

Thesis

掲載論文は学位論文(Thesis)であり原著論文ではない。
従って掲載論文を他論文で引用することを禁止する。

リンチ症候群のスクリーニングとしてのミスマッチ修復タンパクの 免疫染色の有用性：日本人50歳未満大腸癌における検討

臨床医学研究系 臨床腫瘍科（がんプロ）

鈴木 興秀

【背景・目的】リンチ症候群はミスマッチ修復遺伝子の生殖細胞系列変異をおもな原因とし、大腸癌をはじめ多臓器に悪性腫瘍が発生する優性遺伝性症候群であるが、わが国のリンチ症候群の頻度・実態は不明である。近年、原因遺伝子のミスマッチ修復タンパクによる免疫染色がリンチ症候群のスクリーニングに用いられるようになった。今回、50歳未満の初発大腸癌症例を対象にリンチ症候群のおもな原因遺伝子である4種類のミスマッチ修復タンパクの免疫染色を行い、リンチ症候群のスクリーニングとしての有用性について検討した。さらに、リンチ症候群が確定ないし強く疑われる群と、リンチ症候群の可能性がほとんどない群との間で臨床病理学的諸因子や生存期間について比較検討した。

【対象と方法】50歳未満初発大腸癌連続109例に対し、MLH1, MSH2, MSH6, PMS2タンパクの免疫染色を行い、少なくとも1種類のタンパクの欠失を認められた症例について、腫瘍のマイクロサテライト不安定検査を行い、選択的にメチレーション解析も行った。また、患者自身の同意が得られた場合には遺伝学的検査を行った。

【結果】10例(9.2%)に少なくとも1種類のミスマッチ修復タンパクの欠失を認め、その内訳はMLH1/PMS2; 4例, MSH2/MSH6; 4例, MSH6; 2例であった。マイクロサテライト不安定検査では高頻度不安定性が9例に認められた。MLH1/PMS2欠失の4例のうち、3例(高度マイクロサテライト不安定性を認めなかった1例を含む)ではMLH1遺伝子の異常を同定できなかった。他の1例ではMLH1遺伝子のプロモーター領域のメチレーションが認められた。MSH2/MSH6欠失の4例中1例とMSH6単独欠失2例に遺伝学的検査が行われ、EPCAM遺伝子の欠失あるいはMSH6遺伝子変異が同定された。リンチ症候群が確定ないし強く疑われる群(n=6)とリンチ症候群が否定的な群(n=101)の比較では、生存期間は同等であったが、前者の方が有意に若年(P<0.05)かつ右側結腸(P<0.01)に発症し、改訂ベセスダガイドライン陽性項目数が多く(P<0.01)、病理組織学的所見では、低分化腺癌(P=0.03)、および腫瘍部リンパ球浸潤(P<0.05)が多かった。

【結語】50歳未満の大腸癌を対象に、網羅的にミスマッチ修復タンパクの免疫染色を行うことはリンチ症候群のスクリーニングに有用であるが、発症年齢、発生部位、特徴的病理組織学的所見を加味すればさらに効率的なスクリーニングに結びつく可能性が示唆された。この点をさらに明確にするにはさらなる症例の集積が必要と考えられる。

緒言

リンチ症候群(Lynch syndrome, 以下LSと略記)はミスマッチ修復(mismatch repair, 以下MMRと略記)遺伝子であるMLH1, MSH2, MSH6, PMS2遺伝子のいずれかの生殖細胞系列変異をおもな原因とし、大腸癌、子宮内膜癌をはじめ、多臓器に悪性腫瘍が発生する優性遺伝性症候群である^{1,2)}。LSの大腸癌は、散発性大腸癌に比べ、

若年発症(平均年齢45歳前後)、右側結腸好発、同時性・異時性大腸癌の頻度が高いなどの特徴がある^{3,4)}。近年、上記4種類のMMR遺伝子異常のほか、MSH2遺伝子の3'側の欠損によるMSH2遺伝子のプロモーター領域の異常メチル化でMSH2遺伝子の転写が抑制されることや^{5,6)}、MLH1遺伝子のプロモーター領域の異常メチル化を生来有し(germline epimutation)、これが原因でMLH1遺伝子が転写されない⁷⁾epigeneticな異常がLSの原因になり得ることが報告されている。LSはかつて遺伝性非ポリポーシス性大腸癌(Hereditary

医学博士 甲第1274号 平成27年3月27日(埼玉医科大学)

○著者は本学論文の研究内容について他者との利害関係を有しません。

nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC)とも呼ばれ, 原因遺伝子が同定される以前の1990年には大腸癌の家族集積性と発症年齢等に重点を置いたアムステルダム基準⁸⁾が提唱された. 原因遺伝子が次々に同定された⁹⁻¹³⁾1993~1997年以降では, 国際共同研究目的でアムステルダム基準に大腸癌以外の関連癌を加えた改訂アムステルダム基準¹⁴⁾が1999年に提唱され, HNPCCの臨床基準として用いられてきた. その後, 本症候群が大腸癌以外の多臓器に発症する特徴や, 同基準を満たす68%~85%^{15,16)}にしか遺伝子の生殖細胞系列変異が同定されないこと, また逆にMMR遺伝子の生殖細胞系列に異常を認めても改訂アムステルダム基準を満たさない大腸癌が41%¹⁷⁾に存在することなどが考慮され, 近年は本症候群の研究に多大な貢献をしたHenry Lynch博士にちなんでLSと呼称するようになった⁵¹⁾.

LSの研究はアムステルダム基準を満たすような家族集積性が強い大腸癌家系を中心に行われてきたが, しいに大腸癌をはじめとする関連癌の浸透率(生涯発生率)は当初考えられていたほど高くなく, 大腸癌では男性で54~74%, 女性では30~52%, 子宮内膜癌では28~60%, その他の関連癌では10%前後ないしそれ以下であると考えられている⁵¹⁾. ちなみにわが国では核家族化や個人情報保護法の施行により, 改訂アムステルダム基準に合致する症例を拾い上げることはきわめて困難な状況にある⁵²⁾. LSの関連癌の浸透率や, 改訂アムステルダム基準ではLSを十分拾い上げられない可能性が考慮された結果, LSのスクリーニング法として, LSの大腸癌の分子学的特徴であるマイクロサテライト不安定性(microsatellite instability, 以下MSIと略記)を検査するための改訂ベセスタガイドライン³⁾が提唱され, 少なくとも1項目を満たす大腸癌患者には, 腫瘍のMSI検査を行うことが推奨されている. その1項目として, 「50歳未満の患者で診断された大腸癌」があげられている.

