

家族性大腸腺腫症のゲノム APC 遺伝子変異と臨床徴候の関係に関する研究

小堀陽一郎

背景：家族性大腸腺腫症（FAP）は多発性大腸腺腫と多彩な大腸外病変を特徴とし、adenomatous polyposis coli（APC）遺伝子変異に起因する遺伝性疾患と考えられている。本症における遺伝子診断の意義を明らかにするため、APC 遺伝子変異と臨床徴候の関係を検討した。

対象と方法：大腸および大腸外病変から FAP と臨床診断した32家系44例を対象とし、以下を検討した。1) 生殖細胞 APC 遺伝子変異を PCR-SSCP 法、ないし PTT 法でスクリーニングし、5'側（エクソン1-12）変異群、3'側（エクソン13-15）変異群、変異陰性群の3群に分け、大腸病変の程度、胃・十二指腸腺腫の頻度と経過、および他の大腸外病変（骨腫、デスマイド、網膜色素上皮過形成）の頻度を比較検討した。2) 変異陽性例の塩基配列異常を検索し、上記臨床徴候と対比した。

結果：1) 7家系8例は5'側変異群、11家系22例は3'側変異群、14家系14例は変異陰性群であった。3'側変異群では他の2群よりも密生型大腸腺腫症、十二指腸非乳頭部腺腫、および網膜色素上皮過形成の頻度が有意に高かったが、十二指腸非乳頭部腺腫の進展との関係は明らかではなかった。2) 8家系11例に nonsense 変異を、8家系17例に frameshift 変異を認めた。コドン161および1556の変異家系は大腸腺腫症が散在性で鋸歯状腺腫を伴っていた。コドン1556変異家系では顕著な進行性十二指腸腺腫症を、コドン1530変異家系では浸潤性デスマイド腫瘍の発生を認めた。

結論：APC 遺伝子変異部位の違いによる臓器特異的な FAP の形質発現を明らかにした。従って本遺伝子診断は FAP 患者の管理方針決定の一助となりうると考えられる。しかし、FAP の原因としては、APC 遺伝子以外の遺伝的素因の関与も推測された。

（平成13年10月16日受理）

Correlation between APC Germline Mutation and Clinical Phenotype in Familial Adenomatous Polyposis

Yoichiro KOBORI

Background : Familial adenomatous polyposis (FAP) is an autosomal dominant disease characterized by the occurrence of multiple colorectal adenomatous polyps and various extracolonic manifestations. The gene responsible for FAP is the adenomatous polyposis coli (APC) gene. To investigate the clinical significance of the APC gene analysis in the disease, I searched for APC

germline mutations in our FAP patients, and compared them with clinical manifestations.

Subjects and methods : The subjects were 44 FAP patients from 32 families. The *APC* gene in these subjects was screened by polymerase chain reaction based-single strand conformation polymorphism or the protein truncation test. The patients were divided into a 5' mutation group (exons 1-13), a 3' mutation group (exon 15) and a negative group. The types of colorectal polyposis, the frequencies of gastroduodenal adenomatosis and extraintestinal manifestations (osteoma, desmoid tumors, congenital hypertrophy of the retinal pigment epithelium), and the clinical course of duodenal adenomatosis were compared among the three groups. In the 3' and 5' mutation groups, the mutation was further determined by sequencing analysis.

Results : Eight patients from 7 families had a 5' mutation and 22 from 11 families had a 3' mutation. The remaining 14 patients from 14 families were negative for *APC* gene mutation. The prevalence of profuse polyposis, duodenal adenomatosis and congenital hypertrophy of the retinal pigment epithelium were significantly higher in the 3' mutation group than in the 5' mutation group and the negative group. However, there was no difference in the prevalence of progressive duodenal adenomatosis. Fifteen different mutations were detected in 16 families. Eight mutations in eight families were nonsense mutations, while seven in eight families were frameshift mutations. Three families with mutations at codons 161, 332 and 1556 had sparse colorectal adenomatosis with serrated adenoma. A family with a mutation at codon 1556 had severe and progressive duodenal adenomatosis. A family member with a mutation at codon 1530 had severe desmoid tumors.

Conclusion : There is a close correlation between genotypic and phenotypic features in FAP with *APC* gene mutations. Therefore, *APC* gene analysis seems to be a clue that can be used in an individual surveillance program. It is also suggested that genes other than the *APC* gene may be responsible for the development of FAP. (Accepted on October 16, 2001) *Kawasaki Igakkaishi* 27(4) :

279-292, 2001

Key Words ① Familial adenomatous polyposis ② *APC* gene
③ Germline mutation

はじめに

家族性大腸腺腫症 (familial adenomatous polyposis ; 以下 FAP) は大腸に腺腫性ポリープが多発し、放置すれば大腸癌が必発する常染色体優性の遺伝性疾患である。本症では上部消化管病変、骨・軟部腫瘍、網膜色素上皮過形成などの多彩な大腸外腫瘍状病変が発生する。1980年代後半に、本症の原因遺伝子が第5染色体の長腕 (5q21-22) に存在することが確認され^{1)~3)}、1991年に adenomatous polyposis coli (*APC*) 遺伝子として単離された。その後、*APC* 遺伝子

は15のエクソンから成り、細胞増殖の調節に関与する遺伝子であることが明らかとなっている^{4)~7)}。

APC 遺伝子の塩基配列が確定して以来、欧米では遺伝子診断の臨床的意義や *APC* 蛋白の機能解明を目的として FAP の臨床徴候と *APC* 遺伝子異常の関係が研究されている^{8)~10)}。しかし、本邦では *APC* 遺伝子と大腸病変の程度との関係が検討されているにすぎず^{11), 12)}、大腸外病変との関係については十分な検討がなされていない。一方、本症患者の予後規定因子の一つとして十二指腸癌の発生が問題となっている¹³⁾が、*APC* 遺伝子異常と上部消化管病変の

程度や自然史の関係については未だ明らかにされていない。

さらに、近年、典型的 FAP よりも高齢で散在性到大腸腺腫が発生し、生殖細胞 APC 遺伝子変異を認める attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP) 家系^{14), 15)}や大腸腺腫の特殊型である鋸歯状腺腫が多発する serrated adenomatous polyposis^{16), 17)}の存在が報告されているが、これらの疾患と APC 遺伝子との関係については十分には解明されていない。

そこで、今回の研究では臨床的に FAP と診断された患者の生殖細胞 APC 遺伝子変異を検索し、臨床徴候、なかでも消化管病変との関係を遡及的および可及的に対比することで、本症の原因、診断、および治療方針を含めた患者管理における遺伝子診断の意義を考察した。

対象と方法

1. 対象

川崎医科大学消化器Ⅱ内科および関連施設で診断し、少なくとも初回診断時の臨床徴候を十分に検索しえた FAP 患者53家系69症例のうち、十分なインフォームド・コンセントののち、遺伝子解析に関する同意を得た32家系44例（男性23例、女性21例）を対象とした。今回の検討では、家族歴の有無を問わず切除大腸ないし大腸X線・内視鏡検査で100個以上の大腸ポリープを認め腺腫の組織像が確認されたもの、あるいは大腸ポリープは100個以下でも、家族歴あるいは下記に示す大腸外病変を少なくとも一つ以上認めた症例を FAP と診断した。

