

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15089

研究課題名（和文）早期胃癌のマイクロサテライト不安定性は免疫組織化学的染色のみで同定出来るか？

研究課題名（英文）Can microsatellite instability in early-stage gastric cancer be identified by immunohistochemical staining alone?

研究代表者

杉本 亮 (Sugimoto, Ryo)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：30724869

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000 円

研究成果の概要（和文）：PCRの結果とMMR関連タンパク質の発現の相関関係を調べた報告は少ない。MLH1発現低下は、MSI状態を予測する有用なマーカーである。MLH1の発現がMSIの状態を反映していないケースもあった。PMS2の発現低下はMLH1と関連していたが、PMS2の発現低下の頻度はMLH1よりも限定的であった。PMS2とMSH6の発現低下はMMR欠損の検出に役立つが、MSIを予測するためにはMLH1とMSH2/MSH6を評価することが望ましい。MMR遺伝子産物のIHCはEGCのMSI状態を判定するための遺伝子検査に代わるものではない。以上の結果は、2020年にDIGESTIONに掲載された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年マイクロサテライト不安定性（MSI）型癌に対して免疫チェックポイント阻害薬が保険収載され注目を集めている。MSIの検出にはPCR法、免疫染色（IHC）があるが両者の関係についての検討は十分なされていなかった。今回の結果から、MLH1発現低下は、MSI状態を予測する有用なマーカーであった。また、PMS2とMSH6の発現低下はMMR欠損の検出に役立つが、MSIを予測するためにはMLH1とMSH2/MSH6を評価することが望ましい。ミスマッチ修復（MMR）遺伝子産物のIHCは早期胃癌のMSIを判定するための遺伝子検査に代わるものではない。以上は、2020年にDIGESTIONに掲載された。

研究成果の概要（英文）：Few reports have examined the correlation between PCR results and DNA MMR-related protein expression. Decreased expression of MLH1 is a valuable marker to predict MSI status. In some cases, MLH1 expression did not reflect MSI status. Decreased expression of PMS2 was associated with MLH1, but the degree of PMS2 downregulation was more limited than that of MLH1. Although reduced expression of PMS2 and MSH6 helps detect MMR deficiency, it is desirable to evaluate MLH1 and MSH2/MSH6 to predict MSI. IHC of MMR gene products is not a replacement for genetic testing to determine MSI status in EGCs. Based on the above results, the paper was accepted for publication in DIGESTION in 2020.

研究分野：人体病理

キーワード：胃癌 マイクロサテライト不安定性 免疫組織化学染色

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

胃癌の罹患率は検診の普及や *Helicobacter pylori* の除菌が広く行われる様になり減少傾向に転じている。しかし、本邦において死亡率は未だ上位を占めている重要な疾患である(1)。胃癌の発生機序の解明は重要な医学的課題の1つである。現在、大腸癌の発生機序にはいくつかの仮説が提唱されているが、染色体レベルの異常を特徴とする CIN (chromosomal instability) とゲノム上に散在性に分布するマイクロサテライト領域の異常を特徴とする MIN (microsatellite instability: マイクロサテライト不安定性) に分類される事が多く、両者は臨床病理学的、分子病理学的にそれぞれ特徴を有している。CIN 型癌は大腸癌全体の約 90%、左側発生が多く、組織型は大部分が分化型管状腺癌で、分子異常は p53 変異やコピー数の異常が認められる(2)。一方、MSI 型癌は大腸癌全体の約 10%を占め、右側結腸に多く発生し組織型は髄様癌や粘液癌が多い(3)。分子異常は v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B (BRAF)変異やゲノムワイドの DNA メチル化が特徴的とされている。胃癌においても CIN 型、MSI 型癌が発生する事が知られている。近年の網羅的解析によると、胃癌は Epstein-Barr (EB)ウイルス関連胃癌(8%)、MSI 型胃癌(20%)、CIN 型胃癌(40%)、および Chromosomal stable(32%)型胃癌に分類される事が報告された(4)。この中で MSI 型胃癌は進行癌を中心に研究が進められており、臨床病理学的特徴は高齢発症、女性優位、組織学的特徴は大腸髄様癌に類似した組織像を示す。また、5 年生存率が良好であることなどの臨床病理学的、分子病理学的特徴が明らかになってきた(5)。しかし、早期胃癌における MSI 型胃癌の臨床病理学的、分子病理学的特徴はこれまで十分な検討はなされていない。そこで我々は早期癌における MSI 型胃癌について臨床病理学的、分子病理学的な解析を行い以下の事を明らかにした(杉本、菅井ら 2016)(6)。

