

氏名・(本籍)	加藤 彩 (秋田県)
専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	医博甲第 914 号
学位授与の日付	平成 28 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学系研究科医学専攻
学位論文題名	<p>Isolated loss of PMS2 immunohistochemical expression is frequently caused by heterogeneous MLH1 promoter hypermethylation in Lynch syndrome screening for endometrial cancer patients</p> <p>(子宮体癌患者におけるリンチ症候群スクリーニングにおいて、PMS2 の免疫組織化学的発現の単独欠損は、不均一な MLH1 プロモーター高メチル化によってしばしば引き起こされる)</p>
論文審査委員	(主査) 教授 羽瀧 友則 (副査) 教授 柴田 浩行 教授 後藤 明輝

学位論文内容要旨

Isolated loss of PMS2 immunohistochemical expression is frequently caused by heterogeneous *MLH1* promoter hypermethylation in Lynch syndrome screening for endometrial cancer patients

(子宮体癌患者におけるリンチ症候群スクリーニングにおいて、PMS2 の免疫組織化学的発現の単独欠損は、不均一な *MLH1* プロモーター高メチル化によってしばしば引き起こされる)

申請者氏名 加藤 彩

研究目的

リンチ症候群 (LS) は、主に 4 種のミスマッチ修復 (MMR) 遺伝子 (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*) の生殖系列変異により、大腸癌や子宮体癌 (EC) をはじめとする多種の関連癌が高頻度に発生する常染色体優性の遺伝性腫瘍症候群である。LS は EC の 2~6% に内在すると見積もられており、重複発癌した LS 女性においては EC がセンチネル癌として大腸癌と同等以上の役割を果たしている。EC 患者より LS 女性を識別してゆくことは、本人とその近親血縁者に関連癌の予防や早期診療の機会をもたらすため、医療的な意義が深い。

免疫組織化学 (IHC) 評価による LS スクリーニングは EC において重用されており、MMR 蛋白の欠損パターンより変異遺伝子の予測が可能である。MLH1 蛋白発現の欠損例にはメチル化分析を追加することにより、*MLH1* プロモーター領域の DNA 高メチル化 (MLH1-PHM) による散発性癌を分別できる。この戦略で選出された患者は「LS 疑い」例として、遺伝学的解析を提案されることになる。

本研究の焦点である *PMS2* 遺伝子変異による EC 患者は稀であり、他関連癌の発生リスクも比較的低い。遺伝子解析は経済的・精神的な患者負担を伴うため、*PMS2* 遺伝子変異の効率的な弁別は実地臨床スクリーニングにおいて重要である。PMS2 蛋白は、MLH1 蛋白と特異的に結合して機能的二量体を形成するため、PMS2 遺伝子に障害が生じた場合のみならず、MLH1 遺伝子や MLH1 蛋白の機能障害時にも、IHC においてその発現が欠損する。よって、PMS2 蛋白発現欠損の陽性的中率は低い。我々は、PMS2 蛋白発現の単独欠損 (IL-PMS2) 例の中にも、(MLH1 蛋白の発現欠損例と同様に) MLH1-PHM 例が内在する、と仮説を立てた。IL-PMS2 と MLH1-PHM の関連を明らかにし、不要な遺伝学的解析を回避する手順を整えること、を本研究の目的とした。

研究方法

2003 年 1 月から 2013 年 12 月までの期間に、本学附属病院の産婦人科において EC として診療した 360 人を研究対象とした。診療の際に摘出された腫瘍組織を、4 種の MMR 蛋白 (MLH1、MSH2、MSH6、PMS2) に対する特異的抗体を用いて、免疫組織学的に MMR 蛋白の発現を評価し、IL-PMS2 例を選別した。IL-PMS2 例の腫瘍組織より DNA を抽出し、MLPA 法にて *MLH1* のプロモーター領域における高メチル化の有無を評価した。同意が得られた IL-PMS2 患者の血液より DNA を抽出し、*MLH1* と *PMS2* 領域の遺伝子解析 (フルシークエンス法・MLPA 法) を行った。

研究成績

EC 患者 360 人中、IHC にて 68 例 (18.9%) に MMR 蛋白の発現欠損を認めた。MLH1 蛋白欠損例に対する *MLH1* メチル化分析により 26 例を散発性癌として除外し、42 例 (11.7%) を「LS 疑い」例として選出した。IL-PMS2 例は 8 例 (全体の 2.2%) であり、うち 4 例 (50%) にメチル化分析にて MLH1-PHM を認めた。この MLH1-PHM 例では *MLH1* や *PMS2* の遺伝子変異を検出せず、IHC において MLH1 蛋白の不均一な発現を認めた。一方、*MLH1*-PHM を認めない IL-PMS2 の 4 例中では 1 例 (全体の 0.3%) に *PMS2* 遺伝子変異を検出し、MLH1 蛋白は正常発現であった。

結論

EC での LS スクリーニング戦略において、IL-PMS2 例の半数に MLH1-PHM の存在と MMR 遺伝子変異の不在を確認した。IL-PMS2 例にメチル化検査を行うことで、MLH1-PHM による散発癌を分別し不要な遺伝学的解析を回避し得る可能性を示した。本研究は、IHC を含んだ LS スクリーニング戦略の精度と効率を、ともに向上させる新たな戦術の提案である。