2. APC 遺伝子スクリーニング

APC 遺伝子スクリーニング法には、操作が比較的簡便、迅速、高感度であるなどの理由から以前より遺伝子突然変異の検出に多く利用されてきた polymerase chain reaction-based single strand conformation polymorphism (以下 PCR-SSCP) 法ないし、APC 遺伝子変異のほとんどが終止 codon を伴うことなどを利用し、より簡便な方法として近年開発された protein truncation

test (以下 PTT) 法を用いた。DNA は対象の末梢血から salting out 法¹⁸⁾に従い Stratagene 社製の抽出キットを用いて、また RNA は AGPC (acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction) 法¹⁹⁾を用いて抽出した。

1) PCR-SSCP 法⁶⁾

抽出した DNA を用い、APC 遺伝子を Groden らの報告⁶⁾に準じて37対のプライマーを用いて PCR 法で増幅した。なお、APC 遺伝子エクソン1から14までは各エクソンにプライマー1対が対応し、APC 遺伝子の約80%を占めるエクソン15に対しては23区域に分けて設定したプライマーを用いた⁶⁾。

PCR 反応は増幅器として Perkin-Elmer 社製 GeneAmp PCR System 2400 を用い、10 mM Tris 緩衝液、50 mM KCl、2.5 mM MgCl₂、dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各200 μM とプライマー1対を含む反応液に DNA 1.0 μl を加え、ポリメラーゼ (AmpliTaq Gold™, Applied Biosystems 社製) 2.5単位を添加して行った。反応条件は、熱変性94℃60秒、アニーリング50℃ないし55℃90秒、伸長反応72℃60秒を1サイクルとし、35サイクル反応させた。

以上で増幅した DNA 断片を95℃で3分間加熱後、10倍希釈 TBE 緩衝液 (90 mM Tris, ホウ酸, 2 mM EDTA) および TEMED 30 μl を添加した12%ポリアクリルアミドゲル上で、60 W, 4℃, 6時間電気泳動し、第一化学薬品社製 2D 銀染色試薬で染色して変異バンドの有無を検出した。

2) PTT 法²⁰⁾

PTT 法では APC 遺伝子を6領域に分断して PCR 法で増幅した (Fig. 1)。その際、5'側の2領域 (領域 A, B) では RNA を逆転写した cDNA を、その他の4領域 (領域 C~F) では DNA を用いた。各領域のプライマー対のうちセンスプライマーの5'側に T7 コンセンサスプロモーター配列と Kozak コンセンサス配列の計39塩基を追加して反応させた。以上の PCR 産物をウサギ網状赤血球ライセートによる in vitro 翻訳系に添加して APC 蛋白の一部を合成

した。合成蛋白を SDS-PAGE を用いて電気泳動し、短縮蛋白の有無を検出した。

3) ダイレクト・シーケンス²¹⁾

スクリーニング陽性患者の変異 PCR 産物を用いて塩基配列を検索した。PCR 産物を Quiagen 社製 DNA 精製キットで精製後、Dye Terminator 法²¹⁾でダイレクト・シーケンスした。まず、PCR 産物を Perkin-Elmer 社製サイクルシーケンスキットを用い、標準設定でシーケンス反応させた。この際、PCR-SSCP 法と同じプライマーを用いた。次に、Applied Biosystems 社製オートシーケンサー (ABI PRISM 310) で泳動および解析し、塩基配列を決定した。結果は対立する遺伝子配列を 2 回以上解析し、恒常性のある配列異常を陽性とした。なお、スクリーニング陽性かつダイレクト・シーケンス陰性例では RNA をテンプレートとした cDNA のシーケンスまで行い、スプライシング変異の有無を検討した。

3. 臨床病理学的事項

FAP の臨床病理学的事項として下記を検討した。その際、初回診断時および本研究までの診療記録を用いた。

1) 一般的事項

診断時年齢、大腸腺腫症ないし大腸癌の家族歴を確認した。

2) 大腸病変

術後患者では切除大腸における肉眼的ポリープ数と大腸癌の有無を検討した。手術未施行例では初回診断時の大腸 X 線検査ないし大腸内視鏡検査からポリープ数を計測した。ポリープ

数は100個未満 (極散在型)、100以上1000個未満 (散在型)、ないし1000個以上 (密生型) に分類した。さらに、大腸非切除患者では、大腸内視鏡下に採取した生検組織における Longacre ら²²⁾の報告した鋸歯状腺腫の有無を検討した。

3) 大腸外消化管病変

初回診断時に施行した X 線・内視鏡および生検所見から、胃底腺ポリポース、胃腺腫、および十二指腸腺腫の有無を検討した。十二指腸腺腫は十二指腸乳頭部腺腫と非乳頭部腺腫に分けて検討した。

対象44例中19例では上部消化管病変の長期経過についても検討した。経過観察期間は最短6年、最長25年で、平均14.6年であった。乳頭部腺腫に関しては Iida らの基準²³⁾に従い、内視鏡所見から正常 (非腺腫および腺腫)、軽度腫大、著明腫大に分類した。また、非乳頭部腺腫の程度は Spigelman らの報告¹³⁾に従い、病変数、大きさ、および組織型と異型度で stage I から IV に分類した。

4) 消化管外病変

初回診断時および経過観察中の皮膚病変 (類表皮嚢胞、線維腫)、骨・軟部腫瘍 (骨腫、デスモイド腫瘍)、眼病変 (網膜色素上皮過形成) の有無を検討した。これらの消化管外病変は現症のみならず、全身骨 X 線検査、下顎骨パントモグラフィー、CT、超音波検査、直接・間接眼底鏡の結果から各専門医が判定したものをを用いた。

4. 検討方法

1) スクリーニング陽性率の検討

APC 遺伝子スクリーニング陽性率を PCR-SSCP 法と PTT 法で比較した。比較に際し、カイ 2 乗検定を用いた。

2) スクリーニングの臨床的意義

APC 遺伝子スクリーニングの結果は PCR-SSCP 法と PTT 法の両者ないしいずれか一方が陽性のものを変異陽性、それ以外を変異陰性 (PTT 未施行例を含める) と判定した。以上の結果から、APC 遺伝子エクソン12までの変異陽性患者 (5'側変異群)、エクソン13より3'側

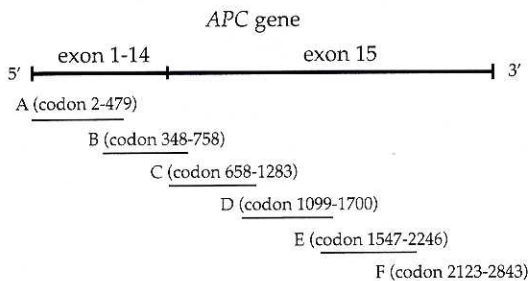


Fig. 1. Segments of the APC gene divided for protein truncation test.

