

大腸直腸癌之基因分析

魏淑鈐 翁昭旻 謝銘鈞 王正一

台大醫院 內科部

前言

在後基因體時代的今天，除了外傷，幾乎所有的疾病都和遺傳因子有關。當人類的基因被解開時，意味著對疾病的診斷、預防及治療進入新紀元。特別是對癌症這種疾病而言，遺傳物質的差異對疾病的發生率、疾病的臨床過程、以及對不同治療的反應程度都將有一定程度的影響。建立新的診斷及治療癌症的策略，的確有其必要性[1]。大腸直腸癌在西方國家是第二常見的癌症。近年來在台灣地區，大腸直腸癌的發生率也逐年增加，已取代胃癌而成為國人第三常見的癌症[2]。對大腸直腸癌基因分析的了解，確實有其必要性及重要性。

在近二十年中，對大腸直腸癌發生過程的一系列基因變化過程的了解，有很大的進步。這樣的了解是透過兩種獨立但又互相重覆的研究路徑而得到的，這包括了(1)對遺傳症候群、家族性群聚大腸直腸癌的研究，及(2)對大腸癌致病機轉的分子遺傳檢測[3]。以下，就利用此二路徑的研究，對大腸直腸癌的基因分析作一介紹。

遺傳症候群及家族性群聚的大腸直腸癌

家人患有大腸直腸癌，被認為是發生大腸直腸癌的危險因子之一。大家所熟知的遺傳症候群可以解釋一部分的癌症發生機率，但大部分的

情況，為什麼會增加大腸直腸癌的危險仍有待了解。遺傳性的大腸直腸癌症候群包括家族性多發腺瘤性息肉(Familial Adenomatous Polyposis, FAP)及遺傳性非息肉性大腸直腸癌(Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer, HNPCC)。FAP約占大腸直腸癌患者的1—5%，而HNPCC則佔了大約5—15%的比例。然而，大多數的家族性大腸直腸癌患者並無法歸類於前二項遺傳性症候群，這些家族有可能是基因部分傳給子代或部分表現所造成的。

一、家族性多發腺瘤性息肉(Familial Adenomatous Polyposis, FAP)

臨床表現為大腸內出現數百至數千個腺瘤性息肉。多半平均於15歲開始出現息肉；若為帶有突變基因者最晚35歲也都會出現大腸息肉。大腸癌平均發生年齡為39歲。如果大腸未切除，大腸癌的發生幾乎是不可避免的。這是一種顯性遺傳的疾病，而且只要帶有突變基因者都會發生多發性息肉。這些病人在上消化道也很常發生息肉。大約50%的病人會有胃息肉，而至少90%的病人會有十二指腸息肉。胃的息肉少有惡性變化，但十二指腸息肉則有惡性化的可能。此症候群有幾種變異型：(1)典型的家族性腺瘤性多發息肉(2)Gardner症候群(Gardner syndrome)及(3)attenuated adenomatous polyposis coli(AAPC)。Gardner症候群定義為腸道息肉合併一些良性的腸道外表現，如：osteomas、epidermoid cysts、desmoid tumors、及congenital hypertrophy of the retinal pigment epithelium。AAPC為腸道

Title: Gene Analysis of Colorectal Cancer

Authors: Shu-Chen Wei, Jau-Min Wong, Ming-Jium Shieh, Cheng-Yi Wang; Department of Internal Medicine, National Taiwan University Hospital

Key Words: gene, colorectal cancer



內有較少的息肉，通常為 5 至 40 個但也有可能到數百個；這些息肉多半比典型的 FAP 息肉位於更近小腸端發生；這樣的病人，大腸癌發生的平均年齡較晚(平均為 54 歲)。

FAP 的突變基因是位於第 5 染色體長臂上的 APC (adenomatous polyposis coli) 基因。APC 是一 2483 個胺基酸的蛋白質，作用為支持細胞與細胞間的沾黏。APC 是一抑癌基因，其對大腸癌發生的重要性不僅在 FAP 的病人(FAP 病人中，約有 80% 可以找到有 APC 基因的突變)，APC 基因的突變導致大多數大腸直腸癌的產生。原因是 APC 在 Wnt-Signalling 訊息傳遞路徑中擔任“守門員”(Gate-Keeper)角色失職[4]。正常功能情況下，APC 蛋白質提供一很大的舞台讓多個 Wnt 路徑中的蛋白質共同作用而得以調控 β -catenin (致癌基因) 的表現。一旦 APC 基因發生突變而失去正常功能時，將造成 β -catenin 的持續穩定表現，經由和 T cell factor-4 (Tcf-4) 的結合，進入細胞核，於是造成核內致癌基因 C-myc、C-jun 及 Cyclin D1 的持續表現，細胞的正常生長調控因此被打斷，癌症由此發生[5,6]。