学位論文(博士一甲)審査結果の要旨

主査: 羽瀨 友則

申請者: 加藤 彩

論文題名: Isolated loss of PMS2 immunohistochemical expression is frequently caused by heterogeneous *MLH1* promoter hypermethylation in Lynch syndrome screening for endometrial cancer patients

(子宮体癌患者におけるリンチ症候群スクリーニングにおいて、PMS2 の免疫組織化学的発現の単独欠損は、不均一な *MLH1* プロモーター高メチル化によってしばしば引き起こされる)

要旨

リンチ症候群(LS)は、主に4種のみスマッチ修復(MMR)遺伝子(*MLH1*、*MSH2*、*MSH6*、*PMS2*)の生殖系列(germ-line)変異により、大腸癌や子宮体癌(EC)をはじめとする多種の関連癌が高頻度に発生する常染色体優性の遺伝性腫瘍症候群である。LSはECの2~6%に内在すると見積もられており、重複発癌した女性においてはECがLSのセンチネル癌として大腸癌と同等以上の重要性がある。EC患者からLS女性を識別してゆくことは、本人とその近親血縁者に関連癌の予防や早期診療の機会をもたらすため、医療的な意義が深い。

PMS2 変異によるEC患者は稀であり、他関連癌の発生リスクも比較的低い。遺伝子解析は経済的・精神的な患者負担を伴うため、*PMS2* 変異の効率的な弁別は臨床的にも重要である。*PMS2* 蛋白は、*MLH1* 蛋白と特異的に結合して機能的二量体を形成するため、*PMS2* 異常の場合のみならず、*MLH1* や *MLH1* 蛋白の異常でも *PMS2* 蛋白発現が欠損する。よって *PMS2* 蛋白発現欠損の *PMS2* 変異の陽性的中率は低い。

本研究ではECとして診療した360人を研究対象とし、免疫組織染色により腫瘍組織における4種のMMR蛋白(*MLH1*、*MSH2*、*MSH6*、*PMS2*)の発現を評価し、IL-*PMS2* 例を選別した。IL-*PMS2* 例の腫瘍組織よりDNAを抽出し、MLPA法にて *MLH1* のプロモーター領域における高メチル化の有無を評価した。さらにIL-*PMS2* 患者の血液よりDNAを抽出し、*MLH1* と *PMS2* の遺伝子解析(フルシーケンス法・MLPA法)を行った。

EC患者360人中、IHCにて68例(18.9%)にMMR蛋白の発現欠損を認めた。*MLH1* メチル化分析により26例を散発性癌として除外し、42例(11.7%)を「LS疑い」例として選出した。IL-*PMS2* 例は8例(全体の2.2%)であり、うち4例(50%)にメチル化分析にて *MLH1*-PHM を認めた。この *MLH1*-PHM 例では *MLH1* や *PMS2* の変異を検出せず、免疫組織染色において *MLH1* 蛋白の不均一な発現を認めた。一方、*MLH1*-PHM を認めないIL-*PMS2* の4例中では1例(全体の0.3%)に *PMS2* 変異を検出し、*MLH1* 蛋白は正常に発現していた。

EC での LS スクリーニング戦略において、IL-PMS2 例の半数に MLH1-PHM の存在と MMR 変異の不在を確認した。IL-PMS2 例にメチル化検査を行うことで、MLH1-PHM による散発癌を分別し、不要な遺伝子解析を回避し得る可能性を示した。

1) 斬新さ

- ① 世界に先駆けて、PMS2 蛋白発現の単独欠損例の約半数に *MLH1* プロモーター領域の DNA 高メチル化が子宮体癌組織で同定され、かつ germ-line の *MMR* 変異が無いことを示したこと。
- ② PMS2 蛋白発現の単独欠損例に対して、腫瘍組織の *MLH1* プロモーター領域の DNA 高メチル化解析を行うことで、germ-line の *MMR* 変異解析を回避できる可能性を示したこと。
- ③ 免疫組織化学染色による MMR 蛋白発現の評価による LS スクリーニング戦略の方向性を示したこと。

2) 重要性

PMS2 蛋白発現の単独欠損例の約半数に *MLH1* プロモーター領域の DNA 高メチル化が子宮体癌組織で同定され、かつ germ-line の *MMR* 変異が無いことを示したことで、腫瘍組織の *MLH1* プロモーター領域の DNA 高メチル化解析を行えば、germ-line の *MMR* 変異解析を回避できる可能性を示したことである。この知見は免疫組織化による MMR 蛋白発現の評価による LS スクリーニングの妥当性を示している。

3) 研究方法の正確性

本研究は、免疫染色、腫瘍組織の DNA メチレーション解析、DNA シークエンス等、標準的で確固とした方法に準じて行われており、正確性や妥当性に問題は無いと判断される。

4) 表現の明瞭さ

抄録、背景、対象と方法、結果、考察、結論、表、図など簡潔で明瞭に記載されている。さらに、すでに学術雑誌に英文論文として掲載受理されており、学位論文として校正、表現など問題ない。

以上、本論文は学位を授与するに十分値する内容と判定された。