

# DNAミスマッチ修復機能欠損と免疫染色

国立がん研究センター東病院

臨床検査部 中村 信之



# 本日の内容

- DNA損傷の修復機構とがん化
  - ✓ DNAミスマッチ修復機能欠損に関わる検査の全体像
  - ✓ DNAミスマッチ修復機能
  - ✓ マイクロサテライト不安定性 (MSI)
  - ✓ DNAミスマッチ修復機能欠損による細胞のがん化
- DNAミスマッチ修復機能欠損をとらえる検査
  - ✓ MSI検査
  - ✓ DNAミスマッチ修復機能欠損の原因とdMMR免疫染色
- まとめ

# DNA損傷の修復機構（様々）

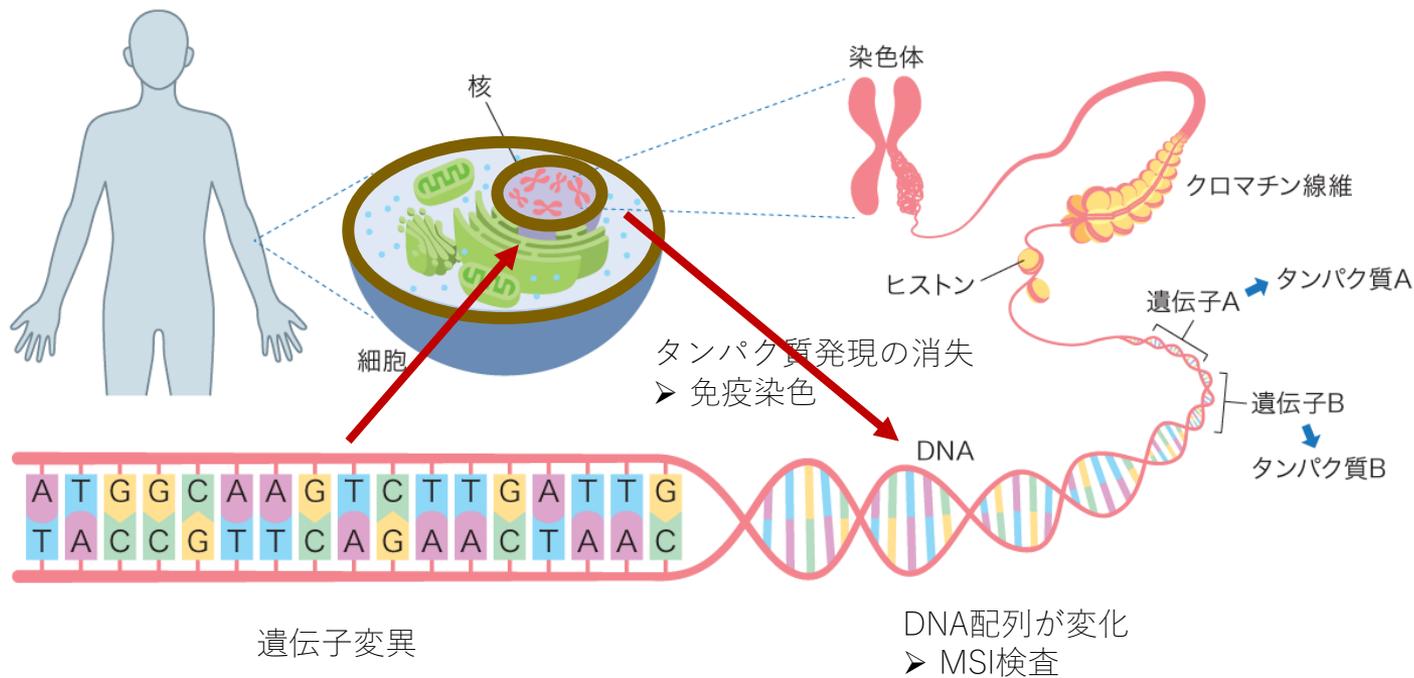
- 一本鎖の損傷

- DNA二重らせんの一方の鎖の損傷に対する修復機構
- ミスマッチ修復（mismatch repair: MMR）
  - ✓ MSI検査, dMMR免疫染色

- 二本鎖の損傷

- DNA二重らせんの両方の鎖が切断されてしまう障害に対する修復機構
- 相同組換え（homologous recombination: HR）
  - ✓ myChoice診断システム

# DNAミスマッチ修復機能欠損に関する検査の全体像



<https://mgenaid.ncgm.go.jp/>より作成

# DNAミスマッチ修復機能とは



## ミスマッチの種類

Single mismatch



Insertion/deletion loop



- ✓ DNAは複製過程において一定の確率で片側の塩基対が変化
- ✓ これを修復するのがミスマッチ修復機能

## DNAミスマッチ修復機能に関わるタンパク質とその機能

DNAミスマッチの認識

ミスマッチを含むDNA領域の除去・修復

MSH2-MSH6 (MutS  $\alpha$ )

MLH1-PMS2 (MutL  $\alpha$ )

MSH2-MSH3 (MutS  $\beta$ )

MLH1-PMS1 (MutL  $\beta$ )

MLH1-MLH3 (MutL  $\gamma$ )