基因分析可用於早期診斷出帶有突變基因者，對疾病的診斷不再需要長時間的追蹤。也因為如此，早期診斷後的病人處理方式也可以有更好、更新的治療策略。帶有突變基因者，需早期開始追蹤腸鏡並縮短其時間間隔；甚至開始化學預防治療(Chemoprevention)。沒有帶著突變基因者，則可延長其追蹤的間隔，以減少病人的痛苦及降低醫療成本。化學預防治療在近幾年來是一熱門討論的話題。

化學預防性治療是因為由於有關節炎的 FAP 病人使用 sulindac 時，發現這些病人的腺瘤數目及大小都有減少的情形[7]。在近幾年來，sulindac、aspirin 及選擇性 cyclooxygenase-2 (COX-2) 已被核准可用於大腸癌的化學預防治療[8]，但使用的對象及時機則仍有待確認。考慮化學預防性治療的利弊得失，若能以基因分析法找出帶有突變基因者，再授予副作用低卻有效的藥物，應可將化學性預防治療之成效／危險比例提到最高。

對於 APC 基因突變的檢測方法，包括早期使用的 linkage analysis 到近幾年的 protein truncation test (PTT)、single strand conformation polymorphism(SSCP)、degenerative gradient gel electrophoresis (DGGE) 及最近一、二年的 denaturing High-performance Liquid chromatography (DHPLC) 或直接對核甘酸的直接定序確認其突變基因所在的變化。對於此巨大基因，如：APC (15 個 Exon, 9Kilo-bases) 先以 PTT、SSCP 或 DHPCC 篩檢出有變化的區段，再以核甘酸直接定序確認，應該是比較有效率且節省人力、物力的方法。其中，DHPLC 對核甘酸序列有變異的偵測敏感度被認為是高於其他種方法(如 SSCP、DGGE...)。DHPLC 被報告的偵測敏感度高達 95-100% [9]。

二、遺傳性非息肉性大腸直腸癌(Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer, HNPCC)

HNPCC 的臨床表現可分為兩大群：(1)發病部位侷限於大腸者，Lynch Syndrome I 及(2)包括腸道以外部位的癌症家族症候群，Lynch syndrome II。這也是一種顯性遺傳的疾病，發生大腸癌平均年齡為 45 歲。HNPCC 的患者比較容易有同時發生的、近小腸端的大腸癌發生。帶有突變基因者，容易有較少數目但體積較大的腺瘤性息肉。大腸癌之外，子宮內膜癌、卵巢癌、胃癌、小腸癌、腎細胞癌等也都曾被報告出現此一癌症家族症候群中。

HNPCC 的基因缺陷是錯誤配對修補基因的損壞，mismatch repair genes (MMR genes)。這些基因的正常功能是修補 DNA 複製時產生的錯誤、或修補受到物理及化學傷害的 DNA，一旦這些修補基因出現突變而導致失去功能，DNA 的錯誤就會持續存在。如果這些錯誤發生於致癌基因或是抑癌基因，癌症就可能產生。目前已被發現的哺乳類 MMR 基因群可分為 Mut S 及 Mut L homologs 兩大群；Mut S homologs 中包括有 MSH2、MSH3、MSH4、MSH5、MSH6，而 Mut L homologs 中則包括有 MLH1、MLH3、PMS1 及 PMS2。已知和錯誤修補功能有密切關係的有 MSH2、MSH3、MSH6、MLH1、PMS1、PMS2 及 MLH3 [10]。MSH3 和 MSH6 的功能有互補作



