



## Detection of known missense mutation of hMLH1 in a hereditary non- polyposis colorectal cancer family using DNA extracts from mouthwash samples

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 中村, 穰志 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1097">http://hdl.handle.net/10271/1097</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 244号	学位授与年月日	平成10年 3月26日
氏 名	中 村 穰 志		
論文題目	<p>Detection of known missense mutation of <i>hMLH1</i> in a hereditary non-polyposis colorectal cancer family using DNA extracts from mouthwash samples  (口腔内洗浄液中 DNA を用いた遺伝性非ポリポーシス大腸癌家系構成員の hMLH1 遺伝子異常の検索)</p>		

博士(医学) 中 村 穰 志

## 論文題目

Detection of known missense mutation of *hMLH1* in a hereditary non-polyposis colorectal cancer family using DNA extracts from mouthwash samples.

(口腔内洗浄液中 DNA を用いた遺伝性非ポリポーシス大腸癌家系構成員の *hMLH1* 遺伝子異常の検索)

## 論文内容の要旨

### 〔はじめに〕

近年、遺伝性非ポリポーシス大腸癌 (HNPCC) の原因遺伝子として、*hMLH1* 遺伝子が同定され、この遺伝子が DNA 複製の際のミスマッチ修復に関与していることが判明した。今回われわれは、発端者に *hMLH1* 遺伝子異常を認めた HNPCC 家系内において、口腔内洗浄液中の脱落細胞の DNA を用いて、家系構成員の *hMLH1* 遺伝子の変異を検索した。

### 〔患者ならびに方法〕

発端者および同一家系内の 4 名の癌患者に *hMLH1* 遺伝子のエクソン 16 のコドン 582 に CTC→GTC (ロイシン→バリン) の点突然変異を認めた、5 世代にわたる HNPACC 家系で、検体採取可能であった 20 例 (第 3 世代: 発端者を含め 5 例、第 4 世代: 7 例、第 5 世代: 8 例) を対象とした。

生理食塩水での口腔内洗浄液から DNA を抽出後、*hMLH1* 遺伝子のエクソン 16 のコドン 582 を含む領域を PCR 法にて増幅した。PCR 産物を制限酵素 *Msp I* で切断した後、電気泳動し、異常なバンドを検出した (PCR-RFLP 法)。各症例のダブルチェックとして、アレル特異的 PCR 法 (AS-PCR 法) あるいはダイレクトシーケンスを施行した。また、各症例について血液サンプルから DNA を抽出後、遺伝子変異を検索し、口腔内洗浄液からのサンプルでの結果と比較検討した。

### 〔結果〕

PCR-RFLP 法にて、20 例中、発端者および第 4 世代 2 例、第 5 世代 2 例の計 5 例に、*hMLH1* 遺伝子のエクソン 16 のコドン 582 に遺伝子変異を認めた。これら 5 例について、AS-PCR 法あるいはダイレクトシーケンスを用いてダブルチェックを施行し、コドン 582 に CTC→GTC (ロイシン→バリン) の変異を確認した。また、これらの症例の血液サンプルからも同様の結果を得た。

### 〔考察〕

遺伝子変異を認めた 5 例中、発端者以外の 4 例は、諸検査にて大腸あるいは他臓器に癌を認めず、変異型保因者と考えられた。このうち、第 4 世代 (子) と第 5 世代 (孫) が変異型保因者であるが、第 3 世代 (母) に変異がなかった症例について、その配偶者の遺伝子を検索したところ、第 4 世代と第 5 世代と同様の遺伝子変異を認めた。家系の再調査をおこなったところ、血族結婚であることが判明し、第 4 世代と第 5 世代の遺伝子変異は、父親由来であることがわかった。また、この遺伝子変異がポリモルフィズムの可能性があるため、健常人 60 家系の *hMLH1* 遺伝子のエクソン 16 のコドン 582 の遺伝子変異を検索したが、同様の塩基置換は認められなかった。

## 〔結果〕

口腔内洗浄液と血液サンプルの結果が一致したことより、遺伝子変異の検索に関して、従来の血液サンプルのDNAを用いた遺伝子診断法だけでなく、口腔内洗浄液のDNAを用いた検索法も有用であると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