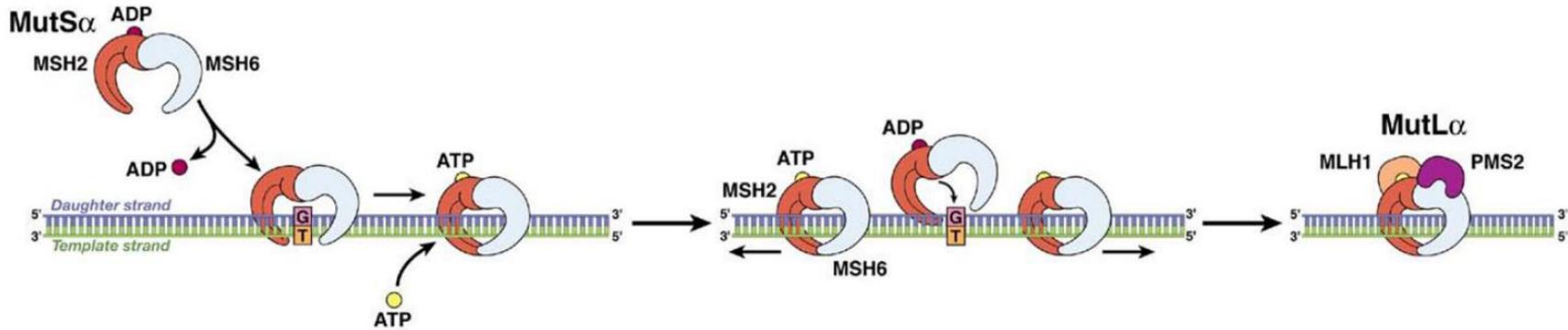
※Mut S homologue (MSH)  
Mut L homologue (MLH)  
Post-meiotic segregation (PMS)

# DNAミスマッチ修復機能のメカニズム

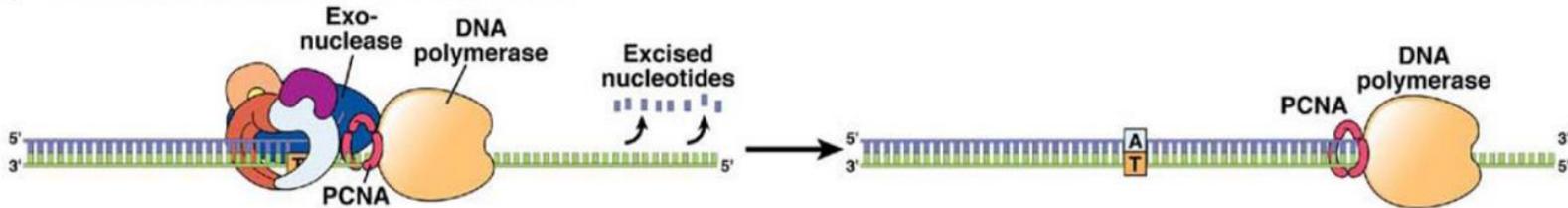
## DNAミスマッチ修復機能に関わるタンパク質とその機能

DNAミスマッチの認識	ミスマッチを含むDNA領域の除去・修復
MSH2-MSH6 (MutS $\alpha$ )	MLH1-PMS2 (MutL $\alpha$ )
MSH2-MSH3 (MutS $\beta$ )	MLH1-PMS1 (MutL $\beta$ )
	MLH1-MLH3 (MutL $\gamma$ )

### A Single mismatch



### B Exonuclease complex and resynthesis



### DNAミスマッチ修復機能に関わるタンパク質とその機能

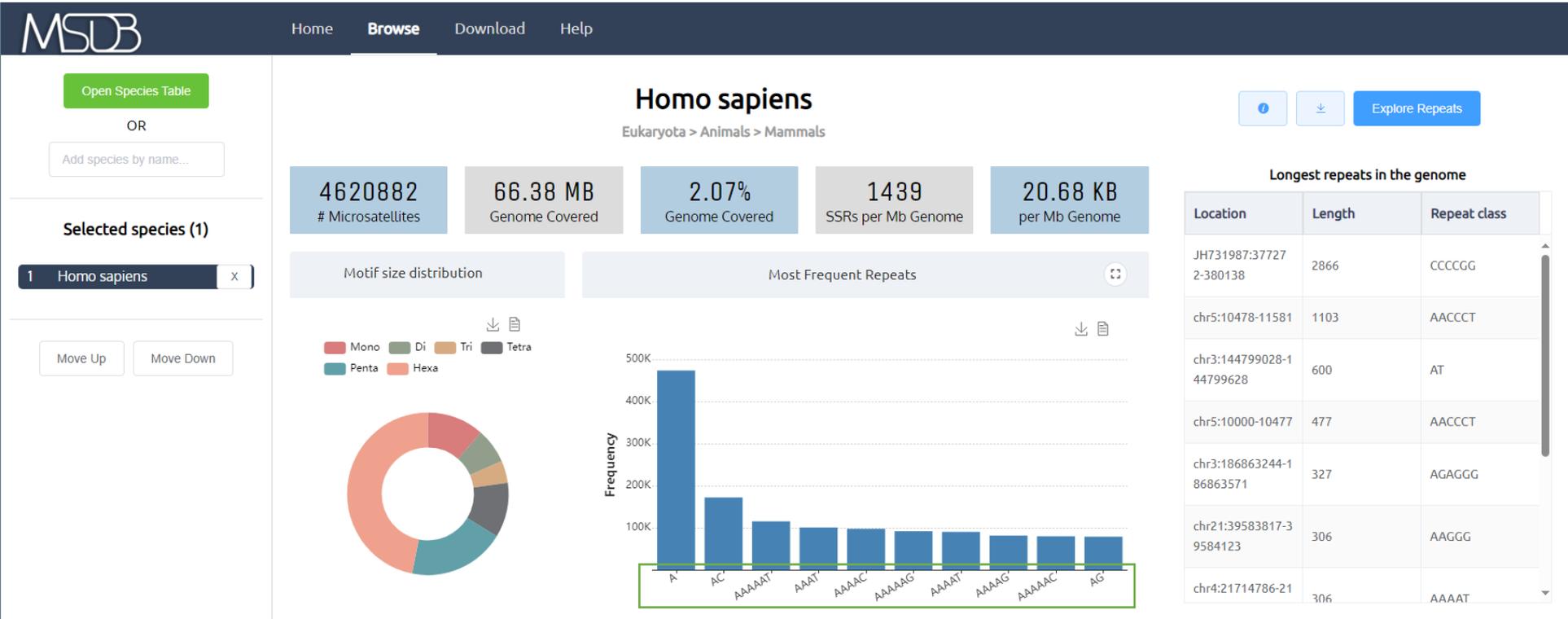
DNAミスマッチの認識	ミスマッチを含むDNA領域の除去・修復
MSH2-MSH6 (MutS $\alpha$ )	MLH1-PMS2 (MutL $\alpha$ )
MSH2-MSH3 (MutS $\beta$ )	MLH1-PMS1 (MutL $\beta$ )
	MLH1-MLH3 (MutL $\gamma$ )

