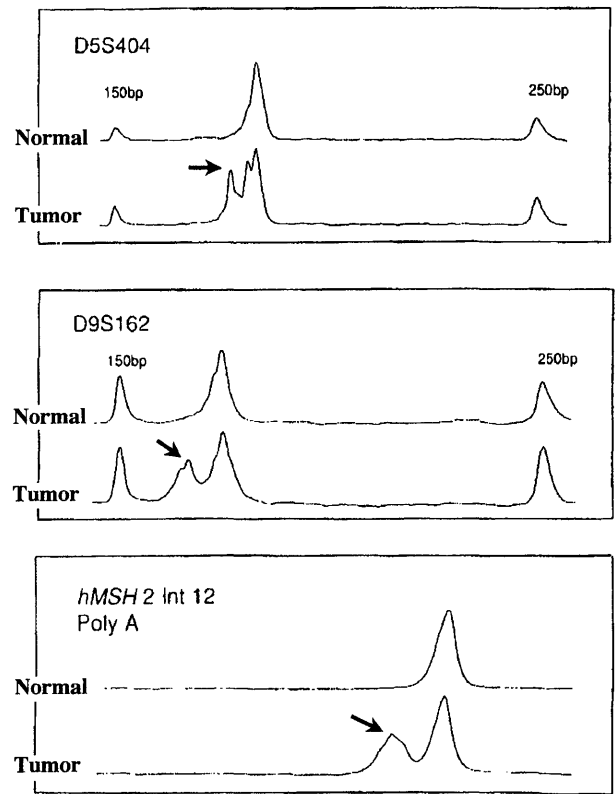
第2図 新アムステルダムクライテリアを満たす症例Aの家系図。●は発端者である子宮体癌症例である。○は女性、□は男性を示す。●およびEnは子宮体癌、●およびCCは大腸癌、●はその他の癌腫を示す(Gは胃癌、Proは前立腺癌、Heは肝臓癌、Cxは子宮頸癌、Btは脳腫瘍、Laは喉頭癌を表す)。数字は診断時の年齢を示す。斜線は死亡した家系構成員を表す。左のローマ数字は世代を表す。発端者を含め、第一度近親者以内に5例のHNPCC関連腫瘍を認めた。母親も子宮体癌と大腸癌の重複癌症例であった。(阪埜浩司, 他: 家族性腫瘍, 3: 62-67, 2003の図1より許可を得て転載)



第3図 新アムステルダムクライテリアを満たす症例Bの家系図。●は発端者である子宮体癌症例である。○は女性、□は男性を示す。●およびEnは子宮体癌、●およびCCは大腸癌、●はその他の癌腫を示す(Leuは白血病を表す)。数字は診断時の年齢を示す。斜線は死亡した家系構成員を表す。左のローマ数字は世代を表す。発端者は41歳という比較的若年で子宮体癌を発症している。発端者を含め、第一度近親者以内に3例のHNPCC関連腫瘍を認めた。(阪埜浩司, 他: 家族性腫瘍, 3: 62-67, 2003の図2より許可を得て転載)

査を実施した結果、385例中2例(0.5%)がHNPCCの新アムステルダムクライテリアをみたす家族性子宮体癌症例であった¹⁹⁾。

症例Aは54歳(2妊2経)の子宮体癌症例で1998年に当科にて手術治療を受けている。病理学的診断は類内膜腺癌の低分化型(G3)でFIGOの手術進行期はIb期であった。彼女の母親および2名の子供の大腸癌の既往歴があり、これらを含めると第三度近親者以内に6例もの大腸癌患者を認め、そのうち3名は30歳以下という極めて若年で発症していた(第2図)。症例Bは比較的若年発症である41歳(2妊2経)の症例で、1991年に当科にて手術治療を受けている。病理学的診断は異型子宮内膜増殖症であった。本症例の姉も比較的若年の42歳で子宮体癌に罹患していた。父親、祖父を含め、第三度近親者以内に5例の大腸癌症例を認め、癌集積性のある家系であった(第3図)。



第4図 症例1におけるMSI解析。腫瘍部由来のDNAに認められた異常な波形を矢印で示す。最大5領域のマイクロサテライトマーカーにより解析し、1領域以上で複製エラーによる異常波形を認めた症例をMSI陽性と判定した。(Banno K et al: Cancer Genet Cytogenet 146: 58-65, 2003のFig 2より許可を得て転載)

第 4 表 子宮体癌 39 例における MSI 解析

Case	Age at operation	Histological type	Grade	Stage	Double cancer	D2	D3	D5	D9	IN
1	58	E	G2	IIIa	-	+	+	+	+	+
2	56	E	G1	Ia	-	+	+	-	+	+
3	55	AS	G2	IIIc	-	+	+	+	-	+
4	55	AS	G3	Ic	OC	+	+	+	+	-
5	60	E	G1	Ib	-	+	-	+	-	+
6	62	E	G2	IIIc	-	+	+	-	+	-
7	55	E	G3	IIIc	-	+	-	+	+	-
8	54	E	G1	Ia	CC	+	+	+	-	-
9	50	E	G1	Ib	OC	-	+	-	+	-
10	56	E	G2	Ic	-	-	-	-	-	+
11	66	E	G1	Ia	-	-	-	-	-	+
12	44	E	G2	IIIc	CC	+	ND	ND	ND	ND
13	59	E	G1	IIa	BC, OC	-	-	-	-	-
14	48	E	G2	Ib	-	-	-	-	-	-
15	58	E	G2	IIIc	-	-	-	-	-	-
16	65	E	G3	IIIc	-	-	-	-	-	-
17	72	E	G2	IVb	-	-	-	-	-	-
18	55	E	G1	Ib	-	-	-	-	-	-
19	65	E	G1	Ic	-	-	-	-	-	-
20	56	E	G1	Ib	-	-	-	-	-	-
21	69	E	G1	Ia	-	-	-	-	-	-
22	68	E	G1	Ic	-	-	-	-	-	-
23	34	E	G1	Ib	-	-	-	-	-	-
24	50	E	G1	Ib	-	-	-	-	-	-
25	61	E	G1	Ic	-	-	-	-	-	-
26	57	E	G1	Ic	-	-	-	-	-	-
27	55	E	G1	Ia	BC	-	-	-	-	-
28	64	E	G3	IIIa	-	-	-	-	-	-
29	56	E	G1	Ic	-	-	-	-	-	-
30	44	E	G1	Ib	-	-	-	-	-	-
31	45	E	G1	Ib	OC	-	-	-	-	-
32	53	E	G1	Ib	-	-	-	-	-	-
33	69	E	G1	Ia	CC	-	-	-	-	-
34	81	E	G1	IIIa	-	-	-	-	-	-
35	58	E	G1	Ib	-	-	-	-	-	-
36	60	E	G3	Ic	-	-	-	-	-	-
37	64	E	G1	IIIc	-	-	-	-	-	-
38	66	S	G2	IIIa	-	-	-	-	-	-
39	62	S	G2	IIIa	-	-	-	-	-	-

