



DNAミスマッチ修復機構からみた大腸癌治療の感受性変化

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2022-12-02 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 岩泉, 守哉 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/00004224



DNA ミスマッチ修復機構からみた 大腸癌治療の感受性変化

岩泉守哉¹⁾

大腸がんの発育進展にかかわる遺伝子不安定性にはマイクロサテライト不安定性(microsatellite instability: MSI)と染色体不安定性(chromosomal instability: CIN)がある。CINの原因として様々な報告があり定説がないのに対し、MSIの原因はDNA ミスマッチ修復(MMR)機構の破綻(dMMR)であることが確認されている。今回我々はMMR機構がDNA ミスマッチのみならずDNAに取り込まれた5-fluorouracil(5-FU)も認識し細胞障害を誘導することを証明した。このことはこれまでにMMR大腸がんは5-FU療法のbenefitが得られないとの臨床的な既報の内容に矛盾しない。最近、リンチ症候群のスクリーニングのみならずコンパニオン診断薬としてもMSI検査が行われるようになり、DNA ミスマッチ修復機構のメカニズムの理解とその応用は重要になっていくであろう。

Key words : マイクロサテライト不安定性, MSI検査, DNA ミスマッチ修復機構

はじめに

大腸がんの遺伝子不安定性には染色体の数的異常あるいは構造異常を呈する染色体不安定性(chromosomal instability: CIN)と、DNA ミスマッチ修復(mismatch repair: MMR)機構の破綻により高頻度の遺伝子変異(hypermutable)を呈するマイクロサテライト不安定性(microsatellite instability: MSI)がある。近年、がんの個別化予防や個別化治療のためにMSI検査が利用されているが、この検査を適切に実施するためには関連の検査であるDNA MMRタンパクの免疫組織化学法(IHC)や次世代シーケンサー(NGS)によりMSI statusを推測する方法(MSI-NGS)などとの相違点以外に、DNA MMR機構のメカニズムや関連する薬物治療感受性変化の理解も必要であると思われる。本稿では、最初にDNA MMR機構からみた大腸がんの分子遺伝学的病態につき概説し、そのうえ

でDNA MMR機構からみた大腸がん治療の感受性変化について、筆者がこれまでにやってきた研究成果を中心に紹介する。

1. DNA ミスマッチ修復機構からみた 大腸がんの分子遺伝学的病態

大腸がんの遺伝子不安定性の大部分は染色体の数的異常あるいは構造異常を呈するCINに起因する^{1,2)}。一方、がんの発育進展の際に数々の遺伝子の病的変化が後天的に起こりうる群も一定の割合で存在し、その結果高頻度の遺伝子変化が生ずる。この群はhypermutable phenotypeとよばれるが、このようになるメカニズムは1990年代前半に入るまでは明らかではなかった。1992年にManuel Peruchoのグループが、大腸がん患者の腫瘍部と非腫瘍部を用いてarbitrarily primed PCRを施行し、PCR産物の電気泳動パターンを比較したところ、約12%の大腸がん症例において正常部よりも腫

1) 浜松医科大学医学部 臨床検査医学

瘍部のバンド長がごくわずかに短いものが目立つことに気づき、シーケンスにより短くなったものは1塩基繰り返し配列領域であることを見出した³⁾。同時期、Stephen Thibodeauのグループではヘテロ接合性の消失(loss of heterozygosity: LOH)の判定マーカーに2塩基繰り返し配列を利用しがん抑制遺伝子領域の探索をしていた。その過程で彼らは、腫瘍部のCA repeat領域で欠失バリエーションが高頻度に観察されることを報告し、このようなマイクロサテライト領域の変化が腫瘍部で起こる現象をMSIとよぶようになった⁴⁾。その後臨床的な検討の蓄積により、15%の大腸がんではマイクロサテライト領域に多数のバリエーションが認められ、右側結腸に局在し、他の大腸がんよりも予後が良いという特徴的な臨床像を呈することが判明してきたが^{5,6)}、このようなMSI陽性大腸がんが起こる分子遺伝学的なメカニズムが判明したのはその後のことである。