# DNAミスマッチ修復機能のメカニズム

- DNAミスマッチ修復機能に関わるタンパク質のどれか一つにでも機能の欠損があるとDNA修復機能がうまく働かず，DNAの複製時に起こったミスマッチがそのまま変異として固定される可能性がある
- DNAミスマッチ修復機能の欠損により最も影響を受けるのがマイクロサテライトと呼ばれる領域

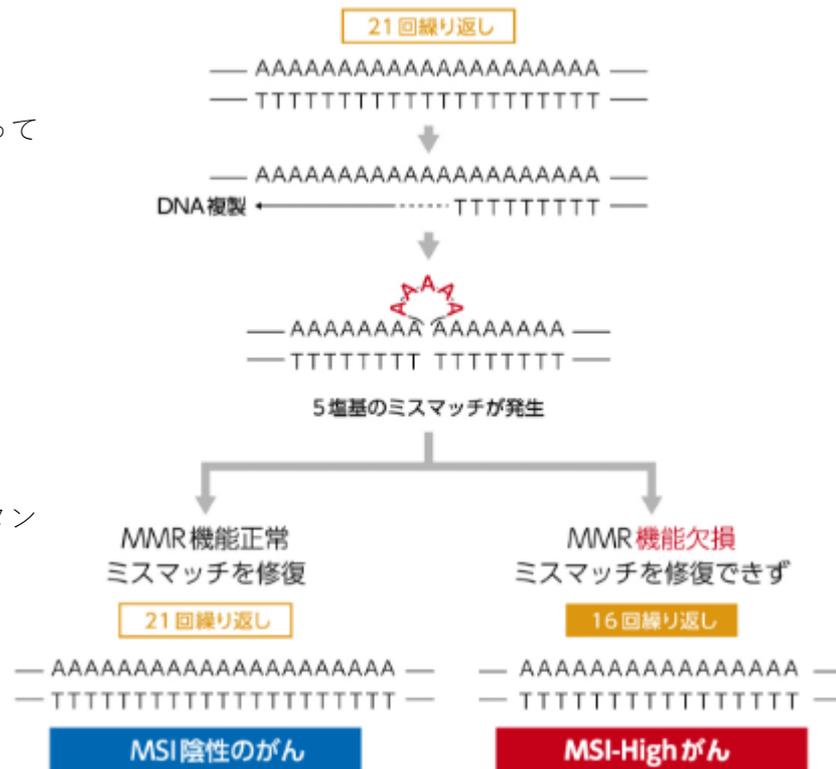
# マイクロサテライト

1~6塩基程度の短いDNAの繰り返し配列が複数連なったもの



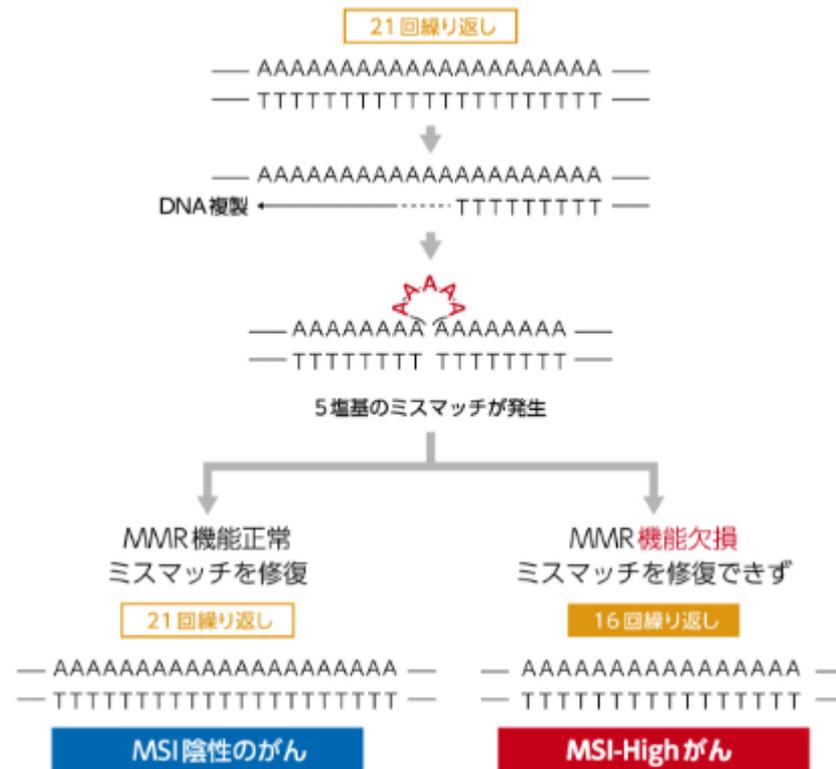
# マイクロサテライト不安定性 (MSI)

- DNA複製時にマイクロサテライトのような長い反復配列は反復の数を誤って複製され一時的なIDL (Insertion-deletion loop) をつくり得ることがある (複製スリップ)
- 通常であれば、DNAミスマッチ修復機能によって修復される
- これが機能しないと、2回目の複製時にこの変異が固定される
- その結果アミノ酸配列が変化し、本来とは異なる異常な (非機能的な) タンパク質が形成される。もしくはタンパク質自体が形成されなくなる
- この現象がマイクロサテライト不安定性 (MSI, microsatellite instability)

