

本邦尿路上皮癌のマイクロサテライト不安定性調査と リンチ症候群スクリーニングの試み

慶應義塾大学医学部泌尿器科学教室

助教 田中 伸之

(共同研究者)

慶應義塾大学医学部泌尿器科学教室 教授 大家 基嗣

慶應義塾大学医学部泌尿器科学教室 准教授 水野 隆一

慶應義塾大学病院病理診断部 講師 三上 修治

はじめに

DNA繰り返し配列であるマイクロサテライト領域では、DNA複製時のミスマッチ修復機構の異常により、塩基配列に変化が生じやすい。この異常をマイクロサテライト不安定性 (microsatellite instability: MSI) と呼ぶ。癌臨床の現場では高頻度マイクロサテライト不安定性 (MSI-High) を有する固形癌は、がん免疫治療で最新の抗PD-1療法 (pembrolizumab) の、臓器横断的な適応を世界で初めて得ている。

MSIはDNAミスマッチ修復 (mismatch repair: MMR) 遺伝子の生殖細胞変異が原因であるリンチ症候群とも関連深く、MSI-Highを有する固形癌患者の一部は、リンチ症候群であることが報告されている。尿路上皮癌、特に上部尿路上皮癌 (いわゆる腎盂尿管癌) ではリンチ症候群の頻度は、海外で1-5%と予想されている。尿路上皮癌は米国NCIが示す世界的な common cancerの1つであり、高齢者に多い。難治性な尿路上皮癌では既に、MSI-Highの有無に関わらず抗PD-1療法が保険承認されているが、MSI-Highが治療効果を予測するバイオマーカーであることが期待できる。では本邦の尿路上皮癌患者 (膀胱・上部尿路上皮癌) には、MSI-Highが一体どの程度認められるか? また、MSI-Highを有する尿路上皮癌患者はどのような臨床的特徴を有し、遺伝的なリンチ症候群はどの程度含まれるのか?

当教室は全ての泌尿器がんにおいて、過去30年に渡るデータ蓄積を行っており、その集約データ量は国内最高峰である。特に尿路上皮癌は世界的規模であり、これまでも国際間多施設共同研究 (Upper Tract Urothelial Carcinoma Collaborative Group) で報告を重ねてきた。一方、国内では当教室関連施設間での尿路上皮癌データの集約化を通して、国内間多施設共同データベース作成・解析に邁進している。本研究で我々は、当教室の世界的な尿路上皮癌データベースを基に、前述のクリニカルクエスチョンに答え得るエビデンスの構築を目的とし、以下の3つを計画した。

1. 癌組織マイクロアレイ作成とハイスループットな高頻度マイクロサテライト不安定性 (MSI-High) ユニバーサル・スクリーニングの実施

2. MSI-Highの臨床的意義と泌尿器がんサーベイランスの最適化

3. リンチ症候群関連泌尿器がんの診断と円滑な遺伝カウンセリング・ワークフローの確立

結 果

1. 癌組織マイクロアレイ作成とハイスループットな高頻度マイクロサテライト不安定性 (MSI-High) ユニバーサル・スクリーニングの実施

ユニバーサル・スクリーニングとは、従来のリンチ症候群診断基準（アムステルダム基準或はベセスダ基準）にとらわれず症例を抽出し、MMRタンパクの免疫組織染色やPCR法によるMSI解析でMSI-High同定を試みる研究手法である。欧米では、ユニバーサル・スクリーニングが費用対効果や感度の高い方法として大腸癌や子宮内膜癌のリンチ症候群診断（MSI-High同定）に推奨されている。本計画では当教室が有する世界的規模な尿路上皮癌データベースを基に、MMRタンパク（MLH1、MSH2、MSH6、PMS2）発現をハイスループットに評価し得る研究基盤として、まず尿路上皮癌組織マイクロアレイ作成を第一に行った（倫理委員会承認番号：20180355）。本組織マイクロアレイは、腫瘍部と共に比較対照となる正常組織部をペアで含み、合計で膀胱癌187症例が作成された。