一方, LSの大腸癌や子宮内膜癌などではMMRタンパクの欠失が認められることから, これらのタンパクに対する免疫染色(immunohistochemistry, 以下IHCと略記)もLSのスクリーニングに有用である. わが国で2012年に発行された遺伝性大腸癌診療ガイドライン³⁾では, 家族歴や臨床病理学的情報から改訂アムステルダム基準や改訂ベセスタガイドラインに合致するかどうかを判断し(1次スクリーニング), 腫瘍(大腸癌)のMSI検査あるいはIHCを行って(2次スクリーニング), 最終的にLSの候補を絞り込み, 最終的に遺伝カウンセリングを行ったうえでLSの確定診断を行うことが推奨されている. 現在, LS(HNPCC)が疑われる症例に対してMSI検査は保険収載されているが, MMRタンパクに対するIHCはされていない. しかしながら, IHCはMSI検査に比べ安価で, 原因遺伝子が推定できることなどから, わが国でもLSの研究領域で急速に普及しつつある.

全大腸癌患者におけるLSの頻度について, 近年のMSI

検査あるいはIHCを用いた欧米からのuniversal screeningからの報告によれば, 2.5%~3.6%¹⁸⁾である. また, 同じく欧米のデータではあるが, LSの原因となるMMR遺伝子の生殖細胞系列変異は370人に一人の割合で存在すると報告されている¹⁹⁾. しかしながら, わが国における全大腸癌におけるLSの頻度や, 一般集団におけるMMR遺伝子異常の頻度についてはほとんど知られていない. このような背景をふまえ, 改訂ベセスタガイドラインで提唱されている項目の一つである, 「50歳未満で診断された大腸癌」に焦点を絞り, 50歳未満の大腸癌患者におけるLSのスクリーニングとしての有用性について検討した. また, これらの研究対象のなかで, LSと確定あるいは強く疑われる症例群とLSが否定的な症例群との間で, 臨床病理学のおよび生存期間について差があるか否かについても検討した.

対象と方法

本研究は埼玉医科大学倫理委員会(申請番号:592-III)および埼玉医科大学総合医療センター倫理委員会(申請番号:926-II, 924-III, 337)の承認のもとで行われた. 遺伝学的検査については, 十分な遺伝カウンセリングを行い, 患者本人が希望した場合にのみ行った.

対象

1997年4月~2014年4月の間に埼玉医科大学総合医療センター消化管・一般外科(旧外科を含む)で初発大腸癌に対し, 原発巣を切除された診断時年齢50歳未満の連続109例を対象とした. 家族性大腸腺腫症や潰瘍性大腸炎, クロウン病に合併した大腸癌は除外した.

方法

臨床病理学的項目: 診療録から, 診断時年齢, 性別, 大腸癌の部位, 組織学的病期, 組織学的所見, 予後(再発の有無, 死亡の有無, 原癌死の有無), 家族歴を抽出した. なお, 同時性多発大腸癌の場合には, 組織学的病期が進行した病変, 同じ場合には腫瘍径が大きい病変のみを検討対象とした. 患者本人・血縁者の大腸癌を含む関連癌と発症年齢から, 改訂アムステルダム基準に合致するか, あるいは改訂ベセスタガイドラインに合致する項目数について検討した. 組織学的検討は大腸癌取扱い規約第8版⁵⁰⁾に基づき, 組織学的病期はTNM分類第7版に従った. また, 改訂ベセスタガイドラインで提唱されているMSI-Hを疑う組織学的特徴である, 腫瘍内リンパ球浸潤(tumor infiltrating lymphocytes, 以下TILと略記), 粘液癌・印鑑細胞癌様分化(mucinous/signet-ring cell differentiation), クロウン様リンパ球反応(Crohn's-like lymphocytic reaction, 以下CRAと略記), および髄様増殖については, 病理検査用に作成された腫瘍のヘマトキシリン・エオジン染色の最大断面において, Alexanderら⁴⁸⁾の方法に従って評価した.

免疫組織化学検査: 大腸癌手術検体パラフィン包埋ブロックを使用し, *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6* および *hPMS2* がコードする4つのMMRタンパクの発現を抗体

によるIHCにより解析した。ホルマリン固定された大腸癌部を含むパラフィン包埋ブロックを4 µmに薄切し、スライドガラスに貼り付けた後、60°Cで24時間乾燥させた。キシレンにて15分間脱パラフィンし、100%エタノールから段階的に脱キシレン処理後、クエン酸バッファー (pH 6.0) により105°C 10分間オートクレーブ処理し抗原性の賦活化を行った。さらに内因性ペルオキシダーゼ活性除去のため過酸化水素加メタノールを用いて、室温で15分間インキュベートした後、一次抗体と反応させた。各MMR遺伝子蛋白に対する一次抗体として、抗hMLH1抗体 (G168-15, BD Pharmingen社, San Diego CA, USA), 抗hMSH2抗体 (FE11, Calbiochem社, La Jolla CA, USA), 抗hMSH6抗体 (44/MSH6, BD Pharmingen社, San Diego CA, USA), 抗hPMS2抗体 (A16-4, BD Pharmingen社, San Diego CA, USA) をそれぞれ50倍, 50倍, 100倍, 50倍に希釈して用いた。染色は, DAKO Envision (Agilent Technologies Dako, Glostrup, Denmark) を使用し, diaminobenzidine (SIGMA社, St.Louis MO, USA) で発色させた。hematoxylineで核染色を行った。周囲の正常粘膜における核の染色性をinternal controlとして大腸癌部の染色性を評価し, 腫瘍細胞の核で染色陰性, 隣接正常粘膜および間質細胞で染色陽性の場合を染色結果「陰性」とした。

MSI検査: IHCでいずれかのMMRタンパクで「陰性」所見が得られた場合, 腫瘍のMSI検査を行った。腫瘍中心部および隣接正常粘膜部のパラフィン包埋ブロックよりDNAを抽出し, 改訂ベセスダガイドラインで推奨されている5つのマーカー, BAT25, BAT26 (mononucleotide repeat) ならびにD5S346, D17S250, D2S123 (dinucleotide repeat) を, TaKaRa Taq HSを用いた polymerase chain reaction (PCR) 法で増幅した。DNAシーケンサー BECKMAN GeXP (Beckman Coulter, Inc, Indianapolis IN) を用いてフラグメント解析を行い, 正常組織由来DNAと腫瘍組織由来DNAの各領域の波形の違いを比較した。正常組織と腫瘍組織でのPCR産物のサイズが異なる場合をマイクロサテライト不安定性陽性とし, 5つのマーカー中2つ以上のマーカーで陽性の場合をhigh frequency MSI (以下, MSI-Hと略記) とし, いずれかひとつが陽性の場合をlow frequency MSI (以下, MSI-Lと略記), それ以外をmicrosatellite stable (MSSと略記) とした。

