

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）  
遺伝学的検査の実施拠点の在り方に関する研究  
分担研究報告書

家族性腫瘍の遺伝学的検査の提供体制の研究

研究分担者 古川 洋一 東京大学医科学研究所教授

研究要旨

家族性腫瘍の遺伝子検査は、その必要性は高いが保険収載されているものはまだない。リンチ症候群や家族性大腸腺腫症などの遺伝性大腸がん、遺伝性乳がん卵巣がん症候群、家族性甲状腺がんや多発性内分泌腺腫症などの遺伝子検査は企業により提供されている。しかしその結果の解釈について、まだ十分な体制が整っているわけではない。また検査の感度が十分とは言えないものもある。家族性大腸腺腫症(FAP)は、約7~8の患者に原因遺伝子APCに異常が認められるが、異常が認められない患者もいる。そこで我々は、APCに異常を認めない家族性大腸腺腫症の全ゲノム解析を行い、病気の原因となる変異が同定できるかどうか試みた。

A. 研究目的

現在、家族性腫瘍に対する遺伝学的検査は、企業あるいは大学の研究室等により提供されている。これらの検査は、それぞれの疾患の原因遺伝子に絞って、主にPCRダイレクトシーケンス法などで塩基配列を調べるものである。しかし次世代シーケンス解析装置の出現により、一度に全ての遺伝子について調べることが可能となった。全ゲノム解析やエクソーム解析により、これまで原因遺伝子に異常が見つからない家族性腫瘍の原因が明らかとなる可能性が高い。

家族性大腸腺腫症は、大腸を中心に多数のポリープが発生する遺伝性の疾患である。原因遺伝子としてAPC遺伝子が同定され、患者の7~8割に病気の原因となる異常が存在するが、APCに異常を認めない例も存在する。さらにAPC以外の原因遺伝子として、MUTYHやPOLD1、POLE 遺伝子の異常も報告されている。したがって、APC遺伝子に異常を認めなかった場合には、これらの原因遺伝子の検査も必要であるとともに、未同定の新たな原因遺伝子異常が関与する可能性がある。そこで我々は、PCRダイレクトシーケンス法でAPCに異常を認めなかった家族性大腸腺腫症の患者のDNAを用いて、全ゲノム解析を行い、病気の原因となる変異の同定を試みた。

本研究は、これまでの原因遺伝子のみを調べる遺伝子検査で同定できない、家族性腫瘍の原因を明らかにするための解析方法の基盤を構築することを目的としている。

B. 研究方法

共同研究機関で治療を受けた家族性大腸腺腫症患者のうち、遺伝カウンセリングを受けて遺伝子検査の説明と同意を得、PCRダイレクトシーケンス法による解析でAPC遺伝子に異常を認めない患者1名を対象とした。

血液から抽出したDNAを用いて、illumina HiSeq 2000により全ゲノム解析(WGS)を行った。得られたデータは、本研究所ヒトゲノム解析センターのDNA情報解析分野にてMappingを行い、さらにヒトゲノム標準配列と比較した。(倫理面への配慮)

本研究は、共同研究施設および当研究所の倫理審査委員会の承認のもとに行われた。研究参加者には、ゲノム解析を含む研究の説明を行い、研究参加の任意性などを説明し、インフォームドコンセントを得て行われた。連結可能匿名化後に、試料を受領し解析が行われた。

C. 研究結果

1. 変異の同定  
今回の解析では、約400万か所の変異を同定した。これらの変異の中で、エクソンおよびスプライスサイトの変異は約3万か所であった。
2. 原因となる変異の同定  
まず、APC遺伝子に着目してエクソン内の変異の検討を行った。その結果8つのsingle nucleotide variants (SNVs)が同定された。

このうち、7つはPCRダイレクトシーケンシング (Sanger法)でも同定されていた。残る1つは同定されていなかった。この変異の頻度は6/50 (12%)であった。

### 3. Deep Sequencingによる変異アレルの検討

上記変異について再度Sanger法により変異を確認したが、変異とは判定不可能であった。そこで変異のある細胞頻度が少ない可能性を考え、IonPGMシーケンサーを用いて変異頻度を検討した結果、coverage=3726にて12%の変異を認めた。

## D . 考察

上記APC遺伝子の変異は、ナンセンス変異でありタンパクの機能を喪失する変異であった。しかし、血液細胞から抽出したDNAの中で約12%であったため、体細胞モザイクの状態が強く疑われた。体細胞モザイクでは、臓器毎にその変異細胞の割合が異なる可能性がある。他の正常臓器 (特に大腸) での変異の検出が必要である。また両親の血液を調べ、変異の有無を検討することが望まれる。本症例では両親がポリポーシスではないことが分かっているため、患者受精卵に起こった*De novo*変異である可能性は十分に考えられる。

## E . 結論

本研究ではAPC以外の遺伝子の病的変異を予想して研究を行ったが、予想に反してSanger法のシーケンシングでは同定できないAPC変異を同定した。本変異が受精卵に起こった新生変異であること、病気の原因となっていることを確認する必要があるが、次世代シーケンサー

による解析法が、感度の点で従来の検査法より優れていることを示唆するものである。

## G . 研究発表

### 1. 論文発表

- Yamamoto S, Ebihara Y, Mochizuki S, Kawakita T, Kato S, Ooi J, Tojo A, Yusa N, Furukawa Y, Oyaizu N, Watanabe J, Sato K, Kimura F, and Tsuji K. Quantitative PCR detection of CEP110-FGFR1 fusion gene in a patient with 8p11 syndrome. *Leukemia & Lymphoma*, 54(9): 2068-9, 2013.
- Shigeyasu K, Tanakaya K, Nagasaka T, Aoki H, Fujiwara T, Sugano K, Ishikawa H, Yoshida T, Moriya Y, Furukawa Y, Goel A, Takeuchi H. Early detection of metachronous bile duct cancer in Lynch syndrome: report of a case. *Surg Today*. Jul 31, Epub, 2013.

### 2. 学会発表

次世代シーケンサーがもたらす近未来の医療  
(第19回日本家族性腫瘍学会学術集会 2013年7月27日 大分)

## H . 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト（参考）

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamamoto, S., Ebihara, Y., Mochizuki, S., Kawakita, T., Kato, S., Ooi, J., Tojo, A., Yusa, N., Furukawa, Y., Oyaizu, N., Watanabe, J., Saito, K., Kimura, F., and Tsuji, K.	Quantitative PCR detection of CEP110-FGFR1 fusion gene in a patient with 8p11 syndrome.	Leukemia & Lymphoma	54(9).	2068-2069	2013
Shigeyasu K, Tanaka K, Nagasaka T, Aoki H, Fujiwara T, Sugano K, Ishikawa H, Yoshida T, Moriyama Y, Furukawa Y, Goel A, Takeuchi H.	Early detection of metachronous bile duct cancer in Lynch syndrome: report of a case.	Surgery Today	Jul 31	Epub	2013