

Clinicopathologic implications of
DNA mismatch repair status
in endometrial carcinomas

(子宮内膜癌における DNA ミスマッチ修復機能の
臨床病理学的意義)

2 0 1 5

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

志鎌 あゆみ

筑 波 大 学

博 士 （ 医 学 ） 学 位 論 文

目次

1. 緒言

2. 方法

1) 対象

2) 治療

3) 免疫組織化学的検査(immunohistochemistry; IHC)の方法

4) IHCの評価方法

5) DNA抽出

6) メチル化特異的PCR(Methylation-specific PCR; MS-PCR)

7) マイクロサテライト不安定性(Microsatellite instability; MSI)解析

8) ミスマッチ修復機能(Mismatch repair; MMR)解析結果による分類

9) 統計解析

3. 結果

1) IHC による MMR 蛋白発現

2) MLH1 プロモーター領域の高メチル化

3) MSI 解析

4) MMR 解析結果と IHC による PTEN, p53 蛋白発現との相関

5) MMR 解析結果と臨床病理学的因子の相関

6) MMR 解析結果による分類

7) Sporadic 群および PLS 群と臨床病理学的因子の解析

8) Sporadic 群および PLS 群と予後の解析

4. 考察

5. 結論

Figure

Fig. 1. 日本人女性の婦人科癌罹患率年次推移

Fig. 2. DNA MMR 機構

Fig. 3. MMR (MLH1、MSH2、MSH6、PMS2) 蛋白の IHC 染色例 (x100)

Fig. 4. MLH1 プロモーター領域の高メチル化検査である MS-PCR の結果

Fig. 5. ベセスタマーカーを用いた MSI 解析の結果

Fig. 6. MMR 解析結果による Sporadic 群と PLS 群の分類

Fig. 7. Kaplan-Meier 法による生存曲線

Table

Table 1. 患者背景

Table 2. ベセスタマーカーのプライマー配列

Table 3. MMR 解析結果による Sporadic 群と PLS 群の分類

Table 4. IHC の結果

Table 5. IHC と MMR 解析結果の相関

Table 6. IHC と MLH1 MS-PCR

Table 7. MMR 解析結果と臨床病理学的因子の相関

Table 8. PLS 群の患者背景

Table 9. OS および DFS に関する単変量解析

Table 10. OS に関する多変量解析

Table 11. 子宮内膜癌における先行研究との比較

1. 緒言

子宮内膜癌は、欧米では最も罹患率の高い婦人科悪性腫瘍である。本邦でも、ライフスタイルの変化により子宮内膜癌の罹患率は10年前の約2倍まで増加し、年間約12000人が発症し、約2000人が死亡している(Fig. 1) [1]。

子宮内膜癌は、臨床病理学的特徴により2つのタイプに分類されている[2]。タイプ1腫瘍は、子宮内膜癌の約80%を占め、エストロゲン刺激の持続が発癌に関与し、大部分が子宮内膜増殖症を前癌病変として生じる。閉経前後での発症が多く、主に高分化型の類内膜腺癌、腫瘍細胞は一般的に異型度が低く、比較的予後良好である[3]。一方、タイプ2腫瘍は、エストロゲン刺激に非依存性で、萎縮した子宮内膜から発生する。高齢での発症が多く、主に低分化型の類内膜腺癌、漿液性腺癌、明細胞腺癌で、腫瘍細胞の異型度が高く、予後不良である[3] [4]。

子宮内膜癌の発生には、マイクロサテライト不安定性(Microsatellite instability; MSI)、PI3K-Akt経路上のPTENやPIK3CA、Rasシグナル経路上のK-RasやBRAF、Wnt/ β カテニン経路上の β カテニン、細胞周期に関わるp53やp16など、様々な遺伝子異常の蓄積が関与すると報告されている。タイプ1腫瘍の分子生物学的特徴として、エストロゲンの持続的刺激に加え、MSIやPTEN、PIK3CA、K-Rasなどの遺伝子異常の蓄積により、子宮内膜増殖症を経て発癌に至る。タイプ1腫瘍においては、p53変異やp16不活化は晩期現象と考えられる。タイプ2腫瘍では、タイプ1腫瘍で認めた分子生物学的な特徴を欠き、p53変異が腫瘍形成の早期に生じ、萎縮した子宮内膜から子宮内膜上皮内癌を経て発癌に至ると考えられている。一部のタイプ2腫瘍では、p53変異とともに、タイプ1腫瘍に特徴的なMSIやPTEN異常を認め、タイプ1腫瘍が進行し生じた、タイプ1とタイプ2の腫瘍が混在した腫瘍も存在する。PTEN遺伝子異常は子宮内膜癌でよく認められる変化であるが、私たちはPTEN蛋白の発現低下を示す子宮内膜癌では、予後良好であることを報告した[5]。このように発癌メカ