メチレーション解析: MLH1 タンパクの欠失を認める場合, 腫瘍部分を60%以上含むパラフィン包埋切片からDNAを抽出し, Combined Bisulfite Restriction Analysis法 (COBRA法)²⁰⁾を用いてMLH1 遺伝子のプロモーター領域のメチレーション解析を行なった。パラフィン切片より抽出したDNAをEpiTect Bisulfite Kits (QIAGEN) を用いてBisulfite処理した後, メチル化DNAと非メチル化DNAに共通のプライマーを用いてPCR法で増幅し, 産物を制限酵素 (*RsaI*) で処理した後3%アガロースゲルで電気泳動を行いメチル化の有無の判定を行った。Positive controlには

SW48細胞を用いた。腫瘍部位でメチレーション陽性と判定された場合には正常粘膜部位でのメチレーション解析も同様に行った。

遺伝学的検査: 末梢血7 mLを用い, 末梢白血球からDNAを抽出した。免疫染色の結果を考慮して検索する遺伝子のターゲットを絞り込んだ。各々の遺伝子に特異的なプライマーを用い, PCR-direct sequence法で各遺伝子のエクソン領域ならびにエクソン-イントロン境界領域の塩基配列を解析した。同法で病的変異が認められなかった場合にはMultiplex ligation-dependent probe amplification (以下, MLPA法と略記)²³⁾で当該遺伝子の広範な欠損/重複を検索した。なお, MSH2 遺伝子に変異が同定されない場合には, MSH2 遺伝子と併せてEPCAM遺伝子についてもMLPA法で解析した。遺伝子変異 (多型を含む) の記載法はden Dunnenら²¹⁾の報告に従い, 病的変異の判定は, 国際消化管遺伝性腫瘍学会 (International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumors :InSiGHT) (<http://insight-group.org>) のデータベースあるいはThompsonら²²⁾の報告を参考に, Class 5に分類されているものを病的変異とした。

統計: 連続変数は中央値 (範囲) で記載した。2群間の連続変数の比較はMann-Whitney検定, 比率の比較はFisher直接確率法で行った。累積生存率の算出はKaplan-Meier法で行い, 生存曲線の検定はlogrank testで行った。全ての統計学的解析はStatflex version 6.4 (アーテック (株), 大阪) で行った。P<0.05を統計学的に有意とした。

結果

患者背景: 年齢は中央値42歳 (24-49歳), 男性46例, 女性63例であった。原発巣の部位は右側結腸 (盲腸, 上行結腸, 横行結腸) 31例, 左側結腸 (下行結腸, S状結腸) 29例, 直腸49例であった。組織型は中分化腺癌68例 (62.4%), 高分化腺癌27例 (24.8%), 低分化腺癌14例 (12.8%) の順であった。組織学的病期はstage 0; 7例 (6.4%), stage I; 7例 (6.4%), stage II; 25例 (22.9%), stage III; 34例 (31.2%), stage IV; 36例 (33.0%) であった。改訂ベセスダガイドラインに挙げられているMSI-Hを示唆する組織学的所見では, TIL陽性17例 (15.6%), CRA48例 (44%), 粘液癌・印鑑細胞様分化13例 (11.9%), 髄様増殖22例 (20.2%) であった。改訂アムステルダム基準を満たすものは1例も認められなかった。改訂ベセスダガイドラインに合致する項目数は1項目; 30例 (27.5%), 2項目; 70例 (64.2%), 3項目9例 (8.3%) で4項目以上を満たした症例は認められなかった (Table 1)。

免疫染色: 10例 (9.2%) に少なくとも1種類のMMRタンパクが4例, MSH2/MSH6タンパクの欠失が4例, MSH6タンパク単独の欠失が2例で, PMS2タンパクの単独欠失例はなかった。

MSI検査: IHCでMMRタンパク発現の欠失を認めた10例全例にMSI検査を行い, MSI-Hを9例に認め,

MLH1/PMS2 タンパクの欠失を認めた 4 例中 1 例が MSS と判定された。MSI-L は 1 例も認めなかった。

メチレーション解析：MLH1/PMS2 タンパクに欠失を認め、MSI 検査で MSI-H であった 3 例に対し、腫瘍部位の MLH1 遺伝子メチレーション解析を試みたが、1 例では DNA の quality が悪く、解析できなかった。他の 2 例中 1 例では、メチレーション陰性であった。残りの 1 例でメチレーション陽性であったため、正常大腸粘膜のメチレーション解析を行ったところ、メチレーション陰性であった。

遺伝学的検査：MLH1/PMS2 タンパクの欠失かつ MSI-H で、腫瘍組織の MLH1 遺伝子メチレーション陽性かつ正常組織でメチレーション陰性であった 1 例（すなわち MLH1 遺伝子の germline epimutation が否定的で、体細胞レベルでの MLH1 遺伝子のプロモーター領域の異常メチル化が示唆される）を除く 9 例のうち、MLH1 遺伝子の異常が疑われる 3 例全例、MSH2（あるいは EPCAM）遺伝子異常が疑われる 4 例中 1 例、および MSH6 遺伝子に異常が疑われる 2 例の合計 6 例で遺伝学的検査が行われた。免疫染色の結果から MLH1 遺伝子異常が疑われるが MSS であった 1 例では、病的変異は認められなかったが、既知のミスセンス変異が認められた。他の 2 例とも PCR-direct sequence 法、MLPA 法ともに MLH1 遺伝子に病的変位を同

定できなかった。MSH2（または EPCAM）遺伝子異常が疑われた 1 例では、PCR-direct sequence 法では MSH2 遺伝子に異常を認めなかったため、MSH2/EPCAM 遺伝子に関する MLPA 法を追加したところ、EPCAM 遺伝子の 3' 末端に位置する exon 9 の欠損を認めた。MSH6 遺伝子異常が疑われた 2 例では、PCR-direct sequence 法でいずれも Class 5 の病的変異を認めた。IHC から遺伝子診断までのフローチャートを (Fig. 1) に、IHC で MMR タンパクに欠失を認めた 10 例の内訳を Table 2 に示す。

LS /suspected LS 群と non-LS 群の比較

遺伝学的検査で LS の確定診断が得られた 3 例と、遺伝学的検査は施行されていないが MSH2/MSH6 タンパク欠失かつ MSI-H で、3 例の合計 6 例を LS/suspected LS 群、MMR タンパクの欠失を認めなかった 99 例と、遺伝子解析の結果リンチ症候群が否定される case 1, 2 を加えた合計 101 例を non-LS 群として、2 群間で臨床病理学的諸因子と生存期間を比較検討した。なお、リンチ症候群の診断が不確実な case 3, 4 は解析から除外した。