現在は、①尿路上皮癌でも特にリンチ症候群との関連が示唆される、上部尿路上皮癌で組織マイクロアレイ作成を進めており、今後は②全ての組織マイクロアレイが作成された段階で、MMRタンパク発現解析を実装予定である。正常組織部のMMRタンパク発現は、germlineすなわちリンチ症候群の有無を示唆し、円滑な計画3の遂行に関与すると考える。さらに本計画では、先行研究で作成を行った腎細胞癌組織マイクロアレイ（ $n=236$ ）のMMRタンパク発現解析も予定しており（倫理委員会承認番号：20180098）、本邦腎細胞癌におけるMSI-Highの詳細が同時に明らかになると考える。

2. MSI-Highの臨床的意義と泌尿器がんサーベイランスの最適化

本調査研究の目的で示す通り、①本邦尿路上皮癌（または腎細胞癌）ではMSI-Highが一体どの程度認められるか？ ②MSI-Highを有する本邦尿路上皮癌（または腎細胞癌）患者はどのような臨床的特徴を有し、遺伝的なリンチ症候群はどの程度含まれるのか？ これら疑問に対する回答は、個別化医療の実現に貢献すると考える。計画1で得られたMSI-Highデータは、生存・各種臨床パラメータとの関係を統計学的に順次検討を予定しているが、我々はさらに、慶應義塾大学病院が独自で開発を進める悪性固形腫瘍160遺伝子に着目した次世代シーケンズプラットフォーム「次世代統合的病理・遺伝子診断法PleSSision-Rapid」（表1）を利用して、遺伝学的に本邦尿路上皮癌（または腎細胞癌）のMSI-Highや随伴する遺伝子変異を明らかにしたい。同プラットフォームは、大幅なコスト削減が可能で、バイオインフォマティクス解析までの自動化は、臨床医への橋渡しが可能である。現在（2020年

表1 PleSSision-Rapidに含まれる160遺伝子 (赤字はMMRタンパク遺伝子)

ABL1	AKT1	AKT2	ALK	AMER1	APC	AR	ARID1A	ARID2	ASXL1
ATM	ATRX	BAP1	BCL6	BCOR	BRAF	BRCA1	BRCA2	BRIP1	BTK
BUB1B	CARD11	CBL	CBLB	CD79A	CD79B	CDC73	CDH1	CDK12	CDK4
CDKN2A	CHEK2	CIC	CREBBP	CRLF2	CSF1R	CTNNB1	CYLD	DAXX	DDB2
DDR2	DICER1	DNMT3A	ECT2L	EGFR	EP300	EPCAM	ERBB2	ERBB3	ERBB4
ERCC5	ESR1	EZH2	FAM46C	FANCA	FANCD2	FANCE	FAS	FBXO11	FBXW7
FGFR2	FGFR3	FH	FLCN	FLT3	FUBP1	GATA1	GATA2	GATA3	GNA11
GNAQ	GNAS	GPC3	GRIN2A	H3F3A	HIST1H3B	HNF1A	HRAS	HSPH1	IDH1
IDH2	IKZF1	IL7R	ILOST	JAK1	JAK2	JAK3	KDM6A	KDR	KIT
KLF6	KMT2D	KRAS	MAP2K1	MAP2K2	MAP2K4	MAP3K1	MAP4K3	MDM2	MED12
MEN1	MET	MLH1	MSH2	MSH6	MTOR	MUTYH	MYC	MYD88	NF1
NF2	NFE2L2	NFKBIA	NOTCH1	NOTCH2	NPM1	NRAS	PALB2	PAX5	PBRM1
PDGFRA	PHF6	PIK3CA	PIK3R1	PMS2	PPP2R1A	PRDM1	PRKAR1A	PTCH1	PTEN
PTPN11	RAC1	RB1	RET	ROS1	SDHB	SETD2	SF3B1	SLC7A8	SMAD4
SMARCA4	SMARCB1	SMO	SPOP	SRC	STK11	SUFU	TERT	TNFAIP3	TNFRSF14
TP53	TSC1	TSC2	TSHR	U2AF1	VHL	WT1	XPC	ZNF2	ZRSR2