E: Endometrioid adenocarcinoma, AS: Adenosquamous carcinoma,
 S: Serous adenocarcinoma, OC: Ovarian cancer, BC: Breast cancer,
 CC: Colorectal cancer, D2: D2S123, D3: D3S1284, D5: D5S404, D9: D9S162,
 IN: *hMSH2* intron 12, ND: not done

子宮体癌 39 例の MSI 解析の結果と臨床病理学的情報（発症年齢，臨床進行期，分化度，重複癌の有無）を表にまとめた。解析の結果，12 例の MSI 陽性腫瘍を認めた（MSI 陽性率 30.7%）。（Banno K et al: Cancer Genet Cytogenet 146: 58-65, 2003 の Table 3 より許可を得て転載，一部改変）

以上の 2 症例に関しては，遺伝子レベルの解析に対する同意が得られず，その後の解析は実施できていない。

2. 子宮体癌におけるマイクロサテライト不安定性 (MSI) 解析

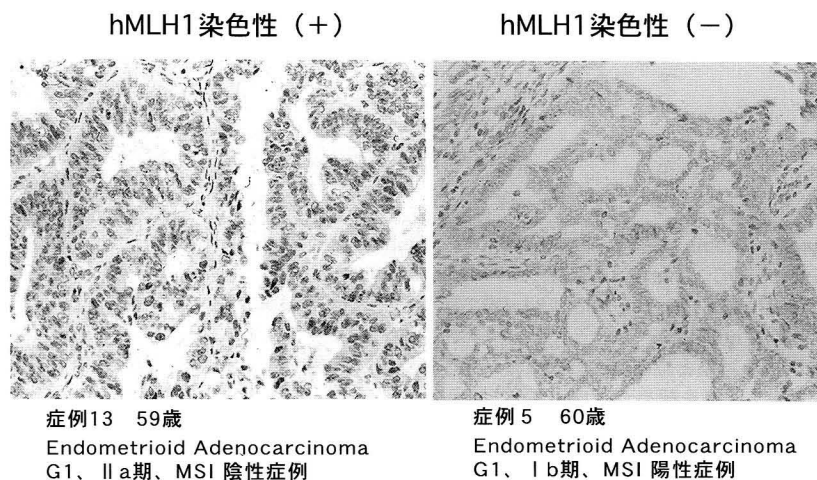
第 4 図に示すように，白血球由来 DNA (Normal) と子宮体癌組織由来 DNA (Tumor) を最大 5 種類のマ

マイクロサテライト領域においてマイクロサテライトマーカーを用いてPCR法により増幅し、電気泳動により正常組織由来のPCR産物には存在しない異常なピークが出現したとき、マイクロサテライト不安定性 (MSI) 陽性と判定した。この結果、解析した子宮体癌 39 例中 12 例 (30.7%) がマイクロサテライト領域 5 領域中少なくとも 1 領域以上の複製エラーを認め、MSI 陽性症例であると判定された²⁰⁾。子宮体癌の発症年齢、病理組織学的所見、重複癌の有無などを調査し表にまとめた (第 4 表)。これらの結果から MSI 陽性子宮体癌の臨床病理学的特性を検討した。発症年齢が 50 歳以下の子宮体癌は MSI 陽性子宮体癌で 2 例、MSI 陰性子宮体癌で 5 例認めたが MSI 陽性子宮体癌において有意に若年発症が多い傾向は認められなかった ($p=0.63$)。他臓器の重複癌に関して、MSI 陽性子宮体癌は 12 例中 4 例 (33.3%) において卵巣癌、大腸癌などの他臓器癌の重複を認め、MSI 陽性子宮体癌は MSI 陰性子宮体癌 (27 例中 4 例, 14.8%) に比べて頻度が多い印象があったものの統計学的に有意差は認められなかった ($p=0.18$)。また、病理組織学的分化度との関連については G2 および G3 腺癌がそれぞれ 12 例中 4 例 (33.3%) および 3 例 (25%) と合計で 7 例 (58.3%) と過半数を占めたが MSI 陰性子宮体癌における G2 および G3 腺癌は 29.6% に認められるに過ぎず、MSI 陽性子宮体癌においては G2 および G3 腺癌が多い傾向を示した ($p=0.09$)。FIGO 臨床進行情との関連では、MSI 陽性子宮体癌の

41.6% (12 例中 5 例) が転移を示す III 期および IV 期であったが、統計学的に MSI 陽性子宮体癌と転移の有無との関連は証明されなかった ($p=0.86$)。予後との比較においては、MSI 陽性例で 12 例中 1 例の死亡 (16.7%) に対し、MSI 陰性 (MSS) 例では 27 例中 5 例 (18.5%) の死亡 (うち 1 例は乳癌にて死亡) であり、生存率による予後との関連性は認められなかった。