“Mutator Phenotype”は1970年代から1980年代に原核生物から発見され、1990年代初めにはDNA修復にかかわる遺伝子の不活化が原因であることが判明した⁷⁾。真核生物のDNA MMR機構は、細胞周期のS期におけるDNA複製エラーを同定する酵素群から成り立っている。DNA複製の際、DNAポリメラーゼはマイクロサテライト領域において適切な数の塩基を取り込めない場合があり、その際一時的にinsertion-deletion loop(IDL)が形成される。このようなIDLをDNA MMR機構が察知し修復するのであるが、DNA MMR機構が機能不全に陥るとこのIDLの修復が不可能となり、ひいてはDNA複製を繰り返すたびにフレームシフトバリエーションやナンセンスバリエーションが蓄積され、その結果多種多様な短縮型変異タンパクが産生されるようになる⁵⁾。この一連のメカニズムがDNA MMR機構の破綻の結果生じるMSI陽性の分子遺伝学的病態であり、哺乳類細胞でDNA MMR機構にかかわる分子は多数あり非常に複雑であるが、DNA MMR機構の主軸となるMutSαを形成するMSH2とMSH6、MutLαと形成するMLH1とPMS2の発現を判定する免疫組織化学(Immunohistochemistry: IHC)

や、生殖細胞系列病的バリエーション、体細胞病的バリエーションにかかわらずDNA MMR遺伝子の病的変化により引き起こされるMSI statusを判定するMSI検査は、ともにリンチ症候群の二次スクリーニングの検査として利用されている⁸⁾。

2. DNAミスマッチ修復タンパクが認識するのはDNAミスマッチ塩基対のみではない

DNA MMR機構が認識するのは単純なDNAミスマッチ塩基対やループ構造のみではない。SN1 type methylating agentsの大量曝露によりDNA内に形成されたO⁶-meG:thymineミスマッチ塩基対あるいはO⁶-meG:cytosineミスマッチ塩基対を認識し、細胞周期におけるG2期のarrestを引き起こしたり、6-Thioguanineの曝露によりDNA内に形成されたme6TG: thymineミスマッチ塩基対を認識してS期のarrestを引き起こしたりもする^{9,10)}。また、2003年のRibicらの報告を皮切りに、MSI-H/dMMR大腸がんは特に術後補助化学療法においてフッ化ピリミジン系薬物の5-fluorouracil(5-FU)療法のbenefitが得られないとの臨床的にも重要な報告が相次いで発表された¹¹⁻¹³⁾。このような臨床的知見から、SN1 type methylating agentsや6-Thioguanineと同じく、5-FUもDNAミスマッチ修復機構と何らかの形でinteractionするのではないかと想像されるに至った。

3. DNAに取り込まれた5-FUはDNAミスマッチタンパク複合体により認識される

5-FUの一部はRNAのみならずDNAに取り込まれることはこれまでの生化学的、細胞生物学的な研究で報告されている。そこで筆者を含むJohn M. Carethersのグループは、DNA内に取り込まれた5-FUがMutSαやMutSβによって認識されるか否かを検討した。MutSα複合体の精製目的にMSH2とMSH6を発現させるため、我々は昆虫細胞とバキュロウイルスを組み合わせた発現系(バキュロウイルス遺伝子発現ベクター系: BEVS)を選択した。BEVS

