

主論文

Clinical Impact of Endometrial Cancer Stratified by Genetic Mutational Profiles, *POLE* Mutation, and Microsatellite Instability

(*POLE* 変異とマイクロサテライト不安定性に基づいて分類された子宮体癌の臨床的意義)

【緒言】

近年子宮体癌の発生に関わる分子学的異常が解明されている。がんゲノムアトラス (TCGA) ネットワークが率いる研究では、子宮体癌は分子遺伝学的に、*POLE* 変異による超高頻度遺伝子変異型、マイクロサテライト不安定性 (MSI) を示すミスマッチ修復 (MMR) 蛋白複合体の機能欠損による高頻度遺伝子変異型、染色体不安定性の指標である染色体コピー数異常の程度による分類による染色体低コピー数型、染色体高コピー数型の 4 つのサブタイプに分類されると報告された。

POLE 遺伝子は、DNA 複製や修復に関与する蛋白複合体の一つである DNA ポリメラーゼ ϵ をコードし、*POLE* 遺伝子に変異を認める子宮体癌は予後が良好であることが報告されている。

MSI は、MMR 蛋白の異常により起こる現象で、子宮体癌において多くは散在性であるが、3-5%は MMR 遺伝子の生殖細胞変異 (リンチ症候群) が原因とされる。MSI 検査や MMR 蛋白の免疫組織化学検討は、リンチ症候群のユニバーサルスクリーニングとして広く行われるようになってきている。また大腸癌などでは、MMR 異常の有無が、予後や抗 PD-1 抗体治療の効果予測のバイオマーカーとなる可能性があることも報告されている。しかしながら、子宮体癌では予後について一定の見解がない。

本研究では、138 例の子宮体癌における *POLE* 変異、MSI、*MLH1* プロモーターメチル化、MMR 蛋白発現を調べ、*POLE* 変異と MSI の有無に基づいて子宮体癌を分類し、臨床病理学的特徴との関連について後方視的に検討を行った。

【対象と方法】

対象

2006 年から 2009 年に岡山大学病院で子宮体癌の手術を行った 138 例であり、必要に応じて術後に後療法を行った。本研究は、岡山大学倫理委員会の承認の下に行った。臨床病理学的情報 (年齢、手術進行期分類、後療法の有無、予後、組織分化度、組織型、筋層浸潤、頸部間質浸潤、脈管侵襲) は、診療録から抽出した。治療後は 3-6 か月毎に診察、膣断端細胞診、CT または PET-CT を行い経過観察した。

DNA の抽出とバイサルファイト処理

ホルマリン固定パラフィン包埋検体よりマクロダイセクションを行い、DNA を抽出、精製し、エタノール沈殿により濃縮させた。その後 DNA のバイサルファイト処理を行った。

POLE、*KRAS*、*BRAF* 変異解析

POLE 遺伝子の exon9 と 13, *KRAS* 遺伝子の exon2 と *BRAF* 遺伝子の exon15 の変異を, サンガー法で解析した。

MSI 解析

MSI 解析は 4 つのモノヌクレオチドマーカー (BAT26, NR21, NR27, CAT25) を用い, 1 つ以上のマーカーで MSI を示したものを MSI とし, 4 つのマーカーいずれも MSI ではないものは non-MSI と定義した。

MLH1 プロモーターのメチル化解析

MLH1 プロモーターを 2 つの領域 (5'領域と 3'領域) に分けて解析した。メチル化は, COBRA 法 (制限酵素は *HhaI* または *RsaI*) で識別し, キャピラリー電気泳動システムを用いて定量的に解析した。本研究では, トータルの PCR 産物に対する制限酵素により切断された PCR 産物の量が 5%以上の場合にメチル化ありと判定した。

MMR 免疫組織化学検討 (IHC)

MMR 蛋白 (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*) の発現を免疫組織化学検討で調べ, 全てが正常に発現しているものを MMR 正常(pMMR)とし, 一つでも発現が欠けているものは MMR 欠損 (dMMR) とした。

統計解析

統計解析には, JMP software (version10.0)を用いた。群間比較は, Fisher の正確確率検定を用いた。子宮体癌特異的生存期間 (ECS) は治療開始から子宮体癌による死亡または最終診察までの期間, 無増悪生存期間 (PFS) は手術から再発または進行までの期間と定義した。ECS と PFS は Kaplan-Meier 法で解析し, 単変量および多変量解析は Cox 比例ハザード回帰解析を行った。 p 値は 0.05 以下を統計的有意とした。

【結果】

138 例の内訳は, 123 例 (89.1%) は類内膜腺癌で, 15 例 (10.9%) はその他の組織型 (明細胞腺癌, 漿液性腺癌を含む) であった。進行期は I 期 93 例 (67.4%), II 期 11 例 (7.8%), III 期 24 例 (17.4%), IV 期 10 例 (7.2%) であった。

MMR 蛋白の発現

97 例 (70.3%) は pMMR であり, 41 例 (29.7%) は dMMR であった。dMMR の内訳は, *MLH1* と *PMS2* 欠損 (d*MLH1*) 23 例 (56.1%), *MSH2* と *MSH6* 欠損 (d*MSH2*) 8 例 (19.5%), *MSH6* 単独欠損 (d*MSH6*) 8 例 (19.5%), *PMS2* 単独欠損 (d*PMS2*) 2 例 (4.9%) であった。

MLH1 プロモーター領域のメチル化と MLH1 蛋白発現の関係

部分的なメチル化 (5'領域のみ) は 24 例 (17.4%), 広範囲なメチル化 (5'領域と 3'領域の両方)