3. 子宮体癌における hMLH1 および hMSH2 蛋白の免疫組織化学的発現解析

MSI 解析を実施した 39 例中 28 例の子宮体癌症例 (MSI 陽性例 12 例, MSI 陰性例 16 例) の手術標本を用い、抗 hMLH1 抗体および抗 hMSH2 抗体による免疫組織化学的にそれぞれの発現を解析した (第 5 図)。その結果、MSI 陽性子宮体癌 12 例中 8 例 (66.7%) において抗 hMLH1 抗体の染色性の消失が認められたのに対し、MSI 陰性子宮体癌 16 例においてはわずか 1 例でしか抗 hMLH1 抗体の染色性の消失が認められず、統計学的に MSI 陽性子宮体癌と hMLH1 蛋白の発現低下との関連性が示された ($p=0.0012$) (第 5 表)。一方、抗 hMSH2 抗体の染色性の消失は、MSI 陽性子宮体癌 12 例中 2 例 (16.7%) にしか認められず、MSI 陰性子宮体癌 16 例においても抗 hMSH2 抗体の染色性の消失は認められなかった。



第 5 図 子宮体癌における hMLH1 蛋白の発現低下。抗 hMLH1 抗体を用いた MSI 陰性症例 (症例 13) および MSI 陽性症例 (症例 5) の免疫組織化学染色の結果を示す。右図の症例 5 においては子宮内膜癌部の核における抗 hMLH1 抗体の染色性が消失している。なお、両症例とも癌周囲の正常部は染色されている (倍率 X100)。(阪埜浩司, 他: 家族性腫瘍, 3: 62-67, 2003 の図 5 より許可を得て転載)

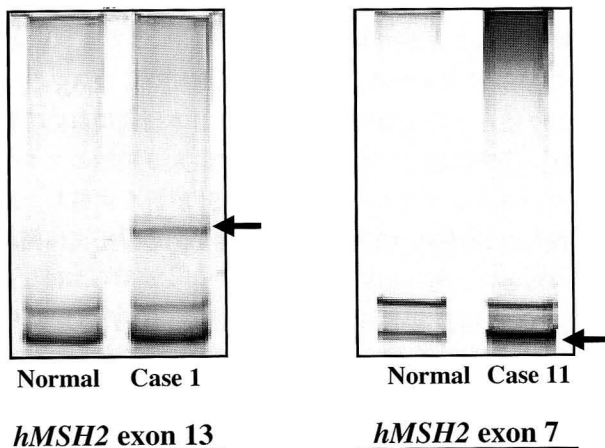
第 5 表 子宮体癌における MSI と hMLH1 蛋白の発現低下との関連

	抗 hMLH1 抗体による癌部の染色性		計 (例)
	+	-	
MSI(+)	4	8	12
MSI(-)	15	1	16

($p=0.0012$ Fisher's exact probability test)
 MSI (+) 例における hMLH1 蛋白の発現低下率=8/12 例 (66.7%)
 MSI (-) 例における hMLH1 蛋白の発現低下率=1/16 例 (6.3%)
 子宮体癌 28 例における MSI と抗 hMLH1 抗体の染色性との関連を示す。MSI 陽性子宮体癌において有意に hMLH1 蛋白発現低下が認められた ($p=0.0012$)。 (阪埜浩司, 他: 家族性腫瘍, 3: 62-67, 2003 の図 4 より許可を得て転載, 一部改変)

4. MSI 陽性子宮体癌例における hMLH1 および hMSH2 遺伝子生殖細胞変異解析

MSI 陽性子宮体癌 12 例において, 施設内倫理委員会の承認と書面による同意のもと DNA ミスマッチ修復 (MMR) 遺伝子である hMLH1 および hMSH2 遺伝子の生殖細胞変異を解析した。その結果, 12 例中 2 例 (症例 1 と症例 11, 16.6%) で hMSH2 遺伝子の生殖細胞変異を²⁰⁾, 1 例 (症例 12, 8.3%) で hMLH1 遺伝子の生殖細胞変異を認め, 合計として MSI 陽性子宮体癌の 25% に hMLH1 および hMSH2 遺伝子の生殖細胞変

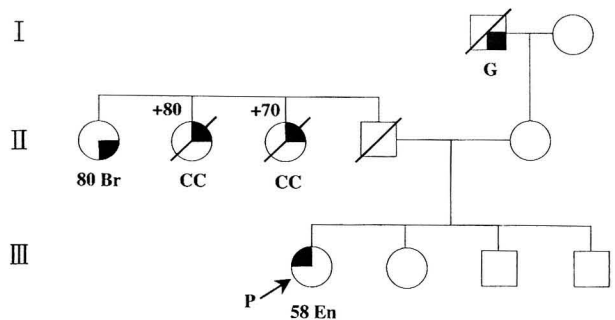


第 6 図 PCR-SSCP 解析の結果. hMSH2 遺伝子の PCR-SSCP 解析の結果, 異常なバンドを示した症例を示す。左図に症例 1 のエクソン 1 を, 右図に症例 11 のエクソン 7 の結果を示す。異常なバンドを矢印で示した。 (Banno K et al : Cancer Genet Cytogenet 146 : 58-65, 2003 の Fig 3 より許可を得て転載)

