

マイクロサテライト不安定性検査とその臨床的意義

Molecular analysis of microsatellite instability and its clinical significance

あら い とみ お
新 井 富 生
Tomio ARAI

はじめに

平成 30 年 12 月にマイクロサテライト不安定性検査が保険収載された。この検査はがん組織から抽出したゲノム DNA 中の高頻度マイクロサテライト不安定性 (high frequency of microsatellite instability、以下 MSI-High) の検出を目的とするもので、分子標的薬であるペムプロリズマブ (キイトルーダ®) の局所進行性または転移性のがん患者への適用を判定するための補助に用いられる。対象となるのは胃癌や大腸癌といった臓器特異的ながんではなく、「がん化学療法後に増悪した進行・再発の MSI-High を有する固形癌 (標準的な治療が困難な場合に限る)」全般が対象となった。今回のペムプロリズマブの MSI-High を示すという条件を満たせば臓器は問わず、癌腫横断的に適応となる点で画期的といえる。

本稿では MSI 検査について基本的知識から解説し、MSI という現象がどのような病態でみられる

かについても紹介する。

I. マイクロサテライトとは

マイクロサテライトとは、短い塩基 (しばしば 1 ~ 4bp) の反復配列の名称である。このような反復配列はゲノム全体にわたって散在する。1 塩基反復配列としては An (アデニンの n 回の繰り返し配列) が一般的である (図 1a)。2 塩基反復配列の場合は CA の繰り返し配列である (CA)_n が多い (図 1b)。マイクロサテライトはイントロン内に多く認められるが、遺伝子のコード配列 (エクソン) 内に存在する例も少なからず存在する。

II. ミスマッチ修復機構

上記のようなマイクロサテライトは複製時に相補的でない塩基が挿入される塩基・塩基ミスマッチや、1 ~ 4 塩基ループを形成する挿入・欠失ミスベ

a 1塩基配列

5' -----AAAAAAAAAAAA----- 3'

b 2塩基配列

5' -----CACACACACACA----- 3'

図 1 マイクロサテライトの塩基配列

- a. 1 塩基配列のマイクロサテライト。アデニン (A) の 11 回の繰り返し配列を例として示す。
- b. 2 塩基配列のマイクロサテライト。シトシン (C) とアデニン (A) からなる 2 塩基 CA の 6 回の繰り返し配列を例として示す。

アが生じることがある。このような DNA 配列の異常を修復するためのシステムが生体には備わっており、ミスマッチ修復機構と称される。この修復機構はリンチ症候群（かつての遺伝性非ポリポーシス大腸癌 hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma, HNPCC）で最初に発見された。ミスマッチ修復機構は、構成する蛋白質が四量体として作用し、種々の異常な状態を修復する（図 2）。MLH1 と MSH2 は重要な構成成分である。

Ⅲ. マイクロサテライト不安定性とは

MSI とは、DNA 複製の際に生じる塩基配列の間違いを修復するミスマッチ修復機能の低下により、マイクロサテライト反復配列が正常と異なる回数を示す現象である（図 3）。つまり、マイクロサテライトの繰り返し配列の回数が高頻度に変化する状態を MSI という。MSI がエクソン内の繰り返し配列部位に起きると frameshift mutation が生じ、生体にとって必要な蛋白質を合成できなくなったり、有害なタンパク質が合成されたりする。このような病態は、遺伝性腫瘍であるリンチ症候群で高頻度にみられるが、散発性の胃癌や大腸癌の 10～15% にも認められる。他臓器のがんにも MSI はみられるが、胃癌・大腸癌に比べると低率である。

Ⅳ. MSI を検出する遺伝子検査

MSI 検査キット (FALCO) は、ペムプロリズマブの MSI-High を示す固形癌への適応を判定するため

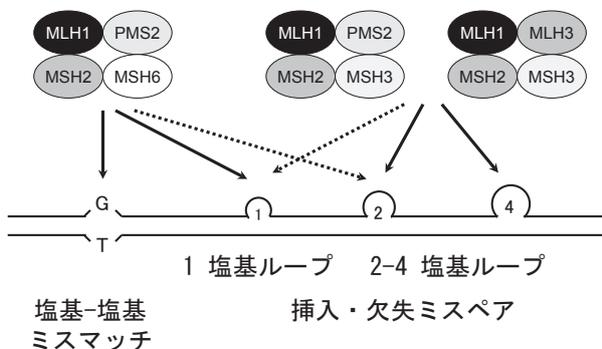


図 2 ミスマッチ修復機構の模式図

ミスマッチ修復遺伝子産物は四量体を形成し、種々のミスマッチに対応する。MLH1、MSH2 はいずれの四量体の構成成分であり、ミスマッチ修復系で重要な役割を果たしている。