LS/suspected LS 群 (n=6) は non-LS 群に比べて、有意に 30 歳未満 (P<0.05) および右側結腸発症 (P<0.01)、改訂ベセスダガイドライン陽性項目数が 3 項目以上 (P<0.01)、低分化腺癌 (P=0.03)、TIL の頻度 (P<0.05) が高かった。性別、病期、改訂ベセスダガイドラインにおける MSI-H 大腸

Table 1. Clinicopathological factors in colorectal cancer patients aged 50 years or younger

Factors		
Age		42 years (range, 24-49 years)
Gender		
	Male	46
	Female	63
Location		
	Right colon	31
	Left colon	29
	Rectum	49
Histological differentiation		
	Well-differentiated	27
	Moderately differentiated	68
	Poorly differentiated	14
TNM Stage *		
	0	7
	I	7
	II	25
	III	34
	IV	36
Tumor infiltrating lymphocytes (TIL)		17 (15.6%)
Crohn's-like lymphocytic reaction (CRA)		48 (44%)
Mucinous/signet-ring differentiation pattern		13 (11.9%)
Medullary growth pattern		22 (20.2%)
The revised Amsterdam criteria		0 (0%)
Number of factors meeting the revised Bethesda guidelines (rBG)		
	1	30
	2	70
	3	9

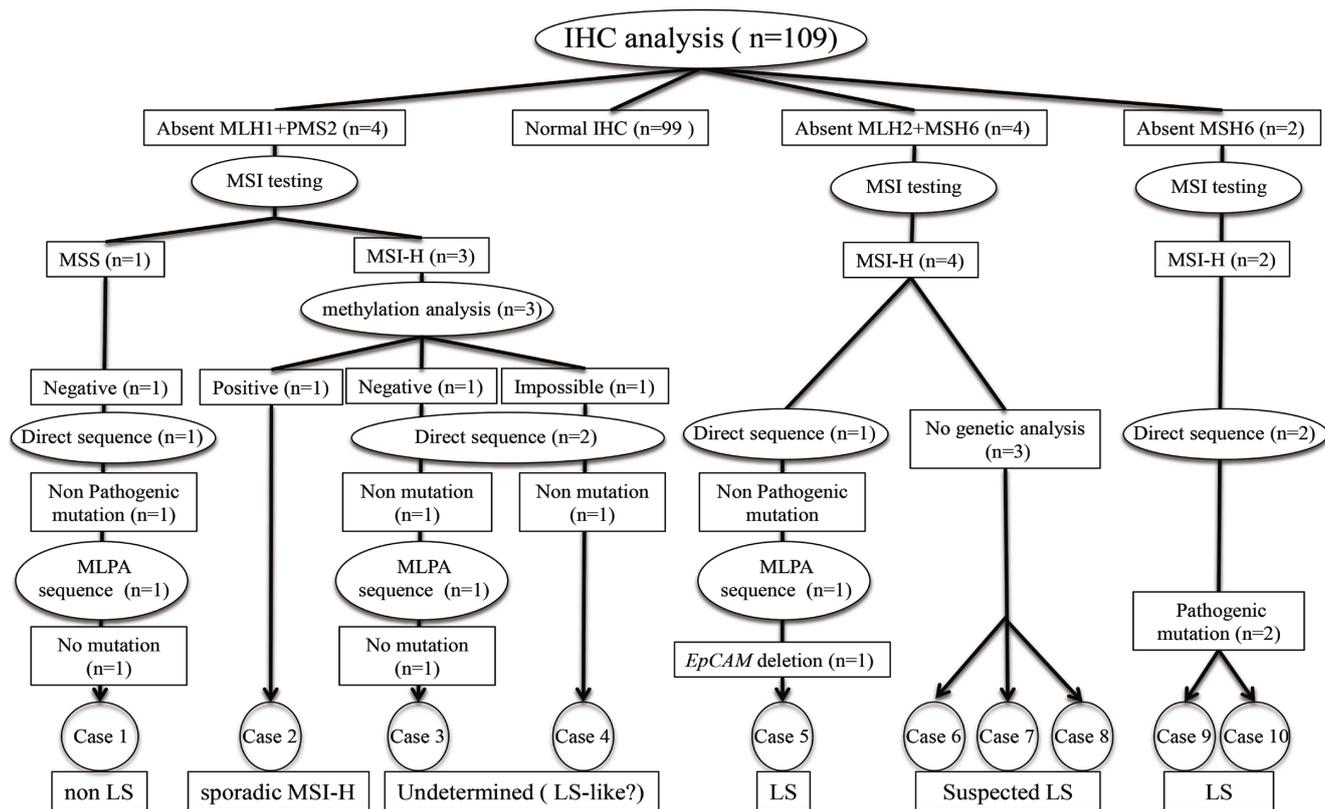


Fig. 1. Flow chart of screening and identification for LS by immunohistochemistry (IHC) first approach.

Table 2. Summary of clinicopathological factors and MMR expression, methylation, MSI and germline mutations in young (< 50 years) colorectal cancer patients with deficient MMR or MSI-H

Case	Age (Years)	Gender	Location	Stage	Number of rBG factors	Loss of MMR protein (IHC)	MSI	Methylation	Germline mutation analysis
1	47	Female	Sigmoid	IIB	1	MLH1/PMS2	MSS	Negative	<i>MLH1</i> : p.V384D
2	37	Female	Ascending	IVB	3	MLH1/PMS2	MSI-H	Positive	Not performed
3	47	Female	Rectum	IIIC	1	MLH1/PMS2	MSI-H	Negative	No mutation (Direct sequence and MLPA)
4	41	Male	Ascending	IIA	3	MLH1/PMS2	MSI-H	cannot be analyzed	No mutation (Direct sequence and MLPA)
5	42	Female	Cecum	IIA	2	MSH2/MSH6	MSI-H	/	<i>EpCAM</i> deletion (MLPA)
6	24	Female	Transverse	IIIC	2	MSH2/MSH6	MSI-H	/	Not performed
7	34	Male	Transverse	IVB	2	MSH2/MSH6	MSI-H	/	Not performed
8	37	Male	Transverse	IIIC	2	MSH2/MSH6	MSI-H	/	Not performed
9	24	Female	Transverse	IIA	2	MSH6	MSI-H	/	<i>MSH6</i> : c.3261dup C
10	47	Male	Sigmoid	0	2	MSH6	MSI-H	/	<i>MSH6</i> : c.1806-1809del

IHC: immunohistochemistry .
 rBG: revised Bethesda Guidelines.
 MMR: mismatch repair .
 MSI: microsatellite instability.
 MLPA: Multiplex Ligation- dependent Probe Amplification.

