

内 容 要 旨 目 次

主 論 文

Accuracy of four mononucleotide-repeat markers for the identification of DNA mismatch-repair deficiency in solid tumors

(固形腫瘍におけるDNAミスマッチ修復欠損の同定のための4つのモノヌクレオチドリピートマーカーの正確性)

竹原裕子、永坂岳司、入谷光洋、春間朋子、原賀順子、母里淑子、中村圭一郎、藤原俊義、C. Richard Boland、Ajay Goel

Journal of Translational Medicine 16:5(1-11), 2018

2016年7月 第85回 大腸癌研究会に発表

主 論 文

Accuracy of four mononucleotide-repeat markers for the identification of DNA mismatch-repair deficiency in solid tumors

(固形腫瘍におけるDNAミスマッチ修復欠損の同定のための4つのモノヌクレオチドリピートマーカーの正確性)

【諸言】

マイクロサテライト不安定性(MSI)はマイクロサテライトリピート配列におけるinsertion-deletionのエラーを特徴とし、DNAミスマッチ修復タンパク欠損(dMMR)を有する腫瘍細胞の特徴である。いずれか1つもしくは2つのMMR遺伝子(MutL homolog (MLH)1, MutS protein homolog (MSH)2, MSH6, およびPMS2)の不活化がMSIの原因となる。元々、MSIはLynch症候群の直腸結腸癌(CRC)患者の90%以上にこの遺伝子異常を認めることが報告されており、その原因としてMMR遺伝子の生殖細胞変異が同定された。その後、MSIはgermlineでのMMR遺伝子の変異がなくとも、散发性(遺伝性ではない)CRCの12%から15%で認められていることが判明した。この場合のMSIはMLH1プロモーターのメチル化による不活性化に起因するものである。CRC患者における、MSIステータスもしくはMMRタンパクの免疫組織化学染色によるMMR欠損の判定は予後および治療効果の予測に重要である。一般的に、MSIを示すCRC患者は予後良好であることが報告されており、その一方で、5-FUといったフッ化ピリミジン系薬剤の化学療法の効果乏しいと報告されている。最近の臨床試験により、PD-1阻害薬が切除不能進行固形癌(CRC含)患者の中でも特にMSI陽性患者に著効することが示された。PD-1阻害薬を用いた臨床試験結果では、その奏効率は、dMMR CRCで40%、dMMR non CRCで71%、MMR欠損のない(pMMR) CRCで0%であり、無増悪生存率がdMMR CRCで78%、dMMR non CRCで67%、MMR欠損のない(pMMR) CRCで11%であった。

腫瘍におけるMSI診断の手法および診断基準は日々改良されてきている。しかし、世界的に安価で再現性があり、実用的で強力なMSIアッセイに関するコンセンサスはない。1997年、CRC患者におけるMSI解析の効果について、National Cancer Institute (NCI) workshopで5つのマーカーパネルを用いることが推奨された。2つのモノヌクレオチドマーカー(BAT26およびBAT25)と3つのジヌクレオチドマーカー(D2S123, D5S346, D17S250)である。Follow-up NCI workshopでは、このパネルはオリジナルのマーカーでは3つのジヌクレオチドマーカーを含むために限界があることが認識された。まず、ジヌクレオチドマーカーはMSI-lowの腫瘍の検出に有用であるが、モノヌクレオチドマーカーはMSI-positive CRCの検出でより高い感度、特異度を示す。続いて、ジヌクレオチドマーカーの多様性ゆえに、結果の解釈には正常組織と腫瘍組織の両方のPCRが必要となる。第3に、conventionalなNCI-panelマーカーはMSH6欠損CRCには適していない。Pentaplex PCRでは5つのquasi-monomorphic mononucleotide-repeatマーカーを採用することで、CRC患者の正常なDNAを必要とせず、dMMR大腸癌に対して、NCIパネルより高い感度・特異度を実現することが可能であった。しかし、この利点に反して、

