

## 主 論 文

Efficient molecular screening of Lynch syndrome by specific 3' promoter methylation of the *MLH1* or *BRAF* mutation in colorectal cancer with high-frequency microsatellite instability

(高頻度のマイクロサテライト不安定性を伴った大腸癌における *MLH1* あるいは *BRAF* の突然変異の特別な 3' プロモーターのメチル化による Lynch 症候群の効率的な分子学的検索)

### 【緒言】

遺伝性または散発性のどちら大腸癌 (CRC) もミスマッチ修復 (MMR) の欠損によって機械的に引き起こされ、多くの散発性大腸癌に比べ異なった臨床病理学的特徴を示す。MMR 欠損癌の遺伝型は、リンチ症候群や遺伝性非ポリポーシス大腸がん (HNPCC) として知られています。しかし、家族性腺腫性ポリポーシス (FAP)、結腸と直腸のポリープの数を観察した遺伝性のほかのタイプの大腸癌症候群と比べて、明らかな臨床病理学的な特徴が乏しいため、散発的な大腸癌からリンチ症候群の正確な診断は困難な場合がある。また、がんの原因となる MMR 遺伝子の生殖細胞系列変異は常にリンチ症候群で検出することはできない。遺伝的あるいは散発的な理由による MMR の機械的欠陥は、マイクロサテライト配列の不安定性 (滑りによる長さ変化) が発生する。モノヌクレオチドリピートマーカの、BAT25、BAT26、BAT40 で観察される高レベルのマイクロサテライト不安定性 (MSI-H) は、MMR の欠損癌の大部分で示されている。したがって、MSI のテストは、散発 CRC 患者から高い確率でリンチ症候群の患者を選択する理想的な手技である。MMR の欠陥を伴ったとの散発性と遺伝性の大腸癌の主な違いは、次のように理解されている。MMR 遺伝子 (*MLH1*、*MSH2*、*MSH6*、および *PMS2*) の生殖細胞不活性化は HNPCC の根底にあり、*MLH1* 遺伝子のエピジェネティックなサイレンシングが MMR の欠陥とともに散発性大腸癌を引き起こす。腫瘍サンプルにおいて、*MSH2*、*MLH1*、*PMS2* と *MSH6* のような MMR 遺伝子産物の免疫組織学 (IHC) 解析はリンチ症候群の診断を支援するために活用される。最近では、MMR の欠損の大腸癌は、これらの腫瘍の典型的な病理組織学的特徴が明らかにされていると一般的に認識されているという理由だけで、IHC なしに組織病理学的観察によって区別することができる。これはリンチ症候群を診断するのに役立つだろう。遺伝性と散発性の両方の形態を含む MMR の欠陥をともなった大腸癌は、MSI の検査または MMR タンパク質の免疫組織学 (IHC) 的検査のいずれかによって診断することができる。

しかし、リンチ症候群を診断するために、我々は両方の MMR の欠陥を有する散発的な大腸癌の遺伝フォームから区別するために、分子法などのいくつかの付加的なアプローチを必要としている。そこで本研究では、初期の MSI 検査と最終的な germline mutation の間の段階でリンチ症候群の事前選択を支援するためのこれらの分子マーカーを評価するために、*BRAF* 変異状態や CpG アイランドのメチル化因子表現型 (CIMP) ステータスのメチル化パターンに同様に *MLH1* プロモーターのメチル化のパターンに焦点を当てた。

## 【材料と方法】

### 対象

腫瘍組織および対応する正常粘膜のびサンプルは、岡山大学とクイーンズランド州ブリスベンのロイヤルブリスベン病院で根治手術を受けた CRC 患者から得た。倫理的な承認を得て、我々はすべての被験者から書面でインフォームドコンセントを得た。腫瘍の病期分類はデュークス分類に基づいて行った。腫瘍と正常両方の粘膜組織のサンプルは-80°Cで保存され、DNAはプロテインアーゼ K、フェノール - クロロホルム抽出による標準的な手順により抽出された。

