

原著

大腸がんにおける EMAST (Elevated Microsatellite Alterations at Selected Tetranucleotide repeats) の特徴と臨床的意義

竹下 美保^{1,5)}, 浦川 優作^{1,2)}, 菅原 宏美^{1,2)}, 二川 摩周¹⁾
兼田 宗英¹⁾, 富田 尚裕^{3,4)}, 田村 和朗¹⁾

要 旨

近年、大腸がんにおけるミスマッチ修復遺伝子異常に起因するマイクロサテライト不安定性 (MSI) の発がん経路が注目されている。わが国の MSI 検査は主に 1 塩基から 2 塩基の反復マーカースが使用されているが、複製エラーは 1 塩基から 2 塩基反復配列のみならず数塩基の反復配列で生じていることもあり、数塩基配列を検索する新しいバイオマーカーとして EMAST が注目されるようになってきた。本研究は、大腸がんにおける EMAST 検出の臨床的意義を明らかにすることを目的とした。

大腸がん患者 168 例から抽出した正常組織由来 DNA と腫瘍組織由来 DNA を用い、フラグメント解析を行った。EMAST 解析では、3 種類 (*MYCL1/D8S321/D20S82*) のマーカースを用い、2 種類以上で陽性を示した症例を EMAST-H (High) 大腸がん、1 種類のみ場合は EMAST-L (Low) 大腸がん、マーカース部位でピーク数の変動を示さない検体を EMAST 陰性大腸がんと判定し、EMAST status として記録した。

EMAST-H 大腸がん例は、高齢の男性に多い傾向があり、占拠部位は右側に多く ($p=7.67E-5$)、病理組織型は乳頭腺癌ないし管状腺癌が 66.7% 認められ優位である一方、低分化腺癌ないし粘液癌は EMAST-L および EMAST 陰性大腸がん群と比較して有意に高率であった ($p=6.73E-3$)。EMAST-H 大腸がん群は 12 例中 10 例 (83.3%) で MSI status を有し、両者は有意に関連することが明らかとなった ($p=8.87E-24$)。一方、*APC*, *KRAS*, および *TP53* 遺伝子異常は低率で特に *KRAS* 異常との関連は認めなかった ($p=0.012$)。EMAST-H 大腸がん 12 例中、MSI-H status を示さない 2 例は、いずれも MSI-H 大腸がんの典型的な特徴を欠いていた。

大腸がんにおける EMAST-H は、MSI-H との関連が強いが、現行の MSI 検査では特定できない大腸がんも存在する。そのため、MSI と EMAST の指標を組み合わせることが予後の評価や治療方針の決定に有用であると考えられる。

Keywords : 大腸がん, Elevated Microsatellite Alterations at Selected Tetranucleotide repeats (EMAST), マイクロサテライト不安定性 (MSI)

はじめに

- 1) 近畿大学大学院 総合理工学研究科 理学専攻
- 2) 兵庫県立がんセンター ゲノム医療・臨床試験センター／遺伝診療科
- 3) 兵庫医科大学 外科学 下部消化管外科
- 4) 市立豊中病院 がん診療部
- 5) 松江市立病院 ゲノム診療部

わが国における大腸がんの罹患数は 153,189 人 (2017 年)、死亡数は 50,658 (2018 年) と 20 年間で倍増し、がんの部位別死亡順位は男性 3 位、女性 1 位 (2018 年) を占め、その診断・治療は重要な課題である¹⁾。

大腸がんの発生進展機序として、Muto, Morson²⁾

らは正常上皮から前がん病変である腺腫を経て早期がんが発生し、さらに進行がんへと進展するという adenoma-carcinoma sequence 説を提唱した。1988 年に Vogelstein³⁾ は、がん化の段階毎に APC, KRAS, Tumor Protein 53 (TP53) などの特徴的な遺伝子異常が加わることを明らかにした。さらに、その後の研究により、ミスマッチ修復 (mismatch repair: MMR) 遺伝子異常に起因するマイクロサテライト不安定性 (microsatellite instability: MSI) として認識可能な顕著な特徴を有する大腸がんの存在が明らかになった。この種の大腸がんは遺伝性のみならず、散発性大腸がんとして認識される非遺伝性大腸がんにもある一定の頻度で認められることが示され⁴⁾、Vogelstein の提唱した大腸がんにおける多段階発がん説とは異なる発がん経路の存在が注目されるようになってきた。

