

学位論文題名

BRCA1 mutation testing for Japanese patients with ovarian cancer in breast cancer screening

(乳癌検診での日本人の卵巣癌患者に対する *BRCA1* 変異の検索)

学位論文内容の要旨

緒言

卵巣癌(表層上皮性・間質性腫瘍)全体の約5~10%は、浸透率の異なる常染色体優性遺伝形式を示す家族性卵巣癌とされている。家族性卵巣癌は最近では、乳癌卵巣癌症候群と遺伝性非ポリポーシス大腸癌(HNPCC)と関連した卵巣癌とに大別される。家系内に乳癌・卵巣癌が多発する乳癌卵巣癌症候群は家族性卵巣癌全体の約85~90%を占め、その約90%に*BRCA1*、一部に*BRCA2*のgermline mutationが関与している。*BRCA1*変異の86%は蛋白中断型のナンセンスまたはフレームシフト変異であり、一般的には*BRCA1*遺伝子上に広く分布する。また、*BRCA1*変異のキャリアーが70歳までに乳癌・卵巣癌になる累積危険率は各々、87%・44%との報告がある。

教室の乳房外来には比較的多くの卵巣癌患者(受診者全体の約4%)が受診しており、我々は乳癌検診時に卵巣癌患者に*BRCA1*変異の検索を行うことの利点について検討した。

対象と方法

患者と検査材料 1996年2月から1998年4月までに教室の乳房外来で乳癌検診を受けた116例の卵巣癌(表層上皮性・間質性腫瘍)患者に、同意を得た後、*BRCA1*のexon 11の変異の検索を行った。末梢血リンパ球から抽出したゲノムDNAを変異検出のための検査材料とした。なお、患者の変異が確認された場合には、未成年者を除く患者の血縁者にも*BRCA1*変異の検索を勧めた。

SC(stop codon)アッセイ ゲノムDNAとプライマーを用いて増幅した*BRCA1*のexon 11を含むPCR断片に対して、SCアッセイにより*BRCA1*のexon 11の変異をスクリーニングした。PCR産物とgap vector (pCI-BR1bg)によるYPH499 (Stratagene)の形質転換はIshioka et al.の方法で行い、ロイシンを含まない培地で形質転換細胞を選択した後、ロイシンとウラシルを含まない培地での形質転換細胞の発育により、Ura⁺の頻度を算出した。Ura⁺が>80%の検体をホモ接合性野生型、Ura⁺が<70%の検体をヘテロ接合性中断型変異とした。

DNAシーケンス分析 ヘテロ接合性中断型変異が検出された検体には、変異を同定するためにDNAシーケンス分析を行った。4組のプライマー対を設定してPCR産物を部分的に重複させ、exon 11を完全に分析できるようにした。PCR産物はALFオートシーケンサー(Pharmacia Biotech)で分析した。

臨床・病理組織学的データ 乳癌検診を行う前に、癌に関する家族歴を面接により調査し、1)第1度・第2度近親者に患者を含めて2例以上の卵巣癌がいる患者、2)第1度・第2度近親者に3例以上の乳癌または卵巣癌がいる患者を乳癌卵巣癌症候群と診断した。卵巣癌の組織標本を鏡検し、組織型と組織分化度を判定した。組織分化度はShimizu et al.の分化度診断法により決定した。進行期(FIGO,1988)、重複癌、診断時年齢、生存月数などは診療記録から調べた。

統計解析 Fisher's exact probability test, Mann-Whitney's U test, Kaplan-Meier法, Mantel-Cox (log-rank) testを使用し, $p < 0.05$ を統計学的有意とした。

結 果

患者・血縁者におけるBRCA1のexon 11の変異

11例(9.5%, 11/116)の患者がSCアッセイでヘテロ接合性中断型変異と判定され, 7例(6.0%, 7/116)がDNAシーケンス分析で蛋白中断型のBRCA1の変異をもつことが判明した。

変異が検出された乳癌卵巣癌症候群の家系は4家系(A, B, C, D)であった。家系A, B, Cの患者は, 血縁者のBRCA1の変異の検索に協力的であった。変異型対立遺伝子(2508delGA: 家系A, Leu1216ter: 家系B, 1275insT: 家系C)と野生型対立遺伝子のヘテロ接合体が, これらの3家系で5例の患者を含む14例で確認された。乳癌卵巣癌症候群の1例の患者(2508delGA: 家系D)は, 血縁者にキャリアーが見つかった場合の精神的ショックと罪悪感に耐えられないという理由で, 血縁者のBRCA1変異の検索を拒否した。1例の散発性卵巣癌患者(2508delGA)は, 結果の判明前に卵巣癌のために腫瘍死したため, 血縁者の検索は遂行できなかった。