では大腸菌での発現系では困難な高等真核生物特有の翻訳後修飾能力を有しており、生化学アッセイや構造解析などに適した天然の生物学的活性と構造を保持した組換えタンパク質を、ポリヘドリンプロモーターの制御下で大量に生産できるからである。まずMSH2とMSH6の複合体であるMutS α に注目し、ミスマッチを認めないheteroduplex oligonucleotide、1分子G:Tミスマッチが組み込まれたheteroduplex oligonucleotide、そして5-FUが1分子組み込まれたheteroduplex oligonucleotideを作製後、これらのheteroduplex oligonucleotideとBEVSで生成したMutS α 複合体を混ぜ合わせた後、electromobility gel shift assays (EMSA)を実施した。その結果、精製したMutS α 複合体はG:Tミスマッチheteroduplex oligonucleotideと5-FUが組み込まれたheteroduplex oligonucleotideを認識することを示した。さらに経時的な結合変化を観察するためにsurface plasmon resonanceを用いて観察したところ、特にアデノシン3リン酸(ATP)混入下でこれら2種類のheteroduplex oligonucleotideは強くMutS α と結合することが判明した¹⁴⁾。同様の方法を用いてMSH2とMSH3の複合体であるMutS β 複合体を、ミスマッチを認めないheteroduplex oligonucleotide、3分子ループ構造を含むheteroduplex oligonucleotide、そして5-FUが1分子組み込まれたheteroduplex oligonucleotideとそれぞれ混ぜ合わせ、EMSAおよびsurface plasmon resonanceで観察した。MutS β 複合体もMutS α と同様、ATP混入下で分子ループ構造を含むheteroduplex oligonucleotide、および5-FUが1分子組み込まれたheteroduplex oligonucleotideとは強く結合した。興味深いことに、5-FUの認識の強さはMutS β 複合体よりもMutS α のほうが強かった¹⁵⁾。

4. フッ化ピリミジン系薬物とDNAミスマッチ修復機構(細胞生物学的な検討)

このような生化学的な検討でMutS β やMutS α がDNA中の5-FUを認識することを実感した

ため、次の疑問は細胞内でDNAに取り込まれた5FUも同様にDNA MMRタンパクにより認識され、細胞障害を引き起こすか否かであった。そこで我々は、DNA MMR機構が正常である(pMMR)大腸がん細胞とDNA MMRタンパクが欠損している(dMMR)大腸がん細胞それぞれに、DNAに取り込まれた5-FUの導入を試みた。どのようにしてDNAに取り込まれた5-FUをデザインすべきか苦慮したが、バクテリオファージを用いて精製した一本鎖プラスミドDNAに5-FUが1分子組み込まれたoligonucleotideをアニールさせたのちにポリメラーゼ反応およびライゲーション反応を行うことで5-FU入りの二本鎖プラスミドDNAを作成し、MMR statusの異なる大腸がん細胞株に導入後、細胞障害度を経時的に観察した。興味深いことに、結果はRibicらの臨床データの報告と同様、dMMR大腸がん細胞株は5-FU入りのプラスミドDNA導入後に細胞障害が促進されたがdMMR細胞株では細胞障害の促進が有意に弱かった。すなわち、導入されたプラスミドDNA中の5-FUはDNA MMRタンパクにより認識され細胞障害を起こすことが示唆された¹⁶⁾。

5. 5-FUと化学構造が類似するtrifluridine(FTD)とDNAミスマッチ修復機構

その後我々のグループは、5-FUと化学構造が類似するtrifluridine(FTD)に注目して同様の検討を試みた。その結果FTD投与に対しては、MMRが正常である(pMMR)大腸がん細胞とdMMR大腸がん細胞の間に殺細胞効果の違いが認められないが¹⁷⁾、MMR機構の破綻により認められるMBD4遺伝子のフレームシフトバリエーションを伴うと、5-FUのみならずFTDにも感受性であることを報告した^{17,18)}。さらに最近米国のグループから、高頻度MSI(MSI-H)またはdMMRの固形がん免疫チェックポイント阻害薬が有効であるというインパクトのある報告がなされている¹⁹⁾。DNA MMR機構の破綻により腫瘍はhypermutable phenotypeとなり、多種多様なneoantigenを生ずることで、

