

STR 解析に基づいた絨毛癌の遺伝学的診断

名古屋大学大学院医学系研究科

医療行政学 准教授 山本英子

名古屋大学大学院医学系研究科

法医学 准教授 山本敏充

名古屋大学医学部

産婦人科 助教 新美薫

助教 西野公博

1. 研究の背景・目的

絨毛癌は妊娠性絨毛癌と非妊娠性絨毛癌に分類される。多くの絨毛癌は妊娠性であり、過去の妊娠時の胎盤絨毛細胞を発生起源とする。分娩、流産、中絶、胞状奇胎など、どの種類の妊娠後にも発症する可能性があり、さらに直前の妊娠が発症原因になるとは限らないと報告されている¹⁾。絨毛癌患者の約半数には胞状奇胎の既往歴があり、胞状奇胎は絨毛癌発症のリスクファクターである。胞状奇胎は異常な受精による妊娠であり、全胞状奇胎と部分胞状奇胎に分類される。全胞状奇胎は核が不活化した卵子に 2 精子受精あるいは 1 精子受精後 2 倍化した雄核発生であること²⁾、部分胞状奇胎は正常卵子に 2 精子受精による 3 倍体であることが明らかにされている³⁾。妊娠性絨毛癌は化学療法が奏功するため、生存率は約 90%と比較的予後が良好である。レジメンはエトポシド (E)、メトトレキサート (M)、アクチノマイシン D (A)を用いた MEA 療法や EMA/CO 療法 (C: サイクロフォスファミド、O: ビンクリスチン) がファーストチョイスとして用いられるが、セカンドレジメンでの効果がなく手術や放射線治療の適応ではない場合には、サードレジメン以降は難治性となり死亡に至る症例が約 10%認められる。

一方、非妊娠性絨毛癌は、胚細胞性絨毛癌と他癌の分化異常によるものがある。胚細胞性絨毛癌は、卵巣や精巣に発症する胚細胞腫瘍で絨毛癌成分のみを認める腫瘍である。手術で完全に切除できない、あるいは多発転移を認める場

合に用いる化学療法は、胚細胞性腫瘍やそれぞれの癌（胃癌や大腸癌など）に対するレジメンを用いる治療と、絨毛癌のレジメン（EMACO 療法や MEA 療法）を用いる治療と、それぞれの報告があり、いずれが適切であるのかについては結論が得られていない。妊娠性絨毛癌と比較して非妊娠性絨毛癌では予後が不良であるとの報告がある。しかしながら、これらは少数症例を扱った報告がほとんどであり、また、妊娠性か非妊娠性かについての診断も、遺伝学的診断に基づいた正確な報告は少ない。

妊娠性絨毛癌の発生母地、あるいは絨毛癌の妊娠性と非妊娠性の鑑別は、DNA 多型解析である short tandem repeat (STR) 解析を用いた遺伝学的分析によって可能である。現在、絨毛癌患者で妊娠歴がある場合には妊娠性絨毛癌、妊娠歴がない場合や性交経験がない場合には非妊娠性絨毛癌として臨床的に診断されている。STR 解析は医療用検査として保険適応はなく、現在は研究レベルで行われるのみである。しかし、化学療法が奏功し予後良好といわれる妊娠性絨毛癌の中にも難治性症例や死亡症例が約 10%あること、非妊娠性絨毛癌は予後不良と報告されているが症例数が少ないためにエビデンスに乏しいことより、絨毛癌の発生母地を遺伝学的検査によって明らかにすることは、絨毛癌の正確な診断だけではなく、特に非妊娠性絨毛癌の治療法の確立のためには必須であると考えられる。臨床的に診断された妊娠性絨毛癌の難治症例は、非妊娠性絨毛癌の可能性も考えられる。また、妊娠性絨毛癌の中でも、発生起源となる妊娠の種類によって化学療法の奏効率や予後に差が生じる可能性もある。

本研究では遺伝学的診断に基づいた非妊娠性絨毛癌、胞状奇胎由来妊娠性絨毛癌と、それ以外を由来とする妊娠性絨毛癌の化学療法有効性や予後を明らかにすることを目的とする。