BRCA1のexon 11の変異をもつ患者の臨床・病理組織学的特徴

III期+IV期の進行例, 漿液性腺癌, G2+G3の組織分化度, 乳癌卵巣癌症候群, 重複癌としての乳癌を有していた症例が, 変異のない群と比べて変異のある群で有意に多かった($p=0.002$, $p=0.0006$, $p=0.01$, $p<0.0001$, $p=0.003$)。変異のある群とない群における卵巣癌の平均診断時年齢は51.0歳と51.2歳であり, 両群間で差を認めなかった。また, III期+IV期の症例の予後に関しても両群間で有意差はなかった($p=0.55$)。

BRCA1のexon 11の変異をもつ患者・血縁者の管理

今回の検討で, 7例の患者を含む16例がBRCA1のexon 11の変異のキャリアーであることが確認された。卵巣癌で死亡した4例の患者と3例の男性のキャリアーを除いた9例の女性のキャリアーには, 監視の強化(increased surveillance)と予防的手術(乳房切除術, 卵巣摘出術)について説明したところ, 全員が前者を選択した。我々は, これらの女性のキャリアーに対し, 1998年4月以来6ヶ月毎に乳癌検診(視診・触診, 超音波断層法, マンモグラフィ)と卵巣癌検診(内診, 経膈超音波断層法, CA125などの腫瘍マーカー検査)を行っているが, 現時点では新たな乳癌・卵巣癌は発見されていない。なお, 今回の検索の結果が陰性であった患者には, 癌の発生における遺伝的素因の関与は否定できないことを説明した。

考 察

BRCA1変異の検索に伴う問題点として, プライバシーの侵害, 雇用・保険・結婚における遺伝的差別の危険性, 自分の遺伝情報を知ることによる心理的悪影響などが従来より指摘されているが, これらのほとんどが本研究でも観察された。また, BRCA1変異のキャリアーは一般の米国婦人では200~400人に1人, 日本人女性では2,000~2,500人に1人と低頻度であることも検索上の問題とされている。しかし, 我々は卵巣癌患者に対して選択的に検索を行ったため, 比較的高率(6.0%)にBRCA1変異のキャリアーを検出することが可能であった。

本研究で認められたBRCA1変異と関連した卵巣癌の臨床・病理組織学的特徴の把握は, 卵巣癌患者にBRCA1変異の検索を行うかどうかを判断する際の参考になると考えられる。欧米では若年発症が, BRCA1変異と関連した卵巣癌のもう一つの特徴とされている。しかし, 本研究ではBRCA1変異の有無による卵巣癌の診断時年齢には差はみられず, またMatsushima et al., Aida et al.も診断時年齢に差はなかったと報告していることから, 若年発症はBRCA1変異と関連した日本人の卵巣癌の特徴ではないのかも知れない。

BRCA1変異のキャリアーには, 最近では説明と同意のもとに, 監視の強化または予防的手術のいずれかが行われている。本研究では予防的手術を選択したキャリアーはいなかった。Burke et al.もキャリアーに対して早期からの監視の強化を勧めているが, 実際に予後が改善されるかについては現在のところ不明であり, 今後のデータの蓄積が必要である。

キャリアーに対するカウンセリングは、乳房外来で乳癌・卵巣癌検診を行う際に我々自身が行っている。キャリアーの悩みを聞き、アドバイスをすることはもちろん大切であるが、乳癌・卵巣癌検診などのフォローアップに責任をもち、信頼関係を築くことに勝るカウンセリングはないと考えている。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 木 敬
副 査 教 授 長 嶋 和 郎
副 査 教 授 藤 本 征 一 郎

学 位 論 文 題 名

BRCA1 mutation testing for Japanese patients with ovarian cancer in breast cancer screening

(乳癌検診での日本人の卵巣癌患者に対する *BRCA1* 変異の検索)

家系内に乳癌・卵巣癌が多発する乳癌卵巣癌症候群は家族性卵巣癌全体の約 85~90%を占め、その約 90%に *BRCA1* の germline mutation が関与している。*BRCA1* 変異の 86%は蛋白中断型のナンセンスまたはフレームシフト変異であり、一般的には *BRCA1* 遺伝子上に広く分布する。*BRCA1* 変異のキャリアーが 70 歳までに乳癌・卵巣癌になる累積危険率は各々、87%・44%とされている。

教室の乳房外来には卵巣癌患者(受診者全体の約 4%)が受診しており、申請者は乳癌検診時に卵巣癌患者において *BRCA1* 変異の検索を行うことの臨床的意義について検討した。