免疫チェックポイント阻害薬投与による腫瘍免疫が起きやすい環境になることが機序のひとつである。

NGSやアルゴリズムを用いた解析によるMSIの質的評価を行ったうえでの詳細な検討では、MSIの影響が強く、さらにミスセンスバリエーションよりもDNA内の塩基配列の挿入または欠失によるバリエーション(Indelバリエーション)が多い腫瘍のほうが免疫チェックポイント阻害薬の効果が強まるとのことである²⁰⁾。このように、MSI statusの把握はがんの治療選択のうえで重要であることが伺え、日常のがん診療現場でもすでにMSI検査はコンパニオン診断としても活用されている。

6. MSI検査および関連の臨床検査にかかわる診療システム構築

前述のように2018年12月、我が国において免疫チェックポイント阻害薬ペムブロリズマブが「がん化学療法後に増悪した進行・再発のMSI-Hを有する固形がん(標準的な治療が困難な場合に限る)」に追加適用となり、これまでにリンチ症候群のスクリーニング検査として利用されていたMSI検査が⁸⁾、本治療薬の適応判定に用いるコンパニオン診断薬としても保険収載された。MSI-Hを有する患者に治療の選択肢が増えるのは朗報である。その一方、Lathamらの報告によると、MSI-Hと診断されたがん患者の16.3%がリンチ症候群であることが判明しており、「がん種にかかわらずMSI-H/MMR-Dのがん患者すべてにリンチ症候群の診断のための遺伝学的検査を実施すべきであろう」とのメッセージを残している²¹⁾。やや誇張した部分があるかもしれないが、がん診療、遺伝子関連検査、遺伝医療それぞれの立場を臓器横断的・職種横断的に理解し、協調し、患者や家族を支える診療システム構築の重要性の一端が発信されたと感じている。

がん診療の視点では、MSI検査によりMSI-Hが認められた場合、ペムブロリズマブが有効である点と、併せてリンチ症候群である可能性が生じるという点を、MSI statusごとのリンチ症

候群の頻度などをもとに、適切に、わかりやすく、しかも本検査の主目的がコンパニオン診断にあることを忘れずに、検査前に説明できることが大切であると思われる。また、MSI-Hであった場合、リンチ症候群関連がん(大腸がんや子宮内膜など)以外の多種多様ながん患者でもリンチ症候群の可能性が生じるため^{21,22)}、がん診療にかかわるどの診療科からでもリンチ症候群の遺伝医療につながる・つなげる場面が生じうるという認識が必要であると考ええる。

遺伝子関連検査の視点では、リンチ症候群のスクリーニング目的でこれまでに行われているMSI検査のマイクロサテライトマーカーセット(ベセスダマーカー:1塩基繰り返し配列であるBAT25, BAT26および2塩基繰り返し配列であるD2S123, D5S346, D17S250)と、ペムブロリズマブの適応判定のためのMSI検査のマイクロサテライトマーカーセット(1塩基繰り返し配列であるBAT25, BAT26, NR21, NR24, MONO27)が異なったり、NGSによりMSI statusを推測する方法(MSI-NGS)が代替的に用いられったり、腫瘍のMMRタンパクのIHCでMMR機能欠損を評価する方法が用いられったりと、MMR機能の欠損の有無を判定する方法が複数存在するため、それぞれの特性を理解することが検査結果解釈の助けになると思われる。

遺伝医療の視点では、アムステルダム基準Ⅱや改定ベセスダ基準によるリンチ症候群の一次スクリーニング、MSI検査やMMRタンパクのIHCによる二次スクリーニング、MMR遺伝子の遺伝学的検査によるリンチ症候群の確定診断、という流れから、コンパニオン診断としてのMSI検査が広がることで、一次スクリーニングが実施されることがなくMSI-Hを有するがん患者が遺伝カウンセリングに来談する場面が増えると思われる。また、Lathamらの報告で、MSI-H/Iがんを有するリンチ症候群患者の45%でリンチ症候群の遺伝学的検査を行うための臨床判断基準を満たしていなかったことから²¹⁾、リンチ症候群に特徴的な臨床像が存在していなくてもMSI-Hを有するがん患者には、遺伝子診療部などリンチ症候群の遺伝に関してともに考える場を提供できるシステム作りが大切であろ