pentaplex MSI アプローチは CRC 患者の MSI ベースでのスクリーニングに汎用化されていない。その原因としては、手技的な側面と、それぞれの研究室において評価に十分なデータが得られていないためであることが推測される。そこで、われわれは以前、dMMR CRC および pMMR CRC の組織検体を用いて、腫瘍および正常部の DNA の PCR 産物の解析を行って、pentaplex-panel marker の正確性について包括的な評価を行った。その結果、オリジナルパネルの 5 つのモノヌクレオチドマーカーのうち、BAT26, NR21, NR27 の 3 つのマーカーのみを用いたパネルが dMMR CRC の検出により適していると考えられた。しかしながら、MSI 陽性 CRC を識別するためのこの MSI マーカーのパネルの実用的、手技的な長所にかかわらず、MSH6 欠損 CRC の検出の不正確さがこれらのマーカーの問題点であった。これらのデータから MSH6 欠損 CRC の検出を改善したより強力なアッセイの開発が必要であることが示唆された。

そこで、今回、4 つの quasi-monomorphic mononucleotide-repeat マーカー (BAT26, NR21, NR27, CAT25) パネルを single multiplex PCR (Tetraplex) で増幅し、dMMR CRC を検出する手法の有用性について検討した。このアッセイでは最初に dMMR 105 例、pMMR 213 例からなる 318 例の CRC 検体のコホートを用いて解析を行った。加えて、MSI 腫瘍は子宮内膜でも高頻度であるため、MMR ステータスの明らかな子宮体癌 (EC) の 138 例のコホートでも MSI アッセイの有用性の解析をおこなった。

【材料と方法】

テストコホートにおける CRC 検体

岡山大学病院において免疫組織化学染色(IHC)で pMMR と診断された CRC 患者の生殖細胞および腫瘍の DNA 212 検体。3 施設(ベイラー大学(Dallas, TX, USA), ハイデルブルグ大学(Heidelberg, Germany), 岡山大学病院)で採取された dMMR と診断された CRC 患者の 105 検体。この 105 例の dMMR CRC コホートは 45 例の MLH1-deficient (dMLH1), 45 例の MSH2-deficient (dMSH2), 15 例の MSH6-deficient (dMSH6) 癌である。腫瘍の DNA は 105 例のホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)腫瘍組織の連続切片(5 μ m)から抽出した。

FFPE サンプルは全例で染色を行い、顕微鏡下に腫瘍部位を同定し、DNA 抽出をおこなった。Genome DNA は QIAamp DNA mini kits (Qiagen, Valencia, CA, USA)を用いてパラフィン包埋組織から抽出した。

バリデーションコホートにおける EC 検体

岡山大学病院の EC 患者から採取した 138 検体。23 例の dMLH1, 8 例の dMSH2, 8 例の dMSH6, 2 例の PMS-2 欠損癌である。腫瘍 DNA は CRC 検体と同様の方法で抽出した。

MMR タンパクの IHC

MMR タンパクの発現を 313 例の CRC 症例, 138 例の EC 症例で MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 タンパクの IHC で検出した。薄切切片(5 μ m)を、脱パラフィンし、エタノールを用いて脱

水処理した。クエン酸 buffer (pH 6.0)で抗原賦活化処理を行った後、3%の過酸化水素水を用いて内因性のペルオキシダーゼをブロックした。その後、一次抗体反応として、スライドを purified mouse monoclonal antibodies against MLH1 (clone G 168-15; 1: 50; BD Pharmingen, San Diego, CA, USA), MSH2 (clone G219-1129; 1:200; BD Pharmingen), MSH6 (clone 44/1 MSH6; 1:100; BD Pharmingen), PMS2 (clone A16-4; 1:200; BD Pharmingen)を用いて、overnight で incubation した。二次抗体と avidin - biotin - peroxidase complex (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)を用いて incubation した。streptavidin-peroxidase の後、biotinyl-tyramide を用いて incubation した。Diaminobenzidine は色原体として、hematoxylin は核の counterstaining のため用いた。腫瘍細胞は間質細胞で MMR 染色が陽性になっていることを確認したうえで、核の染色がないものも含めて上皮細胞のみで MMR タンパクの発現を認めなかったものを評価した。腫瘍組織ではすべて MMR タンパクが発現しているものを pMMR とし、4つの MMR タンパクのうち1つでも欠損があれば dMMR と判定した。