MMR 機能をはじめとする DNA 修復機構によって DNA は修復されているが、MMR 機能が低下した場合、複製エラー (replication error) を蓄積することで腫瘍形成が促進される⁵⁾。1 塩基から数塩基の塩基配列を繰り返すマイクロサテライトは、DNA 複製時に反復回数エラーを生じやすい。

DNA 複製時に生じる複製エラーを *in vitro* で明示する方法として、MSI 検査がある。現在、わが国の MSI 検査は主に 1 塩基から 2 塩基反復マーカ―を使用し、抗 PD-1 抗体のコンパニオン診断として保険収載されている。しかしながら、複製エラーは 1 塩基から 2 塩基反復配列のみならず数塩基の反復配列で生じていることもある。

その中で 4 塩基の反復配列の複製エラーを検索する Elevated Microsatellite Alterations at Selected Tetranucleotide repeats (EMAST) が注目されるようになってきた^{6,7)}。

EMAST を検出する腫瘍を EMAST 腫瘍と呼び、MSI-H 腫瘍のサブタイプと考えられている。EMAST 腫瘍の特徴は未だ明確ではないものの、非遺伝性の散発性大腸がんにおいて予後や生存率の悪化と関連することが示唆されている^{8,9)}。本研究では、大腸がんにおける EMAST 検出の臨床的意義を明らかにすることを目的とした。

対象および方法

1. 対象

2009 年 8 月から 2011 年 8 月にかけて、兵庫医科大

学で大腸がんとして診断され、研究に協力することを書面で同意が得られた 193 例を本研究の対象とし、臨床病理学的背景が明確な 168 例を分析対象とした。

本研究は近畿大学大学院生命倫理委員会(承認番号: 第 15-003 番)と兵庫医科大学倫理委員会(承認番号: 倫比第 120 号)の承認を得て行った。

対象は男性が 94 例 (56.0%)、女性が 74 例 (44.0%) であった。年齢は 34 歳から 92 歳であり、平均年齢は 67.7 ± 11.1 歳であった。年代別では 40 歳未満が 3 例 (1.8%)、40 ~ 59 歳が 33 例 (19.6%)、60 ~ 79 歳が 111 例 (66.1%)、80 歳以上が 21 例 (12.5%) であり、60 歳以上が約 80% を占めていた。大腸がんの進行期分類は、0 および I 期が 38 例 (22.6%)、II 期が 56 例 (33.4%)、III 期が 56 例 (33.3%)、IV 期が 18 例 (10.7%) であった。

大腸がん占拠部位の分類として右側 (proximal) を虫垂・盲腸・上行結腸・横行結腸、左側 (distal) を下行結腸・S 状結腸・直腸とした。進行期分類はリンパ節転移の有無をもとに II 期以下と III 期以上の 2 群に、リンパ管侵襲と静脈侵襲については有と無の 2 群、組織型は乳頭腺癌および管状腺癌の群と低分化腺癌および粘液癌の群の 2 群に分類した。

2. 方法

1) EMAST 解析

各大腸がん症例の切除標本において、正常組織と腫瘍組織を対で採取し、それぞれの組織より抽出したゲノム DNA を用いて解析を行った。

EMAST マーカーは、過去の報告¹⁰⁻¹¹⁾ をもとに、頻度が高いとされる MYCL1, D8S321 および D20S82 の 3 種類の 4 塩基マーカーを使用した (表 1)。蛍光標識プライマーを作成し、polymerase chain reaction (PCR) 法により EMAST マーカー領域の増幅を行い、フラグメント解析 (Gene Mapper) により EMAST の評価を行った。

PCR 反応は、HotStarTaq Master Mix Kit (QIAGEN) を用い、GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems) にて行った。反応液の組成および反応プログラムを表 2 に示す。反応後、1% アガロースゲル電気泳動で PCR 産物の増幅を確認した。