第 6 表. hMLH1 遺伝子および hMSH2 遺伝子の生殖細胞変異

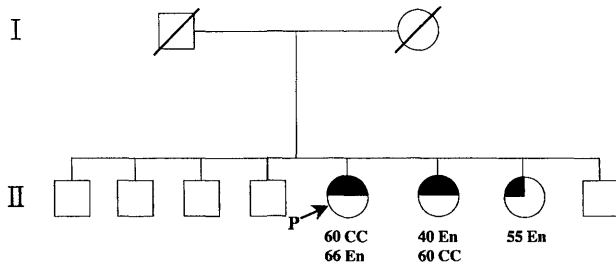
Case	Exon affected	Genomic DNA alteration	predicted effects (codon)
1	Exon 13 (hMSH2)	ATG to ATA	Met (688) Ile
11	Exon 7 (hMSH2)	CTT to TTT	Leu (390) Phe
12	Exon 3 (hMLH1)	CGA to TGA	Arg (100) Term

MSI 陽性子宮体癌 12 症例中 3 例の MMR 遺伝子の生殖細胞変異を検出した。症例 1 では hMSH2 遺伝子のコドン 688 に, 症例 11 ではコドン 390 に 1 塩基の変異が同定された。症例 12 では hMLH1 遺伝子のコドン 100 にナンセンス変異が同定された。 (Banno K et al : Cancer Genet Cytogenet 146 : 58-65, 2003 の Table 4 より許可を得て転載, 一部改変)



第 7 図 症例 1 の家系図. hMSH2 遺伝子のコドン 688 に生殖細胞変異を認めた症例 1 の家系図を示す。矢印は発端者である子宮体癌症例である。○は女性, □は男性を表す。● および En は子宮体癌, ⊙ および CC は大腸癌, ⊚ はその他の癌腫を表す (G は胃癌, Br は乳癌を表す)。斜線は死亡した家系構成員を示し, 数字は癌の発症年齢又は死亡年齢を示す。左のローマ数字は世代を表す。 (Banno K et al : Cancer Genet Cytogenet 146 : 58-65, 2003 の Fig 4 より許可を得て転載, 一部改変)

異を検出した (第 6 図)。この 3 例は hMSH2 遺伝子のコドン 688 の atg が ata (Met が Ile) への 1 塩基変異, コドン 390 の ctt が ttt (Leu が Phe) への 1 塩基変異および hMLH1 遺伝子のコドン 100 のナンセンス変異 (Arg が Stop コドン) と推測された (第 6 表)。これらの 3 症例はいずれも家族内癌集積傾向を示したものの, 新アムステルダムクライテリアは満たしていなかった (第 7 図)。症例 11 では発端者の 2 名の妹も子宮体癌に罹患しており, この 2 名においても今回検出されたコ



第8図 症例11の家系図。hMSH2遺伝子のコドン390に生殖細胞遺伝子変異を認めた症例11の家系図を示す。矢印は発端者である子宮体癌症例である。○は女性、□は男性を表す。●およびEnは子宮体癌、◐およびCCは大腸癌を表す。斜線は死亡した家系構成員を示し、数字は癌の発症年齢又は死亡年齢を示す。左のローマ数字は世代を表す。発端者を含め3姉妹が子宮体癌に罹患しており、発端者も大腸癌の重複癌を認めている。(Banno K et al: Cancer Genet Cytogenet 146: 58-65, 2003のFig 5より許可を得て転載、一部改変)

ドン390のcttがtttへ(LeuがPhe)の変異と同様の生殖細胞変異を認めた(第8図)。症例12は子宮体癌の手術時に回盲部大腸癌の重複癌が発見された。症例12では抗hMLH1抗体を用いた免疫染色により子宮体癌部のみならず、重複癌の回盲部大腸癌の粘液性腺癌部においても染色性の消失を認め、子宮体癌部および回盲部癌部におけるhMLH1蛋白の発現低下を確認した。

考 察

HNPCCは常染色体優性遺伝形式をとる家族性大腸癌であり、従来は大腸癌患者を発端者として分子遺伝学的アプローチによる解析が実施されてきた。しかしながら、HNPCC患者における第一度近親者内の大腸癌以外の癌腫の発生頻度としては子宮体癌が最も多く、欧米では約9~19%と報告されている²¹⁾。我が国における1994年までのHNPCC34家系167例の解析でも10例(6.0%)に子宮体癌の発生を認めている²²⁾。1999年のアムステルダムクライテリアの改訂により子宮体癌の一部が家族性腫瘍であること、その発癌機構はHNPCC同様MMR遺伝子の異常が関与している事実が明らかとなってきた。子宮体癌において以前よりその発生に遺伝的素因の関与が指摘されていたこと、家族性腫瘍であるHNPCCにおいて子宮体癌の発生率が高いこと、罹患後の生存率も比較的高い癌腫であることなどを考えると、二次発癌への予防対策や家系内の血縁者へのサーベイランスといった家族性腫瘍独特な治療戦略の視点からも家族性子宮体

癌の病態解析は重要な意味を持つと考えられているが、分子疫学的なアプローチによる病態の解析はいまだなされていない。

今回、著者は報告としては現時点で国内最大数の子宮体癌385例を対象とした家系調査を実施し、HNPCCの新アムステルダムクライテリアを満たす2例(0.5%)の家族性子宮体癌家系を発見した。現在まで、我が国の家族性腫瘍としての子宮体癌の頻度に関しては本研究以外にはわずか1件しか報告されていない。Sagawaらは本研究より少ない子宮体癌161例を調査し2例(1.5%)が新アムステルダムクライテリアを満たしたと報告している²³⁾。いずれの結果も5%程度にHNPCCが存在すると報告されている大腸癌に比べるとはるかに低頻度であった。この新アムステルダムクライテリアにはHNPCCと関連すると報告されている卵巣癌や胃癌が診断基準の対象癌に含まれていないという問題点が指摘されており、このような理由により新アムステルダムクライテリアでは家族性子宮体癌のごく一部の症例しか抽出できていない可能性がある。今後、我が国における家族性腫瘍としての子宮体癌の頻度を明らかにするためには地域性による発生頻度の差が生じている可能性も含め、大規模かつ全国的な子宮体癌症例の家系調査が必要であると考えられた。

