

学位論文題名

非小細胞肺癌における MLH1/MSH2 発現と
予後因子としての検討

学位論文内容の要旨

背景と目的

human Mut-L-Homologen-1 (hMLH1) と human Mut-S-Homologen-2 (hMSH2)は, DNA mismatch repair (MMR) 遺伝子群に属する遺伝子である. この遺伝子群は, 主に正常の DNA 複製過程で生ずる塩基-塩基ミスマッチもしくは1から4塩基ループの挿入・欠落ミス修復する. MMR 遺伝子群の正常な機能が失われる事は, 遺伝子変異による発癌遺伝子の活性化や腫瘍抑制因子の不活化により発癌の引き金に成り得ると考えられている. 非小細胞肺癌における免疫組織化学的手法を用いた MMR 遺伝子発現検討の報告はほとんどない.

対象と方法

遠隔転移のない, 術前未治療の非小細胞肺癌症例 107 例を対象とした. 症例の内訳は, 男性 70 例, 女性 37 例であり, 平均年齢 63.3 歳 (39 歳から 80 歳まで) であった. 平均観察期間は, 49.3 ヶ月 (3.1 ヶ月から 89.9 ヶ月まで) であった. 免疫組織化学染色には, streptavidin-biotin-peroxidase 法を用いた. hMLH1 はリン酸緩衝生理食塩水にて 1:500 に希釈したマウス抗 hMLH1 抗体, hMSH2 に関しては抗 hMSH2 抗体を同様に 1:50 に希釈したものを一次抗体として用いた. 半定量的な免疫染色の評価は以下の如く, Friedrich らの報告に従った. 各標本は, 染色強度に因って4段階に分類した. つまり, 0点 (染色されず), 1点 (弱い染色であるが判定可能), 2点 (明瞭に染色されている), 3点 (強く染色されている) とスコア化した. 各標本の染色頻度 (腫瘍細胞に占める免疫染色反応陽性の細胞の割合) を4段階に分類し, 1点 (0-10% の細胞が免疫染色反応陽性), 2点 (11-50% の細胞が免疫染色反応陽性), 3点 (51-80% の細胞が免疫染色反応陽性), 4点 (81-100% の細胞が免疫染色反応陽性) とスコア化した. そして, 各標本の染色強度スコアと染色頻度スコアの積を MMR スコアとし各標本の染色状態を評価した. MMR スコア 3点を閾値とし, 3点以下を染色陰性 (-), 3点より上を染色陽性 (+) として評価した. 統計解析は, chi-square test ならびに Fisher's exact test を用いた. 生存率は Kaplan-Meier 法を用いて算出し, Log rank 法にて比較検討した.

結果

方法で述べた判定基準に従って検討した結果、28例(26.2%)が hMLH1 染色陽性 (hMLH1(+)) , 79例(73.8%)が hMLH1 染色陰性 (hMLH1(-)) と分類された。一方、hMSH2 は hMSH2 染色陽性 (hMSH2(+)) が 36例(33.6%) , hMSH2 染色陰性 (hMSH2(-)) が 71例(66.4%) となった。5年生存率は hMLH1/hMSH2(+/+)群で 50.0% , hMLH1/hMSH2(+/-)群で 35.7% , hMLH1/hMSH2(-/+)群で 40.9% , hMLH1/hMSH2(-/-)群で 64.9%であり、これらの間に統計学的有意差 ($P=0.0454$) を認めた。そこで4つの群をあらゆる組み合わせの2群に分けて解析した結果、hMLH1/hMSH2(-/-)群が他の3つの群に比べ有意に予後良好であった ($P=0.0097$)。腺癌症例のみ(57例)もしくは、扁平上皮癌症例のみ(40例)に限って見た場合、それぞれにおいて同様の傾向を示したが、統計学的有意差は認めなかった ($P=0.1153, 0.0896$)。Cox 比例ハザードモデルを用いた単変量解析では、hMLH1/hMSH2 ($P=0.0114$) と共に、年齢 ($P=0.0172$) , 性別 ($P=0.0020$) , T 因子 ($P<0.0001$) , N 因子 ($P<0.0001$) が有意な予後因子であった。単変量解析において有意差を認めた5つの因子を多変量解析にて評価した結果、T 因子 ($P<0.0001$) と N 因子 ($P=0.0015$) が独立予後因子であった。臨床病理学的因子との相関では、両遺伝子共発現陰性群 (hMLH1/hMSH2 (-/-)) と他の3群との群分けにおいて、性別 ($P=0.0312$) , N 因子 ($P=0.0375$) , 臨床病理学的病期 ($P=0.0316$) との間に有意な相関を認めた。

考察

累積生存率の検討では、hMLH1/hMSH2 (-/-) 群がその他の群に比べて有意に予後良好 ($P=0.0097$) であった。大腸癌に関する報告では、microsatellite-instability (MSI) と免疫組織化学的染色によって評価された hMLH1, hMSH2 蛋白の発現低下との高い相関が指摘されていると共に high-frequency microsatellite instability (MSI-H) と累積生存率の改善との相関も報告されている。一方で、非小細胞肺癌では elevated microsatellite alterations at selected tetranucleotide repeat (EMAST) が観察されると報告されている。MSI 評価の国際基準では1~3塩基繰り返し配列の評価となるため EMAST 陽性の腫瘍では、microsatellite stable (MSS) と判定される可能性が高い。つまり MSI-H の大腸癌とは異なった遺伝子異常が非小細胞肺癌では予後改善に寄与している可能性が示唆される。非小細胞肺癌に於いては、腫瘍形成に於ける非常に早期の段階での promoter methylation による hMLH1/hMSH2 発現低下が報告されている。一つの可能性としては、早期の段階での異常な hypermethylation による hMLH1/hMSH2 発現低下が何らかの機序で腫瘍進展、リンパ節転移を阻害していたものが hypermethylation が解除された結果、腫瘍進展、リンパ節転移が進行し予後の悪化を招く事が考え得る。また、hMLH1/hMSH2 (-/-)群はステージ I の症例が多くをしめた ($P=0.0114$)。そのことより、非小細胞肺癌の発癌、進展過程に於ける遺伝子異常の副次的結果として hMLH1/hMSH2 遺伝子に異常が生じ、進行癌では hMLH1/hMSH2 遺伝子が過剰発現している可能性も考えられる。