### MLH1 プロモーターから nested MSP の製品の直接配列決定

bisulfite 処理された DNA サンプルは MLH1 遺伝子のプロモーター領域に特異的なプライマーを用いて増幅した。MLH1-F (5'-GGAGTGAAGGAGGTTAIGGGTAAGT-3') および MLH1-R (5'-ATTCACCACTATCTCITCCAACC-3')、および nested PCR 法のための“メチル化”と“非メチル化”のためのプライマー配列は次のとおりだった：最初の PCR プライマーの配列は、(a) M-F (5'-GTAGATGTTTTATTAGGGTCGC-3') および MLH1-R で、(b) の U-F (5'-GTAGATGTTTTATTAGGGTTGTGT-3') および MLH1-R を使い、生成するフラグメントの長さはそれぞれ 722bp と 511 bp であった。最初の PCR と nested PCR 法の条件は以下の通りである：95°C で 15 分間、90°C 30 秒、58°C 30 秒と 72°C 30 秒を 45 サイクル、最後に、7 分 72°C であった。nested PCR 法の生成物を QIAquick PCR 精製キット (Qiagen) を用いて精製し、直接サーモシーケンサーゼシングキット (アマシャム社、Piscataway, NJ) と SQ-5500E 日立自動 DNA シーケンサーを用いて配列決定した。

### bisulfite 修飾と複数の遺伝子座のメチル化状態を検出

亜硫酸水素ナトリウム修飾は CpGenome DNA 修飾キット (インタージェン社、ニューヨーク、NY) を用いて行った。MINT1、MINT2、MINT31、CACNA1G、p16INK4a、p14ARF、COX2、DAPK、DCC および MGMT のメチル化の状態は、前述の手順を使用して結合された亜硫酸水素制限解析 (COBRA) によって評価され、決定された。

### MLH1 ためのメチル化分析

MLH1 のメチル化状態は、我々は他に記載された新たな方法で検出した。MLH1 プロモーターの上流に位置する CpG アイランドのメチル化がサイレンシングを引き起こすことが示されたが、年齢は関係なかった。しかし、転写開始部位に近い 3' 側の小さな領域でのメチルが常に *in vitro* および大腸癌における MLH1 発現の有無と相関していた。したがって、我々は、上流と下流領域の両方のメチル化状態を評価するために 2 セットのプライマーを使用する必要があった。我々の方法は、我々が産生した断片は、120 または 186 bp の長さであったか否かを判定することによりメチル化または非メチル化された MLH1-5' 領域の配列を区別することができた。同様のアプローチは MLH1-3' 領域の PCR 分析と、それぞれ 122bp および 232 bp の断片に区別されたメチル化及び非メチル 3' 配列の領域 (CCAAT 領域と呼ばれる) のために使用された。

### マイクロサテライト解析

各腫瘍の MSI テストは私達の前に説明した方法で 5 個のマイクロサテライトマーカーの検査 (BAT25、BAT26、D2S123、D5S346、D17S250) に基づいて決定した。2 個のマーカーで MSI を示した場合、我々は、MSI-H として腫瘍を分類した。我々がテストしたいいずれのマイクロサテライトマーカーでも MSI を表示しない腫瘍は、MSS として分類した。

### BRAFのコードン600、KRAS遺伝子コードン12及び13の検出突然変異

BRAF のコードン 600 と KRAS のコードン 12 および 13 の遺伝子における変異は、我々が以前に説明されている標準的なプロトコルを用いて決定した。我々は、製造元の指示に従って SQ-5500E 日立オートシークエンサーで DNA サンプルを配列決定し、RFLP 分析によって検出されたそれぞれの突然変異の性質を確認した。

### MLH1 の免疫組織化学的解析

MLH1 (Clone G168-728, 1mg/ml ; PharMingen, San Diego, CA)、MSH2 (Clone FE11, 0.5 mg / ml ; Oncogene Science, Cambridge, MA)、MSH6 (Clone 44, 0.5 mg / ml ; Transduction Laboratory, Lexington, KY)、および PMS2 (Clone A16-4, Pharmingen) で前もって IHC を行った。我々は核の対比染色としてヘマトキシリンクロモゲンとジアミノ - ベンジジンを使用した。陰性としてスコア化した唯一の病巣は、正常な結腸粘膜細胞、リンパ球や間質細胞など混合染色で積極的に (または周囲の)、明確な非腫瘍組織の証拠があったものであった。 MLH1、MSH2 および MSH6 の通常の染色パターンは、核が染色された。核が染色される非腫瘍細胞のなかで、腫瘍細胞は核が染色されず、異常なパターンを持っていると考えられた。