家族性腫瘍であるHNPCCの発癌はDNAのミスマッチ修復(MMR)機構の異常により生じると考えられおり、これは原因遺伝子とされるMMR酵素遺伝子の生殖細胞変異に起因すると推測されている。このMMR機構の異常はマイクロサテライト不安定性(MSI)として検出することができる。実際にHNPCCでは90%以上でMSIを示すため、MSI解析はHNPCCのスクリーニング法としても期待されている²⁴⁾。本研究において著者は、子宮体癌38例を対象として最大5種類のマイクロサテライトマーカーを用いてMSI解析を実施した。解析した38例中12例にMSI陽性を認め、子宮体癌が30.7%という高いMSI陽性率を示す事実が明らかになった。このMSI陽性率の結果は大腸癌(19%)、肝癌(14%)、乳癌(4%)などの報告²⁵⁾と比較しても高率であり、子宮体癌の発癌にMMR異常が深く関与していることを示唆している。

高率にMSI陽性を示すHNPCCの臨床病理学的特徴は近年の解析により明らかとなりつつある。一般的にその特徴は①若年に発症する(平均42歳)、②右側大腸に発生する、③同時性、異時性に大腸癌が好発する、④低分化型腺癌が多い、⑤粘液性腺癌が多い、⑥予後良好である、との6項目にまとめることができる²⁶⁾。一方、

MSI 陽性子宮体癌の臨床病理学的特徴に関して、我が国における報告はわずかで、統一された結論は得られていない。本研究において MSI 陽性子宮体癌と臨床病理学的特徴との関連を統計学的に解析したが、家族性腫瘍で一般的に認められる若年発症や重複癌の傾向は認められなかった。又、病理組織学的な分化度との関連については HNPCC 同様、MSI 陽性子宮体癌においては G2 および G3 腺癌といった低分化腺癌が多い傾向を示すという知見を得た ($p=0.09$)。一般的に、子宮体癌でも高頻度な高分化型子宮内膜癌は肥満や高エストロゲン状態などの環境因子が発癌に密接に関与していると考えられており、この結果は MMR 異常による発癌機構が通常の子宮体癌とは明らかに異なる機序と生物学的特性を有していることを示唆しており興味深い。今後さらなる症例数を検討することで、MMR 異常と低分化型腺癌の発癌機構の関連を明らかにできる可能性が示された。

HNPCC における MMR 異常の主たる原因遺伝子は MMR 酵素をコードする *hMLH1* および *hMSH2* 遺伝子と推測されている。本研究において著者は子宮体癌と MMR 異常との関連を免疫染色による *hMLH1* 蛋白および *hMSH2* 蛋白の発現と *hMLH1* および *hMSH2* 遺伝子の生殖細胞変異により解析した。

免疫染色による子宮体癌部における *hMLH1* 蛋白および *hMSH2* 蛋白の発現を検討では、MSI 陽性子宮体癌 12 例中 8 例 (66.7%) と高率に *hMLH1* 蛋白の発現低下が認められ、子宮体癌で高率に認められる MSI の多くは *hMLH1* 蛋白の発現低下に起因していることが示唆された。さらに統計学的に MSI 陽性子宮体癌と *hMLH1* 蛋白の発現低下が強く相関したことから ($p=0.0012$)、*hMLH1* 蛋白の免疫染色が子宮体癌における MSI の簡便な検出法として代用できる可能性を初めて示した。

著者はさらに MSI 陽性子宮内膜癌 12 例において、DNA ミスマッチ修復 (MMR) 酵素遺伝子である *hMLH1* および *hMSH2* 遺伝子の生殖細胞変異を解析した。その結果、12 例中 3 例 (25%) で *hMLH1* および *hMSH2* 遺伝子の生殖細胞変異を認めた。2 例が *hMSH2* 遺伝子の 1 塩基の変異であり、*hMSH2* 遺伝子のコドン 688 の atg が ata (Met が Ile) に、コドン 390 の ctt が ttt (Leu が Phe) に変異していた。1 例は *hMLH1* 遺伝子のコドン 100 の cga が tga へ変異するナンセンス変異 (Arg が Stop コドン) であった。本研究により検出されたこれらの生殖細胞変異はアメリカの遺伝子変異のデータベースである

Human Genome Database (HGMD) ([http://](http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/hgmd0.htm)

archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/hgmd0.htm) に登録されており、今回検出されたものと同様の生殖細胞変異が国際的には HNPCC 症例において既に報告されている²⁷⁻²⁹。また現存する遺伝子多型のデータベース上にも登録されておらず、機能的な遺伝子変異と推測される。一方、2 例の *hMSH2* 遺伝子の 1 塩基の変異は遺伝子多型であるという可能性も完全に否定できない。我が国をはじめとして *hMLH1* および *hMSH2* 遺伝子などの MMR 遺伝子の健常人における遺伝子多型解析の報告とデータの蓄積が非常に少ない状況では正確な判断は難しいといえる。最近、症例 1 と同様の生殖細胞変異は Nomura らによって日本人の HNPCC 症例においても検出された¹⁸。この報告において、コントロールの日本人 158 例では *hMSH2* 遺伝子のコドン 688 は全て野生型を示し、変異を認めなかったと報告しており、断定はできないものの機能的なミスセンス変異の可能性を指摘している。症例 11 においては、発端者の妹 2 名にも子宮体癌の罹患歴が確認されたばかりでなく、その妹 2 名にも同一の *hMSH2* 遺伝子コドン 390 の 1 塩基変異が同定された。この 1 塩基変異が遺伝子多型とすれば、日本人において極めて高率に生じている遺伝子多型ということになる。この発端者および妹の 1 名にも大腸癌が発症したという強い癌集積性をもつ家族歴から推測すると機能的な変異である可能性も否定はできず、今後さらに症例を検討していく必要がある。*hMLH1* 遺伝子のナンセンス変異が認められた症例 12 においては、回盲部大腸の粘液性腺癌が重複していたこと、子宮体癌部および回盲部大腸癌部で *hMLH1* 蛋白の発現が低下していたこと、発端者の妹にも同様の生殖細胞変異が検出されたことから明らかな機能的遺伝子変異であると考えられた。*hMLH1* 遺伝子の生殖細胞変異に起因する MMR 機構の異常により子宮内膜や腸管に癌腫が発生した症例と推察される。