2. 研究の対象ならびに方法

(1) 対象患者

名古屋大学医学部附属病院産婦人科において治療中または治療を終えた絨毛癌患者を対象とした。本研究を始める前に名古屋大学医学部の倫理委員会の承認を得て、2018年3月31日までに4名の患者検体を用い研究を行った。妊娠性については、3名が妊娠性、1名が非妊娠性の臨床診断であった。通院中の3名については、患者本人およびパートナーに研究についての説明を行い文書にて同意を得た。

(2) 絨毛癌組織からの DNA 抽出

2 名の患者の手術時に得られた、肉眼的に判別できる絨毛癌組織検体の一部を採取し、QIAamp DNA Micro kit (QIAGEN) を用いて、キットのプロトコールに従って DNA 抽出を行った。治療後の 3 名の患者については、手術時に作製された病理組織ブロックから、10 μm 切片を RNase-Free フォイル付きスライド上に作製し、LMD7000 (Leica) を用いたレーザーマイクロダイゼクション (LMD) により、絨毛癌部分を切除した。切除組織は、PicoPure DNA Extraction Kit (ThermoFisher Scientific) に付属する DNA Reconstruction buffer 及び Proteinase K 入りのチューブに直接投入し、キットのプロトコールに従って DNA 抽出液を作製した。

(3) 患者本人、パートナーからの DNA 採取

同意を得られた患者及びパートナーから、オムニスワブを用いて採取した口腔内粘膜について、QIAamp DNA Micro kit (QIAGEN) を用いて、キットのプロトコールに従って DNA 抽出を行った。

(4) DNA 定量

患者及びパートナーから抽出した DNA、並びに手術時に得られた絨毛癌組織検体の一部から抽出した DNA について、Qubit 3.0 フルオロメーター (ThermoFisher Scientific) を用いて DNA 量を定量した。

(5) STR 解析

患者及びパートナーから抽出した DNA、並びに手術時に得られた絨毛癌組織検体の一部から抽出した DNA を、1 ng/ μL 溶液に調整した。これら調整 DNA 溶液各 1 μL について、AmpFlSTR Identifilter TM plus PCR amplification キット (ThermoFisher Scientific) を用いて、15 座位の STRs および性別判定用マーカー (アメロゲニン) を PCR 増幅した。増幅された産物を、プロトコール・マニュアルに従って、Genetic Analyzer 310 (Applied Biosystems) を用いて、キャピラリー電気泳動した後、GeneMapperID v3.2 ソフトウェアにより型判定を行った。

3. 研究結果

STR 解析の結果を表 1 に示す。臨床診断では、症例 1-3 は妊娠性絨毛癌、症例 4 は非妊娠性絨毛癌（卵巣原発）であった。症例 1 と 3 はパラフィンブロックに包埋された腫瘍組織から、症例 2 と 4 は手術時に得られた新鮮凍結組織より DNA を抽出した。症例 1 は 8 年前に手術が行われた古いパラフィンブロックのため、DNA が断片化して増幅できず、2 か所の腫瘍部分で行ったが、8 ローカスでは結果が得られなかった。

表 2 に妊娠性に関する臨床診断と STR 解析の結果を示す。症例 1 - 4 が今回解析を行った結果であり、症例 1, 3, 4 では臨床診断と STR 解析の結果は一致した。症例 1 では、腫瘍の結果は本人あるいはパートナーのどちらかと全く一致する結果ではなかったため、妊娠性であることがわかった（表 1）。しかし、パートナーの DNA が得られなかったため、責任妊娠が直前の分娩であるのか、過去の胞状奇胎であるのか判別できなかった。症例 2 は、STR 解析の結果は患者（Pt）と腫瘍（T）が完全に一致し、判定は非妊娠性となった。しかし、手術時に肉眼的に癌と思われた組織は、病理プレパラートを確認したところ、癌が壊死し、繊維化と好中球の浸潤を認めた非癌組織であることが確認された。すなわち、DNA 抽出に用いた組織が癌組織ではなく、本人の非癌組織由来である可能性が高いことがわかった。症例 3 は、腫瘍とパートナーの遺伝子型判定の結果が一致したため（表 1）、先行妊娠は正常妊娠であるが、責任妊娠はそれより以前の胞状奇胎（一精子受精）であることが明らかになった。症例 4 は本人（Pt）と腫瘍（T）の遺伝子型判定が一致したため、非妊娠性絨毛癌であることが明らかになった。