フラグメント解析は、3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) と GeneMapper[®] Software version 4.0 (Applied Biosystems) を用い、GeneScan[™]-600LIZ[®] Size Standard (Applied Biosystems) をサイズマーカーに採

表 1. EMAS 特マーカーのプライマー概要

primer	Primary Repeat Sequence	Tm	Chromosomal Location		Primer Sequence	Product Size
MYCL1	(AAAG) ₁₄	53°C	1p32	fwd rev	5'-GGCGAGACTCCATCAAAGG-3' 5'-GAAAAGAAAAGAAAAAAG-3'	182bp
D8S321	(AAAG) ₁₂	55°C	8q24.13	fwd rev	5'-GCCTTGATCACACCACTACA-3' 5'-GTGGTCACTAAAGTTTCTGCT-3'	245bp
D20S82	(AAAG) ₁₀	55°C	20p	fwd rev	5'-GATGAAAGAATGATAGATTACAG-3' 5'-ATCTTCTCATGCCATATCTGC-3'	250bp

用した。解析前に適切な濃度に希釈した PCR 産物 1µL に Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems) 10µL と GeneScan™-600LIZ® Size Standard 0.26µL を加え、98°C で 2 分間の denature を行った後、フラグメント解析を実施した。

2) EMAS 大腸がんの評価

MYCL1, D8S321, D20S82 の EMAS 特マーカーについて、検体ごとに正常組織由来 DNA と腫瘍組織由来 DNA とのフラグメント解析で得られたピークデータを比較した。対をなす染色体は各々、父方由来のアレルと母方由来のアレルを持ち、フラグメント解析を行うと正常組織由来 DNA ではアレルの反復数が異なる場合（ヘテロ接合）は異なる 2 つのピークが出現し、同じ反復数（ホモ接合）であれば単一のピークとして観察される。正常組織由来 DNA のピークと腫瘍組織

由来 DNA から得られたピークを比較し、新規ピークが現れた場合は後成的に複製エラーが生じたと考え EMAS 陽性と評価した。

EMAS 陽性を示すマーカー数が 3 種類中 2 種類以上を示した症例を EMAS-H (High) 大腸がん、1 種類のみ場合は EMAS-L (Low) 大腸がん、EMAS 特マーカーにおいて新たなピーク数の増加を示さない症例を EMAS 陰性大腸がんと判定し、EMAS status として記録した。

3) 統計解析

統計解析には統計ソフト IBM SPSS Statistics 19 と、Microsoft Excel for mac 2016 version 10.11.6 のアドイン統計ツールを使用した。2 群間の差は、カイ二乗検定またはマンホイットニー U 検定を用いて検討し、危険率 5% 未満を有意差ありとした。

表 2. PCR 反応条件 (EMAS 特マーカー解析用)

A. 反応液組成

	MYCL1, D8S321, D20S82 (µL)
2X HotStar Taq Master Mix	5.0
20µM Primer Forward	0.4
20µM Primer Reverse	0.4
DNA	0.4
nuclease-free water	3.8
total	10.0

B. 反応プログラム

CYCLE STEP	TEMP	TIME	CYCLES
Polymerase activation	95°C	15 minutes	1
Denaturation	94°C	30 seconds	
Annealing	55°C	30 seconds	30
Extension	72°C	1 minute	
Final Extension	72°C	10minutes	1
Hold	4°C	∞	

結 果

1. EMAST status と臨床病理学的背景

MYCL1 の EMAST 陽性検出率は 15 例 (8.9%), D8S321 の EMAST 陽性検出率は 25 例 (14.9%), D20S82 の EMAST 陽性検出率は 13 例 (7.7%) であった。168 例のうち, EMAST-H 大腸がんが 12 例 (7.1%), EMAST-L 大腸がんが 28 例 (16.7%), EMAST 陰性大腸がんが 128 例 (76.2%) であった (表 3)。

EMAST-H 大腸がん群の発症年齢は平均 71.1 ± 10.4 歳であり, EMAST-L および EMAST 陰性大腸がん群より約 4 歳高齢であったが有意差は認めなかった。