10月)は遺伝子解析に同意頂いた120例のシーケンスと症例の集積を順次進めている(倫理委員会承認番号:20190006)。

3. リンチ症候群関連泌尿器がんの診断と円滑な遺伝カウンセリング・ワークフローの確立

リンチ症候群は常染色体優性遺伝形式を示す。MSI-Highを有する固形癌患者の一部にはリンチ症候群が予想され、リンチ症候群関連腫瘍として大腸癌・子宮内膜癌・胃癌・卵巣癌等の発症が危惧される。MSI-High症例は、当該施設のがんゲノム医療における二次的所見の対応に準拠する必要がある。このような場合に備えて、本研究では外来主治医による臨床遺伝センター外来受診～遺伝カウンセリングを勧めるワークフロー最適化を、現在検討中である。

考 察

MSI-Highの尿路上皮癌では、遺伝的背景を有しない尿路上皮癌と同様の手術範囲で良いのか? それとも多発性を考慮し広範囲に切除すべきか? リンチ症候群の大腸癌においては、将来的な大腸癌リスクを考慮し広範囲な大腸切除の推奨が議論されている。尿路上皮癌においては、術後フォローアップも含めた、これらサーベイランス最適化のコンセンサスは皆無である。

本邦からの最新報告では、上部尿路上皮癌におけるMSI-Highの検討が成されているが、依然としてエビデンスは不十分と考える^(1,2)。本研究は初めて、膀胱癌におけるMSI-High詳細にメスを入れると共に、独自のシーケンスプラットフォームで他の遺伝子変異との関係を網羅的解析する。複雑なバイオインフォマティクス解析が必要な次世代シーケンスも、

臨床医への橋渡しが前提のPleSSision-Rapid⁽³⁾であれば、ビッグデータもハイスループット処理が可能である。遺伝子解析は既に120例の同意を得ており、その内訳は膀胱癌:61例、上部尿路上皮癌:16例、腎細胞癌:43例に及ぶ。今後我々は、400例の遺伝子解析を到達目標とし、大規模な遺伝子解析データベースをバックグラウンドとした本邦マイクロサテライト不安定調査を行いたいと考える。また、組織マイクロアレイを用いた免疫染色結果は、遺伝子変異解析と比較検討することで、その妥当性を検証し、最終的な臨床現場での応用に繋げたい。

要 約

本研究のクリニカルクエスチョンは、①本邦の尿路上皮癌患者（膀胱・上部尿路上皮癌）には、MSI-Highが一体どの程度認められるか？また、②MSI-Highを有する尿路上皮癌患者はどのような臨床的特徴を有し、遺伝的なリンチ症候群はどの程度含まれるのか？である。大規模な組織マイクロアレイ解析は、ユニバーサル・スクリーニング有用性のエビデンス構築に寄与し、症例毎に対応する正常組織部と比較することで、リンチ症候群の判定に腫瘍部・非腫瘍部の包括的な解析を必要とするかどうか分かる。次世代シーケンスを用いた網羅的な遺伝子変異解析では、MSI-Highと併存する遺伝子変異情報が判明し、将来的により個別化されたサーベイランスが可能になると考える。

文 献

1. Ito T, Kono K, Eguchi H, et al. Prevalence of Lynch syndrome among patients with upper urinary tract carcinoma in a Japanese hospital-based population. *Jpn J Clin Oncol.* 50: 80-88. (2020)
2. Urakami S, Inoshita N, Oka S, et al. Clinicopathological characteristics of patients with upper urinary tract urothelial cancer with loss of immunohistochemical expression of the DNA mismatch repair proteins in universal screening. *Int J Urol.* 25: 151-156. (2018)
3. Watanabe K, Kosaka T, Aimonio E, et al. Japanese Case of Enzalutamide-Resistant Prostate Cancer Harboring a SPOP Mutation With Scattered Allelic Imbalance: Response to Platinum-Based Therapy. *Clin Genitourin Cancer.* 17: e897-e902. (2019)