症例 1 は MEA 療法 3 コース、EA 療法 3 コースにより寛解したが、子宮に再発した。子宮全摘術および MEA 療法 4 コースを行い寛解し、8 年間再発を認めていない。症例 2 は子宮全摘術およびガンマナイフと MEA 療法を併用し、腫瘍マーカーである human chorionic gonadotropin (hCG) が正常域に至り、追加化学療法を現在施行中である。症例 3 は MEA 療法 10 コース、EA 療法 1 コース、全脳照射を行い寛解したが肺に再発した。肺部分切除術および MEA 療法 4 コースを行い寛解し、3 年間再発を認めていない。症例 4 は MEA 療法、BEP 療法、FA 療法、TP/TE 療法、EP/EMA 療法および手術療法（子宮、両側付属器および肺切除術）、ガンマナイフ療法を併用したが、永眠された。

4. 考察

過去に STR 解析を行った 2 症例^{4,5)}を合わせた絨毛癌 6 症例の、妊娠性に関する臨床情報に基づく診断、STR 解析に基づく遺伝学的診断、および各症例の予後を Table 2 に示す。症例 2 は肉眼的に絨毛癌と判断した部分が、病理学的には非癌組織であった可能性があり、判定は不確実となってしまったが、その他の 5 症例については妊娠性、あるいは非妊娠性に関して、臨床情報に基づく診断と STR 解析に基づく遺伝学的診断の結果は一致した。胞状奇胎の既往がある絨毛癌症例では、先行妊娠が胞状奇胎でなく、例えば正常妊娠であっても、胞状奇胎が絨毛癌の責任妊娠ではないかと考えられており、症例 3 の結果と一致した。症例 1 は妊娠性ではあったが、責任妊娠が分娩か胞状奇胎かの判定が本研究ではできなかったため、今後、パートナーの DNA、または胞状奇胎組織のパラフィンブロックから抽出した DNA を用いて STR 解析を行い、責任妊娠の判定を行う予定である。

非妊娠性絨毛癌は妊娠性絨毛癌に比べて予後が不良ではないかと言われているが、本研究で遺伝学的に非妊娠性絨毛癌と判定されたのは 2 例のみであり、症例 4 は死亡と症例 6 は寛解した。寛解した症例 6 は左卵巣に限局する卵巣原発絨毛癌 (stage I) であり、左付属器切除後に多剤併用化学療法 (MEA 療法) を行った⁵⁾。一方、症例 4 は絨毛癌と診断された際に、卵巣病変の他に多発肺転移、脳転移を認めた。卵巣絨毛癌 stage IV であり、初回治療の MEA 療法 1 コース目より治療抵抗性で、後に多発肝転移をきたした。診断の 6 か月以上前より卵巣腫大を認めていたことから、早期に診断できていれば寛解していた可能性は否定できない。しかし、症例 3 や症例 5⁴⁾も多発肺転移や消化管転移、脳転移を診断時に認めながら化学療法が奏功し寛解できたことより、非妊娠性では妊娠性絨毛癌に比べて薬剤耐性を呈しやすい可能性が示唆された。

古いパラフィンブロックから抽出した DNA は断片化し、STR 解析の結果が得られないローカスがあった。症例 1 の腫瘍では 8 ローカス、症例 3 の腫瘍では 3 ローカスの結果が得られなかったが、本研究で用いた STR 解析は 16 ローカスをターゲットとしたため、結果が得られたローカスが症例 1 では 8 ローカス、症例 2 では 13 ローカスであり、妊娠性かどうかの判定は可能であった。しかしながら、妊娠性の詳しい判定については、パートナーの DNA が必要であることがわかった。新鮮組織では抽出された DNA の質はパラフィンブロックよりも良いが、症例 2 のように肉眼的に癌組織と思われる部分が必ずしも癌組織で

はないことがわかったため、今後は新鮮組織を採取した部分の近くの組織でパラフィンブロックを作成し、病理学的に癌の存在を確認し、LMDによる癌組織の切除も併用したほうがよいと思われた。

6 症例の検討の結果、絨毛癌の妊娠性、非妊娠性に関する診断において、臨床情報に基づいた診断が STR 解析に基づく遺伝学的診断とは大きく異なっていないことが示唆された。予後との関係性については、非妊娠性絨毛癌のほうが妊娠性絨毛癌より不良である可能性が示唆されたが、症例をさらに追加して検討する必要があると思われた。