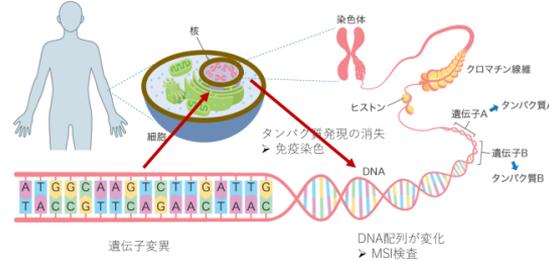


# マイクロサテライト不安定性 (MSI)

- DNAミスマッチ修復機能に欠損があるとマイクロサテライト領域に集中して変異が入り固定されることになる
- MSIが高頻度に認められる場合をMSI-High (MSI-H)、低頻度または認められない場合をMSI-Low/Microsatellite stable (MSI-L/MSS)とよぶ

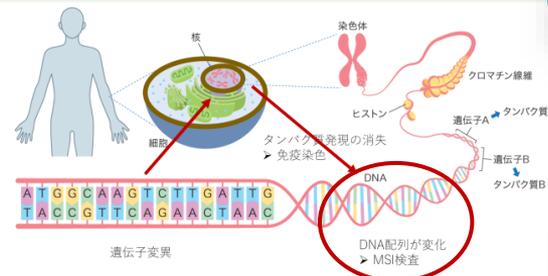


# DNAミスマッチ修復機能欠損による細胞のがん化



1. ミスマッチ修復タンパクをコードする遺伝子変異が起こる
2. ミスマッチ修復タンパクの消失または機能不全が起こりDNAミスマッチ修復機能が欠損
3. それによりDNAの複製エラーを修復することができず、一塩基置換や挿入・欠失などの遺伝子変異が蓄積しやすい状態となる
4. この状態でマイクロサテライトにおいて複製スリップが生じるとMSIとなり、あるいは、がん抑制遺伝子に不活性化変異が入るとその機能が消失する
5. さらに遺伝子変異が蓄積するとMSI-Highとなる、あるいは腫瘍遺伝子変異量（TMB, tumor mutation burden）が増加し、最終的に細胞のがん化が促進される

# MSI検査キット (FALCO)

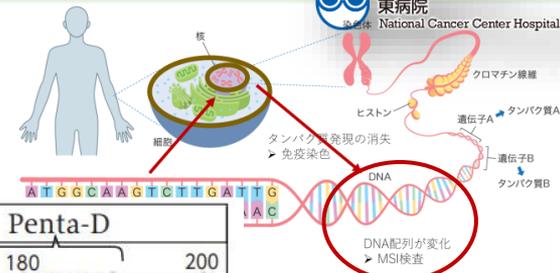


## 測定原理 (マルチプレックスPCR-フラグメント解析法)

- ① 検体から抽出したDNAを用いてマイクロサテライト領域 (5ヶ所, 下表参照) をPCRで増幅する
- ② PCR増幅産物をDNAシーケンサーにてキャピラリー電気泳動を行い, DNAのサイズ (長さ) に応じて分離された波形を得る
- ③ 得られた正常組織と腫瘍組織の波形を比較し (目視で), 両者に差があれば陽性 (MSI+) として判定する

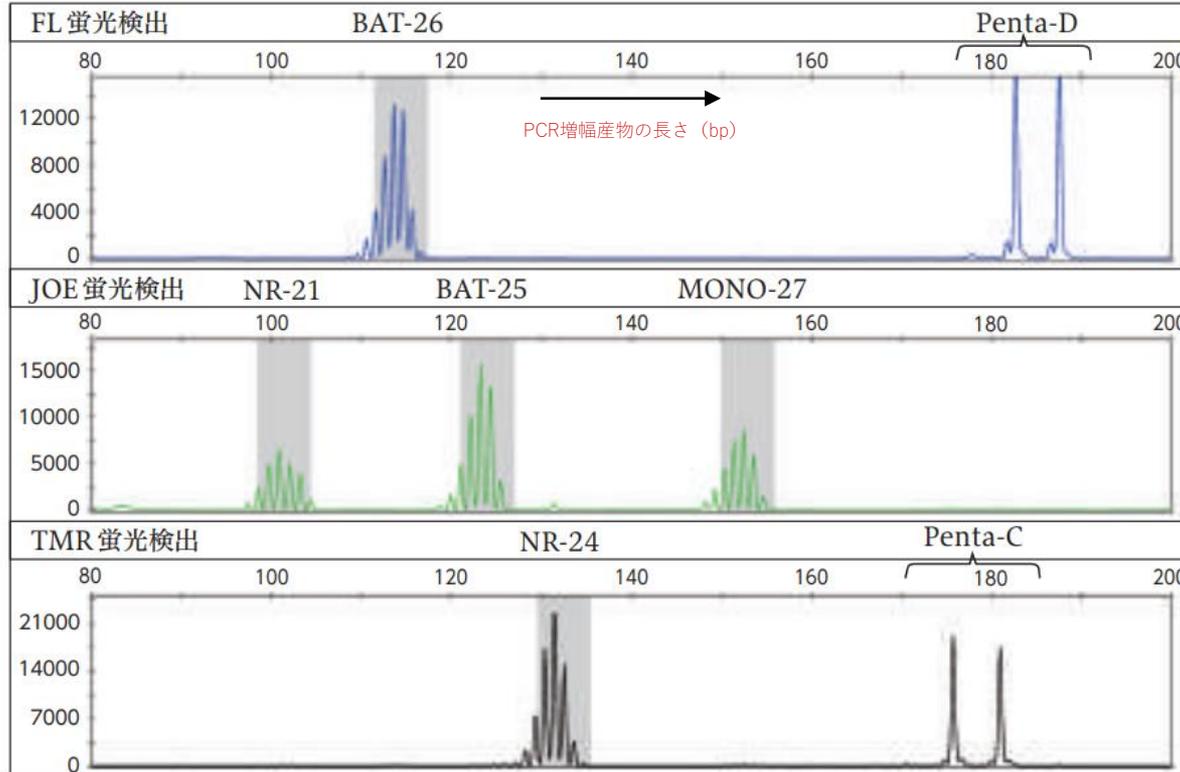
マーカー名	GenBank番号	領域	主要な繰返し配列	多型性	判定基準	
BAT25	L04143	4q	c-kit intron16	(A) <sub>25</sub>	低	MSS (MS Stable)      マーカーがすべて陰性
BAT26	U41210	2p	hMSH2 intron5	(A) <sub>26</sub>	低	MSI-L (MSI-Low)      マーカーが1つ陽性
NR-21	XM_033393	14q	SLC7A8 5'UTR	(A) <sub>21</sub>	低	MSI-H (MSI-High)      マーカーが2つ以上陽性
NR-24	X60152	2q	ZNF2 3'UTR	(A) <sub>24</sub>	低	
MONO-27	AC007684	2p	MAP4K3 5'UTR	(A) <sub>27</sub>	低	