に承認されたコンパニオン診断薬である。この検査はマルチプレックス PCR-フラグメント解析法により、MSI の有無を判定する。具体的な検査内容は以下の通りである。

1. 検体

検体ががん組織から抽出したゲノム DNA が検査対象となる。一般的には、10% 中性緩衝ホルマリンを用いて 6～48 時間を目安として固定し、パラフィン包埋した通常の病理診断用の腫瘍組織 (formalin-fixed paraffin-embedded tissue) を検体とし、薄切した切片から DNA を抽出して検査する。検体の取り扱いに関しては、日本病理学会が策定した「ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程」を参考にするとよい¹⁾。病理組織切片上で腫瘍の比率は 50% 以上が望ましいとされる。

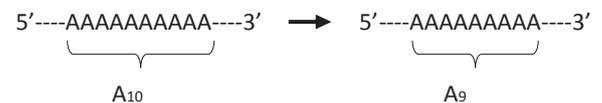
2. PCR によるマイクロサテライト領域マーカーの増幅

腫瘍組織から抽出した DNA を鋳型として、5 個のマイクロサテライト領域 (BAT-26、NR-21、BAT-25、MONO-27、NR-24) を挟むプライマーを用いて PCR で増幅する。これらは 1 塩基の繰り返し配列からなり、MSI を検出する感度の高い部位である。また、正常組織から抽出した DNA と比較しなくても MSI を判定できる。

3. 判定

MSI の判定は、5 種類のマイクロサテライトマーカーの PCR 産物を電気泳動し、MSI+ と識別され

a 1 塩基配列



b 2 塩基配列



図 3 マイクロサテライト不安定性

マイクロサテライトの繰り返し配列の回数が変化することである。アデニン (A) が 10 回繰り返す配列が 9 回に変化した状態 (a)、シトシン (C) アデニン (A) からなる塩基 CA が 6 回繰り返す配列が 7 回に変化した状態 (b) を例として示す。繰り返し配列の回数が増減するとマイクロサテライトは不安定になる。

た MSI マーカー数により行う。MSI が生じ、塩基の繰り返し回数が変化すると PCR 産物の塩基数が変化するので MSI+ と判定できる (図 4)。MSI+ と識別された MSI マーカーの数が 0 個 (microsatellite stable, MSS) または 1 個 (MSI-Low) の場合は「陰性」、MSI+ が 2 個から 5 個の場合は「陽性 (MSI-High)」と判定する。

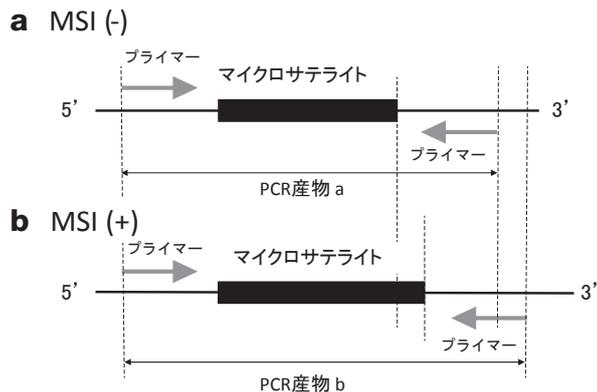


図 4 PCR を用いた MSI 検査法の原理

マイクロサテライトの繰り返し配列の回数が増えると、増幅された PCR 産物の塩基長に差が生じる。この差を電気泳動で検出する。MSI (-) の状態では PCR 産物 a の長さであるが (a)、MSI (+) では変化に応じて PCR 産物の長さが変化し、PCR 産物 b の長さになる (b)。

V. MSI を検出する免疫染色法

今回保険収載された検査は、MSI を分子生物学的に検討する方法である。しかし、ミスマッチ修復遺伝子産物の発現を組織切片上で免疫組織化学的に検討する方法も知られている。MLH1、MSH2、MSH6、PMS2 の 4 種類の抗体を用いて検討することにより (図 5)、上記 MSI 検査とほぼ同等の結果が得られる²⁾。免疫染色の染色パターンにより、どの遺伝子に異常があるかが推定できるが (表 1)、検査対象