1999 年までに ICG-HNPCC には 134 例の *hMLH1* 遺伝子変異が、87 例の *hMSH2* 遺伝子変異が集計されている。変異の種類として *hMLH1* 遺伝子はミスセンス変異が多く、*hMSH2* 遺伝子ではフレームシフト変異が多いと報告されている³⁰。本研究により子宮体癌では HNPCC では頻度が比較的低いとされる *hMLH1* 遺伝子のナンセンス変異と *hMSH2* 遺伝子のミスセンス変異が検出されたという事実は、MMR 遺伝子の遺伝子変異型により発生する癌腫の表現型が異なる可能性を示している。今後、解析を進め、子宮体癌の発生と特異的に関連する MMR 遺伝子の種類および遺伝子変異型を明らかとしたい。

本研究において MMR 遺伝子である *hMLH1* 遺伝子および *hMSH2* 遺伝子で生殖細胞変異を認めた3例は家系内癌集積傾向を認めたものの、いずれの症例も新アムステルダムクライテリアを満たしていなかった。この結果からも新アムステルダムクライテリアでは我が国の家族性子宮体癌の一部しか抽出できない事実を確認し、この診断基準を満たす症例以外にもさらに多くの家族性子宮体癌の存在が推察された。現在の臨床的診断基準である新アムステルダムクライテリアに代わる精度の高い、我が国独自の家族性子宮体癌の診断基準の確立が必要であると考えられた。また、MSI 陽性子宮体癌の25%に MMR 遺伝子の生殖細胞変異を認めたという事実は、家族性子宮体癌症例のスクリーニング法として MSI 解析が大腸癌と同様に有用である可能性を示した。家族性子宮体癌の診断として、仮に新アムステルダムクライテリアを満たさない症例であっても MSI 陽性であり、かつ家族内癌集積傾向を認める症例に対しては積極的に MMR 遺伝子を対象とした遺伝子解析を実施するべきであろう。

前述したように MSI 陽性子宮体癌に高頻度に *hMLH1* 蛋白の発現低下が認められた。*hMLH1* 蛋白の発現低下が認められた8例中 *hMLH1* 遺伝子の生殖細胞遺伝子変異はわずか1例であった。この結果より、子宮体癌で生じている高頻度の *hMLH1* 蛋白の発現低下は生殖細胞変異に起因しない遺伝子の不活化機序によるものと推測された。最近になって DNA のプロモーター領域のメチル化異常といったエピジェネティックな変化による遺伝子発現の消失機構が注目されており、*hMLH1* 遺伝子のプロモーター領域に高頻度に異常メチル化が生じている事実が報告された³¹⁾。この報告からも子宮体癌における MSI には *hMLH1* 遺伝子のエピジェネティックな変化である異常メチル化異常が深く関与している可能性が高い。今回、MSI 陽性子宮体癌において家族性腫瘍で一般的に認められる若年発症や重複癌といった傾向が証明されなかった事実もこの可能性を支持している。

子宮体癌の発癌に関与する MMR 遺伝子の候補として本研究では多くの HNPCC において生殖細胞変異が生じている *hMLH1* 遺伝子および *hMSH2* 遺伝子に着目し解析した。しかしながら、本研究結果において、この2種の遺伝子異常は確かに存在し関与しているものの、*hMLH1* 遺伝子および *hMSH2* 遺伝子の異常という機序だけでは MMR 異常のすべてを説明できるものではなく、さらなる別の MMR 遺伝子の関与も予測される。HNPCC 遺伝子の原因遺伝子として、MMR 遺伝子

は現在まで *hMLH1* 遺伝子、*hMSH2* 遺伝子以外に *hMSH3* 遺伝子、*hMSH6* 遺伝子、*PMS1* 遺伝子および *PMS2* 遺伝子の計6種が同定されている。そのなかでも最近 *hMSH6* 遺伝子の生殖細胞変異が HNPCC で同定された。*hMSH6* 遺伝子変異例では子宮体癌、卵巣癌を合併すると報告され^{32,33)}、特に子宮体癌の発癌との関連性で *hMSH6* 遺伝子は注目されはじめており、今後の研究において重要な遺伝子として位置づけられる。

子宮体癌の一部が家族性腫瘍であり、その発癌に MMR 遺伝子異常が深く関与している事実は、発癌機構が一部不明であった子宮体癌の生物学的特徴を理解するうえで貴重な知見と考えられ、本研究のようなこの種の子宮体癌症例の抽出と解析は重要な意義があると考えられる。今後、本研究で得られた知見を基盤として家族性子宮体癌の精度の高い臨床診断基準やサーベイランス法が確立されれば本疾患の早期発見や早期治療が可能となる。また家族性子宮体癌の遺伝子診断法が確立されれば、発症前診断が可能となり、患者本人のみならず広く家系構成員の癌予防にも寄与できる。さらに本研究が発展し、将来的に MMR 遺伝子変異型と表現型との関連より子宮体癌の臨床病態が予測できるようになれば、症例に応じた子宮体癌治療個別化の実現も期待される。