### 統計解析

すべての統計解析は JMP4.05J (SAS Institute, Inc., Cary, NC) を用いて行われた。周波数の違いは、フィッシャーの正確確率検定またはピアソンのカイ二乗検定適切で評価した。3 CRC のサブセットのメチル化遺伝子座の平均数の間の関連付けは、Wilcoxon/ Kruskal-Wallis 検定を用いて分析した。報告されたすべての P 値は両面あり、 $P < 0.05$  を統計学的に有意であると考えられた。感度と特異度の信頼区間は、小さなサンプルに適したテーブルを使用して、独立した二項確率変数とみなす対応する偽陰性および偽陽性エラー率の信頼区間に基づいていた。陽性尤度比 (PLR) は  $(1-\beta) / \alpha$  と等しくなり、負の対数尤度比 (NLR) は  $\beta / (1-\alpha)$  に等しく、 $\alpha$  と  $\beta$  は、偽陽性と偽陰性のエラー率であり、陽性尤度比 (PLR) と陰性尤度比 (NLR) の respectively. Confidence 間隔は離散化尤度を用い数値近似によって得られ、95%の保障範囲は可能なすべての組み合わせで確認した： $0 < \alpha, \beta < 0.3$ 。

### **【結果】**

#### MLH1プロモーター領域のbisulfite-PCR産物のダイレクトシークエンス — メチル化アレル特異的なダイレクトシークエンス

我々はMLH1プロモーターのnt1031-1600の領域に位置することが知られているCpGアイランドの

メチル化状態について信頼できる情報を得るために、bisulfite処理したnested PCR産物の塩基配列を決定。図1aは、我々がリンチ症候群のCRCの2例と、MSI-HのCRCの2例をパイロットダイレクトシーケンスで得られた結果である。我々が選んだプライマーで、我々がターゲットとした領域のCpGダブレットのメチル化及び非メチル化バージョンを含む配列を区別することが容易になった。MLH1のプロモーター領域におけるCpGアイランドのシトシンは2例の散发性MSI-HのCRC組織（01Tと07T）にシトシンとして残ったが、リンチ症候群患者（15Tと17T）の2つのCRC組織においてはチミンに変換されていた。

#### リンチ症候群と散发MSI-HのCRCのCRCで2つの異なるMLH1プロモーター領域のメチル化状態

我々は、リンチ症候群のCRCと散发性MSI-H CRCの5'領域および3'領域をmethylation specific single PCR (MSSP) を使用してMLH1プロモーターの両領域のメチル化状態を評価した（図1b）。この方法で、私たちはすでに3'領域のメチル化が高度MLH1のサイレンと相関していることが示された。すなわち、MLH1の発現の損失していた。散发性MSI-H CRC19例で、18例にMLH1プロモーターの5'領域にメチル化が認められ、16例に3'領域のメチル化が認められた。（図1b及び2）これとは対照的に、リンチ症候群のCRCではメチル化のケースは、ほとんど観察されなかった：3'領域のメチル化は16例の腫瘍サンプル中2例、5'領域のメチル化は3例であった。

#### 散发性および遺伝性のMMR欠陥大腸癌におけるMLH1およびIHCのメチル化状態

MMRのタンパク質上のMLH1およびIHC結果のメチル化状態は、図2に示されている。散发性MSI-H CRCの大半はMLH1の発現がなかった。しかし、リンチ症候群でしかうち16サンプル中7例でMLH1の発現の減少を示し、MLH1のgermline mutationはそのうちの2例で確認された。2つのサンプルは、MLH1の3'領域のメチル化を示した。5つのサンプルは、MSH2発現の消失を示し、それらの中で2サンプルはMSH2のgermline mutationが確認された。2つのサンプルは1 germline mutationが確認され、2つの標本がgermline mutationを検出することなくPMS2の発現の減少を示し、MSH6の発現の減少を示した。リンチ症候群の1サンプルはMLH1とPMS2両方の発現の減少を示した。

#### MMRの欠損結腸直腸癌におけるCIMP遺伝子と非CIMP遺伝子のメチル化状態

図3は散发性MSI-H CRCとリンチ症候群のCRCで MINT1、MINT2、MINT31、p16INK4aとCACNA1Gを含むCIMPマーカーのメチル化状態を示している。また、比較のためにp14ARF、DAPK、COX2、MGMTとDCCを含む非CIMP遺伝子のメチル化状態を評価した。我々はCIMP5マーカーのうち3マーカー以上でメチル化を示すCIMP (+) を定義する。すべてCIMP (+) のリンチ症候群のCRCはなかったのに対し、19例の散发性MSI-H癌中15例は、CIMP (+) であると決定された。非CIMPマーカーのうち、p14ARFはCIMPパネルと同様のメチル化パターンを示し、主に散发性MSI-HのCRCでメチル化を示した。両方のプロモーターのメチル化はまれに散发性MSI-H CRCで観察された。リンチ症候群ではDAPKまたはCOX2のいずれかのメチル化は、ほとんど観察されなかった。MGMTのメチル化はそれほど頻繁に起こっていないが、CRCの両方のタイプで同様のレベルで示したのに対し、対照的に、DCCは、頻繁に、散发性MSI-Hとリンチ症候群のCRCのいずれもメチル化されていた。