表 1 ミスマッチ修復遺伝子産物発現パターンと変異が疑われる遺伝子

変異遺伝子	蛋白発現			
	MLH1	MSH2	MSH6 ^{a)}	PMS2
<i>MLH1</i>	-	+	+	- ^{b)}
<i>MSH2</i>	+	-	-	+
<i>MSH6</i>	+	+	-	+
<i>PMS2</i>	+	+	+	-

a) *MSH6* 遺伝子のエクソン内にマイクロサテライトが存在するため、*MSH6* 遺伝子に根本原因がなくても *MSH6* 発現が減弱することがある。

b) *PMS2* は *MLH1* の存在のもとで安定して存在するため、*MLH1* 発現が減弱すると *PMS2* 発現も減弱する。

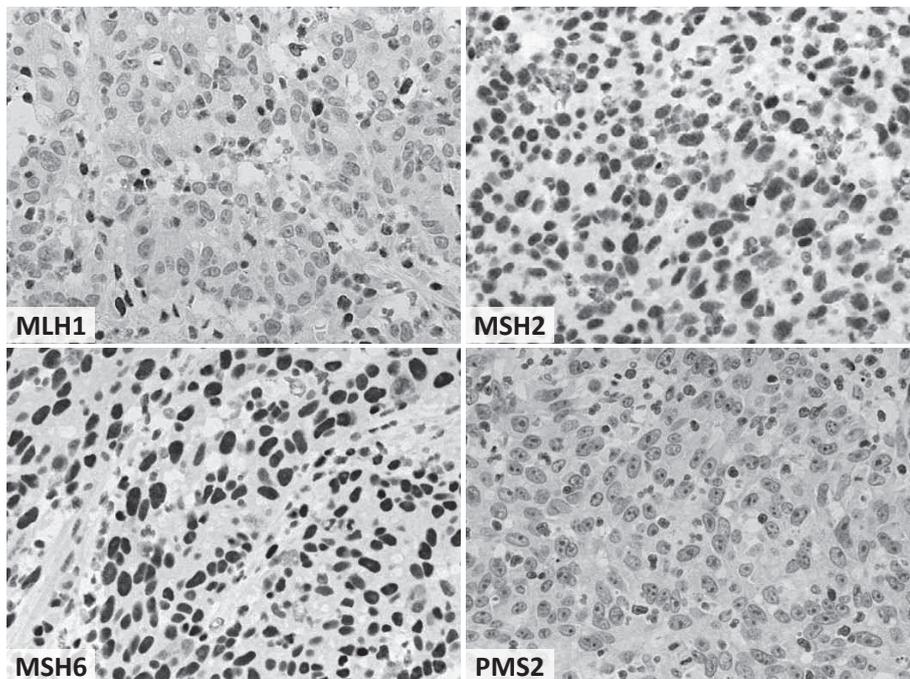


図 5 ミスマッチ修復遺伝子産物の免疫組織学的所見

MSH2、MSH6 の発現は保たれているが、MLH1、PMS2 発現は高度に減弱している。

とならない遺伝子の変異による MSI は検出できない。PCR による遺伝子検査と比較し、一般的な病理検査室で簡便に実施できるという利点はあるが、この方法はペムプロリズマブの投与の判定にはまだ承認されていない。

VI. マイクロサテライト不安定性により惹起される病態

マイクロサテライト不安定性は、大別して2種類の病態でみられる。一つは遺伝性腫瘍であるリンチ症候群であり、もう一つは *MLH1* 遺伝子プロモーター領域のメチル化による散発性腫瘍である。この両者はミスマッチ修復機構に障害を生じるという点で共通するので、発癌経路は異なるものの表現型としての病態は共通点もみられる(図6, 7)³⁾。本項では、以下にそれぞれの病態について解説する。

1. リンチ症候群

ミスマッチ修復遺伝子の生殖細胞系列の変異により若年発症の大腸癌、子宮体癌など種々の悪性腫瘍が発生する遺伝性腫瘍である。常染色体優性遺伝を示し、家系内に悪性腫瘍発生が集積する。欧米では大腸癌の2~4%がリンチ症候群とされるが^{4,5)}、

本邦での頻度はまだ不明である⁶⁾。*MLH1*、*MSH2*、*MSH6*、*PMS2*が代表的な原因遺伝子であり、*MLH1* 遺伝子(52~55%)と *MSH2* 遺伝子(39~41%)の変異症例が90%以上を占める。