用，當其中之一失去功能時未必會出現問題，可是一旦兩者都失去功能時就容易發生癌症。而在大多數目前的報告中，MSH2(第 2 染色體)及 MLH1(第 3 染色體)的基因突變，是 HNPCC 病人的主要變化基因(兩者合併約佔 65% 的 HNPCC 基因變化)，其他如 PMS1(第 2 染色體)及 PMS2(第 7 染色體)則佔其他的 10% 左右 [11,12]。

由此修補系統失去功能而產生的癌症，其腫瘤組織多半可發現複製錯誤的出現。可經由檢測 2 或 3 組 DNA 重複片段的長度數目是否不同於正常組織(Microsatellite instability)，而得知是屬於 MSI-high、MSI-low 或 MSS (Microsatellite stable)的腫瘤。一般而言，HNPCC 的大腸癌腫瘤中，約 90% 是屬於 MSI-H；而一般的大腸癌腫瘤約有 10-15% 為 MSI-H [12]。目前對 HNPCC 使用的 microsatellite 標記，已由 HNPCC 的國際聯合組織(ICG-HNPCC)及國際癌症組織 National Cancer Institute (NCI)統一；目前建議使用的標記包括 BAT25、BAT26、D2S123、D5S346、D17S250 等五個 [13,14]。MSI-H 定義為大於等於 30% 的 instability 出現時；而 MSS 則為 5 個標記都沒有變化。

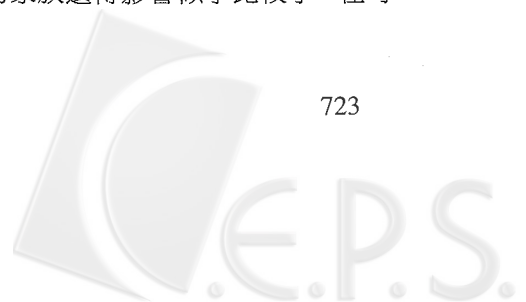
因為缺乏類似 FAP 病人的典型大腸內大量息肉的臨床症狀，HNPCC 的診斷主要還是得靠家族史病史的詢問。傳統的 Amsterdam's 定義包括了(1)家族中至少有 3 個人發生組織學確立的大腸直腸癌，其中一人是其他的一等親，並排除 FAP 的可能(2)至少發病於連續兩子代(3)其中一人之大腸直腸癌診斷時年齡小於 50 歲。但此一定義卻未將腸道以外的癌症列入考慮，於是另有 Bethesda 定義，其中包含了典型的 Amsterdam 定義符合者之外，更將子宮內膜癌、卵巢癌、胃癌、肝膽系統及小腸癌、膀胱及腎、輸尿管癌也列入考慮，並將較年輕即發生癌症者(45 歲)或小於 40 歲即發生大腸腺瘤者列入定義中。這樣的確可增加診斷的敏感性，可是經由 MMR 基因及 MSI 標記的分析，其出現基因突變的陽性率確有降低的情形。有學者提出配合臨床病史及基因分析以確立 HNPCC 的診斷，但目前看起來似乎仍以病史為最可靠的診斷依據，其理

由說明如下。

無庸置疑的是，對 HNPCC 病人的基因分析應由檢測 MMR 基因群開始。其中 MSH₂ 及 MLH₁ 應首先檢測，因為根據報告，多數的突變發生於此 2 基因。但也根據研究結果顯示，並沒有明顯的突變好發點存在，也就是說，對於突變基因的檢測必須要將整個基因序列都做完整的分析(包括外顯子(Exon)及外顯子-內含子(Intron)的交接處)才能算是一可信賴的突變偵測法。hMLH₁ 有 19 個外顯子(cDNA: 2.7Kb)；hMSH₂ 有 16 個外顯子(cDNA: 2.5Kb)。再加上 hPMS1、hPMS2、hMLH6、hMSH3 的完整基因分析將是一巨大的工程。之前用於偵測 MMR 基因突變的方法也和 FAP 的 APC 基因分析法類似，包括 SSCP、DGGE、PTT、DHPLC 及核甘酸的直接定序。若考慮其敏感度、專一度及花費/效益比例，DHPLC 先篩檢整個基因，再以核甘酸直接定序確認為目前較可行、有利的方式 [15,16]。但即便經由廣泛的基因檢測，仍然只能在 60-70% 的 MSI-H 且符合 Amsterdam 或 Bethesda 定義的 HNPCC 病人中找到基因突變 [12]。除了整大段基因遺失及 promoter 的突變之外，可以假設的是仍有其他的 MMR 基因或其他路徑會造成 HNPCC 的發生。