Tetraplex System と Quasi-Monomorphic Variation Range (QMVR)

MSI の解析には 4 つの Mononucleotide-repeat microsatellite target (CAT25, NR21, NR27, BAT26)を用いて、single multiplex PCR reaction (Tetraplex)を行った。プライマーの配列は Supplementary Table1 に示す。それぞれの sense primer には PET, NED, VIC, 6-FAM の蛍光マーカーを付与した。Tetraplex assay における PCR の設定は 95°C 15 分の後、95°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 30 秒を 35 サイクル、最後に 72°C 10 分とした。PCR 産物はホルムアルデヒドで希釈し、Applied Biosystems 310 Avant automated capillary electrophoresis DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)で解析を行った。アレルのサイズは GeneMapper 3.1 software (Applied Biosystems)を用いて決定した。

4 つの MSI マーカーのそれぞれで QMVR の設定および評価は、過去に報告しているように、個々の PCR 産物を評価し、それぞれのマーカーにおけるアレルサイズ、腫瘍特異性などをもとに決定している。

統計学的解析手法

CRC における MMR ステータスの診断精度について統計的な解析を行った。解析には JMP (v10.0.2; SAS Institute Cary, NC, USA)を用いた。

【結果】

Germline DNA による各マーカーの QMVR の設定

モノヌクレオチドリピートマーカーは世界中の広範な個体群の germline DNA において高い単型性を示す。理論的には、それぞれのマーカーの QMVR は個々の実験設定に左右されない。しかしながら、特定の機器や試薬がそれぞれのアレルサイズの測定に影響を及ぼす場合がある。そこで、MSI 腫瘍の解析に先立って、一度 germline DNA での QMVR の詳細な評価をする必要があ

った。それぞれの MSI マーカーの QVMR を設定するために IHC で pMMR とされている 212 例の CRC 患者の germline DNA と tumor DNA を増幅した。テストセットではそれぞれのマーカーで Figure 1 に示すように QMVR とサイズシフトした dMMR 症例が確認された。Germline DNA における、それぞれのモノヌクレオチドマーカーの多形の範囲は CAT25(106-108 bp), NR21 (131-134 bp), NR27 (153-156 bp), BAT26 (175-177 bp)であった。最も一般的なアレルでは CAT25 (108 bp), NR21 (133 bp), NR27 (154 bp), BAT26(176bp)であった。

これらを比較すると、それぞれのマーカーサイズの理論値については Supplementary Table 1 に示すように、CAT25 (109 bp), NR21 (133 bp), NR27 (159 bp), BAT26 (182 bp)である。これらの結果より、われわれの増幅システムでは最も一般的なアレルは各マーカーサイズの理論値より短いとの結果を示した (CAT25 で 1 bp, NR21 で 0 bp, NR27 で 5 bp, BAT26 で 6 bp)。

テストセットでの MMR タンパク欠損 CRC 識別のための個々のアレルマーカーの性能特性

dMMR CRC を識別するための個々のマーカーの性能特性について検討した(Table 1)。われわれの解析では 4 つのモノヌクレオチドリピートマーカー全てが dMMR CRC を 91.4% (NR1)から 95.2% (BAT26)の感度で、また pMMR CRC の特異度 97.5% (NR27)から 100% (CAT25)で検出可能であることを示した。dMSH2 での感度が最も高く、dMSH6 での感度が最も低かった。