[https://www.falco-genetics.com/msi/msi\\_analysis-Promega](https://www.falco-genetics.com/msi/msi_analysis-Promega)より作成

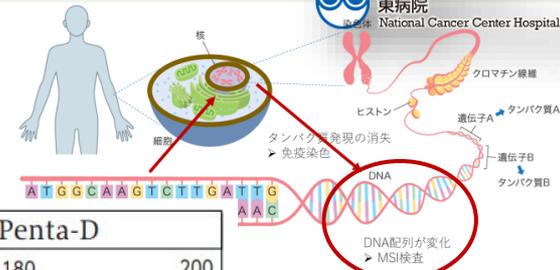


# MSI検査の評価 (フラグメント解析)

## 陰性の泳動パターン

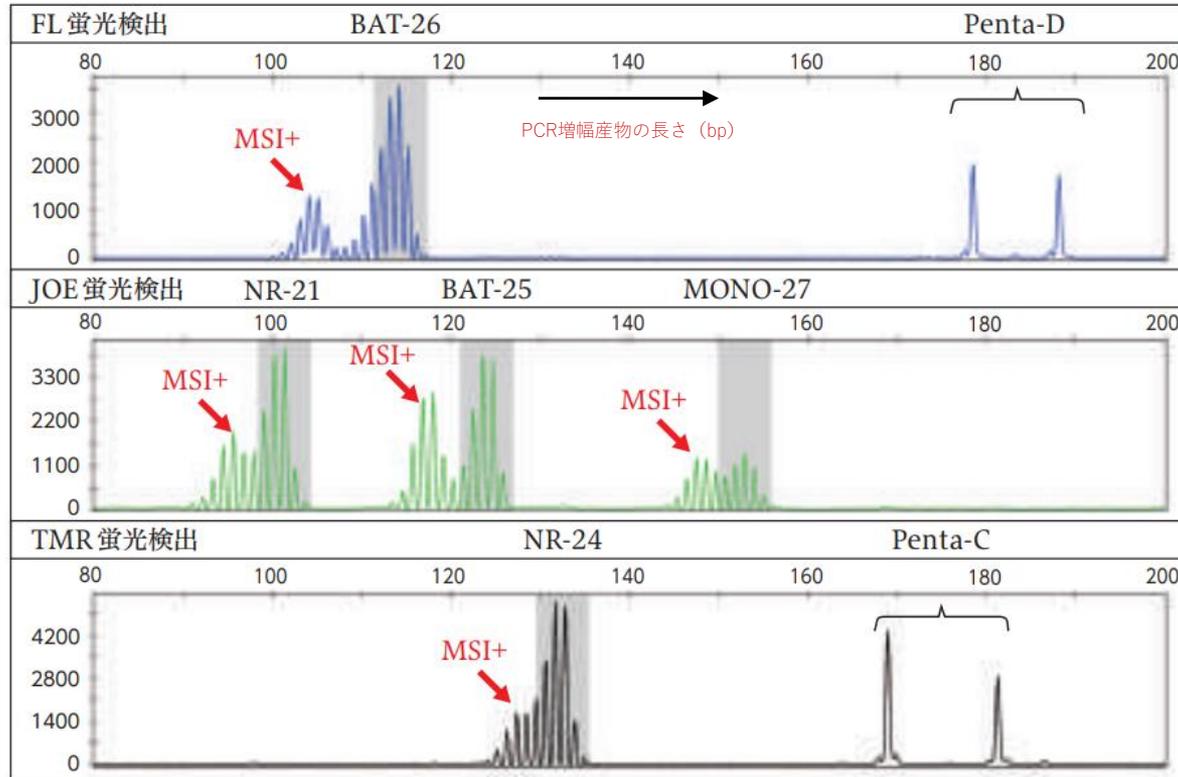


Marker	Allele size <sup>a</sup> (bp)
BAT25	122-124
BAT26	116-117
BAT40	142-143 and 145-146
NR21	98-99
NR22	138-140



# MSI検査の評価 (フラグメント解析)

## MSI-Highの泳動パターン

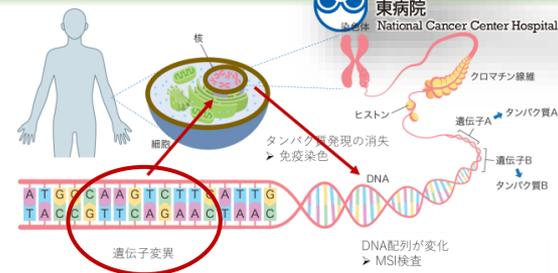


Marker	Allele size <sup>a</sup> (bp)
BAT25	122-124
BAT26	116-117
BAT40	142-143 and 145-146
NR21	98-99
NR22	138-140

## MSI検査の留意点

- ✓ 目視で判定するので、小さなIDLや腫瘍細胞割合が低い検体、DNAの分解が進んでいる検体は偽陰性となる可能性がある
- ✓ 腫瘍細胞割合は50%以上が推奨

# DNAミスマッチ修復機能欠損の原因



MMR関連酵素のうち、*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* 遺伝子が重要と考えられている