MSI 型早期胃癌は早期胃癌全体の約 13% (45 例/330 例) に認められ高齢者(平均 74.5 歳: 範囲 50-91 歳)に多く発症する。MSI 型早期胃癌の組織型は乳頭管状型癌の比率が多い。DNA ミスマッチ修復 (DNA mismatch repair: DNA MMR) 関連遺伝子産物である MLH1 の免疫組織化学的な発現の解析では MSI 型早期胃癌において MLH1 発現低下/消失が 77.8%であり、MSS 型早期胃癌と比較して有意に多く認められた($p < 0.001$)。DNA メチル化解析では MSI 型早期胃癌は高 DNA メチル化状態が有意に多く認められた($p < 0.001$)。Allelic Imbalance (AI) 解析では MSI 型早期胃癌は全体的に AI が高い傾向があり、特に 3 番染色体短腕、22 番染色体長腕で MSS 型早期胃癌よりも有意に多く認められた($p < 0.001$)。大腸癌における MSI 癌は CIN 型癌と排他的であり、AI は殆ど認められない事が知られている。大腸 MSI 型癌と胃 MSI 型癌は異なる腫瘍発生を示す可能性が示唆された。MSI の検出は臨床的に改定アムステルダム基準から除外された症例に関して、NCI 基準に則り 2 種類の mononucleotide (BAT25, BAT26)、3 種類の dinucleotide (D5S346, D2S123, D17S250) を用い PCR-Microsatellite 法によって行われる。しかし、PCR 法を用いた検査は設備や PCR 法に精通した技術者が必要となり、一般的な施設では解析自体が施行困難である。広く普及している免疫組織化学的染色で MSI 胃癌を検出する事が可能となれば、MSI 胃癌の検出も容易となる。そこで、我々は PCR の結果と DNA MMR 関連タンパクの免疫染色態度の関係性を明らかにするために早期胃癌 119 例に対して先行研究を行った。MSI 型胃癌の免疫染色では MLH1 は病変全体に発現消失した症例、発現に heterogeneity を示す症例が認められた。PMS2 染色では発現消失した症例、発現に heterogeneity を示す症例、

核に陽性像を認める症例、細胞質および核に弱陽性を示す症例が認められた。MSH2 と MSH6 は大部分の症例で陽性を示していたが、完全消失も 2 例含まれていた (図 1)。一方、MSS 型早期胃癌でも MLH1 陰性、PMS2 陰性の症例が認められた。MMR 関連遺伝子産物の免疫染色結果に偽陽性が認められ MSS 型早期胃癌を MSI 型早期胃癌と誤診する可能性も示唆された。

2. 研究の目的

免疫組織化学的染色で MSI を検出する事が出来れば MSI 胃癌の検出が容易となると考えられる。しかし、PCR 結果と DNA MMR 関連蛋白発現の相関性を検討した報告は少ない。本研究では日常診療で遭遇する機会の多い MSI 陽性胃癌を効率的に検出し癌発生機序解明の基盤となる研究を行う。

3. 研究の方法

1. 早期胃癌の MSI 解析：早期胃癌 119 例 (目標 300 症例) の症例を集積し、内視鏡的胃切除検体の腫瘍部、非腫瘍部から DNA を抽出し PCR-microsatellite (polymerase chain reaction- microsatellite)法にて、BAT25, BAT26, NR21, NR22 および NR24 の各マイクロサテライトマーカ-について解析を行う。MSI の判定基準は Boland らの基準に従い高 MSI, 低 MSI, MSS に分類する。2. 早期胃癌の MS 状態毎に以下の解析を行う。a) 臨床病理学的特徴の解析：男女比, 発症年齢, 発生部位, および肉眼型を解析する。b) 組織学的特徴の解析：内視鏡的胃切除検体は DNA サンプルの採取後に 10% 緩衝ホルマリンにて固定する。固定後標本では新鮮組織を採取した部分を含む標本を作製し癌組織は胃癌取り扱い規約 (15 版) に則り病理診断を行う。具体的には診断時に癌の病変の大きさ, 組織型, 脈管侵襲, 深達度の評価を行う。c) DNA MMR 関連遺伝子産物 (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) の免疫組織化学的発現解析：DNA MMR 関連遺伝子産物の発現解析を行う。病理診断を行う際, 病変の特徴を表している切片を選出し免疫組織化学的染色にて monoclonal 抗体 hMLH1 (ready-to use; clone ES05; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), hMSH2 (ready-to use; clone FE11; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), hPMS2 (ready-to use; clone EP49; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), および hMSH6 (ready-to use; clone EP51; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)。MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 の発現異常の解析を行う。免疫染色は, 自動免疫染色装置 (Dao Auto Stainer) を用いる。3. 免疫染色の評価：MMR タンパク質の染色結果を 5 つのパターンに分類した。(1) 陰性 (核および細胞質の両方の染色) (2) 陽性 (3) 細胞質染色陽性、(4) 核弱陽性、(5) 不均一性。MMR の発現の不均一性は、intraglandular と clonal の 2 つのパターンに分類した。