テストセットでの dMMR 癌の識別のための Tetraplex システムの有用性

Tetraplex system を用いた CRC での dMMR または pMMR の検出のための 4 つのアレルマーカーの組み合わせの可能性について検討した。アレルサイズのバリエーションが 4 つのマーカーで 1 以上であれば MSI と診断する。Tetraplex system では Table 2 に示すように、dMMR CRC の検出感度が 97.1% (95% 信頼区間 (CI) = 91.9-99.0%), pMMR CRC の特異度が 95.3% (95% CI = 91.5-97.4%) であった。MSI と MMR タンパク発現ステータスの相関について検討すると、Tetraplex system で最も高い感度をしてしたのは dMLH1 (100%)と dMSH2 (100%)であった。加えて、4 つのマーカーの中で 1 以上で MSI と判定すると、dMSH6 の感度は 86.7% (15 例中 13 例)と十分有効なものであった。

EC での MMR 発現ステータスのプロファイルとバリデーションセットでのそれぞれのマーカーの QMVR 分布

Tetraplex system は他の癌種においても dMMR 癌の検出が可能であるかについて、EC 検体を用いて同様に検討した。まず、138 例の EC 検体のコホートを用いて MMR タンパクの発現を評価した。IHC で 41 例(29.7%)の EC に dMMR を認めた。dMLH1 が 23 例 (56.1%), dMSH2 が 8 例(19.5%), dMSH6 が 8 例(19.5%), PMS2 欠損が 2 例(4.9%)であった。CRC で用いた 4 つのアレルマーカーを増幅し、それぞれの dMMR における QMVR とアレルサイズの分布を検討した。Figure 3 に示すように、pMMR サンプルに加えて、dMMR サンプルではアレルが小さい方向にシフトすることが明らかであった。

バリデーションセットでのMMR タンパク欠損 EC 識別のための個々のアレルマーカ-の性能特性

dMMR EC の識別のための個々のマーカ-の性能特性について検討した(Table 3).

われわれの解析では4つのモノヌクレオチドマーカ-で dMMR EC 検出が可能であることが明らかであった. 別のアレルでは dMMR EC の検出感度は 78.1%から 90.2%, pMMR EC の特異度が 99.0% から 100%であった.

EC のバリデーションセットでの dMMR 癌の識別のための Tetraplex システムの有用性

dMMR EC および pMMR EC で Tetraplex system を用いてすべてのマーカ-の有用性について検討した. アレルサイズのバリエーションが 4 つのマーカ-で 1 以上で MSI と診断すると, Tetraplex system は dMMR で 92.7% (95% CI = 80.6-97.5%)の感度, pMMR で 97.9% (95% CI =92.8-99.4%)の特異度を示した(Table 4).

MSI と MMR タンパク発現ステータスの相関について検討すると, Tetraplex system での感度は dMLH1 (95.7%), dMSH2 (100%), dMSH6 (75.0%), PMS2 欠損(100%)であった(Figure 4).

【考察】

結腸直腸癌(CRC)の発生に関する個々の susceptibility の分子的基礎や, 腫瘍の発生や進展を司る因子, 抗腫瘍薬への反応を決定する因子についての理解が進んできた. The Cancer Genome Atlas (TCGA)によると, CRC は少なくとも 2 つのクラスタに分類される. 高頻度変異腫瘍とそうでないものである. 高頻度変異 CRC はさらに 2 つの subset に分類される. 超高頻度変異による DNA polymerase E (POLE)のエキソヌクレアーゼドメインの変異により DNA 修復系の欠損を認める腫瘍と, 腫瘍の大部分を占める DNA ミスマッチ修復タンパク欠損(dMMR)およびマイクロサテライト不安定性(MSI) phenotype を有するものである. POLE 遺伝子に変異のあるものは MSI phenotype を示す dMMR とは明確に区別される.