2. *MLH1* 遺伝子プロモーター領域のメチル化による散発性腫瘍

散発性の胃癌や大腸癌でも MSI が10~15%にみられる。これらは *MLH1* 遺伝子のプロモーター領域

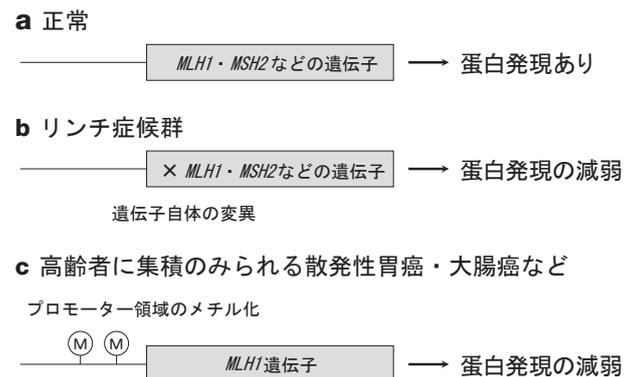


図6 加齢に伴う *MLH1* メチル化による発癌の分子機構

ミスマッチ修復遺伝子は、発現がみられるのが正常な状態であるが(a)、リンチ症候群ではミスマッチ修復遺伝子そのものに変異がみられる(b)。高齢者に集積のみられる散発性癌では *MLH1* 遺伝子には変異は認められないが、プロモーター領域のメチル化により蛋白発現が減弱する(c)。

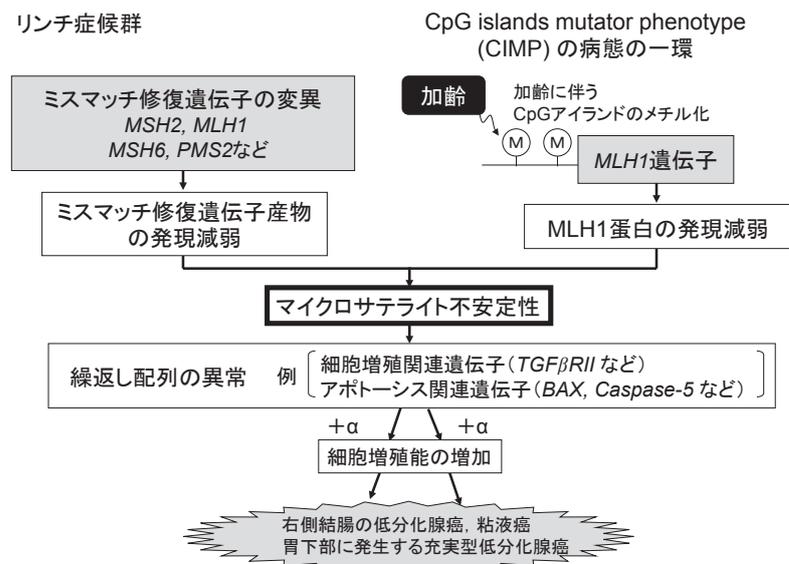


図7 リンチ症候群と *MLH1* 遺伝子のメチル化による発癌機序

リンチ症候群ではミスマッチ修復遺伝子に変異があり MSI が生じる。一方、加齢に伴い *MLH1* 遺伝子プロモーター領域のメチル化によっても MSI の病態が生じる。その前後の発癌経路は異なるものの、表現型として癌の臨床病理像は共通するものがある。