う。リンチ症候群関連病変が認められないからといってリンチ症候群を除外することはできないのである。

このように、個別化治療すなわちコンパニオン診断のためのMSI検査が行えるようになると、個別化予防すなわちリンチ症候群の遺伝子診療につながる・つなげる場面も出てくる。しかしながら、治療担当医やプライマリ・ケア医が遺伝カウンセリングなどの遺伝医療をどの程度認識しているのか不明である。そこで我々は日米の認定遺伝カウンセラーに半構造的インタビューを行い、プライマリ・ケアにおける遺伝医療の認識度につき日米比較を行った²³⁾。その結果、米国では日本よりもプライマリ・ケア医からの遺伝カウンセリング依頼が多く、来談者は遺伝カウンセリング来談時に遺伝性腫瘍や遺伝学的検査についてある程度理解されていることが判明した。すなわち米国ではプライマリ・ケアの場で遺伝医療が効果的に行われており、このような共同研究・診療連携は、患者、家族、そして地域に寄り添うケアにつながるのではないかと推察される。このような海外の姿勢を積極的に学んでいき、MSI検査のみならずがんの病的体細胞変化を治療薬の選定のために生かす遺伝子パネル検査を用いた「がんゲノム医療」を、地域の特性に合わせてシステム構築を行っていくことも大切であるかもしれないと感じている。

本論文内容に関連する著者の利益相反：なし

■文 献

- 1) Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B: Genetic instabilities in human cancers, *Nature*, **396**: 643-649, 1998.
- 2) Iwaizumi M, Shinmura K, Mori H, Yamada H, Suzuki M, Kitayama Y, et al.: Human Sgo1 downregulation leads to chromosomal instability in colorectal cancer, *Gut*, **58**: 249-260, 2009.
- 3) Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M: Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis, *Nature*, **363**: 558-561, 1993.
- 4) Thibodeau SN, Bren G, Schaid D: Microsatellite instability in cancer of the proximal colon, *Science*, **260**: 816-819, 1993.

- 5) Boland CR, Goel A: Microsatellite instability in colorectal cancer, *Gastroenterology*, **138**: 2073-2087, 2010.
- 6) Pritchard CC, Grady WM: Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice, *Gut*, **60**: 116-129, 2011.
- 7) Grilley M, Holmes J, Yashar B, Modrich P: Mechanisms of DNA-mismatch correction, *Mutat Res*, **236**: 253-267, 1990.
- 8) 大腸がん研究会 編：遺伝性大腸がん診療ガイドライン2016年版，金原出版，東京，2016。
- 9) Carethers JM, Hawn MT, Chauhan DP, Luce MC, Marra G, Koi M, et al.: Competency in mismatch repair prohibits clonal expansion of cancer cells treated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, *J Clin Invest*, **98**: 199-206, 1996.
- 10) Stojic L, Mojas N, Cejka P, Di-Pietro M, Ferrari S, Marra G, et al.: Mismatch repair-dependent G2 checkpoint induced by low doses of SN1 type methylating agents requires the ATR kinase, *Genes Dev*, **18**: 1331-1344, 2004.
- 11) Carethers JM, Smith EJ, Behling CA, Nguyen L, Tajima A, Doctolero RT, et al.: Use of 5-fluorouracil and survival in patients with microsatellite-unstable colorectal cancer, *Gastroenterology*, **126**: 394-401, 2004.
- 12) Jover R, Zapater P, Castells A, Llor X, Andreu M, Cubiella J, et al.: The efficacy of adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil in colorectal cancer depends on the mismatch repair status, *Eur J Cancer*, **45**: 365-373, 2009.
- 13) Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, et al.: Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer, *N Engl J Med*, **349**: 247-257, 2003.
- 14) Tajima A, Hess MT, Cabrera BL, Kolodner RD, Carethers JM: The mismatch repair complex hMutS alpha recognizes 5-fluorouracil-modified DNA: implications for chemosensitivity and resistance, *Gastroenterology*, **127**: 1678-1684, 2004.
- 15) Tajima A, Iwaizumi M, Tseng-Rogenski S, Cabrera BL, Carethers JM: Both hMutS α and hMutS β DNA mismatch repair complexes participate in 5-fluorouracil cytotoxicity, *PLoS One*, **6**: e28117, 2011.
- 16) Iwaizumi M, Tseng-Rogenski S, Carethers JM: DNA mismatch repair proficiency executing 5-fluorouracil cytotoxicity in colorectal cancer cells, *Cancer Biol Ther*, **12**: 756-764, 2011.
- 17) Suzuki S, Iwaizumi M, Yamada H, Sugiyama T, Hamaya Y, Furuta T, et al.: MBD4 frameshift mutation caused by DNA mismatch repair deficiency enhances cytotoxicity by trifluridine, an active antitumor agent of TAS-102, in colorectal cancer cells, *Oncotarget*, **9**: 11477-11488, 2017.
- 18) Suzuki S, Iwaizumi M, Tseng-Rogenski S, Hamaya Y, Miyajima H, Kanaoka S, et al.: Production of