➤ これらの遺伝子のDNA変異による機能不全やプロモーターのメチル化による

発現抑制

➤ *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* タンパクの消失

✓ 大腸がんにおいては *BRAF V600E* 変異により下流の *MLH1* のプロモーター領域のメチル化 (Promoter hypermethylation) が起こり *MLH1* の発現抑制

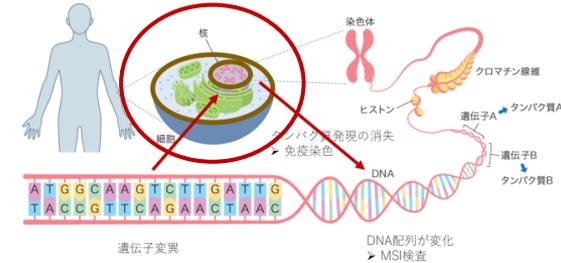
✓ リンチ症候群では *MSH2* の上流に存在する *EPCAM* 3'末領域の大欠失により *MSH2* のプロモーター領域のメチル化 (Promoter hypermethylation) が起こり *MSH2* の発現抑制

## DNAミスマッチ修復機能に関わるタンパク質とその機能

DNAミスマッチの認識      ミスマッチを含むDNA領域の除去・修復

<i>MSH2-MSH6</i> (MutS $\alpha$ )	<i>MLH1-PMS2</i> (MutL $\alpha$ )
<i>MSH2-MSH3</i> (MutS $\beta$ )	<i>MLH1-PMS1</i> (MutL $\beta$ )
	<i>MLH1-MLH3</i> (MutL $\gamma$ )

# 免疫染色によるDNAミスマッチ修復機能欠損検査



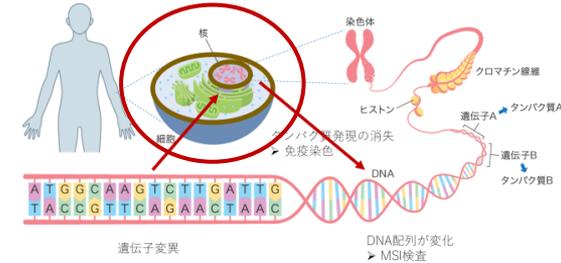
➤ 対象 : 固形癌

➤ 方法 : 4つのDNAミスマッチ修復関連遺伝子（MLH1, MSH2, MSH6, PMS2）によって発現したタンパクを免疫染色で検出する

➤ 評価方法 : 腫瘍細胞の核における各タンパク質の発現を観察し、核が染色されている場合は変化なし、染色性が消失した場合は変化ありと判定

➤ 留意事項 : もともとDNAの損傷修復に関わるタンパクなので正常細胞の核にも発現

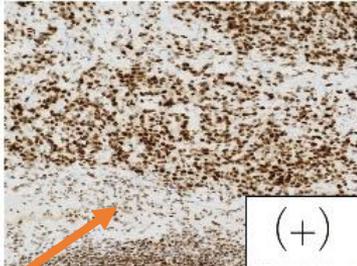
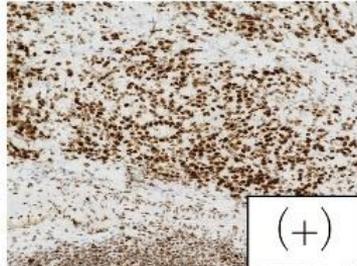
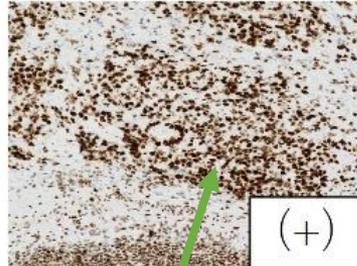
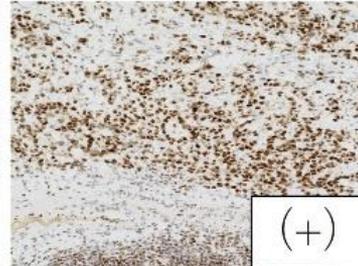
# 免疫染色によるDNAミスマッチ修復機能欠損検査



## 判定：

- ▶ 4つのタンパク質全てで発現保持が認められる場合はDNAミスマッチ修復機能が保たれているので“proficient MMR (pMMR)”と判定
- ▶ 4つのタンパク質のうちいずれか1つでも発現が消失する場合は，DNAミスマッチ修復機能が低下している状態，すなわち”deficient MMR (dMMR)”と判定
- ▶ 内部陽性コントロール：正常細胞や間質に浸潤するリンパ球など

# dMMR免疫染色によるタンパク発現の様々なパターンと原因遺伝子の推測

原因遺伝子	dMMR-IHC			
	MLH1	MSH2	MSH6	PMS2
変異なし	 (+)	 (+)	 (+)	 (+)