癌の組織学的所見(粘液・印鑑細胞様分化およびCRA)については、両群間に有意差は認められなかった(Table 3)。また、全生存期間の比較では、LS/suspected LS群とnon-LS群の生存期間中央値(MST)は各々9.0ヶ月(1.0-

99ヶ月), 158ヶ月(1.0-197ヶ月)で、累積5年生存率は各々40%, 62%であったが、両群間の生存期間に統計学的有意差は認めなかった(P=0.11)(Fig. 2)

Table 3. Comparison of clinicopathological factors between the LS/suspected LS group and the non-LS group

Clinicopathological factors	LS / suspected LS (n=6)	non-LS (n=101)	P-value
Gender (Male vs. Female)	3/3	42/59	0.69
Age (<30 years vs. ≥30 years)	2/4	5/96	<0.05
Number of factors filled rBG* (<3 factors vs. 3≥ factors)	3/3	5/96	<0.01
Location (Right colon / Left colon and Rectum)	5/1	25/76	<0.01
Stage (<stage III < vs. ≥stage III)	3/3	35/65	0.66
Histological differentiation (Poorly differentiated vs. Others)	3/3	11/90	0.03
MSI-H histology (rBG)*	5/1	63/38	0.41
Mucinous/signet-ring differentiation pattern (positive vs. negative)	2/4	11/90	0.15
TIL** (positive vs. negative)	3/3	14/87	<0.05
CRA*** (positive vs. negative)	4/2	43/58	0.40
Medullary growth pattern (positive vs. negative)	2/4	20/81	0.60

* rBG: revised Bethesda Guidelines.
 **TIL: Tumor infiltrating lymphocytes
 ***CRA: Crohn's-like lymphocytic reaction

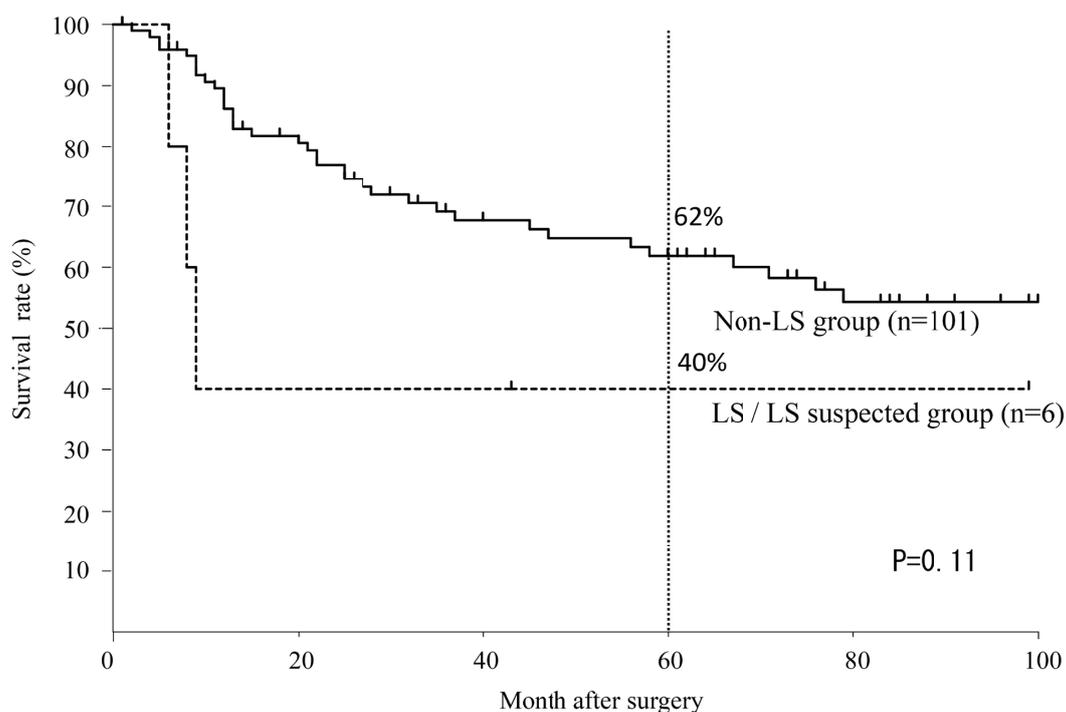


Fig. 2. Comparison of overall survival times between the LS/LS suspected group and the non-LS group.

考 察

MLH1 タンパクとPMS2 タンパク, MSH2 タンパクとMSH6 タンパクは各々複合体を形成して機能を発揮する²³⁾. MLH1 タンパクはPMS2 タンパク以外のMLH3, MSH2 タンパクはMSH6 タンパク以外のMSH3 タンパクなどと複合体を形成することもできる²⁴⁾. 一方, PMS2 タンパクはMLH1 タンパク, MSH6 タンパクはMSH2 タンパク以外に結合するタンパクが存在せず, 各々結合する相手となるタンパクが存在しないと不安定となり, 分解されることが知られている²⁵⁾. したがって, MLH1/PMS2 タンパクの欠失は*MLH1* 遺伝子, MSH2/MSH6 タンパクの欠失は*MSH2* 遺伝子 (あるいは*EPCAM* 遺伝子の3'側領域の欠損), MSH6 タンパクの単独欠失は*MSH6* 遺伝子, PMS2 タンパクの単独欠失では*PMS2* 遺伝子の異常が想定される. このことを利用し, MMRタンパクのIHCによってLSのスクリーニングを行う方法が検討されてきた. 近年では4種類のMMRタンパクのいずれにも良質な抗体が開発され, わが国の研究者の間でも急速に普及していると考えられる. また, *EPCAM* 遺伝子産物に対する抗体も開発され, *MSH2* 遺伝子異常が疑われるも病的変異が同定されなかった症例に応用されつつある^{26,27)}. 今回の検討では従来標準的な方法として行われているMLH1, MSH2, MSH6, PMS2 の4種類のMMRタンパクに対する免疫染色を行った. また, MLH1 タンパクの欠失を認めるLS以外の大腸癌としては, 鋸歯状腺腫が発生母地と推定され, 高齢女性の右側結腸に好発し, MSI-Hを特徴とするもの (散発性MSI-H大腸癌) が知られているが, 50歳未満の大腸癌においてこのepigeneticな異常がどのくらいの頻度で生じているかは不明である. このような癌は*MLH1* 遺伝子のプロモーター領域の後天的なメチレーションのほかに, *BRAF* 遺伝子のV600E体細胞変異が高率に起きること²⁸⁾が知られており, 一方LSでは後天的なメチレーションや*BRAF* 遺伝子変異がほとんど起きないことから, LSとの鑑別に応用されている. 今回は*MLH1* 遺伝子のプロモーター領域のメチレーション解析として, 標準的な方法のひとつであるCOBRA法を採用したが, *BRAF* 遺伝子変異の解析は行わなかった. この点は今後の研究課題としたい. しかしながら, 腫瘍において*MLH1* 遺伝子のプロモーター領域のメチレーションを認めた1例(case 2)において, *MLH1* 遺伝子の生殖細胞系列変異の可能性を除外しただけでなく, 正常粘膜においてはメチル化を認めなかったことから, 稀ながらLSの原因として注目されつつある*MLH1* 遺伝子のepimutation⁷⁾の可能性も否定することができた.