## 〔はじめに〕

遺伝性非ポリポーシス大腸癌（HNPCC）は同一家系内に大腸あるいは他臓器に癌が好発する常染色体優性遺伝性の疾患である。近年hMSH2遺伝子やhMLH1遺伝子などDNAミスマッチ修復遺伝子の異常がこの疾患に関与していることが判明した。現在までにHNPCC発端者の遺伝子変異は数多く報告されているが、家系構成員については、第一度近親者数名の遺伝子解析の報告が散見されるのみである。申請者は、発端者にhMLH1遺伝子変異を認めた本邦のHNPCC最大家系構成員20名について、含嗽による口腔粘膜脱落細胞のDNAを用いてhMLH1遺伝子変異を検索した。

## 〔患者ならびに方法〕

発端者および家系内の4名の癌患者にhMLH1遺伝子のエクソン16コドン582にCTC→GTC（ロイシン→バリン）の点突然変異を認めた、5世代にわたるHNPCC家系で、検体採取可能であった20例を対象とした。

生理食塩水での口腔内洗浄液から口腔内脱落細胞を採取し、DNAを抽出後、hMLH1遺伝子のエクソン16コドン582を含む領域をPCR法にて増幅。PCR産物を制限酵素MspIで切断後、MspI認識配列をもつ変異アレルを検出した。各症例のダブルチェックとして、PCR増幅の際、3'末端にミスマッチを持つプライマーを使用したアレル特異的PCR法（AS-PCR法）あるいは直接塩基配列決定法を施行した。

また、採血可能であった症例について血液サンプルでの遺伝子変異を検索し、口腔内洗浄液での結果と比較検討した。

## 〔結果〕

PCR-RFLP法にて、20例中6例に変異アレルを認めた。これらについて、AS-PCR法あるいは直接塩基配列決定法を用いてダブルチェックを施行し、hMLH1遺伝子のエクソン16コドン582にCTC→GTC（ロイシン→バリン）の変異を確認した。また、血液サンプルからも同様の遺伝子変異を認めた。

## 〔考察〕

遺伝子変異を認めた6例中、発端者以外の5例は、諸検査にて大腸あるいは他臓器に癌を認めず、変異型保因者と考えた。このうち、第4世代（子）と第5世代（孫）が変異型保因者であるが、第3世代（母）に変異がなかった症例について、その配偶者（胃癌の既往歴あり）の遺伝子を検索したところ、第4世代と第5世代と同様の遺伝子変異を認めた。詳細な家系の再調査をおこなったところ、第3世代（母）とその配偶者が血族結婚であることが判明し、第4世代と第5世代の遺伝子変異は、配偶者由来であることがわかった。また、この遺伝子変異がDNA多型の可能性があるため、健常人60家系のhMLH1遺伝子のエクソン16コドン582の遺伝子変異を検索したが、同様の塩基置換は認めなかった。

# 〔結論〕

HNPCC は、発癌以前の段階での特徴的な表現型を持たない。従って、発癌のリスク判定として遺伝子変異の検索が有用であると考えられる。家系毎の hMSH2 遺伝子や hMLH1 遺伝子の変異の検索は労力を要するが、変異が確認されればその家系構成員の検索は比較的容易と考えられる。遺伝子解析には、血液サンプルがよく用いられるが、血液採取時の煩雑さが原因となり多症例のサンプル収集が難しくなることもある。申請者は、より簡便な口腔内洗浄液中の脱落細胞を用いた検出法の評価を行い、良好な結果を得た。口腔内洗浄液は、自宅で採取可能であり、研究施設へも郵送できるという簡便性から、スクリーニング法としてきわめて有用であり、遺伝子診断の臨床応用という観点で有益であると考えられた。

以上の研究に関し、審査委員会では以下のような質疑を行った。

- 1) 口腔内洗浄液からの DNA 収量と他のサンプリング法との比較
- 2) サンプル採取時のコンタミネーションの影響はあるか
- 3) PCR 増幅時に使用したプライマーの量が通常よりも多い理由
- 4) PCR 増幅時のコンタミネーション防御について
- 5) PCR-RFLP 法に用いたアンチセンスプライマーを長く設定した理由
- 6) アレル特異的 PCR 法の再現性と信頼性について
- 7) アレル特異的 PCR 法の特異性をあげる工夫について
- 8) ダイレクトシーケンスゲル中の尿素の意義
- 9) エクソン 16 は DNA 結合部位か
- 10) DNA 多型の判定法について
- 11) 他の突然変異の検索法について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士（医学）の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 教授 梶 村 春 彦

副査 教授 金 子 榮 蔵      副査 教授 小 出 幸 夫