の変異陽性患者（3'側変異群），および変異陰性患者（変異陰性群）の3群に分け，臨床事項を比較した．比較に際しては，カイ2乗検定ないし Kruskal-Wallis 検定を用い，危険率5%未満を有意差ありとした．

3) APC 遺伝子変異型と形質発現の対比

ダイレクト・シーケンスで塩基配列の判明した家系における APC 遺伝子の変異型と形質発現を対比した．後者として，大腸腺腫症の程度，鋸歯状腺腫の有無，十二指腸腺腫症の程度と経過，および大腸外病変の有無に着目した．

なお，本検討では APC 遺伝子以外の要因による家系内の形質発現の違い，年齢による違いなどを考慮し，同一家系内の各患者に対しても十分な検討を行った．

結 果

1. APC 遺伝子スクリーニング

1) スクリーニング陽性率

全32家系に PCR-SSCP 法でスクリーニングを施行し，14家系（43.8%）で APC 遺伝子変異が陽性であった．一方，PTT 法を施行したのは24家系で，このうち15家系（62.5%）が陽性であった．Table 1 に，PCR-SSCP 法と PTT 法の判定結果の関係を示す．両スクリーニング法を施行した24家系のうち20家系で判定が一致していたが，その他の4家系は PTT 法陽性かつ PCR-SSCP 法陰性であった．従って，PTT 法による APC 遺伝子変異陽性率が PCR-SSCP 法よりも高かったが，有意差は見いだせなかった．

2) 遺伝子変異と臨床徴候の関係

以上のスクリーニングの結果から，対象44例は5'側変異群8例（7家系），3'側変異群22例（11家系），変異陰性群14例（14家系）に分類された．Table 2 に3群間

で診断時の臨床像を比較した結果を示す．診断年齢は3群間で有意に異なり，3'側変異群が変異陰性群よりも若年で FAP を診断されていた．大腸病変の比較では，大腸癌の頻度は3群で差はなかったが，大腸腺腫症の程度は異なっていた．すなわち，3'側変異群では他の2群よりも密生型腺腫症の頻度が有意に高かった（5'側変異群25%，3'側変異群59%，変異陰性群29%）．一方，胃病変の頻度に3群で差はなかったが，十二指腸非乳頭部腺腫の頻度は3'側変異群（100%）で5'側変異群（63%）および変異陰性群（64%）よりも有意に高かった．しかし，十二指腸非乳頭部腺腫の程度は5'側変異陽性群で stage II 以上が60%，3'側変異群67%，変異

Table 1. Results of APC gene screening in patients with FAP

PTT	PCR-SSCP		Total
	positive	negative	
positive	11	4	15
negative	0	9	9
not perform	3	5	8
Total	14	18	32

number : families

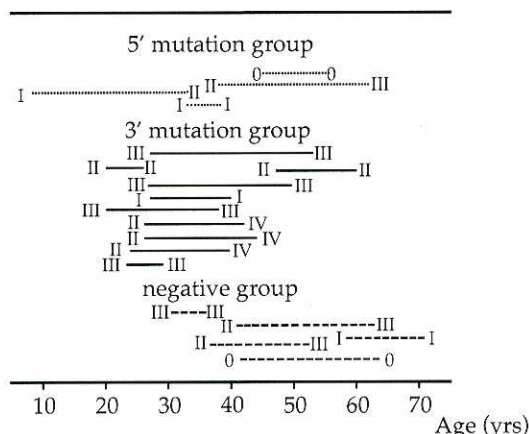
Table 2. Comparison of clinical features among groups divided by APC gene screening result.

	5'mutation group (n=8)	3'mutation group (n=22)	negative group (n=14)
Mean age at diagnosis (range) ^a	38 (8-72)	25 (9-47)	42 (22-65)
Familial history	5	19	8
Colonic lesion			
Colon cancer	3	7	7
Number of colorectal adenoma ^b			
scattered	2	1	2
sparse	4	8	8
profuse	2	13	4
Extracolonic lesions			
Upper gastro-intestinal lesions			
FGP	5	12*	6
Gastric adenoma	2	8*	2
Duodenal adenoma ^c	5	21*	9
Ampullary adenoma	4	12*	5
Extraintestinal lesions			
Osteoma	5	18	10
Desmoid	1	4	1
Soft tissue tumor	1	7	4
CHRPE ^d	0	13**	7***

CHRPE ; congenital hypertrophy of retinal pigment epithelium. FGP ; fundic gland polyposis. *one case, **two cases, and ***three cases are not examined. a,b,c : p<0.05, d : p<0.01.

Table 3. Comparison of duodenal adenomatosis with FAP

	5' mutation group (n=5)	3' mutation group (n=21)	negative group (n=9)
Grade of non-ampullary adenomatosis (n=5)		(n=21)	(n=9)
Stage I	2	7	4
Stage II	2	12	4
Stage III	1	2	1
Stage IV	0	0	0
Grade of ampullary adenomatosis	(n=4)	(n=12)	(n=5)
normal	0	3	1
slightly swollen	3	4	2
markedly swollen	1	5	2

**Fig. 2.** Correlation between the APC gene mutation and clinical course of duodenal adenomatosis**Table 4.** Results of germline APC gene mutation sequencing analysis

Kindreds(subjects)	Exon	Codon	Nucleotide change	Consequence of mutation
1 (1)	4	161	CAA → TAA	Nonsense
2 (1)	5	213	CGA → TGA	Nonsense
3 (1)	6	232	CGA → TGA	Nonsense
4 (2)	8	302	CGA → TGA	Nonsense
5 (1)	9	332	CGA → TGA	Nonsense
6 (2)	13	554	CGA → TGA	Nonsense
7 (1)	15	656	AA del	Frameshift, stop at codon 672
8 (1)	15	848	AGAT del	Frameshift, stop at codon 859
9 (1)	15	935	TAC → TAA	Nonsense
10 (3)	15	1068	TCAA del	Frameshift, stop at codon 1124
11 (2)	15	1102	TAC → TAG	Nonsense
12 (1)	15	1251	G del	Frameshift, stop at codon 1264
13 (2)	15	1324	C del	Frameshift, stop at codon 1414
14 (1)	15	1324	C del	Frameshift, stop at codon 1414
15 (3)	15	1530	G del	Frameshift, stop at codon 1564
16 (5)	15	1556	A ins	Frameshift, stop at codon 1558

陰性群56%で、3群間で明らかな違いはなかった。同様に乳頭部腺腫の程度にも差はなかった

(Table 3)。消化管外病変のうち、骨・軟部腫瘍の頻度には差はなかったが、網膜色素上皮過形成の頻度は5'側変異群(0%)で他の2群(3'側変異群65%, 変異陰性群63%)よりも低かった。Figure 2に経過観察例における十二指腸非乳頭部腺腫の形態変化を示す。5'側変異群4例中2例、3'側変異群10例中3例、変異陰性群5例中2例にstageの進行が認められ、3群間で進行例の頻度に明らかな違い

は指摘出来なかった。また乳頭部腺腫の進行は変異陰性群の1例にのみ認められた。

2. APC 遺伝子変異型と形質発現

1) APC 遺伝子変異型

スクリーニング陽性18家系中16家系においてダイレクト・シーケンスにより塩基配列異常が同定された。他の2家系はPTT法で陽性であったが、DNAの塩基配列に異常を認めず、さらにcDNAの解析により、エクソン4-5のスプライシング異常を示唆する配列異常を認めた。

Table 4に16家系のAPC遺伝子変異を示し、Figure 3に家系2(Fig. 3A)と家系12(Fig. 3B)のシーケンスの結果を実例として呈示した。

本研究で判明したAPC遺伝子変異部位はコドン161(エクソン4)からコドン1556(エクソン15)の範囲にわたり、単塩基置換によるnonsense変異が8家系、1ないし5塩基脱落によるframeshift変異が7家系、1塩基挿入によるframeshift変異が1家系であった。従って、全家系においてAPC蛋白の短縮が推測された。

2) 形質発現

Figure 4にAPC遺伝子型が判明した16家系27例の臨床徴候とAPC遺伝子変異部位の関係をまとめた。

網膜色素上皮過形成はエクソン13コドン554より3'側の変異家系に認められた。極散

在型の大腸腺腫症はエクソン 4 コドン161, エクソン 9 コドン332, およびエクソン15コドン1556の変異 3 家系に認められた。一方, 十二指腸腺腫症の経過観察例のうち, stage の進行を 2 家系 (5 例) に認めたが, その中でエクソン15コドン1556の変異家系 (3 例) では, いずれも20歳代から40歳代の経過中に stage II からIV