4. 研究成果

5. 研究実績の概要：本研究は平成 30 年から開始し、MSI 陽性早期胃癌を抽出するために必要な免疫染色マーカーを明らかにし、HE 染色像と免疫染色により MSI 陽性胃癌を早期癌の時点で診断する方法を確立することを目的とする。平成 32 年 (令和 2 年) は研究成果の最終的なまとめと論文投稿を行った。平成 31 年 (令和 1 年) に見られた染色パターンは再染色や抗体を一昼夜反応させ解消された。DNA-MMR 関連遺伝子産物の染色態度の比較において、核陽性、核陰性と heterogeneity を 3 型 (intraglandular-heterogeneity, clonal-heterogeneity, co-exist (intraglandular and clonal) heterogeneity) に分類して検討した。最終的に MSI 陽性早期胃癌において MLH1 陰性は 39 例、intraglandular-heterogeneity は 0 例、clonal-heterogeneity は 1 例、co-exist (intraglandular and clonal) heterogeneity は認め無かった。また、6 例の MLH1 陽性を認めた。PMS2 陰性は 36 例、

intraglandular-heterogeneity は 0 例， clonal-heterogeneity は 1 例， co-exist (intraglandular and clonal) heterogeneity は認め無かった。また、9 例の PMS2 陽性を認めた。MSH2 と MSH6 は各々陰性は 4 例、heterogeneity は認め無かった。また、42 例の MSH2 と MSH6 陽性を認めた。一方、MSS 早期胃癌においても MLH1 陰性は 2 例、PMS2 陰性は 2 例認められていた。MSH6 陰性を 1 例認めた。MSI 陽性早期胃癌において、MLH1/PMS の発現低下は MSS 癌にも少数認められるため、擬陽性となる可能性もあるが、MLH1 と PMS2 の発現低下は MSI を予測する有用なマーカーである。上記の所見を基に論文作成し、2020 年 digestion に採択された (Sugimoto R, Endo M, Osakabe M, et al. Immunohistochemical Analysis of Mismatch Repair Gene Proteins in Early Gastric Cancer Based on Microsatellite Status. *Digestion* 2020;1-10 doi: 10.1159/000510679[published Online First: Epub Date]).

文献

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2011;61(2):69-90.
2. Takahashi Y, Sugai T, Habano W, Ishida K, Eizuka M, Otsuka K, et al. Molecular differences in the microsatellite stable phenotype between left-sided and right-sided colorectal cancer. *International journal of cancer*. 2016;139(11):2493-501.
3. Arai T, Sakurai U, Sawabe M, Honma N, Aida J, Ushio Y, et al. Frequent microsatellite instability in papillary and solid-type, poorly differentiated adenocarcinomas of the stomach. *Gastric cancer : official journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association*. 2013;16(4):505-12.
4. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*. 2014;513(7517):202-9.
5. Marrelli D, Polom K, Pascale V, Vindigni C, Piagnerelli R, De Franco L, et al. Strong Prognostic Value of Microsatellite Instability in Intestinal Type Non-cardia Gastric Cancer. *Annals of surgical oncology*. 2016;23(3):943-50.
6. Sugimoto R, Sugai T, Habano W, Endoh M, Eizuka M, Yamamoto E, et al. Clinicopathological and molecular alterations in early gastric cancers with the microsatellite instability-high phenotype. *International journal of cancer*. 2016;138(7):1689-97.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sugimoto Ryo, Endo Masaki, Osakabe Mitsumasa, Toya Yosuke, Yanagawa Naoki, Matsumoto Takayuki, Sugai Tamotsu	4. 巻 -
2. 論文標題 Immunohistochemical Analysis of Mismatch Repair Gene Proteins in Early Gastric Cancer Based on Microsatellite Status	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Digestion	6. 最初と最後の頁 1~10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000510679	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------