総括

我が国における家族性腫瘍としての子宮体癌の病態を分子疫学的手法にて解析するため、当科にて1991年2002年の間に治療を行った子宮体癌385例に対し疫学的調査を実施し、さらにインフォームド・コンセントの得られた39例に対して MMR 遺伝子異常との関連性を検討するため分子生物学的解析を行い、以下の事項を明らかにした。

1. 新アムステルダムクライテリアを満たす家族性子宮体癌は全子宮体癌の0.5%に存在する。
2. 子宮体癌症例において30.7%と高率に MSI 陽性を認め、子宮体癌の発癌に MMR 異常が密接に関与している。
3. MSI 陽性子宮体癌12例中8例(66.7%)に *hMLH1* 蛋白の発現低下が認められ、統計学的にも強く相関した ($p=0.0012$)。よって *hMLH1* 蛋白の免疫染色が子宮体癌における MSI の簡便な検出法として代用できる可能性がある。
4. MSI 陽性子宮体癌は G2 や G3 といった低分化型腺癌が多い傾向を示し、MMR 異常による子宮体癌は高エストロゲン状態などの環境因子が発生に寄与するとさ

れる高分化型子宮内膜癌とは異なる発癌機構と生物学特性を有する。

5. MSI 陽性子宮体癌 12 例中 3 例 (25%) で MMR 遺伝子である *hMLH1* および *hMSH2* 遺伝子の生殖細胞変異を検出した。いずれの症例も新アムステルダムクライテリアを満たしておらず、家族性子宮体癌に関してこの診断基準の問題点を具体的に明らかとした。また、我が国においては新アムステルダムクライテリアを満たさないさらに多くの家族性子宮体癌の存在が推測された。

6. 家族性子宮体癌に関して、新アムステルダムクライテリアを満たさない症例であっても MSI 陽性および家系内癌集積傾向がある症例に対しては MMR 遺伝子を対象とした遺伝子診断の実施は有意義と考えられる。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました慶應義塾大学医学部産婦人科学教室野澤志朗教授に深謝致します。また、御指導いただきました栃木県立がんセンター菅野康吉博士、藤田保健衛生大学医学部産婦人科宇田川康博教授、慶應義塾大学医学部産婦人科学教室進 伸幸専任講師に感謝致します。さらに本研究に多大な御協力をいただきました慶應義塾大学医学部産婦人科学教室の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

本研究の一部は、第 54 回日本産科婦人科学会学術講演会 (2002 年, 東京) 第 55 回日本産科婦人科学会学術講演会 (2003 年, 福岡) および第 62 回日本癌学会学術講演会 (2003 年, 名古屋) において発表した。

なお、本研究の一部は平成 13 年度文部科学省科学研究費補助金、特定領域 C「分子疫学的解析による遺伝性子宮内膜癌の病態解明」および平成 15 年度文部科学省科学研究費補助金、特定領域「分子疫学的手法を用いた家族性子宮内膜癌の病態解明と遺伝子診断」によった。

文 献

- 1) Lynch HT, Krush AJ : The cancer family syndrome and cancer control. *Surg Gynecol Obstet* 132 : 247-250, 1971
- 2) Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT : The International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Dis Colon Rectum* 34 : 424-425, 1991
- 3) Lynch HT, Lynch JF : Hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Semin Surg Oncol* 18 : 305-313, 2000
- 4) Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT : New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by

- the International Collaborative Group on HNPCC. *Gastroenterology* 116 : 1453-1456, 1999
- 5) 阪埜浩司, 二河田雅信, 平澤 晃, 進 伸幸, 青木大輔, 宇田川康博, 野澤志朗 : 遺伝性非腺腫性大腸癌 (HNPCC) と婦人科癌. *産婦人科の実際*, 50 : 1819-1825, 2001
- 6) 阪埜浩司, 進 伸幸, 矢野倉恵, 平尾 健, 岩田 卓, 平澤 晃, 青木大輔, 野澤志朗 : 遺伝性子宮内膜癌とは一特に DNA ミスマッチ修復遺伝子について. *産婦人科の世界*, 55 : 863-870, 2003
- 7) Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan RS, Zborowska E, Kinzler KW, Vogelstein B : Inactivation of the Type II TGF- β receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 268 : 1336-1338, 1995
- 8) Rompino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC, Perucho M : Somatic frameshift mutation in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 275 : 967-969, 1997
- 9) Ikeda M, Orimo H, Moriyama H, Nakajima E, Matsubara N, Mibu R, Tanaka N, Shimada T, Kimura A, Shimizu K : Close correlation between mutation of E2F and hMSH3 genes in colorectal cancers with microsatellite instability. *Cancer Res* 58 : 594-598, 1998
- 10) Souza RF, Yin J, Smolinski KN, Zou TT, Wang S, Shi YQ, Rhyu MG, Cottrell J, Abraham JM, Biden K, Simms L, Leggett B, Bova GS, Frank T, Powell SM, Sugimura H, Young J, Harpaz N, Shimizu K, Matsubara N, Meltzer SJ : mutation of the E2F-4 cell cycle gene in primary human gastrointestinal tumors. *Cancer Res* 57 : 2350-2353, 1997
- 11) Planck M, Wenngern E, Borg A, Olsson H, Nilbert M : Somatic frameshift alterations in mononucleotide repeat-coating genes in different tumor types from an HNPCC family with germline MSH2 mutation. *Genes chromosome Cancer* 29 : 33-39, 2000
- 12) Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, Lanspa SJ, Lynch JF, Lynch PM, Cavalieri RJ, Boland CR : Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology* 104 : 1535-1549, 1993
- 13) Nystrom-Lahti M, Wu Y, Moisio AL, Hofstra RM, Osinga J, Mecklin JP, Jarvinen HJ, Leisti J, Buys CH, de la Chapelle A, Peltomaki P : DNA mismatch repair gene mutations in 55 kindreds with verified or putative hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Hum Mol Genet* 5 : 763-769, 1996
- 14) Moslein G, Tester DJ, Lindor NM, Honchel R, Cunningham JM, French AJ, Halling KC, Schwab M, Goretzki P, Thibodeau SN : Microsatellite instability and mutation analysis of *hMSH2* and *hMLH1* in patients with sporadic, familial and hereditary colorectal cancer. *Hum Mol Genet* 5 : 1245-1252, 1996
- 15) Wu Y, Nystrom-Lahti M, Osinga J : *MSH2* and