MMRタンパクのIHCにおける「染色陰性」とMSI検査における「MSI-H」は高率に一致するといわれており, 最近の検討では90.5~95.1%の一致率^{29,32)}と報告され, 特にLSの原因遺伝子の90%程度を占めるとされている*MLH1* と*MSH2* 遺伝子変異例では一致率がきわめて高い

と考えられている. ただし, MSH6 タンパクに欠失が生じてても他のMMRタンパクが機能を補完する可能性があり, このような理由でNational Cancer Institute (NCI) パネル (シングルヌクレオチドのマーカーとしてBAT25, BATT26 の2種類しか含んでいない) ではMSI-Hの頻度は46%~77%にとどまることが報告されている³³⁻³⁵⁾. しかしながら, 今回検討した症例のうちのcase 9,10の2例ではMSI-Hを示した. まとまった報告例がきわめて少ないものの, *PMS2* 遺伝子変異の場合にはIHCで*PMS2* タンパクの欠失を示さなかったり, マイクロサテライト不安定性もMSI-Hを示さない場合がしばしば認められる. たとえば, ノルウェーの*PMS2* 遺伝子の創始者変異 (founder mutation) の家系では, *PMS2* タンパクの83.3%が正常に染色され, MSI-Hは71.4%に認めた³⁶⁾. わが国における*PMS2* 遺伝子に変異を有するLSの特徴についてはほとんど知られていない. 今回の検討では, *PMS2* 遺伝子変異を想定させる症例は存在しなかった.

MLH1/PMS2 タンパクの欠失を認めた1例(case 1)では, 腫瘍はMSSかつ, *MLH1* 遺伝子変異を認めなかったが, *MLH1* 遺伝子の多型 (p.V384D) を認めた. この遺伝子多型はLSの原因にならないことは言うまでもないが, 大腸癌のリスクを増加させる可能性があることが, われわれの研究グループを含む複数の研究グループから報告されている^{37,38)}. MMR染色が偽陰性となる理由として, 一般的には古いホルマリンプロック, 染色の技術的な問題, 抗体と反応するエピトープとの関係などが考えられるが, この症例ではMLH1/PMS2 タンパクが染色陰性である一方, MSH2/MSH6 の染色性は良好であり, 真の理由は不明である. なお, MLH1/PMS2 タンパク欠失かつMSI-Hの3例中, 散発性MSI-H大腸癌が疑われた1例(case 2)を除く, 2例(case 3,4)では*MLH1* 遺伝子変異が認められなかったが, その解釈は慎重に行う必要がある. case 4では抽出したDNAの劣化によりメチレーション解析ができなかったが, 散発性MSI-Hの可能性はある. 一方, case 3ではMSI-Hかつメチレーション陰性で, わが国のLSスクリーニングに有用とされる関連癌に胃癌を加えた修飾アムステルダム基準⁴⁹⁾を満たしていることから, むしろLSの可能性を示唆するとも言える. 現段階では, 可能な限り原因遺伝子の構造異常の可能性も考慮して広範囲な欠失/重複を検出するMLPA法による解析も行ったが, 異常を同定できなかった. 臨床的にLSが疑われる症例の10~15%³⁹⁾にMMR関連遺伝子の生殖細胞系列変異が同定できない. 近年, MSI-Hを示すものの, MMR遺伝子の生殖細胞系列変異あるいはプロモーター領域の高メチル化を認めない大腸癌患者について, "Lynch-like syndrome"⁴⁰⁾あるいは"Lynch syndrome-like"⁴¹⁾の呼称が提唱されている. これらの原因として, *MLH1* あるいは*MSH2* 遺伝子の体細胞変異が高率に同定されている⁴¹⁾. その原因の全容は明らかになっていないが, *MUTYH* 関連ポリポーシス⁴²⁾の原因遺伝子である*MUTYH* 遺伝子の両アレルの生殖細胞系列変異

や、ポリメラーゼ校正関連ポリポーシス⁴³⁾の原因遺伝子である*POLE*遺伝子の体細胞変異⁴⁰⁾が報告されている。

今回の研究で解析対象症例を50歳未満の初発大腸癌に絞った理由として、①改訂ベセスダガイドラインによれば、50歳未満であれば発生部位やMSI-Hを示す特徴的な病理組織像にかかわらず、MSI検査を推奨していること、②リンチ症候群の初発大腸癌発生年齢の平均は45歳前後であり、50歳未満であればより高齢者より有効なスクリーニングが行える可能性があること、③50歳未満の大腸癌患者において有効なスクリーニング法を経てLSの診断を行うことができれば、患者本人に対する適切な長期間にわたるサーベイランス計画(異時性多発癌や関連癌の発生)を提示することができる、と考えたからである。

今回の結果から、MMRタンパクに対するIHCからLSの候補をおよそ10例(9.2%)まで絞り込むことができることが明らかになった。最終的に遺伝学的検査でLSと確定できたものが3例、LSが強く疑われるものの未確定が3例、LSの可能性が完全には否定できないが解析結果からはLSでないと判定せざるを得ないのが2例、LSでないと考えられるのが2例であった。MSI検査でIHCの結果を間接的に確認することは重要と思われるが、MLH1/PMS2タンパク欠失例におけるメチレーション解析や、今回行わなかった*BRAF*遺伝子変異解析は、その頻度の低さから50歳未満の大腸癌においてはそれほど重要な意味は持たない可能性がある。したがって、あくまで50歳未満の大腸癌を対象にした場合はあるが、MMRタンパクの欠失が疑われれば、メチレーション解析や*BRAF*遺伝子解析を省略して、直接遺伝学的検査に進むことはむしろcost-effectiveである可能性がある。最近、米国のSloan-Kettering Medical Centerで2006-2010年に50歳以下の大腸癌に対して、IHCでMMRタンパク欠損を38例(19.1%)で認め、このうち22例に遺伝子診断が行われ、最終的に17例(全体の5.1%)がLSと診断されたと報告されている⁴⁴⁾。この報告を除き、類似の報告は少なく⁴⁵⁾、50歳未満(あるいは以下)大腸癌におけるMMRタンパク欠失の頻度や、IHCからのスクリーニングの有用性については、人種差を考慮した研究の発展が期待される。