正常細胞（間質細胞）

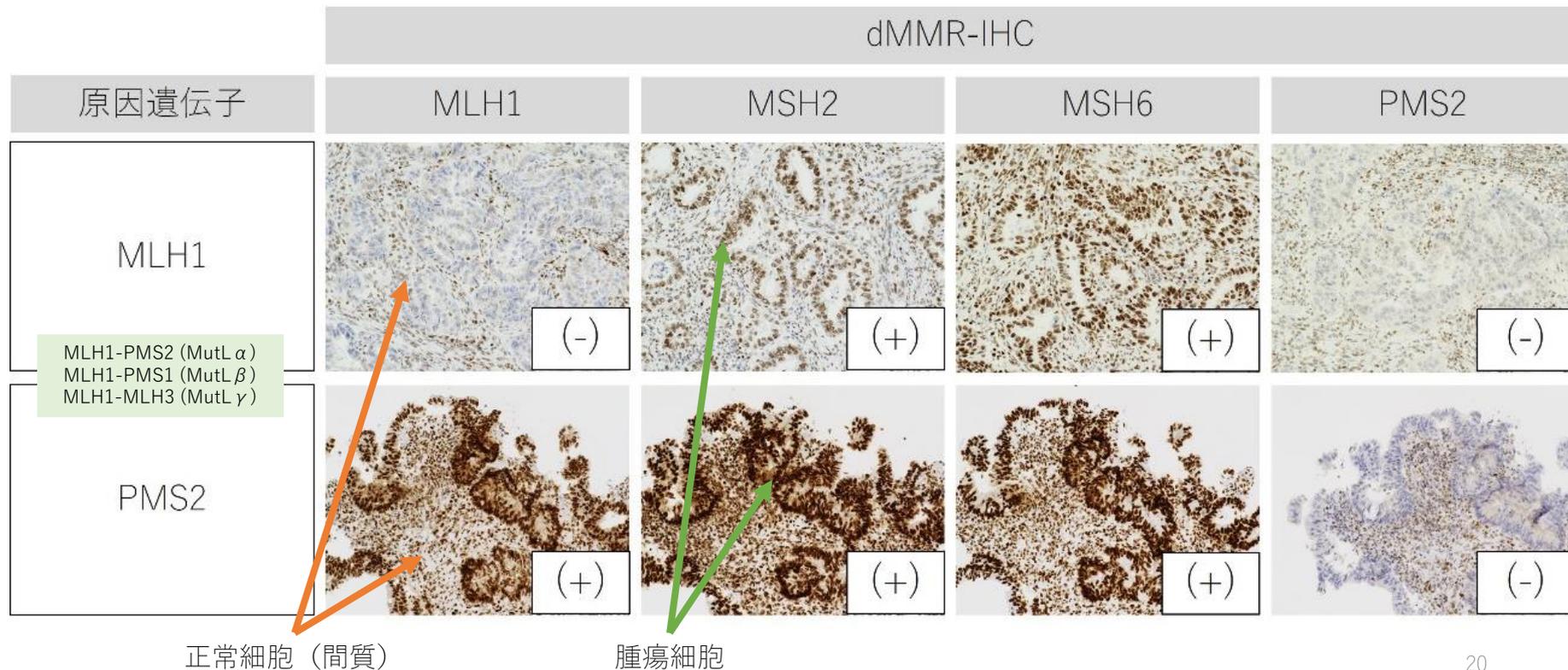
リンパ球

腫瘍細胞

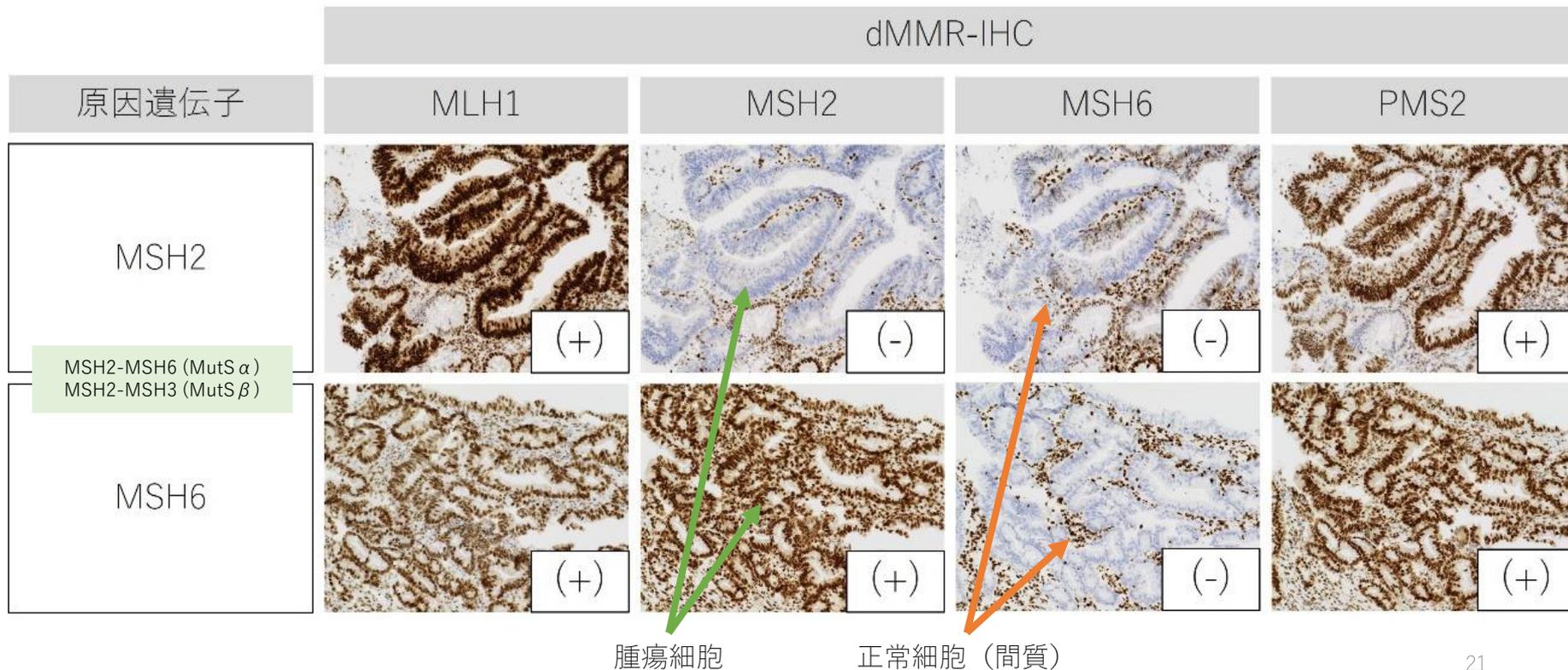
内部陽性コントロール

- ✓ 4つのタンパク質全てで発現保持が認められる
- ✓ ミスマッチ修復機能の判定は正常
- ✓ proficient MMR (pMMR)