まとめ

非小細胞肺癌に於いて hMLH1 と hMSH2 の果たす役割は不明な点が多いが、予後予測因子となりうる可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 近 藤 哲

副 査 教 授 秋 田 弘 俊

副 査 教 授 今 村 雅 寛

学 位 論 文 題 名

非小細胞肺癌における MLH1/MSH2 発現と 予後因子としての検討

human Mut-L-Homologen-1 (MLH1) と human Mut-S-Homologen-2 (MSH2)は、DNA mismatch repair (MMR) 遺伝子群に属する遺伝子である。この遺伝子群は、主に正常の DNA 複製過程で生ずる塩基-塩基ミスマッチもしくは1から4塩基ループの挿入・欠落ミスを修復する。MMR 遺伝子群の正常な機能が失われる事は、遺伝子変異による発癌遺伝子の活性化や腫瘍抑制因子の不活化により発癌の引き金に成り得ると考えられている。今回、非小細胞肺癌に於ける MLH1 と MSH2 の発現と長期予後及び臨床病理学的因子との相関に関し免疫組織学的手法を用いて検討した。

遠隔転移のない、術前未治療の非小細胞肺癌切除症例 107 例を対象とした。症例の内訳は、男性 70 例、女性 37 例であり、平均年齢 63.3 歳 (39 歳から 80 歳まで) であった。術後平均観察期間は、49.3 ヶ月 (3.1 ヶ月から 89.9 ヶ月まで) であった。免疫組織化学染色は、モノクローナル抗体を用いた streptavidin-biotin-peroxidase 法によった。半定量的な免疫反応の評価は Friedrich らの報告に従った。各標本を染色強度によって 0-3 点の 4 段階に分類し、各標本の染色頻度 (腫瘍細胞に占める免疫染色反応陽性の細胞の割合) も 1-4 点の 4 段階に分類し、スコア化した。そして各標本の染色強度スコアと染色頻度スコアの積を MMR スコアとし各標本の染色状態を評価した。MMR スコア 3 点以下を染色陰性、3 点より上を染色陽性として評価した。統計解析は、chi-square test ならびに Fisher's exact test を用いた。生存率は Kaplan-Meier 法を用いて算出し、Log rank 法にて比較検討した。

術後 5 年生存率は MLH1/MSH2(+ / +) 群で 50.0%、MLH1/MSH2(+ / -) 群で 35.7%、MLH1/MSH2(- / +) 群で 40.9%、MLH1/MSH2(- / -) 群で 64.9% であり、これらの中に有意差 ($P=0.0454$) を認めた。そこで 4 つの群をあらゆる組み合わせの 2 群に分けて解析した結果、MLH1/MSH2(- / -) 群がその他の群に比べ有意に予後良好であった ($P=0.0097$)。Cox 比例ハザードモデルを用いた単変量解析では、MLH1/MSH2 (- / -) の因子 ($P=0.0114$) と共に、年齢 ($P=0.0172$)、性別 ($P=0.0020$)、T 因子 ($P<0.0001$)、N 因子 ($P<0.0001$) が有意な予後因子

であった。単変量解析に於いて有意差を認めた5つの因子を多変量解析にて評価した結果、T因子($P < 0.0001$)とN因子($P = 0.0015$)が独立予後因子であった。MLH1/MSH2 (-/-)群とその他の群において臨床病理学的因子との相関を検討したところ、性別($P = 0.0312$)、N因子($P = 0.0375$)、病理学的病期($P = 0.0316$)との間に有意な相関を認めた。

非小細胞肺癌に於いてMLH1とMSH2の果たす役割は不明な点が多いが、MLH1、MSH2ともに発現していない症例ではリンパ節転移が少なく病期もより早期で、術後生存期間が延長することが明らかとなった。この点で予後予測因子となる可能性が示唆された。

口頭発表に引き続き、副査今村雅寛教授より①MLH1/MSH2共に染色陰性の群が他の群に比べ有意に予後が良好な理由、②染色強度単独、染色頻度単独での分類による予後の検討に関しての質問があった。続いて副査秋田弘俊教授より①肺癌でMLH1/MSH2の発現につき検討しようと考えた動機について、②非小細胞肺癌に関して同様の検討をした他の研究の結果について、③非小細胞肺癌におけるMSI発現に関しての質問があった。最後に主査近藤哲教授より、今回の検討で染色されたMLH1/MSH2蛋白に関しての質問があったが、いずれの質問に対しても、申請者は主旨をよく理解し自らの研究データと文献的考察を混じえ誠意ある回答をした。

非小細胞肺癌に於けるMLH1 / MSH2発現に関する本研究の意義は大きく、審査員一同協議の結果、申請者が博士(医学)の学位授与に値するものと判定した。