は18例(13.0%)に認めた。部分的なメチル化は、pMMRに13例(13.4%)、dMLH1に4例(17.4%)、dMSH2に4例(50.0%)、dMSH6に2例(25.0%)、dPMS2に1例(50.0%)認めた。一方、広範囲なメチル化はpMMRに2例(2.1%)とdMLH1に16例(69.6%)認めたが、他のdMMRには認めなかった。

KRAS/BRAF変異

*BRAF*変異は認めなかった。*KRAS*変異は20例(14.5%)認めた。

POLE変異

*POLE*変異は12例(8.7%)に認め、P286Rが7例(58.3%)、V411Lが5例(41.7%)であった。

MSIとPOLE変異とMLH1メチル化とMMR蛋白発現の関係

MSIは40例(29.0%)に認めた。dMMR41例中MSIは38例(92.7%)、pMMR97例中non-MSIは95例(97.9%)であった。*POLE*変異のある12例は全例non-MSIでpMMRであった。dMMRであるがnon-MSIとなったのは3例で、1例は*MLH1*メチル化によるエピジェネティックなdMLH1であり、2例はdMSH6であった。

遺伝子変異情報に基づく子宮体癌の分類と臨床的予後との関係

*POLE*変異とMSIが重複している症例はなかったため、子宮体癌を*POLE*変異群とMSI群とnon-MSI群に分類した。*POLE*変異群、MSI群、non-MSI群の5年PFSとECSは、それぞれ、100%、89.5%、74.5%($p=0.0420$)と、100%、88.7%、84.5%($p=0.3162$)であった。各群と臨床病理学的特徴との間に有意な関連は認めなかった。単変量解析では、FIGO進行期、組織分化度、組織型、筋層浸潤の深さ、脈管リンパ管侵襲、*POLE/MSI*が有意にPFSと関連していた。多変量解析では、*POLE/MSI*と組織型、後療法が有意にPFSと関連しており、予後因子となりうると考えられた。ECSの多変量解析では、組織型のみが予後と有意に関連していた。

【考察】

これまでの子宮体癌の分子遺伝学的な研究の中で最も包括的なものはTCGA研究である。その中では、全ゲノムスクリーニング、エクソームスクリーニング、MSI解析、コピー数解析、プロテオーム解析が行われ、子宮体癌を分子遺伝学的に4つのカテゴリーに分類し、予後と関連すると報告された。しかしながら、この分類を臨床応用するには、調べる範囲が多すぎる点や、コスト面において現実的ではない。

そこで、我々は臨床応用可能かつ予後を有意に規定する子宮体癌の分子遺伝学的分類を検討した。その結果、*POLE*変異群とMSI群は予後が良好である傾向を見出した。これらは、臨床応用するのに容易でコストもかからないという利点がある。*POLE*変異に関しては、これまでも子宮体癌において良好な予後を示すことは報告されており、本研究でも極めて良好な予後を示した。

DNAミスマッチ修復機構の欠損は、子宮体癌において最も多くみられる分子遺伝学的な異常である。本研究でMSIの頻度は29.0%であり、頻度は他の研究と同様であった。本研究のMSI解析には4つのモノヌクレオチドマーカーを用いたmultiplex PCRを行った。従来のNCI推奨パ

ネルを用いた解析では MSI-high, MSI-low, MSS に分類されるが, MSI-high は dMMR でモノヌクレオチド, ジヌクレオチドに関わらず多くのマーカーで MSI となる。一方, MSI-low は pMMR で1つか2つのマーカー, それもほとんどがジヌクレオチドマーカーで MSI を示す。こういった背景からモノヌクレオチドマーカーを用いた multiplex PCR 法が MSI 解析に使用されつつある。

MLH1 プロモーターは大きな CpG island を持つが, 少なくとも2つの領域に分けることができ, Deng らは大腸癌で, 本研究で言う所の3'領域にわたる広範囲なメチル化が *MLH1* 遺伝子発現に関与していると結論づけている。本研究の子宮体癌において, 5'領域のみの部分的なメチル化は pMMR や dMLH1 以外の dMMR でも認めたが, 3'領域にわたる広範囲なメチル化は, dMLH1 の 69.6%に認め 2.1%の pMMR に認めるも他の dMMR には認めず, 広範囲なメチル化が *MLH1* 遺伝子発現に関与していると考えられる。

子宮体癌において MSI(dMMR)の予後に関しては一定の見解はまだない。最近, McMeekin らが, 大規模なコホートで, エピゲネティックな異常による dMMR (つまり *MLH1* メチル化) は, MMR 遺伝子変異や pMMR 群に比較して予後不良であることを報告した。一方で, 我々や Stello らの大規模なコホートの研究を含むいくつかの研究では, MSI は再発リスクや遠隔転移が少なく, 予後良好の傾向にあり, McMeekin らの報告とは矛盾する結果となった。この理由として, McMeekin らの検討では極めて良好な予後を示す *POLE* 変異を調べておらず, このため, 予後が最も良好である *POLE* 変異子宮体癌が pMMR 群のカテゴリーに組み入れられる事になるため, その結果, pMMR 群の予後がより良く示された可能性があると考えた。

本研究は単一施設の少ないサンプル数の研究であるが, 今後の研究や臨床において容易に実行できる遺伝子解析法を提供している点で有用である。また, *POLE* 変異とモノヌクレオチドマーカーによる MSI は, 予後良好で化学療法や放射線療法など後療法が不要であることを示すバイオマーカーとして臨床で応用できる可能性がある。

【結論】

本研究で, 子宮体癌において *POLE* 変異と MSI は, 予後良好かつ臨床応用可能なバイオマーカーとなる可能性があることを示した。