性別を比較すると EMAST-H 大腸がん群は, 男性例が 66.7% (8/12) に対し, EMAST-L および EMAST 陰性大腸がん群は 55.1% (86/156) で前者に男性例が多い傾向にあったが有意差は認めなかった。

占拠部位は EMAST-H 大腸がん群は右側大腸がんが 83.3% (10/12) と EMAST-L および EMAST 陰性大腸がん群の 25.0% (39/156) に比較して有意に高率であった ($p=7.67E-5$)。

進行度分類で EMAST-H 大腸がん群の II 期以下の症

例は 75.0% (9/12) で EMAST-L および EMAST 陰性大腸がん群の 54.5% (85/156) に比較し高い傾向を示したが統計的に有意差は認めなかった。

リンパ管侵襲および静脈侵襲の検討において, EMAST-H 大腸がん群のリンパ管侵襲陽性が 75% (9/12), 静脈侵襲陽性は 83.3% (10/12) に対し, EMAST-L および EMAST 陰性大腸がん群ではリンパ管侵襲陽性が 69.2% (108/156), 静脈侵襲陽性が 79.5% (124/156) で, いずれも EMAST-H 大腸がん群が EMAST-L および EMAST 陰性大腸がん群に比較し軽度ながら高い傾向を示した。

病理組織型をみると EMAST-L および EMAST 陰性大腸がん群は低分化型腺癌あるいは粘液癌が 6.4% (10/156) と低率であるのに対し, EMAST-H 大腸がん群は 33.3% (4/12) と有意に高率であった ($p=6.73E-3$)。加えて EMAST-H 大腸がん群は乳頭腺癌ないしは管状腺癌が 66.7% (8/12) と優位であったが, その 8 例中 7 例は中分化型管状腺癌で乳頭腺癌や高分化型腺癌は低率であった。

転移巣のない II 期の症例に限ると, 静脈侵襲陽性は EMAST-L および EMAST 陰性大腸がん群で 85.7%

表 3. EMAST status と臨床病理学的背景

		EMAST status					n=168
		EMAST-H n=12 (7.1%)	EMAST-L n=28 (16.7%)	EMAST陰性 n=128 (76.2%)	EMAST-H n=12 (7.1%)	EMAST-L, 陰性 n=156 (92.9%)	p
年齢	平均±SD	71.1±10.4	68.7±10.1	67.2±11.4	71.1±10.4	67.5±11.1	0.281
性別	男性	8 (66.7%)	19 (67.9%)	67 (52.3%)	8 (66.7%)	86 (55.1%)	0.635 ¶
	女性	4 (33.3%)	9 (32.1%)	61 (47.7%)	4 (33.3%)	70 (44.9%)	
占拠部位	右側大腸	10 (83.3%)	6 (21.4%)	33 (25.8%)	10 (83.3%)	39 (25.0%)	7.67E-5*** ¶
	左側大腸	2 (16.7%)	22 (78.6%)	95 (74.2%)	2 (16.7%)	117 (75.0%)	
進行度	0-II	9 (75.0%)	15 (53.6%)	70 (54.7%)	9 (75.0%)	85 (54.5%)	0.281 ¶
	III-IV	3 (25.0%)	13 (46.4%)	58 (45.3%)	3 (25.0%)	71 (45.5%)	
リンパ管侵襲	無	3 (25.0%)	11 (39.3%)	37 (28.9%)	3 (25.0%)	48 (30.8%)	0.926 ¶
	有	9 (75.0%)	17 (60.7%)	91 (71.1%)	9 (75.0%)	108 (69.2%)	
静脈侵襲	無	2 (16.7%)	4 (14.3%)	28 (21.9%)	2 (16.7%)	32 (20.5%)	0.958 ¶
	有	10 (83.3%)	24 (85.7%)	100 (78.1%)	10 (83.3%)	124 (79.5%)	
病理組織型	乳頭腺癌および 中・高分化腺癌	8 (66.7%)	25 (89.3%)	121 (94.5%)	8 (66.7%)	146 (93.6%)	6.73E-3** ¶
	低分化腺癌および 粘液癌	4 (33.3%)	3 (10.7%)	7 (5.5%)	4 (33.3%)	10 (6.4%)	

