

## 論文の内容の要旨

論文題目 マイクロサテライト不安定性を示す大腸癌の  
存在部位と遺伝子異常の関連についての研究

指導教員 名川 弘一 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成16年4月 入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 田中潤一郎

大腸癌の発癌モデルとしては、多段階発癌モデルと遺伝子の *microsatellite* 部分の不安定性を特徴とする MSI (*microsatellite instability*) による発癌モデルがある。多段階発癌モデルでは、癌遺伝子および癌抑制遺伝子に遺伝子異常が蓄積していくことにより、発癌のステップが正常粘膜から腺腫そして癌へと進んでいく。このモデルでは、最初に *APC* 癌抑制遺伝子の不活性化が生じ、*K-ras* 遺伝子の活性化、*p53* 遺伝子の欠失が続いて生じる。一方、MSI による発癌モデルでは、ミスマッチ修復遺伝子 (*hMLH1*、*hMSH2*、*hPMS2*、*hMSH6* など) に異常が生じた結果、誤って複製された塩基配列を正しい塩基配列に修復できなくなり、遺伝子異常が蓄積して癌が生じる。

MSI 癌は全大腸癌の 10~20 パーセントを占めるといわれている。そして、MSI 癌は、遺伝性非ポリポーシス大腸癌 (HNPCC) と散発性 MSI 癌の 2 つのグループに分けられる。HNPCC の患者では、ミスマッチ修復遺伝子の生殖細胞変異により MSI となるのに対し、散発性大腸 MSI 癌の多くはミスマッチ修復遺伝子 *hMLH1* の異常メチル化により引き起こされると報告されている。散発性大腸 MSI 癌の特徴は広く研究されており、1) 粘液癌や低分化腺癌が多いこと、2)

microsatellite 不安定性を示さない MSS 癌の患者と比較して女性に多く、3)HNPCC 患者と比較して高齢者が多いこと、そして、4)予後が比較的よいことなどが報告されている。また、5)MSI 癌は盲腸、上行結腸、横行結腸など近位結腸に多いという特徴もある。

大腸癌の発癌過程における遺伝子異常に関しては、このように染色体の欠失や変異 MSI の重要性が報告されてきたが、もうひとつの傍遺伝子異常も発癌において重要な役割を果たしていることが近年の研究で明らかになってきた。散发性の大腸癌において MSI 頻度は 10%程度であるが、HNPCC とは異なり、その MSI を来す機序として *hMLHI* 遺伝子のプロモーター領域のメチル化が示唆されている。さらに、近年の研究において、CpG island methylator phenotype (CIMP) というメチル化の新しい概念が提唱されている。すなわち、遺伝子プロモーター領域の CpG メチル化に関しては、腫瘍内で高頻度にメチル化されているゲノム内での特定の場所 (MINT) が同定されている。そして、その MINT 部位がメチル化されている腫瘍は、CIMP と呼ばれ、多くの遺伝子プロモーター領域の CpG メチル化を伴っているものと考えられている。CIMP 陽性の大腸癌は近位大腸に多い、女性に多い、高齢者に多い、粘液癌が多いなどの MSI 癌と類似した性質をもつ。さらに、大腸 MSI 癌の大多数が CIMP を呈することも報告されている。

散发性大腸 MSI 癌は、少ないながらも遠位大腸にも発症する。しかし、遠位大腸 MSI 癌の遺伝子異常、臨床病理学的因子に関しては、現在まで十分明らかにされていない。近位大腸と遠位大腸に存在する散发性 MSI 癌の発症機序において、いずれも主に *hMLHI* 遺伝子のメチル化により MSI となるのか、また、一様に前述した特徴をもつのかについてはいまだ報告はない。そこで、本研究では遠位大腸 MSI 癌に注目し、臨床病理学的因子、*hMLHI* 遺伝子の異常メチル化と CIMP の頻度、さらに各種のミスマッチ修復タンパクの発現頻度を、近位大腸 MSI 癌と比較検討した。

本研究の結果、近位大腸 MSI 癌と比較して遠位大腸 MSI 癌においては臨床的には有意に若年発症という特徴のみがみられた。遺伝子異常としては、*hMLHI* 遺伝子のメチル化の頻度が、遠位大腸の症例で有意に低頻度であった。さらに、多くの大腸 MSI 癌に認める CIMP に関連する *p16*、*MINT1*、*MINT2*、*MINT31* のメチル化を調べたところ、遠位大腸 MSI 癌においてはいずれの部位におけるメチル化も CIMP も有意に低頻度であった。以上の結果はこれまでの大腸 MSI 癌

に関する報告と異なっており、遠位大腸 MSI 癌が従来報告されている MSI 癌とは異なる性質をもつことが考えられた。

次に、hMLH1 タンパクの発現低下の有無を免疫組織化学染色により検討した。結果、遠位大腸 MSI 癌においては発現低下しているサンプルが有意に少なかった。この結果は、メチル化に関する結果と矛盾しないものと考えられた。しかし、興味深いことに、遠位大腸 MSI 癌症例においては免疫組織化学染色で発現が低下している症例でもメチル化を認めるものが近位大腸 MSI 癌と比較して有意に少なく、遠位大腸 MSI 癌においてはメチル化以外の原因で hMLH1 タンパクの発現低下に至っている症例があることが示唆された。