への顕著な進展がみられた。また, 鋸歯状腺腫を認めた家系は最も5'側 (エクソン 4 コドン161) ないし3'側 (エクソン15コドン1556) にあたる変異家系であった。デスモイド腫瘍はエクソン6, 13および, 最も3'側寄りの2家系 (エクソン15コドン1530ないし1556) にみられた。このうちコドン1530の変異家系に著明な進展を伴うデスモイド腫瘍が発生していた。

以上のように, エクソン13コドン554からエクソン15コドン1324に至る変異家系では, いずれも腺腫数が100個以上で, 十二指腸病変を有し, 網膜色素上皮過形成などの大腸外合併症を認める FAP 典型例であったのに対し, 他部位の変異家系では非典型的な臨床像を示す例がみられた。すなわち家系1 (極散型大腸腺腫症, 鋸歯状

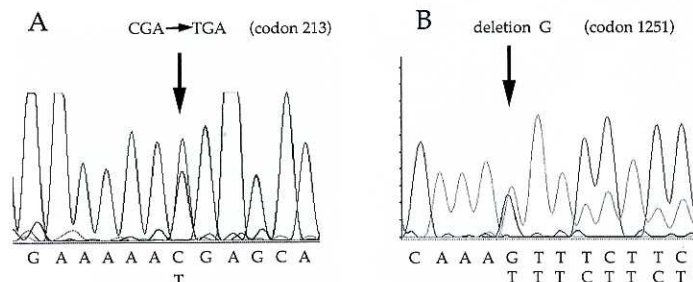


Fig. 3. Examples of direct sequencing in family 2 (A) and family 12 (B). Sequencing curves in family 2 demonstrate a C to T replacement at codon 213 resulting in nonsense mutation. Sequencing curves in family 12 demonstrate 1 bp (G) deletion at codon 1251.

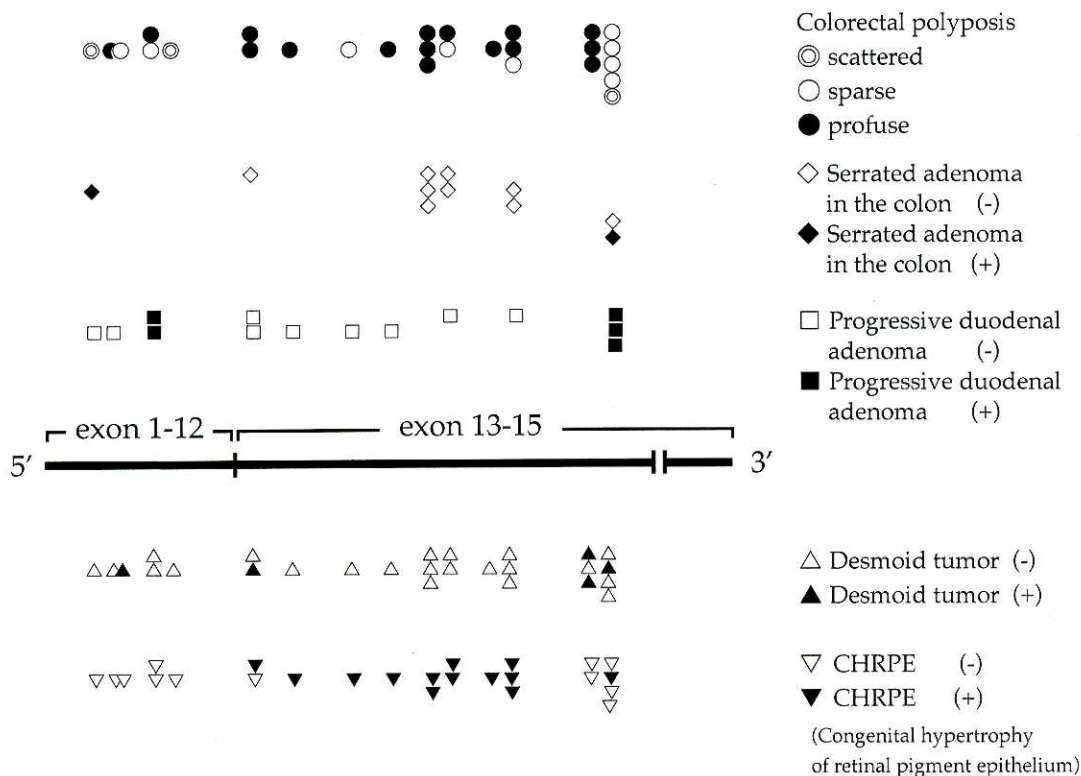


Fig. 4. Correlation between the site of the APC gene mutation and clinical features

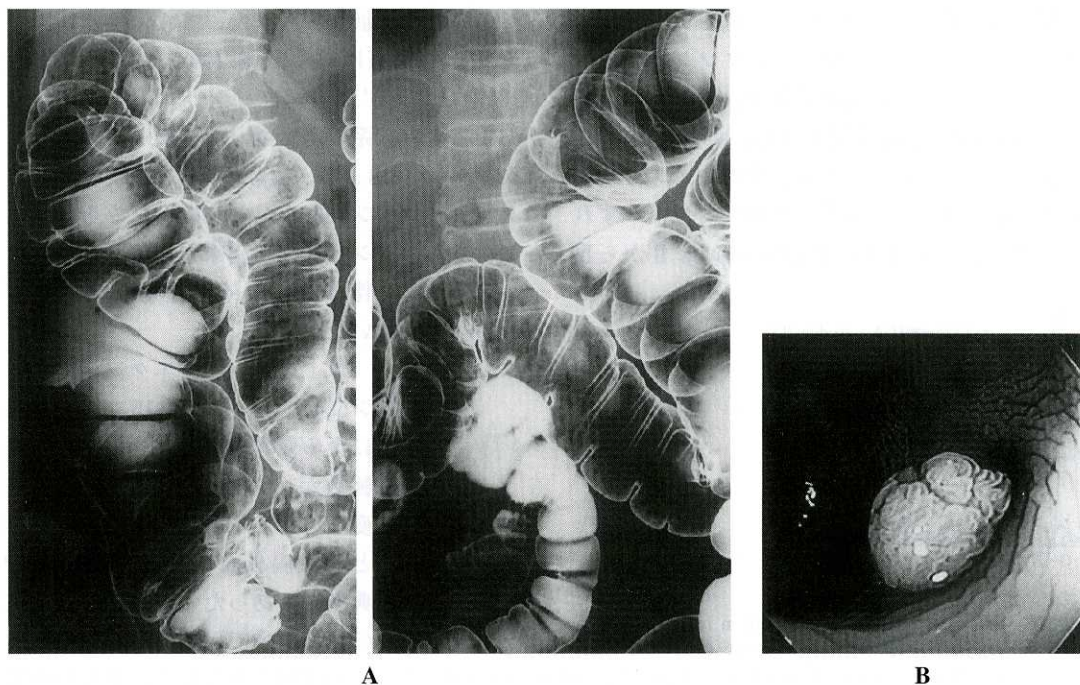


Fig. 5. A member of a family with *APC* gene mutation at codon 161. Barium enema shows sparse colonic polyposis (A). Colonoscopy shows a serrated adenoma in the sigmoid colon (B).