** p < 0.01, *** p < 0.001, ¶ Yates補正

(42/49), EMAST-H 大腸がん群で 71.4 % (5/7) にみられた。一方, リンパ管侵襲陽性は, EMAST-L および EMAST 陰性大腸がん群の 69.4 % (34/49) に対し, EMAST-H 大腸がん群は 85.7 % (6/7) と高い傾向を示した。

2. EMAST status とゲノム不安定性

対象症例において過去にベセスダマーカーおよび MNR マーカーを使用し MSI 検査を測定している。また, 同様に *MLH1* methylation, *APC*, *KRAS*, *TP53* 遺伝子に関する解析結果の蓄積があり, それらの結果と本研究の EMAST status を突合して検討した (表 4)。

EMAST-H 大腸がんは MSI-H 大腸がんとして 12 例中 10 例 (83.3 %) で合致した ($p=8.87E-24$)。また, *MLH1* methylation も 50 % (6/12) で一致した。EMAST-H 大腸がん群では, *APC* 遺伝子変異が 33.3 % (4/12), *TP53*

遺伝子変異が 16.7 % (2/12) 確認された。EMAST-L および EMAST 陰性大腸がん群では, MSI-H status を有する例が 1.3 % (2/156), *MLH1* methylation は 13.5 % (21/156) と EMAST-H 大腸がん群に比較し有意に低率であった ($p=8.97E-4$)。一方, *APC* 遺伝子変異は 48.7 % (76/156), *TP53* 遺伝子変異 17.9 % (28/156) と EMAST-H 大腸がん群に比べやや高い傾向を示した。*KRAS* 遺伝子変異率は EMAST-H 大腸がん群は 0 % であったが, EMAST-L および EMAST 陰性大腸がん群は 41.0 % (64/156) と有意に高率であった ($p=0.012$)。MSI-H 大腸がんにおいては *KRAS* 変異率に統計的有意な結果は得られなかったが, EMAST-H 大腸がんとはほぼ同様の傾向を示した。

EMAST-H 大腸がんのうち, MSI-H status を示さない 2 症例が存在した。いずれも 60 ~ 70 代男性の *MLH1* methylation の無い左側大腸がんであり, リンパ管侵襲

表 4. EMAST status とゲノム不安定性

	EMAST status			EMAST status				MSI status	
	EMAST-H	EMAST-L	EMAST陰性	EMAST-H	EMAST-L, 陰性	MSI-H	MSS		
	n=12 (7.1%)	n=28 (16.7%)	n=128 (76.2%)	n=12 (7.1%)	n=156 (92.9%)	n=12 (%)	n=156 (%)		
MSI-H (12例)	10 (83.3%)	2 (7.1%)	0 (0.0%)	10 (83.3%)	2 (1.3%)	-	-		
MSS (156例)	2 (16.7%)	26 (92.9%)	128 (100%)	2 (16.7%)	154 (98.7%)	-	-		
				$p = 8.87E-24^{***} \uparrow$					
MLH1 (M) (27例)	6 (50.0%)	4 (25.0%)	17 (13.3%)	6 (50.0%)	21 (13.5%)	6 (50.0%)	21 (13.5%)		
MLH1 (uM) (141例)	6 (50.0%)	26 (92.9%)	128 (100%)	6 (50.0%)	135 (86.5%)	6 (50.0%)	135 (86.5%)		
				$p = 8.97E-4^{***} \uparrow$		$p = 3.58E-4^{**} \uparrow$			
APC (M & MCR-mut) (80例)	4 (33.3%)	13 (46.4%)	63 (49.2%)	4 (33.3%)	76 (48.7%)	3 (25.0%)	77 (49.4%)		
APC (-) (88例)	8 (66.7%)	15 (53.6%)	65 (50.8%)	8 (66.7%)	80 (51.3%)	9 (75.0%)	79 (50.6%)		
				$p = 0.466 \uparrow$		$p = 0.184 \uparrow$			
KRAS mut (codon. 12, 13) (64例)	0 (0.0%)	12 (42.9%)	52 (40.6%)	0 (0.0%)	64 (41.0%)	1 (8.3%)	63 (40.4%)		
KRAS (-) (104例)	12 (100%)	16 (57.1%)	76 (59.4%)	12 (100%)	92 (59.0%)	11 (91.7%)	93 (59.6%)		
				$p = 0.012^{*} \uparrow$		$p = 0.058 \uparrow$			
TP53 mut&LOH (exon 7, 8) (30例)	2 (16.7%)	2 (7.1%)	26 (20.3%)	2 (16.7%)	28 (17.9%)	1 (8.3%)	29 (18.6%)		
TP53 (-) (138例)	10 (83.3%)	26 (92.9%)	102 (79.7%)	10 (83.3%)	128 (82.1%)	11 (91.7%)	127 (81.4%)		
				$p = 0.780 \uparrow$		$p = 0.615 \uparrow$			