## MSI-H大腸癌患者からのリンチ症候群の分子スクリーニングの効率

MSI-H 腫瘍は MMR の欠乏によって特徴付けられ、リンチ症候群と散発性 CRC の両方が含まれ、散発性 CRC の MSI-H CRC からの効率的な除去はリンチ症候群を診断する上で効率を向上させる。MLH1 の 3' 領域 (CCAAT メチル化) のプロモーターのメチル化は、散発性 MSI-H の CRC19 例のうちと 16 例にあり、リンチ症候群 16 例のうち 2 例しか確認されなかった。このように、CCAAT 非メチル化はリンチ症候群の診断のための肯定的な結果と考えられ、このことは 88%感度と 84%の特異性に対応している。リンチ症候群を予測する上で、MSI-H CRC の中で非 CCAAT メチル化陽性尤度比 (PLR) は 5.5 で、CCAAT メチル化の負の対数尤度比 (NLR) であったことは 0.15 であった。CCAAT メチルの代わりに BRAF の変異状態を考慮すると、リンチ症候群の診断のための感度は 100%、特異度は 84%であった。したがって、散発性 MSI-H CRC を診断するために MSI-H の CRC の BRAF の変異の PLR は 6.3 で、リンチ症候群を診断するための BRAF のワイルドタイプの NLR はゼロであった。3 マーカー以上で CIMP 陽性とみなすとき、我々は 5 マーカーを使用して CIMP ステータスを評価する。リンチ症候群の診断で CIMP 陰性プラス MSI-H の感度は 88%、特異度は 79%であった。リンチ症候群の CIMP 陰性の PLR は 4.2 で、CIMP 陽性の NLR は 0.16 であった。

### 【考察】

リンチ症候群は、CRCの発生、子宮内膜癌および他の癌や腫瘍のMSIの存在によって特徴付けられる優性遺伝性症候群である。ベセスダガイドラインはリンチ症候群の疑いのある家族を集め、さらに分子解析を提案されている。(MMR遺伝子のgermline mutationを求める) 本研究では、MLH1のメチル化状態は、CIMPプロモーターおよびBRAF V600Eの変異状態がgermlineの分析の前にリンチ症候群を疑う患者の選択を改善するのに役立つだろうと評価している。

ベセスダガイドラインと改訂ベセスダ (Bethesda) ガイドラインはMSIのテストを適用することによって、リンチ症候群例発見する確率を改善するために考えられた選択基準である。ベセスダパネルと呼ばれる推奨基準パネルが提案され、広くMMRの欠乏によって引き起こされる腫瘍を解明するために使用されている。言い換えれば、ベセスダガイドラインはMSI検査を適用する前に、家族で発生している癌の特徴のパターン認識を使用して、MMR欠乏に散発的なCRCを排除することを目指している。MMRの欠乏で散発的なCRCを除去するために別のオプションは、MSIのテストで選択した後のMMR欠陥が遺伝性または散発性のCRCのどちらかで観察された'通常'の(より好ましくは'特異な')変化を定義する分子のテストを使用することである。

MLH1遺伝子のプロモーターの高メチル化は、MLH1タンパク質の発現の有無に関連すると考えられ、MSI-Hで散発的なCRCを発生させる。MLH1プロモーターのメチル化のパターンは多彩なため、MLH1のプロモーター解析の難しさは、多くの研究で実証されている。MLH1は、特に3'側に、そのプロモーターのいくつかのCpGアイランドがあり、プロモーターの上流に位置するメチル化密集エリアのほとんどは、MLH1のサイレンシングに関係のないことが示されている。逆に、小規模な3'領域のメチル化は近い転写開始部位に常にMLH1大腸細胞株における発現と外科的に除去材料の有無と相関している。Dengらは、特に転写因子CBFを結合したこの地域でCCAATボックスを同定した。CCAATボックスの2つの塩基対上流に位置するCpGアイランドのメチル化はCCAATボックスにCBFの結合を阻害する。我々は、この多彩なメチル化をプロモーター全体のbisulfiteシーケンシングに