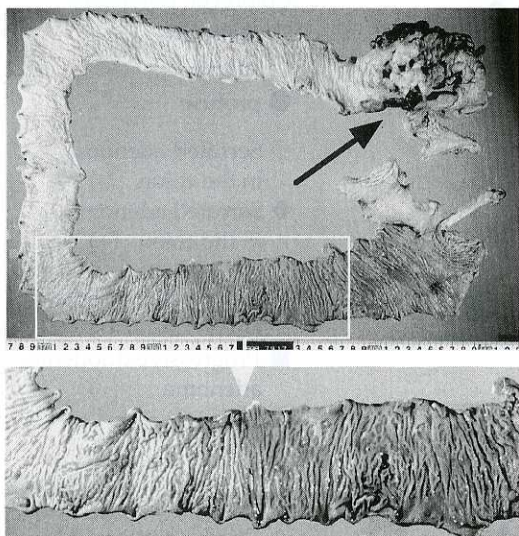


Fig. 6. A member of a family with *APC* gene mutation at codon 332. Macroscopic findings of the resected colon shows sparse adenomatous polyposis and an advanced cancer (arrow).

腺腫) (Fig. 5), 家系5 (極散型大腸腺腫症, 大腸外病変なし) (Fig. 6), 家系15 (浸潤性デスマイド腫瘍) (Fig. 7), および家系16 (極散

在型ないし散在型大腸腺腫症, 進行性十二指腸腺腫症, 鋸歯状腺腫) (Fig. 8) において特徴的な臨床徴候が認められた。

考 察

近年, FAP の臨床徴候と *APC* 遺伝子変異の対比から, 本症の表現型が変異部位に依存することが報告されている^{9)~12)}。なかでも, 大腸腺腫症の程度や術後の残存直腸癌^{24), 25)}, デスマイド腫瘍^{9), 26)~28)}, および網膜色素上皮過形成^{29), 30)}の発生と遺伝子変異部位が密接に関係することから, *APC* 遺伝子解析は本症の診断のみならず初回手術方針の決定に際しても必要と考えられるようになっていく。

APC 遺伝子変異の検出には PCR-SSCP 法が多く用いられてきた。しかし, 本遺伝子は8529塩基で構成される遺伝子で, 生殖細胞の変異好発部 (mutation cluster region; MCR) がないため労力がかかり, 高い陽性率も得られていない^{6), 9), 26)}。これに対し, FAP 家系における遺伝

子変異の大部分が nonsense または frameshift mutation である事実から、より簡便かつ迅速に短縮 APC 蛋白を検出する PTT 法が開発された。本研究では PCR-SSCP 法よりも PTT 法の陽性率が高く、有意差はみられなかったが、後者がより鋭敏である可能性が示唆された。一方、最近の Friedle らの640例の検討²⁶⁾で52%に陰性例がみられるように、既存の報告では数種の解析法によっても同様に多くの陰性例が存在する^{6), 8) ~ 10)}。本検討でも、PCR-SSCP 法ないし PTT 法を用いた場合でも44%に陰性家系が存

在した。また、Scott ら³¹⁾および Giarola ら³²⁾は APC 遺伝子変異陰性 FAP 家系の大腸形質発現が陽性家系と異なることを報告しているが、本検討でも変異陰性群の臨床徴候として密生型大腸腺腫症および十二指腸腺腫症の頻度が低い傾向がみられた。このことから FAP の原因として APC 遺伝子以外の遺伝子変異の存在が否定できないと考えられた。

FAP における大腸腺腫症の程度は APC 遺伝子変異部位に影響されることが明らかとなっている。すなわち、エクソン15コドン1250から

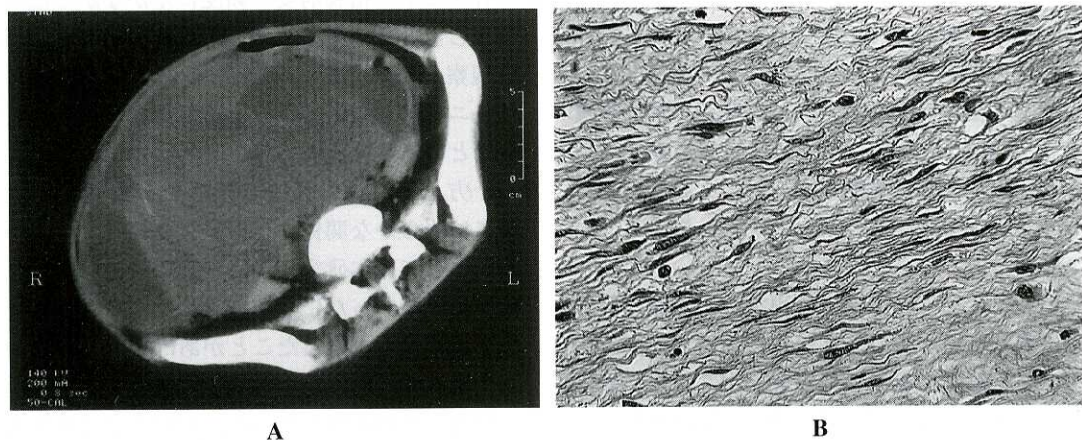


Fig. 7. A member of a family with APC gene mutation at codon 1530. CT shows a large intra-abdominal tumor (A). Histologic findings of the tumor are compatible with desmoid tumor (H.E. staining $\times 400$) (B).

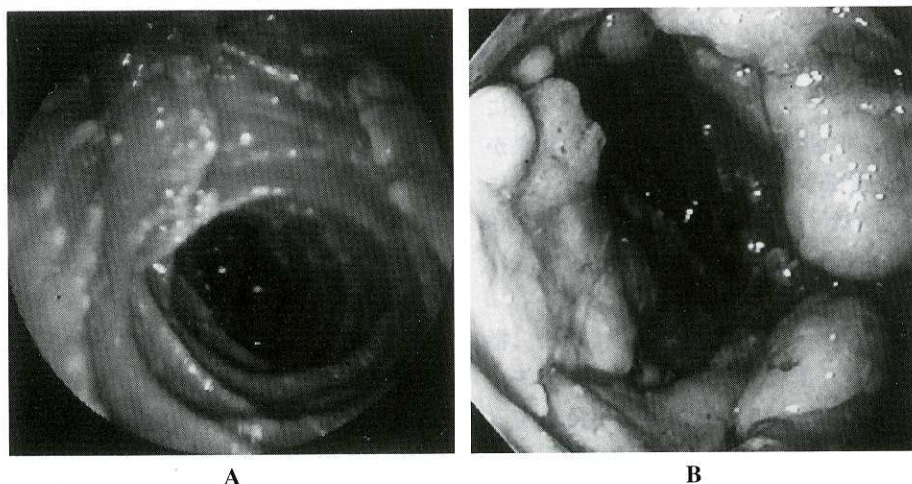


Fig. 8. A member of a family with APC gene mutation at codon 1556. Duodenoscopy at the age of 29 years reveals numerous protrusions (Grade II) (A). At the age of 44 years, the duodenal lesions has increased in size and showed manifest carpet-like configuration (Grade IV) (B).