M: methylation, uM:un-methylation, mut: mutation, LOH: loss of heterozygosity, MCR: mutation cluster region, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, \uparrow Yates補正

は無いものの静脈侵襲を認め、病理組織型は分化型腺癌で MSI-H 大腸がんの典型的な特徴とは一致しなかった (表 5)。

考 察

本研究において、EMAST-H 大腸がん例は高齢の男性に多い傾向があり、占拠部位は右側に多く、組織型は EMAST-L 大腸がん群および EMAST 陰性大腸がん群に比較し低分化腺癌ないしは粘液癌が高率に認められたが分化型管状腺癌が優位であり、その中でも特に中分化型管状腺癌を多く認めた。この結果は、EMAST-H 大腸がんは男性に多く、中分化型管状腺癌が多いとする Lee らの報告¹²⁾ と一致していた。しかし一方で、EMAST-H 大腸がんは左側に多く、進行度が高い傾向にあるとの報告もあり、今後さらなる検討を要する。

EMAST-H 大腸がん群では進行度Ⅱ期の症例に限って検討すると、明らかな転移巣が無く進行度が低いものの、予後因子に当たるリンパ管侵襲が7例中6例 (85.7%) にみられた。一方、進行度Ⅱ期の EMAST 陰性大腸がんにおいてリンパ管侵襲陽性が49例中34例 (69.4%) であったことは術後サーベイランスや予後予

測の観点から重要な結果を示したものと考えられる。その根拠として、ESMO (European Society for Medical Oncology) 大腸がんガイドライン¹³⁾ ではリンパ管侵襲は、多臓器浸潤、若年発症などとともに再発危険因子であり、術後化学療法を考慮すべき根拠の一つとなっている。EMAST-H 大腸がん群は明らかな転移巣がなくとも、高いリンパ管侵襲の頻度を示したことから、EMAST status は大腸がんの予後予測因子として活用できる意義あるバイオマーカーの候補と考えられた。

大腸がんにおけるゲノム不安定性にはマイクロサテライト不安定性以外に染色体不安定性 (chromosomal instability : CIN) が大きく関わっている¹⁴⁾。APC 遺伝子は家族性腺腫性ポリポーシスの原因遺伝子であり、散発性大腸がんにおいても70~80%の高頻度に変異が検出される。また TP53 遺伝子は、第17番染色体短腕上 (17p13.1) に存在するがん抑制遺伝子であり、TP53 遺伝子の異常はヒトのあらゆる組織由来 (上皮系、間葉系、造血系、中枢神経系) の腫瘍に認められている。その頻度は腫瘍の種類により差があるが、ヒトがん組織の約50%において検出されるとの報告が一般的である¹⁵⁾。EMAST-H 大腸がんにおいても CIN との関係性が見いだされる可能性があり、過去に解析