三、分散性的大腸直腸癌：

大部分的大腸直腸癌患者都是分散性的病例。但是統計資料顯示，這些所謂的分散性大腸直腸癌患者的一等親人，有 2 至 3 倍機會患有大腸直腸癌。造成這種危險度增加的基因至今尚未被確認，但有可能和食物、環境中的致癌物代謝相關。家族中發生大腸直腸癌的人數及其發病年齡對其他家人再發生癌症的危險度都有影響。舉例來說：家人中有 2 位一等親有大腸直腸癌者，比只有一位一等親有癌症者，發生癌症的危險度至少為 2 倍以上。又如：一等親發生大腸直腸癌者，若其發病年齡為 55 歲以上時，家人發生大腸直腸癌的危險度為一般人的 2 倍；但若其發病年齡為 45 至 55 歲時，危險度為 3 倍；若發病年齡小於 45 歲，其危險度則增加至 4 倍 [17]。癌症發生在大腸任何位置，對家人的危險度都一樣，但直腸段的家族遺傳影響似乎比較小。在可



能的致病基因未被確認之前，必須建議家人定期執行臨床篩檢(糞便潛血反應及內視鏡檢)。一旦有更多的家人發病，就須考慮列入 FAP 或 HNPCC 的診斷，或加上基因分析以確立診斷。

大腸癌發生過程中的一系列基因變化

Fearon 和 Vogelstein 於 1990 年提出的 Vogelgram (Adenoma-Carcinoma Sequence) 首先提出了由正常細胞發展至癌症一系列基因突變的模式[18]。這個模式首次將基因層面發生的事件與之後於組織層面產生的結果連結。對癌症發生的過程提供了可以以基因分析切入的一個網狀連接模式。在這個由正常黏膜上皮→初期腺瘤→晚期腺瘤→癌→轉移至他處的過程曾被提出的相關基因有 APC/ β -catenin、K-ras、P53、DCC、Cyclin D₁ 及 c-myc...等。

APC/ β -catenin、Cyclin D₁ 及 c-myc 的功能及其對細胞生長的調控方式已在之前說明過。K-ras 是一致癌基因，其轉譯的蛋白質會與細胞膜結合，參與細胞內的訊息傳遞。K-ras 基因的第 12 和 13 個胺基酸在大腸的腺瘤和癌組織常被發現有突變，此一突變將造成不正常的訊息傳遞而產生不正常的細胞生長—亦即腺瘤或癌。P53 是一抑癌基因，位於第 17 染色體的短臂，P53 蛋白質是一核磷酸蛋白，是細胞週期 G₁ 至 S 期的重要調控蛋白。當細胞內偵測到突變時，P53 的調控使細胞停在 G₁ 期進行修復的工作，修復完才正常進入 S 期及細胞分裂。或是受傷太嚴重時，直接導入細胞凋亡(Apoptosis)而不致使有問題的細胞繼續生長繁衍。一旦這個抑癌基因出現問題，此調控功能不再存在，有異常狀況的細胞不再停止於細胞 G₁ 期進行修復或引發細胞凋亡，反而持續分裂生長，產生癌症。在大腸癌組織中，約 60% 其 P53 為突變型。DCC 基因位於第 18 染色體的一抑癌基因，最近的研究顯示當 DCC 蛋白無法正常的與 Netrin-I 結合時，將抑制細胞凋亡的正常調控。綜合以上，經由一系列致癌基因、抑癌基因的出現突變，正常的細胞一步一步的形成癌細胞，甚至開始到處移