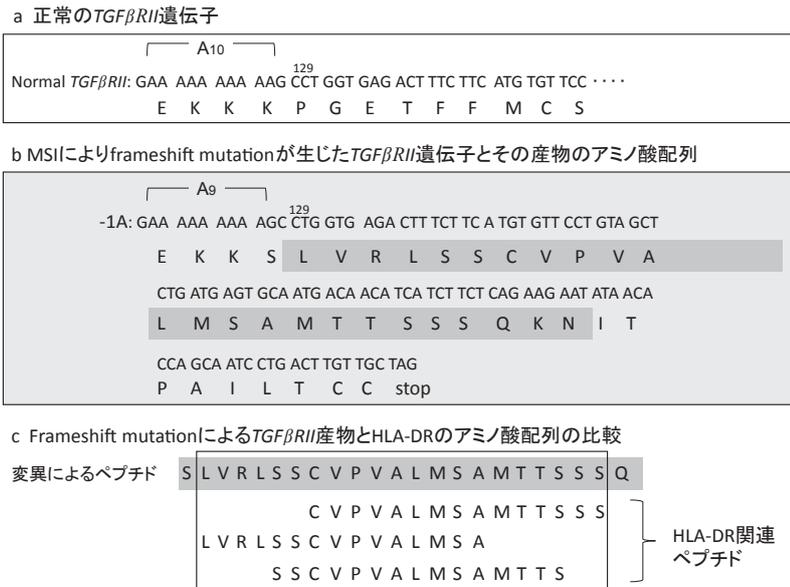


図8 MSIと tumor-infiltrating lymphocyte との関連

TGFβRII 遺伝子のエクソン内にA₁₀の塩基配列が存在する。これがMSIによりA₉に変化すると、frameshift mutationを生じ、産生されたペプチドのアミノ酸配列がHLA-DRに類似しており、腫瘍抗原性を増加させる。
(Copyright (2001) National Academy of Sciences, U.S.A.)

域にある CpG island といわれる部位のメチル化により、*MLH1* 遺伝子発現のスイッチがオフになり、結果として *MLH1* 蛋白質発現が減弱することにより生じる。この現象は加齢と関連があるので⁷⁾、MSI 陽性胃癌・大腸癌は高齢者に多く発生する^{8,9)}。実際、85歳以上の胃癌・大腸癌の1/4～1/3はMSIを示し、その比率は特に女性で高い。また、MSIを示す胃癌・大腸癌には組織学的特徴もみられ、胃癌では充実型低分化腺癌(43.0%)、乳頭腺癌(32.5%)が、大腸癌では髄様癌(ほぼ100%)、粘液癌(約50%)でMSIを示す比率が高い^{8,10-12)}。

VII. MSIを示す腫瘍と宿主の免疫反応

以前から発癌経路に関して、腫瘍を染色体不安定性(chromosomal instability, CIN)経路とMSI経路とに分類する考え方が示されていた¹³⁾。さらに最近の遺伝子変異に基づく組織分類でも、MSIを示す腫瘍は胃癌・大腸癌ともに独立した亜型として分類されている^{14,15)}。MSIを示す腫瘍の大部分はリンチ症候群ではなく、散発性の腫瘍が大部分であり、病理組織学的特徴として tumor-infiltrating lymphocyte (TIL) や Crohn's-like lymphoid reaction のような宿主の免疫反応が知られている。これらの発生機序は

すべて明らかにされているわけではないが、MSIにより *transforming growth factor-β receptor type 2* (*TGFβRII*) 遺伝子のエクソン内のA₁₀がA₉に変化し、frameshift mutationにより合成されたペプチドがHLA-DRに類似したアミノ酸配列を示すことから(図8)、リンパ球浸潤が惹起されると説明されている(図9)¹⁶⁾。Crohn's-like lymphoid reactionはB細胞の集簇であるので、何らかの液性免疫の関与が示唆される。

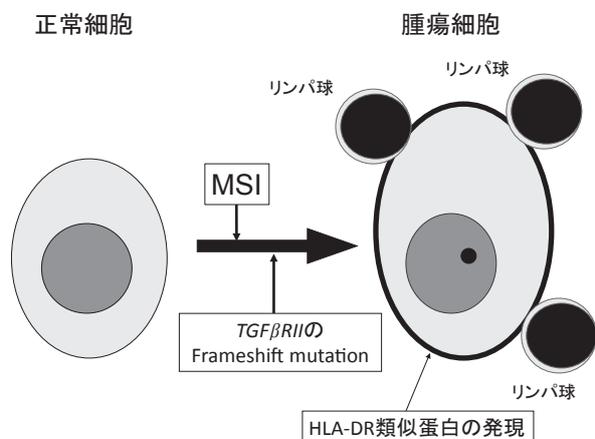


図9 Tumor-infiltrating lymphocyte のメカニズム

MSIにより惹起された*TGFβRII* 遺伝子の frameshift mutationにより HLA-DR 類似蛋白質が発現され、宿主側の反応としてリンパ球浸潤が増加する。