1464の間の変異では密生型腺腫症が好発する¹⁸⁾のに対し、エクソン5より5'側^{14), 33), 34)}、エクソン9³⁵⁾、およびエクソン15コドン1556より3'側³⁴⁾の変異家系では腺腫数が少なく、しばしばAFAPの臨床像を呈することが報告されている。大腸腺腫症の程度は年齢、あるいは評価方法³⁶⁾によって影響されるため、腺腫数100個未満を基準とするAFAPの診断は曖昧な側面を有している。しかし、本研究においても極散在型大腸腺腫症は、エクソン4³⁷⁾、9、およびコドン1556の変異家系にみられた。さらに、エクソン4および9の変異家系では発端者が60歳ないし70歳代で診断されていたことから、これら2家系の臨床像はAFAPに合致すると考えられた。しかし、上記3家系以外では大腸腺腫症の程度とAPC遺伝子変異に密接な関係を指摘しえなかった。従って、極散在型以外の大腸腺腫症はAPC遺伝子変異部位のみで規定されるとはいえない。

一方、今回大腸病変の表現型として鋸歯状腺腫に着目して解析したところ、組織学的に鋸歯状腺腫を確認できたのは11家系中2家系であった。しかも、Scottら³¹⁾がAPC変異陰性家系に鋸歯状腺腫を伴うFAPの存在を報告したのに対し、本研究では鋸歯状腺腫陽性家系ではAFAPに合致するAPC遺伝子変異を伴っていた。鋸歯状腺腫における体細胞遺伝子変異は未だ議論の余地はあるが、p53遺伝子³⁸⁾、あるいはマイクロサテライト不安定性³⁹⁾がその発生に関与しているとの報告がある。本研究の結果からは、APC遺伝子変異も鋸歯状腺腫の発生に関与する可能性、および鋸歯状腺腫がAFAPに特徴的な臨床徴候である可能性が示唆された⁴⁰⁾。

本研究で明らかとなった知見として、十二指腸腺腫症とAPC遺伝子の関係があげられる。従来、FAPでは高率に十二指腸癌が発生することから、十二指腸病変は本症の予後規定因子の一つとされてきた¹³⁾。加えて、本症患者の80%では多彩な形態の十二指腸腺腫が認められ^{41)~43)}、緩徐な臨床経過をとる^{41), 44)}ことが明

らかとなっている。今回、APC遺伝子変異との関係を検討したところ、密生型大腸腺腫症の頻度と同様の傾向を示した。すなわち、3'側変異群の全例で十二指腸腺腫が陽性であったのに対し、5'側変異群および変異陰性群では頻度が低かった。従って、十二指腸腺腫症は大腸腺腫症や網膜色素上皮過形成と同様に、APC遺伝子変異部位と密接に関係した臨床徴候と考えられる⁴⁵⁾。Sanabria⁴⁶⁾らはFAPの十二指腸腺腫症に家族内集積性は認められたものの、APC遺伝子エクソン15コドン686から1693までの変異の有無で十二指腸病変の頻度に差がなかったと報告している。本研究では十二指腸病変を詳細に観察したうえでAPC遺伝子の全領域をスクリーニングしたことから上述の結果が得られたものと考えられる。

一方、十二指腸腺腫の経過とAPC遺伝子変異には明らかな関係を指摘出来なかった。この要因として、本研究における経過観察期間は比較的長期であったにも関わらず、十二指腸病変の進展例が少なかったことがあげられる。しかし1家系で20歳代から40歳代の経過中顕著に十二指腸病変が進展していた。本家系では対象家系中最も3'側のコドン1556に変異を認めた。加えて、同家系では散在型ないし極散在型大腸腺腫症がみられた。進行性の十二指腸腺腫症を認めたFAPのAPC遺伝子変異としてコドン1520⁴⁷⁾とエクソン4コドン168⁴⁸⁾の記載があり、いずれの報告においても大腸腺腫症は極散在型とされている。従って、進行性十二指腸腺腫症に関与するAPC遺伝子変異が極散在型あるいはAFAPの遺伝子変異に近い部位に存在する可能性が示唆された。この意味から、十二指腸腺腫症のサーベイランスに際しては、APC遺伝子変異を確定したうえで経過観察することが重要と考えられる。

本研究において、網膜色素上皮過形成とAPC遺伝子変異部位との密接な関係が確認できた。すなわち、対象家系においては網膜色素上皮過形成がコドン554からコドン1324のAPC遺伝子変異にのみ認められたが、これは欧米で報告さ

れているエクソン9とエクソン15コドン1444の間の変異^{28), 29)}に合致していた。一方、デスモイド腫瘍はエクソン15コドン1445から1560のAPC 遺伝子変異に好発することが報告されている^{9), 27), 28)}。しかし、本研究では各変異群にデスモイド腫瘍が認められた。ただし、コドン1530の変異家系に著明に増大したデスモイド腫瘍が発生していた。従って、既報の3'側の変異は浸潤性のデスモイド腫瘍の発生に関与する可能性が推測される。

以上のように、本研究ではFAPにおけるAPC 遺伝子変異部位と大腸腺腫症の程度、および網膜色素上皮過形成や十二指腸腺腫の発生との関係を明らかにした。さらには、進行性十二指腸腺腫症、浸潤型デスモイド、鋸歯状腺腫に関与する可能性も見いだした。従って、今後APC 遺伝子診断に基づいた患者管理方針を確立することも可能と考えられる。すなわち、APC 遺伝子診断が大腸において初回の手術方針の決定に必要と考えられてきた様に、十二指腸腺腫症においても変異部位によってより嚴重な経過観察の必要性や治療方針決定に役立つ可能性が示唆された。さらに浸潤型デスモイド、鋸歯状腺腫においてもその例外ではない可能性が考えられた。また、本症において網膜色素上皮過形成をはじめとする臨床徴候を分析することで、APC 遺伝子変異部位をある程度推測し遺伝子解析を進めることも可能であろう。一方、遺伝子変異部位と臨床徴候の特異的な関係は β カテニン⁴⁹⁾、E-カドヘリンなどのAPC 関連蛋白との相互作用が臓器特異的に障害されること⁵⁰⁾、あるいはAPC 遺伝子変異部位の違いによる dominant negative effect の違い⁵¹⁾などが推測されているが、未だその詳細については明らかではない。従って、遺伝子診断の臨床的意義やAPC 蛋白機能をさらに確立するためにも、より多数の家系について解析が必要と思われる。

結 語

FAP 患者32家系44例における生殖細胞 APC

遺伝子のスクリーニング結果とシーケンス解析結果を臨床徴候と対比した。

1) スクリーニングでは、7家系8例は5'側変異群（エクソン1～12）、11家系22例は3'側変異群（エクソン13～15）、14家系14例は変異陰性群であった。3'側変異群では他の2群よりも若年発症で、密生型大腸腺腫、十二指腸非乳頭部腺腫、および網膜色素上皮過形成の頻度が有意に高かった。

2) シーケンス解析では、8家系11例に nonsense 変異を、8家系17例に frameshift 変異を認めた。コドン161、および1556の変異家系は大腸腺腫症が散在性で鋸歯状腺腫を伴っていた。コドン1556変異家系では顕著な進行性十二指腸腺腫症を、コドン1530変異家系では浸潤性デスモイド腫瘍の発生を認めた。

以上より、本研究において、APC 遺伝子とFAPの表現型には密接な関係があり、特に十二指腸病変の頻度は、大腸腺腫症の程度、網膜色素上皮過形成の有無に加えて密接な変異部位との関係があることを明らかにした。また、FAPの発生にはAPC 遺伝子変異以外の原因遺伝子の関与が否定できないと考えられた。