轉。

經由對這一系列在癌症形成過程中產生變化的基因分析，對大腸癌將來的診斷及治療策略產生之影響有：

一、診斷：

除了之前提到的配合臨床發現及對 FAP (APC gene)、HNPCC (MMR genes) 的基因檢測可早期診斷出其確切病因外，大腸癌的分期觀念有可能經由基因之分析結果而須重新調整。曾有報告指出，若在淋巴結中的 DNA 可找到 K-ras 及 P53 突變的存在證據時，代表仍有微量的癌細胞存在(micrometastases)。另一方法為以淋巴結之 RNA 進行反轉錄片段複製(reverse transcriptase-PCR/RT-PCR) 分析 CEA，結果發現 micrometastases 存在於某些傳統分期 Duke II 的患者淋巴結中。這些次族群病人的預後明顯比沒有 micrometastases 者差(沒有 micrometastases 的 stage II 患者其 5 年存活率為 91%；而有 micrometastases 的 stage II 患者其 5 年存活率降至 50%)。傳統的觀念是 Duke stage II 的患者不需接受術後的 Adjuvant Chemotherapy；但經由選定合適的標記來找出有微量存在的癌細胞患者再投予合適的 Adjuvant 治療，將可以改善某一特定群病人之預後。

二、治療：

包含傳統的化學治療及最近被重視的化學預防性治療。在大腸癌形成過程中的每部分都可以視為治療的標的。考慮 Wnt 路徑在大腸癌形成過程的重要性，可以考慮在此路徑中找出有效的新藥。目前，研究群正嘗試以小分子量物質阻斷 Tcf 與 β -catenin 的交互作用。如此即可阻斷下游致癌基因(c-myc、cyclin D₁ 等)的被活化而使得腫瘤的生長或病程進展獲得控制。此外，如果能找出影響癌細胞移轉的調控基因，對腫瘤的擴散也可以控制的更好。最近在乳癌的研究已出現這樣的可能性。Muller 及他的同僚發現 leucocyte chemoattractant receptor (CXCR4) 表現於乳癌細胞，而 CXCR4 的配體 (ligand) CXCL12 則表現於淋巴結、骨髓和肺，這些都是乳癌常見的轉移部位[19]。在免疫有缺陷的小鼠模式，阻斷 CXCR4 可降低移轉的機會。發展可抵抗

CXCR4 的小分子可能就可以控制或預防移轉。在大腸癌應該也有類似的調控模式，若能發現此調控基因，應也可以預防大腸癌的移轉。

根據過去對大腸癌形成之研究，也使得大腸癌成為一可預防的疾病。特別是發現腺瘤是一無症狀的轉換病灶(介於正常與癌之間的過渡區)，而腺瘤的發生與大腸直腸癌的發生率及致死率成比例。在今天，腺瘤不只是一單純的大腸癌發生指標，它也成為一可降低大腸癌危險度的治療標的。經由這樣的處理，更能釐清並建立新的大腸癌預防／治療方式。之前曾提到以 Sulindac, Aspirin 或其他的非類固醇抗發炎藥物，甚至新型的選擇性 COX-2 抑制物對腺瘤的數目及大小給予介入性治療，就是此一例子的實證。經由如此，探討其有效的作用機轉(如：Prostaglandin dependent 或 independent；COX-2 dependent 或 independent)都可以對大腸癌的分生機轉更了解，進而找出可有效控制此一癌前病灶而副作用最少的預防性治療藥物。

以上提到的部分，都是以傳統的生物科技法，一次針對一個基因作分析。近幾年，一些新的分析方式，可提供更廣、更深的基因表現分析，以提供更多的資訊。基因晶片(Microarray)是較早的一個例子、蛋白質晶片(Proteomics)則是較近的一個方法。cDNA microarray 提供一次可同時找出甚至數千個基因的表現改變。比較正常與有特定變化或經特殊處理後的 cDNA microarray，即可知道那幾群基因的表現有改變，的確是一有效率的方法。再加上人類基因群(human genome)的解碼、配合生物資訊(Bioinformatics)在電腦的使用，使得基因的研究更有效且迅速。蛋白質晶片更可以直接針對蛋白質(基因的後產物)層面的變化為分析對象，了解其功能群上的改變和差異性。拜生物資訊資料庫(Bioinformatics database)及分析軟體的進步所賜，對蛋白質等較複雜產物之分析才可以進展的如此順利。經此技術，或可找出癌症相關之蛋白質，作為一生物標記以幫助癌症的早期偵測、診斷、預後指標或專一治療的標的物[20]。