truncated MBD4 protein by frameshift mutation in DNA mismatch repair-deficient cells enhances 5-fluorouracil sensitivity that is independent of hMLH1 status, *Cancer Biol Ther*, **17**: 760-768, 2016.

- 19) Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al.: PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency, *N Engl J Med*, **372**: 2509-2520, 2015.
- 20) Mandal R, Samstein RM, Lee KW, Havel JJ, Wang H, Krishna C, et al.: Genetic diversity of tumors with mismatch repair deficiency influences anti-PD-1 immunotherapy response, *Science*, **364**: 485-491, 2019.
- 21) Latham A, Srinivasan P, Kemel Y, Shia J, Bandlamudi C, Mandelker D, et al.: Microsatellite Instability Is Associated With the Presence of Lynch Syndrome Pan-Cancer, *J Clin Oncol*, **37**: 286-295, 2019.
- 22) Le DT, Durham JN, Smith KN, Wang H, Bartlett BR, Aulakh LK, et al.: Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade, *Science*, **357**: 409-413, 2017.
- 23) 岩泉守哉, 福江美咲, 鳴本敬一郎, フェターズ マイク, 前川真人: がんの遺伝子診療とプライマリ・ケアの連携調査-遺伝カウンセラーへのインタビューによる日米比較-, *臨床病理*, **66(suppl)**: 255, 2018.

DNA mismatch repair system and therapeutic sensitivity in colorectal cancer

Moriya Iwaizumi¹⁾

1) *Department of Laboratory Medicine,
Hamamatsu University School of Medicine*

Summary

In colorectal cancer progression, two forms of genomic instability have been identified: microsatellite instability (MSI) and chromosomal instability (CIN). About 85% of colorectal cancers display recurrent and tumor-specific chromosome alterations and the identification of specific patterns of chromosome gains and losses during tumor progression is consistent with the idea that CIN is an etiological factor in colorectal cancer. On the other hand, MSI is generally due to dysfunction of DNA mismatch repair (MMR) proteins such as MSH2 and MSH6 that form MutSα complex and MLH1 and PMS2 that form MutLα complex, and about 15% of colorectal cancers show some form of MSI. Nowadays, MSI testing is used for screening of Lynch syndrome which is one of hereditary colorectal tumor syndromes caused by germline pathogenic variant of DNA MMR genes, and companion diagnostics to decide whether a patient with solid tumor can be effective for anti PD-1 antibody. To make the most of MSI testing and associated laboratory testing, it would be important to understand clinical practice associated with DNA MMR system as well as mechanisms of MSI and DNA MMR deficiency. In this review I first explain functions of MSI, mechanisms of disease progression and sensitivity/resistance for antitumor agents when DNA MMR is disrupted.

Keywords

microsatellite instability, MSI testing,
DNA mismatch repair system