謝 辞

稿を終えるに当たり、ご指導ならびにご校閲を賜りました川崎医科大学消化器内科Ⅱ教室 春間 賢教授に深謝します。本研究において直接のご指導ご鞭撻、さらにご校閲を賜りました九州大学大学院医学研究院病態機能内科学 飯田三雄教授、同光学医療診療部 松本主之先生に深甚なる謝意を表します。またご助言ご協力頂いた川崎医科大学消化器内科Ⅱ教室の諸兄ならびに同小児外科学教室 青山興司教授に深く感謝いたします。なお、本研究の一部は平成10年度～11年度文部省科学研究費補助金基盤研究C（課題番号 10670520）、大学院重点特別経費（平成11年度）および川崎医科大学プロジェクト研究費（9-301, 10-306）の援助によって行われた。

文 献

- 1) Herrera L, Kakati S, Gibas L, Pietrzak E, Sandberg AA : Gardner syndrome in a man with an interstitial deletion of 5q. *Am J Med Genet* 25 : 473-476, 1986
- 2) Bodmer WF, Bailey CJ, Bodmer J, Bussey HJ, Ellis A, Gorman P, Lucibello FC, Murday VA, Rider SH, Scambler P, Sheer D, Solomon E, Spurr NK : Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature* 328 : 614-616, 1987
- 3) Leppert M, Dobbs M, Scambler P, O'Connell P, Nakamura Y, Stauffer D, Woodward S, Burt R, Hughes J, Gardner E, Lathrop M, Wasmuth J, Lalouel JM, White R : The gene for familial polyposis coli maps to the long arm of chromosome 5. *Science* 238 : 1411-1413, 1987
- 4) Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, Smith KJ, Preisinger AC, Hedge P, McKechnie D, Finnear R, Markham A, Groffen J, Boguski MS, Altschul SF, Horii A, Ando H, Miyoshi Y, Miki Y, Nishisho I, Nakamura Y : Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* 253 : 661-665, 1991
- 5) Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, Horii A, Koyama K, Utsunomiya J, Baba S, Hedge P, Markham A, Kraush AJ, Petersen G, Hamilton SR, Nilbert MC, Levy DV, Bryan TM, Preisinger AC, Smith KJ, Su LK, Kinzler KW, Vogelstein B : Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* 253 : 665-669, 1991
- 6) Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, Joslyn G, Stevens J, Spirio L, Robertson M, Sargeant L, Krapcho K, Wolff E, Burt R, Hughes JP, Warrington J, MacPherson J, Wasmuth J, Paslier DL, Abderrahim H, Cohen D, Leppert M, White R : Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 66 : 589-600, 1991
- 7) Joslyn G, Carlson M, Thliveris A, Albertsen H, Gelbert L, Samowitz W, Groden J, Stevens J, Spirio L, Robertson M, Sargeant L, Krapcho K, Wolff E, Burt R, Hughes JP, Warrington J, MacPherson J, Wasmuth J, Paslier DL, Abderrahim H, Cohen D, Leppert M, White R : Identification of deletion mutations and three new genes at the familial polyposis locus. *Cell* 66 : 601-613, 1991
- 8) Miyoshi Y, Ando H, Nagase H, Nishisho I, Horii A, Miki Y, Mori T, Utsunomiya J, Baba S, Petersen G, Hamilton SR, Kinzler KW, Vogelstein B, Nakamura Y : Germ-line mutations of the *APC* gene in 53 familial adenomatous polyposis patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 : 4452-4456, 1992
- 9) Dobbie Z, Spycher M, Mary JL, Haner M, Guldenschuh I, Hurliman R, Amman R, Roth J, Muller H, Scott RJ : Correlation between the development of extracolonic manifestations in FAP patients and mutations beyond codon 1403 in the *APC* gene. *J Med Genet* 33 : 274-280, 1996
- 10) van der Luijt RB, Khan PM, Vasen HF, Tops CM, van Leeuwen-Cornelisse IS, Wijnen JT, van der Klift HM, Plug RJ, Griffioen G, Fodde R : Molecular analysis of the *APC* gene in 105 Dutch kindreds with familial adenomatous polyposis : 67 germline mutations identified by DGGE, PTT and southern analysis. *Hum Mutat* 9 : 7-16, 1997
- 11) Nagase H, Miyoshi Y, Horii A, Aoki T, Ogawa M, Utsunomiya J, Baba S, Sasazuki T, Nakamura Y : Correlation between the location of germ-line mutations in the *APC* gene and the number of colorectal polyps in familial adenomatous polyposis patients. *Cancer Res* 52 : 4055-4057, 1992
- 12) Enomoto M, Konishi M, Iwama T, Utsunomiya J, Sugihara KI, Miyaki M : The relationship between frequencies of extracolonic manifestations and the position of *APC* germline mutation in patients with familial adenomatous polyposis. *Jpn J Clin Oncol* 30 : 82-88, 2000
- 13) Spigelman AD, Williams CB, Talbot IC, Domizio P, Phillips RK : Upper gastrointestinal cancer in patients with familial adenomatous polyposis. *Lancet* 30 : 783-785, 1989
- 14) Spirio L, Olschwang S, Groden J, Robertson M, Samowitz W, Joslyn G, Gelbert L, Thliveris A, Carlson M, Otterud B, Lynch H, Watson P, Lynch P, Laurent-Puig P, Burt R, Hughes JP, Thomas G, Leppert M, White R : Alleles of the *APC*

- gene : an attenuated form of familial polyposis. *Cell* 75 : 951–957, 1993
- 15) Lynch HT, Smyrk T, McGinn T, Lanspa S, Cavalieri J, Lynch J, Slominski-Castor S, Cayouette MC, Priluck I, Luce MC : Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP) : a phenotypically and genotypically distinctive variant of FAP. *Cancer* 76 : 2427–2433, 1995
 - 16) Leggett BA, Devereaux B, Biden K, Searle J, Young J, Jass J : Hyperplastic polyposis : association with colorectal cancer. *Am J Surg Pathol* 25 : 177–184, 2001
 - 17) Torlakovic E, Snover DC : Serrated adenomatous polyposis in humans. *Gastroenterology* 110 : 748–755, 1996
 - 18) Miller SA, Dykes DD, Polesky HF : A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16 : 1215, 1988
 - 19) Chomczynski P, Sacchi N : Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162 : 156–159, 1987
 - 20) van der Lijft R, Khan PM, Vasen H, van Leeuwen C, Tops C, Roest P, den Dunnen J, Fodde R : Rapid detection of translation-terminating mutations at the adenomatous polyposis coli (*APC*) gene by direct protein truncation test. *Genomics* 20 : 1–4, 1994
 - 21) Sanger F : Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science* 24 : 1205–1210, 1981
 - 22) Longacre TA, Fenoglio-Preiser CM : Mixed hyperplastic adenomatous polyps/serrated adenoma : a distinct form of colorectal neoplasia. *Am J Surg Pathol* 14 : 524–537, 1990
 - 23) Iida M, Yao T, Itoh H, Watanabe H, Matsui T, Iwashita A, Fujishima M : Natural history of duodenal lesions in Japanese patients with familial adenomatous polyposis/Gardner's syndrome. *Gastroenterology* 96 : 1301–1306, 1989
 - 24) Vasen HF, van Duijvendijk P, Buskens E, Bulow C, Bjork J, Jarvinen HJ, Bulow S : Decision analysis in the surgical treatment of patients with familial adenomatous polyposis : a Dutch-Scandinavian collaborative study including 659 patients. *Gut* 49 : 231–235, 2001
 - 25) Bulow C, Vasen H, Jarvinen H, Bjork J, Bisgaard ML, Bulow S : Ileorectal anastomosis is appropriate for a subset of patients with familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 119 : 1454–1460, 2000
 - 26) Friedl W, Caspari R, Sengteller M, Uhlhaas S, Lamberti C, Jungck M, Kadmon M, Wolf M, Fahnenstich J, Gebert J, Moslein G, Mangold E, Propping P : Can *APC* mutation analysis contribute to therapeutic decisions in familial adenomatous polyposis? Experience from 680 FAP families. *Gut* 48 : 515–521, 2001
 - 27) Caspari R, Olschwang S, Friedl W, Mandl M, Boisson C, Boker T, Augustin A, Kadmon M, Moslein G, Thomas G, Propping P : Familial adenomatous polyposis : desmoid tumors and lack of ophthalmic lesions (CHRPE) associated with *APC* mutations beyond codon 1441. *Hum Mol Genet* 4 : 337–340, 1995
 - 28) Davies DR, Armstrong JG, Thakker N, Horner K, Guy SP, Clancy T, Sloan P, Blair V, Dodd C, Warnes TW, Harris R, Evans DG : Severe Gardner syndrome in families with mutations restricted to a specific region of the *APC* gene. *Am J Hum Genet* 57 : 1151–1158, 1995
 - 29) Olschwang S, Tiret A, Laurent-Puig P, Muleris M, Parc R, Thomas G : Restriction of ocular fundus lesions to a specific subgroup of *APC* mutations in adenomatous polyposis coli patient. *Cell* 75 : 959–968, 1993
 - 30) Wallis YL, Morton DG, McKeown CM, Macdonald F : Molecular analysis of the *APC* gene in 205 families : extended genotype-phenotype correlations in FAP and evidence for the role of *APC* amino acid changes in colorectal cancer predisposition. *J Med Genet* 36 : 14–20, 1999
 - 31) Scott RJ, Meldrum C, Crooks R, Spigelman AD, Kirk J, Tucker K, Koorey D : Familial adenomatous polyposis. More evidence for disease diversity and genetic heterogeneity. *Gut* 48 : 508–514, 2001
 - 32) Giarola M, Stagi L, Presciuttini S, Mondini P, Radice MT, Sala P, Pierotti MA, Bertario L, Radice P : Screening for mutations of the *APC* gene in 66 Italian familial adenomatous polyposis patients : evidence for phenotypic differences in cases with and without identified mutation. *Hum Mutat* 13 : 116–123, 1999
 - 33) Giardiello FM, Brensinger JD, Luce MC, Petersen GM, Cayouette MC, Krush AJ, Bacon JA, Booker SV, Bufill JA, Hamilton SR : Phenotype expression of disease in families that have mutations in the 5' region of the adenomatous