疾病的基因分析絕對只是一種手段，目的在於對疾病深入了解後，提供更好的醫療照顧，

進入達到預防疾病的目的。或許在不久的將來，下面的病例討論報告可能出現。一位六十歲男性，乙狀結腸癌症經手術切除後，組織學淋巴結為正常細胞；但經 RT-PCR 發現淋巴結內仍有微量癌細胞 RNA，cDNA microarray 分析其 metastases 路徑的結果顯示 5 年內有 70% 肝移轉的可能，於是建議病人接受 adjuvant 化學治療。將病人手術的標本培養成的癌細胞做化學藥物測試，選出敏感度最高的藥物 A 予以治療，術後 5 年時，病人一切正常，仍在門診定期追蹤。另一例為一 FAP 家族的子代，在其父親 35 歲發病時(病人 5 歲)診斷並執行基因分析，發現這 2 人都有 APC gene，Exon 15 的 truncation 突變。病人於 15 歲時開始接受天然食品萃取物 B 的化學預防治療及每年一次的膠囊內視鏡檢追蹤，至今 35 歲未有大腸息肉產生，病人仍在門診規則追蹤。雖然這在今天看起來都像科幻小說般的情節，我們仍然希望未來不遠的一天，這樣的事件是再平凡不過的事。

推薦讀物

1. Liefers GJ, Tollenaar RA: Cancer genetics and their application to individualized medicine. *Eur J Cancer* 2002;38:872-9.
2. Health and vital statistics, Taiwan area, ROC, 1997.
3. Burt RW, DiSario JA, Cannon-Albright L: Genetics of colon cancer: impact of inheritance on colon cancer risk. *Ann Rev Med* 1995;46:371-9.
4. Polakis P: The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor. *Biochim Biophys Acta* 1997;1332:F127-47.
5. Korinek V, Barker N, Morin PJ, et al: Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science* 1997;275:1784-7.
6. Behrens J: Control of beta-catenin signaling in tumor development. *Ann N Y Acad Sci* 2000;910:21-33; discussion -5.



7. Winde G, Gumbinger HG, Osswald H, Kemper F, Bunte H: The NSAID sulindac reverses rectal adenomas in colectomized patients with familial adenomatous polyposis: clinical results of a dose-finding study on rectal sulindac administration. *Int J Colorectal Dis* 1993;8:13-7.
8. Ricciardiello L, Roda E, Bazzoli F: Chemoprevention in colorectal neoplasias: what is practical and feasible? *Dig Dis* 2002;20:70-2.
9. Wu G, Wu W, Hegde M, et al: Detection of sequence variations in the adenomatous polyposis coli (APC) gene using denaturing high-performance liquid chromatography. *Genet Test* 2001;5:281-90.
10. Jacob S, Praz F: DNA mismatch repair defects: role in colorectal carcinogenesis. *Biochimie* 2002;84:27-47.
11. Cheah PY, Eu KW, Seow FC: Update of genetics in colorectal carcinomas: genomic instability and somatic evolution. *Ann Acad Med Singapore* 2000;29:331-6.
12. Muller A, Fishel R: Mismatch repair and the hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome (HNPCC). *Cancer Invest* 2002;20:102-9.
13. Dietmaier W, Wallinger S, Bocker T, Kullmann F, Fishel R, Ruschoff J: Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression. *Cancer Res* 1997;57:4749-56.
14. Bocker T, Diermann J, Friedl W, et al: Microsatellite instability analysis: a multicenter study for reliability and quality control. *Cancer Res* 1997;57:4739-43.
15. Holinski-Feder E, Muller-Koch Y, Friedl W, et al: DHPLC mutation analysis of the hereditary nonpolyposis colon cancer (HNPCC) genes hMLH1 and hMSH2. *J Biochem Biophys Methods* 2001;47:21-32.
16. Kurzawski G, Safranow K, Suchy J, Chlubek D, Scott RJ, Lubinski J: Mutation analysis of MLH1 and MSH2 genes performed by denaturing high-performance liquid chromatography. *J Biochem Biophys Methods* 2002;51:89-100.
17. St John DJ, McDermott FT, Hopper JL, Debney EA, Johnson WR, Hughes ES: Cancer risk in relatives of patients with common colorectal cancer. *Ann Intern Med* 1993;118:785-90.
18. Fearon ER, Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-6.
19. Muller A, Homey B, Soto H, et al: Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001;410:50-6.
20. Umar A, Viner JL, Hawk ET: The future of colon cancer prevention. *Ann N Y Acad Sci* 2001;952:88-108.