いくつかの臨床試験で MSI は免疫チェックポイント阻害薬の効果予測因子となることが示唆されている. そこで, MSI 解析は, Lynch 症候群の診断だけでなく, 免疫チェックポイント阻害薬に反応すると考えられる高頻度変異腫瘍の選別において重要なものとなる. 固形癌の dMMR 診断において, 迅速で, 費用対効果が高い正確な MSI アッセイの確立は, 臨床分野だけでなく, 研究分野においても重要である. 本研究では, 4 つの mononucleotide microsatellite marker を増幅する single PCR 反応を用いた迅速で正確な MSI アッセイの開発と応用について述べてきた. このアッセイは CRC と同様に EC においても pMMR および dMMR の MSI ステータスの診断に有用であった.

一般的な 5 つのマイクロサテライトマーカ-からなる NCI パネルを用いた MSI 解析は臨床および研究の場で最も使用されている方法である. しかし, 多くの研究でジヌクレオチドリピートは, ほとんどが pMMR である MSI-low 腫瘍を検出するのに対し, モノヌクレオチドリピートマーカ-は dMMR 癌の検出により正確であることが示されている.

われわれは以前に, BAT25, BAT26, NR21, NR24, NR27 の 5 つのモノヌクレオチドマーカ-

一からなる pentaplex PCR の有用性について報告した。この研究結果では、3 つのマーカー (BAT26, NR21, NR27) に対して、NR24 および BAT25 は dMMR 腫瘍の検出力で劣っていた。このため、3 つのマーカー (BAT26, NR21, NR27) による dMMR 腫瘍の検出感度や陽性的中率を、5 つのマーカーからなるパネルを使用した場合と比較すると、3 つのマーカーの方が、それら腫瘍に対する検出感度や陽性的中率は優れていた。MSI ベースのアッセイとして経済的な面からも、少ないマーカーパネルのほうが将来的に CRC のスクリーニング検査となることが推測される。

また、現在保険適応にて使用されている NCI マーカーパネルの問題点の一つは dMSH6 CRC の検出率が低いことである。われわれの過去の研究では pentaplex panel のモノヌクレオチドマーカーを用いても、他の MMR タンパク欠損 CRC と比較して dMSH6 CRC の検出感度は低いことが示されている。MSH2 と MSH6 からなる heterodimeric complex である MutSa は、DNA 配列における 1 つもしくは 2 つのヌクレオチドの小さな insertion/deletion ループおよび base/base mismatch を認識し、修復するため特徴を有する。このため、dMSH6 による insertion/deletion は、極めて短いという特徴を有する。それゆえ、dMSH6 による MutSa 機能の欠損は短いモノヌクレオチドリピートに起因する不安定性を招くと考えられる。今回の研究では CAT25 というモノヌクレオチドマーカーを加えることで、dMSH6 癌の検出感度を改善した。われわれの 4 つのマーカーパネルを用いた場合の dMSH6 の検出感度は CRC バリデーションセットで 86.7% (15 例中 13 例)、EC テストセットも 75.0% (8 例中 6 例) と高い感度を示した。

dMMR 腫瘍の検出感度の高いアッセイを開発するために、より高感度の MSH6 マーカーの開発に重要なものは QMVR であると考えられる。本研究で使われた 4 つのマーカーの正常な QMVR は 3bp から 4bp であった。これは QMVR の range が dMMR 癌の、とくに sMSH6 癌の検出感度を改善していると考えられた。予測される問題点としては、本研究ではテストセットに PMS2 欠損癌を含まなかったことである。加えて、テストセットおよびバリデーションセットにおける MSH6 欠損の検出感度はいまだ 90% を下回るものであった点もあげられる。

【結論】

MSI 陽性固形がんのスクリーニングのための PCR を用いた Tetraplex assay を開発した。Tetraplex assay は簡便かつ迅速なスクリーニング検査であり、癌患者の正常部位の DNA 検体を必要とせず、CRC と同様に EC における dMMR 患者においても高い感度・特異度を示しており、従来の dMMR 癌診断にかわる新しい検査方法となりうると考えられる。