LS確定及び強く疑う症例の合計6例と、LSが否定的な101例の比較において、発症年齢、原発部位、改訂ベセスダガイドライン陽性項目数、病理組織学的所見(低分化腺癌、TIL)などの差が明らかになった。単一施設の少数の検討であるが、著者が検索した範囲ではこのような報告は見あたらなかった。両群間の比較から、50歳未満の大腸癌すべてを網羅的にMMRに対するIHCを行うのではなく、発症年齢、発生部位や組織型、改訂ベセスダガイドライン陽性項目数などの特徴的な所見を考慮に入れた絞り込みをあらかじめ行うことで、50歳未満大腸癌といえどもより効率的なLSのスクリーニングが可能であることを示唆していると考えられる。特に、TILは一般的にLS

あるいは散発性MSI-H大腸癌を予測する上で、他の組織学的所見より感度・特異度が高い有用な所見であるが、対象症例を50歳未満に限定した場合でも従来と同様の結果が得られた点は意義深いと考えられる。

LS(HNPCC)の大腸癌は散発性大腸に比べ予後が良いことが示唆されている。その理由のひとつとしてLS(HNPCC)では進行したステージの比率が低いことが挙げられる⁴⁶⁾。いずれにしても、ステージをマッチした検討においてもstage I, II, IIIにおいてはLSの大腸癌の生存率が有意に高いことが指摘されている⁴⁷⁾。しかしながらこれらの検討では、すべての症例でMMR遺伝子の生殖細胞系列変異を解析しておらず、その解釈には慎重を要する。今回の検討では50歳未満の症例に限り、LS/suspected LS群とnon-LS群の間で全生存期間を比較したが、有意差を認めなかった。この点については、より多くの症例を集積して再検討する必要があると考えられる。

謝 辞

本研究全般にわたり、多大なご指導を頂きました埼玉医科大学国際医療センター呼吸器内科教授小林国彦先生および総合医療センター消化管・一般外科教授石田秀行先生、遺伝学的検査についてご指導頂きましたゲノム医学研究センター准教授江口英孝先生、病理組織学的検討についてご指導頂きました総合医療センター病理部教授田丸淳一先生、同講師東守洋先生、総合医療センター非常勤講師(福島医科大学器官制御外科学講座講師)隈元謙介先生、メチレーション解析とリンチ症候群全般にわたりご指導頂きました埼玉県立がんセンター腫瘍診断・予防科部長兼科長赤木究先生に深甚なる謝意を表します。

参考文献

- 1) Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003;348:919-32.
- 2) Peltomaki P. Lynch syndrome genes. *Fam Cancer* 2005;4:227-32.
- 3) Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Ruschoff J, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:261-8.
- 4) Lynch HT, de la Chapelle A. Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet* 1999;36:801-18.
- 5) Kovacs ME, Papp J, Szentirmay Z, Otto S, Olah E. Deletions removing the last exon of TACSTD1 constitute a distinct class of mutations predisposing to Lynch syndrome. *Hum Mutat* 2009;30:197-203.
- 6) Ligtenberg MJ, Kuiper RP, Chan TL, Goossens M, Hebeda KM, Voorendt M, et al. Heritable somatic

- methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nat Genet* 2009;41:112-7.
- 7) Suter CM, Martin DI, Ward RL. Germline epimutation of MLH1 in individuals with multiple cancers. *Nat Genet* 2004;36:497-501.
 - 8) Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 1991;34:424-5.
 - 9) Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, et al. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 1994;368:258-61.
 - 10) Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Wei YF, Carter KC, Ruben SM, et al. Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature* 1994;371:75-80.
 - 11) Papadopoulos N, Nicolaides NC, Liu B, Parsons R, Lengauer C, Palombo F, et al. Mutations of GTBP in genetically unstable cells. *Science* 1995;268:1915-7.
 - 12) Papadopoulos N, Nicolaides NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA, et al. Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science* 1994;263:1625-9.
 - 13) Miyaki M, Konishi M, Tanaka K, Kikuchi-Yanoshita R, Muraoka M, Yasuno M, et al. Germline mutation of MSH6 as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet* 1997;17:271-2.
 - 14) Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999;116:1453-6.
 - 15) Lagerstedt Robinson K, Liu T, Vandrovcova J, Halvarsson B, Clendenning M, Frebourg T, et al. Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) diagnostics. *J Natl Cancer Inst* 2007;99:291-9.
 - 16) Sjursen W, Haukanes BI, Grindedal EM, Aarset H, Stormorken A, Engebretsen LF, et al. Current clinical criteria for Lynch syndrome are not sensitive enough to identify MSH6 mutation carriers. *J Med Genet* 2010;47:579-85.
 - 17) Vasen HF, Moslein G, Alonso A, Bernstein I, Bertario L, Blanco I, et al. Guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (hereditary non-polyposis cancer). *J Med Genet* 2007;44:353-62.
 - 18) Weissman SM, Burt R, Church J, Erdman S, Hampel H, Holter S, et al. Identification of individuals at risk for Lynch syndrome using targeted evaluations and genetic testing: National Society of Genetic Counselors and the Collaborative Group of the Americas on Inherited Colorectal Cancer joint practice guideline. *J Genet Couns* 2012;21:484-93.
 - 19) Hampel H, de la Chapelle A. The search for unaffected individuals with Lynch syndrome: do the ends justify the means? . *Cancer Prev Res (Phila)* 2011;4:1-5.
 - 20) Xiong Z, Laird PW. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res* 1997;25:2532-4.
 - 21) Den Dunnen JT, Antonarakis SE. Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet* 2001;109:121-4.
 - 22) Thompson BA, Spurdle AB, Plazzer JP, Greenblatt MS, Akagi K, Al-Mulla F, et al. Application of a 5-tiered scheme for standardized classification of 2,360 unique mismatch repair gene variants in the InSiGHT locus-specific database. *Nat Genet* 2014;46:107-15.
 - 23) Bellizzi AM, Frankel WL. Colorectal cancer due to deficiency in DNA mismatch repair function: a review. *Adv Anat Pathol* 2009;16:405-17.
 - 24) Peltomaki P. Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:1174-9.
 - 25) Senter L, Clendenning M, Sotamaa K, Hampel H, Green J, Potter JD, et al. The clinical phenotype of Lynch syndrome due to germ-line PMS2 mutations. *Gastroenterology* 2008;135:419-28.
 - 26) Nagasaka T, Rhee J, Kloor M, Gebert J, Naomoto Y, Boland CR, et al. Somatic hypermethylation of MSH2 is a frequent event in Lynch Syndrome colorectal cancers. *Cancer Res* 2010;70:3098-108.
 - 27) Rumilla K, Schowalter KV, Lindor NM, Thomas BC, Mensink KA, Gallinger S, et al. Frequency of deletions of EPCAM (TACSTD1) in MSH2-associated Lynch syndrome cases. *J Mol Diagn* 2011;13:93-9.
 - 28) McGivern A, Wynter CV, Whitehall VL, Kambara T, Spring KJ, Walsh MD, et al. Promoter hypermethylation frequency and BRAF mutations distinguish hereditary non-polyposis colon cancer from sporadic MSI-H colon cancer. *Fam Cancer* 2004;3:101-7.
 - 29) Canard G, Lefevre JH, Colas C, Coulet F, Svrcek M, Lascols O, et al. Screening for Lynch syndrome in colorectal cancer: are we doing enough? *Ann Surg Oncol* 2012;19:809-16.
 - 30) Moreira L, Balaguer F, Lindor N, de la Chapelle A, Hampel H, Aaltonen LA, et al. Identification of Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *JAMA* 2012;308:1555-65.
 - 31) Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K,