表 5. EMAST-H 大腸がんの背景

No	EMAST -H	MSI -H	MLH1 (M)	APC mut	KRAS mut	TP53 mut	Age	Sex	Location	pT	pN	Stage	リンパ管 侵襲	静脈 侵襲	病理 組織型
1	●	●					51	M	上行結腸	3	0	IIA	無	軽度	低分化
2	●	●		●			65	F	上行結腸	3	0	IIA	軽度	無	粘液性
3	●	●	●				76	M	横行結腸	3	0	IIA	軽度	軽度	高分化
4	●	●	●				62	F	盲腸	2	0	I	中等度	軽度	低分化
5	●	●	●			●	72	M	横行結腸	4a	2a	IIIC	中等度	中等度	中分化
6	●						70	M	S状結腸	2	0	I	無	軽度	中分化
7	●	●	●				81	M	上行結腸	4a	2a	IV	高度	高度	低分化
8	●			●		●	60	M	直腸	3	1a	IIIB	無	中等度	中分化
9	●	●					68	M	横行結腸	3	0	IIA	軽度	無	中分化
10	●	●	●	●			85	M	上行結腸	3	0	IIA	中等度	軽度	中分化
11	●	●	●				81	F	上行結腸	3	0	IIA	軽度	中等度	中分化
12	●	●		●			82	F	上行結腸	3	0	IIA	軽度	中等度	中分化

PT (原発腫瘍壁進達度) : Tis 上皮内 1 粘膜下層 2 固有筋層 3 漿膜下層以上 4a 臓側腹膜貫通 4b 隣接臓器に浸潤
 PN (所属リンパ節) : 0 転移なし 1a 1個に転移 1b 2-3個に転移 1c 所属リンパ節転移はないが、漿膜下層、腸間膜、腹膜に覆われていない周辺組織に腫瘍を認める 2a 4-6個に転移 2b 7個以上に転移

が終了している *APC*, *KRAS*, *TP53* 遺伝子変異と突合し関連性を検討した。著者らの成績では、EMAST-H 大腸がんは EMAST-L および EAMST 陰性大腸がんと比較し、*APC*, *KRAS*, および *TP53* 遺伝子異常は低率であり、特に *KRAS* 遺伝子変異は皆無であった。一方で MSI-H status と *MLH1* methylation との関連性が顕著であった。以上より、EMAST-H 大腸がんは大腸がんにおける多段階発がん説あるいは CIN とは異なる機序により発症し、MSI-H 大腸がんに類似することが示された。

EMAST-H 大腸がん 12 例中 MSI-H status を有する症例は 10 例 (83.3%) 存在し、EMAST status と MSI status は有意に関連性があることが明らかになり、右側結腸や進行度が低い点は、他の報告^{11,12)}と同様であった。一方、EMAST-H 大腸がん例のうち MSS を示した 2 症例は、いずれも MSI-H 大腸がんの典型的な特徴を欠いていた。Bikash らは、直腸における EMAST-H 大腸がんは MSI-H 大腸がんとは異なり、5 年生存率の低下、局所再発増加および肝転移をもたらすと報告している¹⁶⁾。したがって、EMAST-H 大腸がんは複製エラーに起因した腫瘍であっても MSI-H 大腸がんとは異なる独自の生物学的特徴が存在する可能性が考えられ、その解明にはさらに詳細な検討が必要である。

大腸がん組織における抗 MSH3 抗体の免疫組織化学を用いた解析で、MMR タンパクである MSH3 欠損が、1 塩基から 2 塩基反復配列を示す MSI マーカーに比べ、明らかに EMAST マーカーにおいて不安定性を示すとの報告がされている^{6,8,17)}。わが国の MSI 検査は主に 1 塩基から 2 塩基反復配列マーカーを使用しているが、ゲノム上に存在する反復配列は数塩基の反復配列も多く存在し、その複製エラーも起こる可能性が十分にある。本研究において、1 塩基から 2 塩基反復配列マーカーでは検出しえない 2 例が確認されたことはその一端を示したものと推測される。

以上のことから、抗 PD-1 抗体の奏功可能例を確実に特定する手段として、現行のベセスダマーカーおよび MNR マーカーに EMAST を含めた複数のマイクロサテライトマーカーを組み合わせ、複製エラーを総合的に評価するシステム構築が必要であると考えられる。

EMAST 腫瘍のためのマーカーパネルは未だ確立されていないが、5 種類前後の有用な EMAST マーカーによる EMAST status を評価する研究が進んでおり、近い将来適切な医療介入に導く新しいコンパニオン診断