- MLH1* mutations in sporadic replication error-positive colorectal carcinoma as assessed by two-dimensional DNA electrophoresis. *Genes Chromosome Cancer* 18 : 269-278, 1997
- 16) Herfarth K, Kodner IJ, Whelan AJ. Mutations in *MLH1* are more frequent than in *MSH2* in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. *Genes Chromosome Cancer* 18 : 42-49, 1997
 - 17) Genuardi M, Anti M, Capozzi E, Leonardi F, Fornasaring M, Novella E, Bellacosa A, Valenti A, Gasbarrini GB, Roncucci L, Benatti P, Percesepe A, Ponz de Leon M, Coco C, de Paoli A, Valentini M, Boiocchi M, Neri G, Viel A : *MLH1* and *MSH2* constitutional mutations in colorectal cancer families not meeting the standard criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Int J Cancer* 75 : 835-839, 1998
 - 18) Nomura S, Sugano K, Kashiwabara H, Taniguchi T, Fukuyama N, Fujita S, Akasu T, Moriya Y, Ohhigashi S, Kakizoe T, Sekiya T : Enhanced detection of deleterious and other germline mutations of *hMSH2* and *hMLH1* in Japanese hereditary nonpolyposis colorectal kindreds. *Biochem Biophys Res Commun* 271 : 120-129, 2000
 - 19) 阪埜浩司, 進 伸幸, 平尾 健, 岩田 卓, 平澤 晃, 青木大輔, 野澤志朗 : 遺伝性非腺腫症性大腸癌(HNPCC)と子宮内膜癌. *家族性腫瘍* 3 : 62-67, 2003
 - 20) Banno K, Susumu N, Hirao T, Yanokura M, Hirasawa A, Aoki D, Udagawa Y, Sugano K, Nozawa S : Identification of germline *MSH2* gene mutations in endometrial cancer patients not fulfilling the new clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 146 : 58-65, 2003
 - 21) Watson P, Lynch HT : The tumor spectrum in HNPCC. *Anticancer Res* 14 : 1653-1640, 1994
 - 22) 野水 整, 土屋敦雄, 大木進司, 渡辺文明, 八巻義雄, 阿部力哉, 本多つよし, 佐藤 章, Vasen H : 遺伝性非ポリポーシス大腸癌家系にみられる子宮体癌の特徴. *外科* 58 : 186-189, 1996
 - 23) Sagawa T, Yamada H, Yamamoto R, Sakuragi N, Fujimoto S : Two cases of endometrial cancer meeting new criteria of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gynecol Oncol* 79 : 327-331, 2000
 - 24) Liu B, Parsons R, Papadopoulos N, Nicoladies NC, Lynch HT, Watson P, Jass JR, Dunlop M, Wyllie A, Peltomaki P, de la Chapelle A, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW : Analysis of mismatch re-
pair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nat Med* 2:169-174, 1996
 - 25) Han HJ, Yanagisawa A, Kato Y, Park JG, Nakamura Y : Genetic instability in pancreatic cancer and poorly differentiated type of gastric cancer. *Cancer Res* 53 : 5087-5089, 1993
 - 26) Horii A, Han HJ, Shimada M, Yanagisawa A, Kato Y, Ohta H, Yasui W, Tahara E, Nakamura Y : Frequent replication errors at microsatellite loci in tumors of patients with multiple primary cancers. *Cancer Res* 54 : 3373-3375, 1994
 - 27) Okamura S, Koyama K, Miyoshi Y, Monden M, Takami M : Novel germline mutation of *hMSH2* in a patient with hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) and in a patient with six primary cancers. *J Hum Genet* 1998; 43 : 434-40, 1998
 - 28) Yuan Y, Han HJ, Zheng S, Park JG : Germline mutations of *hMLH1* and *hMSH2* genes in patients with suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer and sporadic early onset colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 41 : 219-227, 1998
 - 29) Wang Q, Lasset C, Desseigne F, Saurin JC, Maugard C, Navvaro C, Ruano E, Descos L, Trillet-Lenoir V, Bosset JF, Puisieux A : Prevalence of germline mutations of *hMLH1*, *hMSH2*, *hPMS1*, *hPMS2* and *hMSH6* genes in 75 French kindreds with nonpolyposis colorectal cancer. *Hum Genet* 105 : 79-85, 1999
 - 30) 馬場正三, 松原長秀 : HNPCC in the year 2000. *マイライフ社*, p.25-31, 2000
 - 31) Kondo E, Furukawa T, Yoshinaga K, Kijima H, Semba S, Yatsuoka T, Yokoyama T, Fukushima S and Horii A : Not *hMSH2* but *hMLH1* is frequently silenced by hypermethylation in endometrial cancer but rarely silenced in pancreatic cancer with microsatellite instability. *Int J Oncol* 17 : 535-541, 2000
 - 32) Miyaki M, Konishi M, Tanaka K, Kikuchi-Yanoshita R, Muraoka M, Yasuno M, Igari T, Koike M, Chiba M, Mori T : Germline mutation of *MSH6* as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet* 17 : 271-272, 1997
 - 33) Akiyama Y, Sato H, Yamada T, Nagasaki H, Tsuchiya A, Abe R, Yuasa Y : Germline mutation of *hMSH6/GTBP* gene in an atypical hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindred. *Cancer Res* 57 : 3920-3923, 1997