- Kuebler P, et al. Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:5783-8.
- 32) Julie C, Tresallet C, Brouquet A, Vallot C, Zimmermann U, Mitry E, et al. Identification in daily practice of patients with Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer): revised Bethesda guidelines-based approach versus molecular screening. *Am J Gastroenterol* 2008;103:2825-35.
- 33) Berends MJ, Wu Y, Sijmons RH, Mensink RG, van der Sluis T, Hordijk-Hos JM, et al. Molecular and clinical characteristics of MSH6 variants: an analysis of 25 index carriers of a germline variant. *Am J Hum Genet* 2002;70:26-37.
- 34) Ku JL, Yoon KA, Kim DY, Park JG. Mutations in hMSH6 alone are not sufficient to cause the microsatellite instability in colorectal cancer cell lines. *Eur J Cancer* 1999;35:1724-29.
- 35) Plaschke J, Kruppa C, Tischler R, Bocker T, Pistorius S, Dralle H, et al. Sequence analysis of the mismatch repair gene hMSH6 in the germline of patients with familial and sporadic colorectal cancer. *Int J Cancer* 2000;85:606-13.
- 36) Grindedal EM, Aarset H, Bjernevoll I, Royset E, Maehle L, Stormorken A, et al. The Norwegian PMS2 founder mutation c. 989-1G > T shows high penetrance of microsatellite instable cancers with normal immunohistochemistry. *Hered Cancer Clin Pract* 2014;12:12.
- 37) Fan Y, Wang W, Zhu M, Zhou J, Peng J, Xu L, et al. Analysis of hMLH1 missense mutations in East Asian patients with suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13:7515-21.
- 38) Ohsawa T, Sahara T, Muramatsu S, Nishimura Y, Yathuoka T, Tanaka Y, et al. Colorectal cancer susceptibility associated with the hMLH1 V384D variant. *Mol Med Rep* 2009;2:887-91.
- 39) Morak M, Heidenreich B, Keller G, Hampel H, Laner A, de la Chapelle A, et al. Biallelic MUTYH mutations can mimic Lynch syndrome. *Eur J Hum Genet* 2014;11:1334-7.
- 40) Kang SY, Park CK, Chang DK, Kim JW, Son HJ, Cho YB, et al. Lynch-like syndrome: Characterization and comparison with EPCAM deletion carriers. *Int J Cancer* 2014.
- 41) Mensenkamp AR, Vogelaar IP, van Zelst-Stams WA, Goossens M, Ouchene H, Hendriks-Cornelissen SJ, et al. Somatic mutations in MLH1 and MSH2 are a frequent cause of mismatch-repair deficiency in Lynch syndrome-like tumors. *Gastroenterology* 2014;146:643-6 e648.
- 42) Sampson JR, Dolwani S, Jones S, Eccles D, Ellis A, Evans DG, et al. Autosomal recessive colorectal adenomatous polyposis due to inherited mutations of MYH. *Lancet* 2003;362:39-41.
- 43) Kilpivaara O, Aaltonen LA. Diagnostic cancer genome sequencing and the contribution of germline variants. *Science* 2013;339:1559-62.
- 44) Steinhagen E, Shia J, Markowitz AJ, Stadler ZK, Salo-Mullen EE, Zheng J, et al. Systematic immunohistochemistry screening for Lynch syndrome in early age-of-onset colorectal cancer patients undergoing surgical resection. *J Am Coll Surg* 2012;214:61-7.
- 45) Chew MH, Koh PK, Tan M, Lim KH, Carol L, Tang CL. Mismatch repair deficiency screening via immunohistochemical staining in young Asians with colorectal cancers. *World J Surg* 2013;37:2468-75.
- 46) Stigliano V, Assisi D, Cosimelli M, Palmirotta R, Giannarelli D, Mottolese M, et al. Survival of hereditary non-polyposis colorectal cancer patients compared with sporadic colorectal cancer patients. *J Exp Clin Cancer Res* 2008;27:39.
- 47) Watson P, Lin KM, Rodriguez-Bigas MA, Smyrk T, Lemon S, Shashidharan M, et al. Colorectal carcinoma survival among hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma family members. *Cancer* 1998;83:259-66.
- 48) Alexander J, Watanabe T, Wu TT, Rashid A, Li S, Hamilton SR. Histopathological identification of colon cancer with microsatellite instability. *Am J Pathol* 2001;158:527-35.
- 49) 古川洋一. 本邦におけるリンチ症候群の遺伝子変異. *INTESTINE* 2013;17:489-96.
- 50) 大腸癌研究会. 大腸癌取扱い規約第8版 東京: 金原出版; 2013.
- 51) 大腸癌研究会. 遺伝性大腸癌診療ガイドライン 2012年版. 東京: 金原出版; 2012.
- 52) 田島雄介, 隈元謙介, 石橋敬一郎, 芳賀紀裕, 岩間毅夫, 石田秀行, 他. リンチ症候群の診療録から第1次スクリーニングを行う場合のpitfall. *日外科系連会誌* 2013;38:944-9.
- 53) 福井崇史, 丸瀬英明, 高橋新, 古井陽介, 権藤延久. FAPの遺伝子診断におけるMLPA法の有用性. *家族性腫瘍* 2009;9:9-12.