- polyposis coli gene. *Ann Intern Med* 126 : 514–519, 1997
- 34) Soravia C, Berk T, Madlensky L, Mitri A, Cheng H, Gallinger S, Cohen Z, Bapat B : Genotype-phenotype correlations in attenuated familial adenomatous polyposis coli. *Am J Hum Genet* 62 : 1290–1301, 1998
 - 35) Rozen P, Samuel Z, Shomrat R, Legum C : Notable intrafamilial variability in a kindred with familial adenomatous polyposis and an *APC* mutation in exon 9. *Gut* 45 : 829–833, 1999
 - 36) Wallace MH, Frayling IM, Clark SK, Neale K, Phillips RK : Attenuated adenomatous polyposis coli : the role of ascertainment bias through failure to dye-spray at colonoscopy. *Dis Colon Rectum* 42 : 1078–1080, 1999
 - 37) Esaki M, Matsumoto T, Mizuno M, Kobori Y, Yoshimura R, Yao T, Iida M : Effect of sulindac treatment for attenuated familial adenomatous polyposis with a new germline *APC* mutation at codon 161 : report of a case. *Dis Colon Rectum* (in press)
 - 38) Hiyama T, Yokozaki H, Shimamoto F, Haruma K, Yasui W, Kajiyama G, Tahara E : Frequent p53 gene mutations in serrated adenomas of the colorectum. *J Pathol* 186 : 131–139, 1998
 - 39) Iino H, Jass JR, Simms LAY, Young J, Leggett B, Ajioka Y, Watanabe H : DNA microsatellite instability in hyperplastic polyps, serrated adenomas, and mixed polyps : a mild mutator pathway for colorectal cancer? *J Clin Pathol* 52 : 5–9, 1999
 - 40) Matsumoto T, Iida M, Kobori Y, Mizuno M, Nakamura S, Hizawa K, Yao T : Serrated adenoma in familial adenomatous polyposis : relation to germline *APC* gene mutation. *Gut* (in press)
 - 41) Iida M, Yao T, Itoh H, Watanabe H, Matsui T, Iwashita A, Fujishima M : Natural history of duodenal lesions in Japanese patients with familial adenomatosis coli/Gardner's syndrome. *Gastroenterology* 96 : 1301–1306, 1989
 - 42) Iida M, Aoyagi K, Fujimura Y, Matsumoto T, Hizawa K, Nakamura S : Nonpolypoid adenomas of the duodenum in patients with familial adenomatous polyposis. *Gastrointest Endosc* 44 : 305–308, 1996
 - 43) Matsumoto T, Iida M, Nakamura S, Hizawa K, Mizuno M, Yao T, Tsuneyoshi M, Fujishima M : Depressed adenoma of the duodenum in patients with familial adenomatous polyposis : endoscopic and immunohistochemical features. *Cancer* 86 : 1414–1420, 1999
 - 44) Matsumoto T, Iida M, Nakamura S, Hizawa K, Yao T, Tsuneyoshi M, Fujishima M : Natural history of ampullary adenoma in familial adenomatous polyposis : reconfirmation of benign nature during extended surveillance. *Am J Gastroenterol* 95 : 1557–1562, 2000
 - 45) Matsumoto T, Iida M, Kobori Y, Mizuno M, Nakamura S, Hizawa K, Yao T : Genetic predisposition to clinical manifestations in familial adenomatous polyposis with special reference to duodenal lesions. *Am J Gastroenterol* (in press)
 - 46) Sanabria JR, Croxford R, Berk TC, Cohen Z, Bapat BV, Gallinger S : Familial segregation in the occurrence and severity of periampullary neoplasms in familial adenomatous polyposis. *Am J Surg* 171 : 136–141, 1996.
 - 47) Leggett BA, Young JP, Biden K, Buttenshaw RL, Knight N, Cowen AE : Severe upper gastrointestinal polyposis associated with sparse colonic polyposis in a familial adenomatous polyposis family with an *APC* mutation at codon 1520. *Gut* 41 : 518–521, 1997
 - 48) Gunther K, Horbach T, Hohenberger W, Kraus C, Ballhausen W : Colonic late-onset familial adenomatous polyposis combined with severe duodenal polyposis and familial endometrial cancer. *Am J Med* 108 : 681–683, 2000
 - 49) Munemitsu S, Albert I, Souza B, Rubinfeld B, Polakis P : Regulation of intracellular beta-catenin levels by the adenomatous polyposis coli (*APC*) tumor-suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 : 3046–3050, 1995
 - 50) Friedl W, Meuschel S, Caspari R, Lamberti C, Krieger S, Sengteller M, Propping P : Attenuated familial adenomatous polyposis due to a mutation in the 3' part of the *APC* gene. A clue for understanding the function of the *APC* protein. *Hum Genet* 97 : 579–584, 1996
 - 51) Dihlmann S, Gebert J, Siermann A, Herfarth C, von Knebel Doeberitz M : Dominant negative effect of the *APC* 1309 mutation : a possible explanation for genotype-phenotype correlations in familial adenomatous polyposis. *Cancer Res* 59 : 1857–1860, 1999