5. 文献

1. Fisher RA, Newlands ES, Jeffreys AJ, Boxer GM, Begent RH, Rustin GJ, Bagshawe KD. Gestational and nongestational trophoblastic tumors distinguished by DNA analysis. *Cancer*, 69(3):839-45, 1992
2. Kajii T, Ohama K. Androgenetic origin of hydatidiform mole. *Nature*, 268(5621):633-634, 1977
3. Jacobs PA, Szulman AE, Funkhouser J, Matsuura JS, Wilson CC. Human triploidy: relationship between parental origin of the additional haploid complement and development of partial hydatidiform mole. *Ann Hum Genet*, 46(Pt 3):223-231, 1982
4. Yamamoto E, Niimi K, Shinjo K, Yamamoto T, Fukunaga M, Kikkawa F. Identification of causative pregnancy of gestational trophoblastic neoplasia diagnosed during pregnancy by short tandem repeat analysis. *Gynecol Oncol Case Rep*, 9:3-6, 2014
5. Yamamoto E, Ino K, Yamamoto T, Sumigama S, Nawa A, Nomura S, Kikkawa F. A pure nongestational choriocarcinoma of the ovary diagnosed with short tandem repeat analysis: case report and review of the literature. *Int J Gynecol Cancer*, 17(1):254-258, 2007

表 1 絨毛癌 4 症例の STR 解析の結果

ローカス	D8S1179	D21S11	D7S820	CFS1PO	D3S1358	TH01	D13S317	D16S539	D2S1338	D19S433	vWA	TPOX	D18S51	Ameto- genin	D5S818	FGA
症例 1	Pt	14,16	30,31	8	10	16,17	8	11,13	-	13,15.2	16	8	13,14	X,X	11,12	22,22
	T	13,14	30.2	-	-	15,16	-	-	-	13	17	-	-	X,Y	12,13	-
症例 2	Pt	14,16	28,30	8,10	10,11	16,17	8,9	9,13	18,23	14,14	17,18	8,11	14,15	X,X	10,12	19,21
	T	14,16	28,30	8,10	10,11	16,17	8,9	9,13	18,23	14,(14)	17,18	8,11	14,15	X	10,12	19,21
	Pa	14,17	29,30	10,12	10,11	15,16	9,11	9,10	17,25	13,13	14,16	8,11	13,15	X,Y	10,11	23,25
症例 3	Pt	11,12	29,29	10,12	10,11	15,16	8,11	11,11	19,22	14,16.2	14,18	8,11	14,16	X,X	11,13	23,23
	T	12	24,32.2	-	-	15	11	12	-	15.2	17	9	15	X	11	19
	Pa	12,13	32.2,33.2	11,12	11,13	15,17	8,11	9,12	18,22	13,15.2	14,16	9,9	15,18	X,Y	10,11	19,20
症例 4	Pt	11,13	29,30	9,11	11,12	15,16	8,3, OL	11,14	19,23	13,15.2	17,19	8	16,17	X	11,12	18,20
	T	11,13	29,30	9,11	11,12	15,16	OL	11,14	19,23	13,15.2	17,19,20	8	16,17	X	11,12	18,20

Pt, Patient; T, tumor; Pa, partner.

表2 絨毛癌の妊娠性に関するSTR解析の結果と予後

症例	年齢	臨床診断	先行妊娠	胎状奇胎既往	STR解析結果	原発巣	転移巣 (診断時)	予後
1	39	妊娠性	分娩	あり	妊娠性	子宮	なし	再発後寛解
2	31	妊娠性	分娩	あり	非妊娠性**	子宮	肺、脳	治療中
3	37	妊娠性	分娩	あり	妊娠性 (胎状奇胎1精子受精)	子宮	肺	寛解
4	38	非妊娠性	なし	なし	非妊娠性	卵巣	肺	死亡
5*	30	妊娠性	流産	なし	妊娠性	子宮	肺、脳、肝、小腸、大腸	再発後寛解
6*	19	非妊娠性	なし	なし	非妊娠性	卵巣	なし	寛解

*症例5と症例6は過去の研究の結果を示す4.b)。

**組織が癌ではなく本人の組織であった可能性が強い。