ペムプロリズマブやニボルマブ(オプジーボ[®])は抗PD-1抗体薬であり、免疫チェックポイントを阻害する作用が期待される。一般的に、PD-1はT細胞表面に発現する膜タンパク質で、腫瘍細胞が発現しているリガンドであるPD-L1やPD-L2と結合することでT細胞活性化の抑制機構が促進される。抗PD-1抗体薬は、癌細胞が抗腫瘍免疫応答からの逃避を解除するように作用する。肺癌においては腫瘍細胞にPD-L1が比較的高頻度に発現している。しかし、最近の研究ではPD-L1発現を示す大腸癌はMSIに関わらず極めて低率(2.3%)である一方、浸潤しているリンパ球などで高率にPD-L1発現がみられると報告されている¹⁷⁾。腫瘍と宿主の免疫反応は種々の腫瘍によって関係が異なることが示唆される。したがって、今回MSI陽性を示す腫瘍に対し、ニボルマブが癌腫横断的に保険適応となったが、治療薬の作用機序は各腫瘍によって異なるのかもしれない。

おわりに

MSI検査は分子標的薬の適応を決めるための検査でもあるが、リンチ症候群の補助診断としても実施される。若年発症のがん、多発・重複がん、家族歴のあるがんにおいてはリンチ症候群の可能性を疑って検査を進める必要がある。リンチ症候群は遺伝性疾患なので、臨床的には患者本人のみならず家族へのケアも必要となり、多職種が協力して慎重に対応する必要がある。

文 献

- 1) 日本病理学会. ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程. 2018.
- 2) Yuan L, Chi Y, Chen W, et al. Immunohistochemistry and microsatellite instability analysis in molecular subtyping of colorectal carcinoma based on mismatch repair competency. *Int J Clin Exp Med*. 2015; **8**(11): 20988-21000.
- 3) Arai T, Takubo K. Clinicopathological and molecular characteristics of gastric and colorectal carcinomas in the elderly. *Pathol Int*. 2007; **57**(6): 303-314.
- 4) Hampel H, Frankel WL, Martin E, et al. Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *N Engl J Med*. 2005; **352**(18): 1851-1860.
- 5) Barrow E, Hill J, Evans DG. Cancer risk in Lynch Syndrome. *Fam Cancer*. 2013; **12**(2): 229-240.
- 6) 大腸癌研究会. 遺伝性大腸癌診療ガイドライン. 東京: 金原出版; 2016.
- 7) Nakajima T, Akiyama Y, Shiraishi J, et al. Age-related hypermethylation of the hMLH1 promoter in gastric cancers. *Int J Cancer*. 2001; **94**(2): 208-211.
- 8) Arai T, Sakurai U, Sawabe M, et al. Frequent microsatellite instability in papillary and solid-type, poorly differentiated adenocarcinomas of the stomach. *Gastric Cancer*. 2013; **16**(4): 505-512.
- 9) Kakar S, Burgart LJ, Thibodeau SN, et al. Frequency of loss of hMLH1 expression in colorectal carcinoma increases with advancing age. *Cancer*. 2003; **97**(6): 1421-1427.
- 10) Arai T, Matsuda Y, Aida J, et al. Solid-type poorly differentiated adenocarcinoma of the stomach: clinicopathological and molecular characteristics and histogenesis. *Gastric Cancer*. 2019; **22**(2): 314-322.
- 11) Arai T, Esaki Y, Sawabe M, et al. Hypermethylation of the hMLH1 promoter with absent hMLH1 expression in medullary-type poorly differentiated colorectal adenocarcinoma in the elderly. *Mod Pathol*. 2004; **17**(2): 172-179.
- 12) Arai T, Kasahara I, Sawabe M, et al. Microsatellite-unstable mucinous colorectal carcinoma occurring in the elderly: comparison with medullary type poorly differentiated adenocarcinoma. *Pathol Int*. 2007; **57**(4): 205-212.
- 13) Simpson AJ, Caballero OL, Pena SD. Microsatellite instability as a tool for the classification of gastric cancer. *Trends Mol Med*. 2001; **7**(2): 76-80.
- 14) Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*. 2014; **513**(7517): 202-209.
- 15) Guinney J, Dienstmann R, Wang X, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med*. 2015; **21**(11): 1350-1356.
- 16) Saeterdal I, Bjorheim J, Lislud K, et al. Frameshift-mutation-derived peptides as tumor-specific antigens in inherited and spontaneous colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; **98**(23): 13255-13260.
- 17) Liu S, Gnen M, Stadler ZK, et al. Cellular localization of PD-L1 expression in mismatch-repair-deficient and proficient colorectal carcinomas. *Mod Pathol*. 2019; **32**(1): 110-121.