よりメチル化パターンを確認した後、独自のメチル化特異的PCRを用いて、MLH1のサイレントと相関していることが解明された。そこで本研究では、BRAF V600Eまたは腫瘍のCIMP状況の変異状態と比較して、新たなリンチ症候群の例には、このメチル化（メチル化しているCCAAT）の有用性を評価した。

MSI-HとCCAATメチル化あるいはBRAF変異とを組み合わせるとリンチ症候群を診断する感度と特異度は、CCAATメチル化との組み合わせは感度は88%で特異性は100%、BRAF変異との組み合わせは両方の特異性は84%であった。

疾患を有する確率 $P$ は、簡単な方程式 $O = P/(1-P)$ によって疾患を有するオッズ $O$ に関係している。リンチ症候群であるMSI-Hのフラクションが $X\%$ と推定されている場合、CCAATメチル化テストの前では、MSI-Hであるリンチ症候群である確率は、 $X/100$ で、リンチ症候群であることのオッズは $X/(100-X)$ である。したがって、 $X\%$ のリンチ症候群を有する確率を持つ人で、リンチ症候群を持っていることのオッズは $X/(100-X)$ で、CCAATメチル化陽性の検査結果後、オッズは $5.5X/(100-X)$ に変化する。その結果、 $O = P/(1-P) \Rightarrow P = O/(O+1)$ 、となるので、テスト結果後の確率は $P = 5.5X/(4.5X+100)$ になる。

MLH1におけるCCAATメチル化は3例を除いて、散発的なMSI-HのCRCに固有のものとして識別された。3例すべては、BRAFの突然変異を欠いていて、CIMP表現型に属していなかった。二人はMLH1のIHC染色を欠いていた。彼らはアムステルダム基準を満たしていないが、そのうちの何例かは、がんの高齢発症があったにも関わらず、その家族の病歴、臨床基準を満たすのに十分ではなかったリンチ症候群の例に属していてもよかった。逆に、CCAATメチル化はリンチ症候群の2例で同定され、どちらのケースはMLH1遺伝子のgermline mutationが確認された。MLH1のサイレントが両方の対立遺伝子のメチル化によって、またはヘミメチル化（第二ヒット）プラスMLH1の正体不明のgermline mutation（最初のヒット）によって引き起こされるかどうかは不明である。いずれの例もKRASとBRAFの両方で、野生型であってCIMPを示さなかった。CIMPを評価する方法はMLH1のCCAAT単一のメチル化アッセイよりも複雑だが、もちろんCIMPは、MSI-H CRCの間でリンチ症候群を選択するには追加のマーカーとして適用することができる。また、リンチ症候群を診断する感度とCIMPの特異性は、BRAFの変異またはMLH1メチル化のいずれかより優れていなかった。

本研究では、MMRの欠損のCRCの一次検査は、MMRタンパク質のIHC検査によって行われていなかった。したがって、我々は、IHC染色はリンチ症候群の診断を向上させる方法であると評価することはできなかった。また、現在使用しているMSIの試験は、NCIパネルの結果に基づいた偽陽性と偽陰性例が確認されるなど、さまざまな問題を持っている。例えば、MLH6のgermline mutationによって引き起こされるリンチ症候群はまれベセスダパネルのマーカーによって、MSI-Hを示している。複数のモノヌクレオチドマーカーを使用することにより、MLH6変異体が正しく、MSI-Hと診断することができる。この研究のシリーズでは、MSI-Hの状態が古典的なベセスダパネルによって評価されたため、MSH6欠陥を有するものを含むMMRの欠陥を持ついくつかの腫瘍が見逃されているかもしれない。

リンチ症候群の患者では、MMR遺伝子のgermline mutationの最終検査は変異を示さない場合もあるので、MMRでCRCを定義するためのより正確なMSI検査を行うことができれば、MSI検査にBRAF変異およびMLH1のCCAATメチル化を含む分子検査を加えることで、リンチ症候群の可能性がある患者の絞り込みに適した検査方法、あるいは、最終検査の代用となり得る。BRAF V600Eは、MSI-HのCRC

を対象とした検査の中では最も費用対効果が良く、且つ、効率的な事前選択分子検査である可能性が示唆された。

**【結論】**

リンチ症候群の患者を調べる検査では、MSI 検査と BRAF の突然変異、あるいは MLH1 のメチル化の解析を組み合わせる方法が、感度，特異性だけでなく、費用対効果の面からも有用な方法と考えられる。