乳癌検診を受けた 116 例の卵巣癌(表層上皮性・間質性腫瘍)患者に、同意を得た後、*BRCA1* の exon 11 の変異の検索を行った。変異が確認された場合には、未成年者を除く患者の血縁者にも *BRCA1* 変異の検索を勧めた。

ゲノム DNA とプライマーを用いて増幅した *BRCA1* の exon 11 を含む PCR 断片に対して、SC(stop codon)アッセイにより *BRCA1* の exon 11 の変異をスクリーニングした。PCR 産物と gap vector (pCI-BR1bg)による YPH499 (Stratagene)の形質転換は Ishioka et al.の方法で行い、ロイシンを含まない培地で形質転換細胞を選択した後、ロイシンとウラシルを含まない培地での形質転換細胞の発育により、Ura⁺の頻度を算出した。Ura⁺が>80%の検体をホモ接合性野生型、Ura⁺が<70%の検体をヘテロ接合性中断型変異とした。

ヘテロ接合性中断型変異が検出された検体には、変異を同定するために DNA シークエンス分析を行った。4 組のプライマー対を設定して PCR 産物を部分的に重複させ、exon 11 を分析した。PCR 産物は ALF オートシーケンサー(Pharmacia Biotech)で分析した。

乳癌検診前に、癌の家族歴を面接調査し、1) 第 1 度・第 2 度近親者に患者を含めて 2 例以上の卵巣癌がいる患者、2) 第 1 度・第 2 度近親者に 3 例以上の乳癌または卵巣癌がいる患者を乳癌卵巣癌症候群と診断した。卵巣癌の組織標本を鏡検し、組織型と組織分化度を判定した。進行期(FIGO,1988)、重複癌、診断時年齢、生存月数などは診療記録から調べた。

統計解析には、Fisher's exact probability test, Mann-Whitney's U test, Kaplan-Meier 法, Mantel-Cox (log-rank) test を使用した。

11例(9.5%, 11/116)がSCアッセイでヘテロ接合性中断型変異と判定され、DNAシーケンス分析で7例(6.0%, 7/116)が蛋白中断型の*BRCA1*の変異をもつことが判明した。

変異が検出された乳癌卵巣癌症候群の家系は4家系(A, B, C, D)であった。家系A, B, Cの3家系では、血縁者の*BRCA1*の変異の検索に協力的で、変異型対立遺伝子(2508delGA: 家系A, Leu1216ter: 家系B, 1275insT: 家系C)と野生型対立遺伝子のヘテロ接合体が、5例の患者を含む14例で確認された。1例の患者(2508delGA: 家系D)は、血縁者の*BRCA1*変異の検索を拒否した。1例の散発性卵巣癌患者(2508delGA)は、結果判明前に腫瘍死したため、血縁者の検索を遂行できなかった。

*BRCA1*のexon 11の変異をもつ患者の臨床・病理組織学的特徴としては、III期+IV期の進行例、漿液性腺癌、G2+G3の組織分化度、乳癌卵巣癌症候群、重複癌としての乳癌を有していた症例が、変異のない群と比べて変異のある群で有意に多かった($p=0.002$, $p=0.0006$, $p=0.01$, $p<0.0001$, $p=0.003$)。変異のある群とない群における卵巣癌の平均診断時年齢ならびにIII期+IV期の症例の予後に関しては両群間で差はなかった。

卵巣癌で死亡した4例の患者と3例の男性キャリアーを除いた9例の女性キャリアーに、監視の強化と予防的手術(乳房切除術, 卵巣摘出術)について説明したところ、全員が前者を選択した。

公開発表に際し、副査の長嶋教授から、*BRCA1*のexonの選択について、SCアッセイでのpoint mutationの検出の可能性、日本人における*BRCA1*変異頻度が低い理由、変異陽性の卵巣癌の組織型、などについての質問と乳癌と卵巣癌の発症年齢の相違から乳癌検診での変異検査の意義についての確認があった。副査の藤本教授からは、進行卵巣癌における変異の有無と予後との関係、男性キャリアーに対する監視の強化の内容、女性キャリアーに対する予防的手術の意義、などについて質問があった。主査の吉木教授からは、*BRCA1*がコードしているタンパクの機能、遺伝子発現の臓器特異性、epigenetic factorを含む変異頻度の人種的差異、変異陽性の卵巣癌の組織型が漿液性腺癌であること、変異陽性の場合の乳癌の組織型の特徴、予防的手術以外の治療法、遺伝子治療の可能性、などについて質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は自身の解析結果と文献的情報をもとに概ね妥当な回答をなした。

審査員一同は、乳癌検診での日本人卵巣癌患者における*BRCA1*変異の検索の臨床的意義を初めて示唆した本研究の成果を評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに資格を有するものと判定した。