の開発につながるものと期待する。

結 語

大腸がんにおける EMAST-H は、右側に多く中分化型管状腺癌が多い特徴を有していた。また EMAST-H 大腸がんは MSI-H 大腸がんとの関連が強いが、現行の MSI 検査のみでは特定できない MMR 機能の低下した大腸がんが存在する。その検出のため、MSI と EMAST の指標を組み合わせることが予後の評価や治療方針の決定に有用であると考えられる。

謝 辞

本論文は筆者が近畿大学大学院総合理工学研究科理学専攻遺伝カウンセラー養成課程に在籍中の研究成果をまとめたものです。本論文へのご指導とご助言を戴きました近畿大学大学院総合理工学研究科 西郷和真准教授、巽純子 准教授 に深謝いたします。遺伝カウンセラー養成課程でのご指導、サポートを賜りました南武志教授、川下理日人講師に深く感謝の意を表します。本研究で使用した検体、解析したデータは兵庫医科大学下部消化管外科の先生方ならびに近畿大学理工学部生命科学科遺伝医学研究室の諸先輩方が長年蓄積してこられたものです。そのご努力に敬意を表しますとともに、本研究がそのデータ蓄積の一端に加えていただけたことに感謝いたします。

文 献

- 1) 国立がん研究センター がん登録・統計 (更新・確認日:2020.7.6), at https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/summary.html
- 2) Muto T, Bussey HJ, Morson BC: The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 1975; 36: 2251-2270.
- 3) Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al.: Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988; 319: 525-532.
- 4) Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, Tanaka K, et al.: Molecular nature of colon tumors in hereditary nonpolyposis colon cancer, familial polyposis, and sporadic colon cancer. *Gastroenterology* 1996; 111: 307-317.
- 5) Martin SA, Lord CJ, Ashworth A: Therapeutic targeting of the DNA mismatch repair pathway. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 5107-5113.

- 6) Tamura K, Kaneda M, Futagawa M, et al.: Genetic and genomic basis of the mismatch repair system involved in Lynch syndrome. *Int J Clin Oncol* 2019; 24: 999-1011.
- 7) Carethers JM: Microsatellite instability pathway and EMAST in colorectal cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep* 2017; 13: 73-80.
- 8) Carethers JM, Koi M, Tseng-Rogenski SS: EMAST is a form of microsatellite instability that is initiated by inflammation and modulates colorectal cancer progression. *Genes (Basel)* 2015; 6: 185-205.
- 9) Tseng-Rogenski SS, Hamaya Y, Choi DY, et al.: Interleukin 6 alters localization of hMSH3, leading to DNA mismatch repair defects in colorectal cancer cells. *Gastroenterology* 2015; 148: 579-589.
- 10) Xu L, Chow J, Bonacum J, et al.: Microsatellite instability at AAAG repeat sequences in respiratory tract cancers. *Int J Cancer* 2001; 91: 200-204.
- 11) Venderbosch S, van Lent-van Vliet S, de Haan AF, et al.: EMAST is associated with a poor prognosis in microsatellite instable metastatic colorectal cancer. *PLoS One* 2015; 10: e0124538.
- 12) Lee SY, Chung H, Devaraj B, et al.: Microsatellite alterations at selected tetranucleotide repeats are associated with morphologies of colorectal neoplasias. *Gastroenterology* 2010; 139: 1519-1525.
- 13) Schmoll HJ, Van Cutsem E, Stein A, et al.: ESMO consensus guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. a personalized approach to clinical decision making. *Ann Oncol* 2012; 23: 2479-2516.
- 14) Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B: Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 1997; 386: 623-627.
- 15) 石岡千加史 : p53 とヒトのがん. *加齢医研誌* 2004; 56: 1-33.
- 16) Devaraj B, Lee A, Cabrera BL, et al.: Relationship of EMAST and microsatellite instability among patients with rectal cancer. *J Gastrointest Surg* 2010; 14: 1521-1528.
- 17) Haugen AC, Goel A, Yamada K, et al.: Genetic instability caused by loss of MutS homologue 3 in human colorectal cancer. *Cancer Res* 2008; 68: 8465-8472.