遠位大腸 MSI 癌症例では hMLH1 の発現低下を認めない症例が過半数であったため、他のミスマッチ修復タンパクである hMSH2、hPMS2、hMSH6 の発現についても免疫組織化学染色で検討したところ、いずれのミスマッチ修復タンパクにも両グループ間で差異を認めなかった。hMLH1 の C 末端のドメイン (C-terminal homology domain: CTH) を介して hMLH1 と hPMS2 がヘテロダイマーを形成して hPMS2 が安定化するために、hMLH1 が発現低下していると hPMS2 も発現しないという報告と、hMLH1 または hMSH2 の発現低下により hMSH6 の C<sub>8</sub> モノヌクレオチドリピートに 2 次的に変異が起こると考えられるという報告がある。以上を考慮に入れると、遠位大腸 MSI 癌 11 例中、hMLH1 が 3 例、hMSH2 が 4 例、hMSH6 が 0 例、hPMS2 が 1 例 (重複なし) の症例において MSI となる経路に関与していると考えられる。これに対して、近位大腸 MSI 癌 24 例において関与しているミスマッチ修復タンパクは、hMLH1 のみが 16 例、hMSH2 のみが 3 例、hMLH1 と hMSH2 の両方が 2 例、hMSH6 が 0 例、hPMS2 が 2 例であった。また、いずれのミスマッチ修復タンパクにも発現低下を認めないものが遠位大腸で 3 例、近位大腸で 1 例あった。これらの症例については、hMSH3 や hPMS1 などの今回検討しなかったミスマッチ修復タンパクが MSI となる経路に関与していたと考えられた。以上の結果より、遠位大腸 MSI 癌では、近位大腸 MSI 癌に比し hMLH1 の発現低下が有意に少なく、その原因もメチル化ではない可能性があることが示唆された。

大腸 MSI 癌は抗癌剤に抵抗性であるといわれており、化学療法の検討は MSS 癌以上に重要と考えられる。術後の補助化学療法を受けている再発高リスクの病期 II と病期 III の大腸癌の患者を対象とした予後研究により、MSI 患者は MSS 患者に比較して予後が良好であったとの報告を考えると、大腸癌患者の術後補

助化学療法を選択の際に MSI の検索は有用と考える。大腸癌治療において標準的な抗癌剤である 5-FU に関して、病期 II と III の症例で予後を改善しないという報告もあるが、2'-Deoxy-5-azacytadine によって *hMLH1* 遺伝子を脱メチル化して 5-FU に対する抵抗性が克服されたとの *in vitro* の報告もある。しかし、遠位大腸 MSI 癌が *hMLH1* 遺伝子のメチル化によるものではないという本研究の結果を考慮すると、*hMLH1* 遺伝子の脱メチル化が遠位大腸 MSI 癌の治療として適切でないとも考えられる。また、CIMP 陽性腫瘍が、CIMP 陰性腫瘍と比較して 5-FU に対する感受性が有意差をもって高いことも報告されているが、これも遠位大腸 MSI 癌症例には当てはまらない可能性も考えられる。白金製剤による DNA のダメージは、ヌクレオチド除去修復や DNA 相同組み換え修復などの機構により修復されるため、これらの機構が正常に機能していない癌細胞において、白金製剤の効果はより強いと報告されている。それに対して、ミスマッチ修復の機構に異常があると白金製剤の効果は減弱するといわれている。*hMLH1* と *hMSH2* の発現が抑制されている大腸癌細胞株では、それらが発現しているものと比較して cisplatin と carboplatin に対しより抵抗性を示したとの報告もあるが、本研究で、遠位大腸 MSI 癌では近位大腸 MSI 癌よりも *hMLH1* の発現が抑制されているものが有意に少なかったことよりこれらの薬剤に対しても反応が異なる可能性が考えられる。また、大腸癌患者に対する化学療法の研究で、MSS 癌よりも MSI 癌の患者においてイリノテカンが有意に奏効したという報告、大腸癌細胞株を使った研究で、*UGT1A1* 遺伝子にメチル化がありタンパク発現が低下しているものは、脱メチル化を行うことによりタンパク発現が回復し、イリノテカンの活性代謝物である SN-38 に対する抵抗性が強くなるという報告もあるが、本研究で、遠位大腸 MSI 癌にメチル化が有意に低頻度であることを考えるとイリノテカンの奏効率も近位大腸と遠位大腸の MSI 癌では異なる可能性があると思われる。以上より、遠位と近位の大腸 MSI 癌では化学療法の検討を別個に行う必要性が示唆された。

本研究により遠位大腸と近位大腸の MSI 癌では *hMLH1* 遺伝子のメチル化の頻度、CIMP の頻度、さらには発現が抑制されているミスマッチ修復タンパクの種類が異なることが示された。よって、将来的には大腸 MSI 癌症例の存在部位を検討することにより、より効果的な術後化学療法を選択することができるようになる可能性が示唆された。