# dMMR免疫染色によるタンパク発現の様々なパターンと原因遺伝子の推測



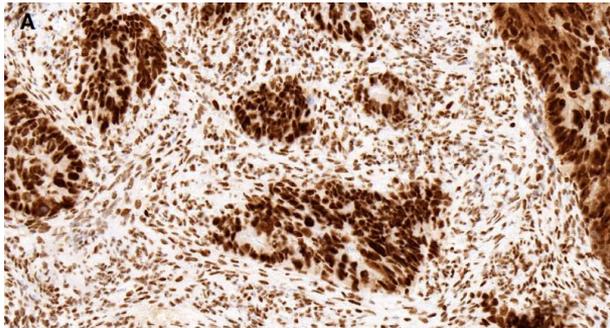
# dMMR免疫染色によるタンパク発現の様々なパターンと原因遺伝子の推測



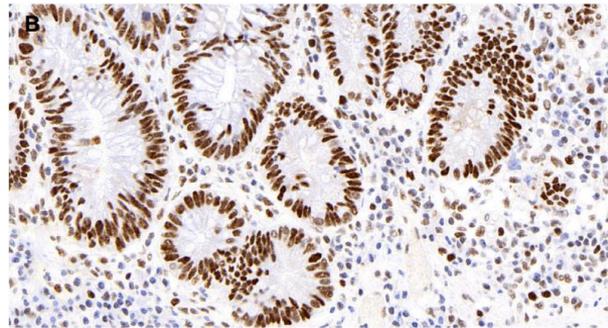
# 症例

様々な内部陽性コントロール

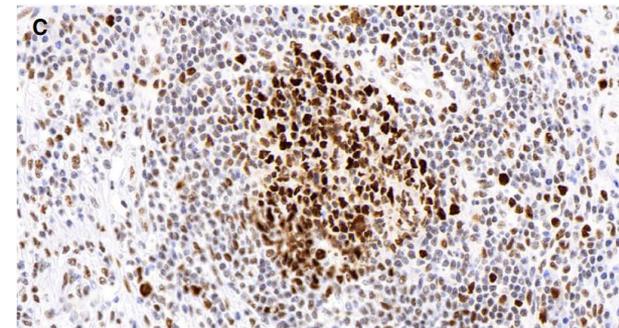
- ✓ 一般に、dMMR免疫染色では、内部陽性コントロール細胞の核よりも腫瘍細胞の核の染色性がより強い
- ✓ ただし、染色の強度は、異なる検査室間、さらには単一の検査室でも染色run毎に大きく異なる可能性がある



間質細胞と炎症細胞



非腫瘍性の大腸上皮細胞



リンパ濾胞の胚中心

# dMMR免疫染色の解釈におけるピットフォール

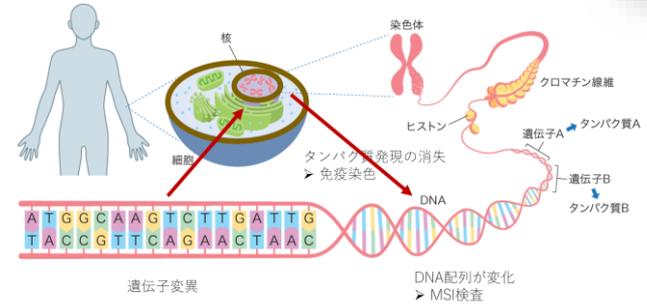
染色パターン	考えられる原因	次のステップ
<ul style="list-style-type: none"> <li>□ 腫瘍核と内部コントロールの両方で、染色性が消失または弱い</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>□ 免疫染色の技術的問題</li> <li>□ 長い冷虚血時間</li> <li>□ 固定不良または抗体の拡散不良（染色ムラがある場合）</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>□ 再染色</li> <li>□ 他のブロックを染色</li> <li>□ PCRでMSIを検査</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>□ 腫瘍核の染色性がコントロールより弱い</li> <li>□ ネオアジュバント（術前補助）療法後で、腫瘍核の染色性がコントロールより弱い、または斑点状の染色性を示す</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>□ 固定不良</li> <li>□ ミスマッチ修復異常</li> <li>□ ネオアジュバント療法に関連したMSH6（またはPMS2）染色性の低下</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>□ 再染色しても同じ場合はequivocalまたは判定不能とする</li> <li>□ PCRでMSIを検査</li> <li>□ 治療前の検体で再染色</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>□ 細胞質が染色される</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>□ 免疫染色の技術的問題</li> <li>□ EPCAM-MSH2融合遺伝子などのミスマッチ修復異常</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>□ 再染色</li> <li>□ 他のブロックを染色</li> <li>□ 細胞質の染色のみの場合は判定不能とする</li> </ul>

## dMMR免疫染色の留意点と限界

- 染色工程の確認に外部陽性コントロールも有効だが、検査材料の抗原性の保持に問題があるかどうかまではわからない
- 免疫染色だけでは同定が難しい遺伝子変異（アミノ酸置換型変異など）も存在し得ることにも留意する
- 判断に迷う場合にはMSI 検査等を追加することで総合的に判定することが望ましい

# MSI検査とdMMR免疫染色

## 検査結果から見えてくる両者の違い



### □ MSI検査

- ✓ マイクロサテライト領域でおきた複製スリップのような複製ミスを修復できなかった結果生じる，DNA配列の長さの違いをPCR法で判定する検査
- ✓ dMMRの結果を見る検査

### □ dMMR免疫染色

- ✓ ミスマッチ修復機能に関わる4つのタンパク質の発現あるいは機能欠損の状態をみる
- ✓ dMMRの原因（タンパク質の機能不全・欠如）を見る検査

## まとめ

- DNAの修復機構に異常が生じると細胞ががん化することがある
- 免疫染色はその異常を検出できる身近で有効な検査法である
- 病理医/検査技師が結果の評価法に習熟しておくことは検査の品質管理に重要
- 万能な検査はないので、判定に迷う場合は測定原理が異なる検査を追加して総合的に判断するのが望ましい
- 分子病理分類やリンチ症候群のスクリーニングにも活用されている