ニズムの差は、その後の腫瘍の発育にも関与すると考えられ、腫瘍の分子生物学的特徴を明らかにすることは適切な医療を提供するためにも有用な情報である。

常染色体優先遺伝形式をとるLynch症候群は遺伝性腫瘍のなかで最も頻度が高く、女性では高率に子宮内膜癌を合併し、生涯発症リスクは40～60%である[6] [7] [8]。約半数が初発の悪性腫瘍として子宮内膜癌を発症する[9]。1990年代初頭にLynch症候群の原因が、DNAミスマッチ修復(Mismatch repair; MMR)遺伝子(MLH1, MSH2, MSH6, PMS2)の生殖細胞変異であることが報告され[10] [11] [12] [13]、MMR機能の異常が子宮内膜癌の発癌機序の一つとして注目されるようになった。Lynch症候群の大部分に、MLH1またはMSH2遺伝子の変異が見つかる。また、MSH6遺伝子変異を有する場合、遺伝性腫瘍に特徴的な若年ではなく、高齢での発症が多いこと、また子宮内膜癌の発症リスクが高いことが報告されている[14] [15] [16]。

MMR機構は、DNA修復機序のひとつで、DNA複製時に生じる塩基対のミスマッチあるいは1～4塩基対程度の挿入や欠失といったエラーを是正する(Fig. 2) [17]。塩基対のミスマッチあるいは1塩基対の挿入や欠失の場合、MSH6とMSH2ヘテロダイマーであるMutS α がミスマッチを認識、MLH1とPMS2ヘテロダイマーを誘導し、それらがエキソヌクレアーゼ1 (Exo1)を動員し、損傷部位を除去、DNAポリメラーゼ δ により正しい配列に再合成される。また、1～4塩基対の挿入や欠失の場合は、MSH3とMSH2のヘテロダイマーであるMutS β がエラーを認識し、MLH1とMLH3のヘテロダイマーであるMutL γ が誘導され、同様に切り出し、再合成される。

MMR機能異常は、MMR遺伝子の生殖細胞変異(Lynch症候群)あるいは体細胞変異により引き起こされるほか、DNA配列を変化させずに体細胞変異を引き起こす後成的(epigenetic)変化が原因となることもある。後成的変化としては、MLH1プロモーター領域におけるCpGアイランドの高メチル化によるサイレンシングが最も頻度が

高い[18] [19] [20] 。

DNA中に存在する数塩基の繰り返し配列の連続領域であるマイクロサテライト領域ではMMR機能異常の影響を受けやすく、MSIを招く。MSIの状態では、遺伝子変異が起こりやすいため、発癌に関与する標的遺伝子の変異が生じた場合、その変異が蓄積され、発癌に至ると考えられている。MSIは、PCRにより増幅されたマイクロサテライトDNA断片の長さを測定し、繰り返し配列の反復数の差を検出することによって視覚化できる。正常組織から抽出したDNAと比較し、腫瘍DNAにおいてアレール変動を認めた場合、MSIと判断される。National Cancer Institute(NCI)は、MSI解析として、5つのマイクロサテライトマーカー(BAT25, BAT26, D2S123, D5S346, D17S250)を使用することを推奨している[21]。大腸癌と並んで、子宮内膜癌では20～30%と高い頻度でMSIが確認される[22] [23]。子宮内膜癌におけるMSIの要因は、MMR遺伝子の生殖細胞変異とMLH1プロモーター領域の高メチル化であることが明らかとされている[24]。

腫瘍細胞にてMMR遺伝子の両アレールの不活化が起こると、その遺伝子産物であるMMR蛋白発現が抑制される。これは、腫瘍組織を用いたMMR蛋白の免疫組織化学的検査(immunohistochemistry; IHC)により確認することが可能である。MMR蛋白はヘテロダイマーとして機能するため、1つのMMR遺伝子が不活化すると、IHCでは少なくとも1つ以上のMMR蛋白の発現が低下する。染色パターンにより、どのMMR遺伝子に変化が存在するか絞り込むことができうることは、一般の病理学検査室での実施の容易さとあわせて、MMR機能の評価としてIHCの有用性が支持される一因となっている。

子宮内膜癌と並んで、高率にMSI陽性を示す大腸癌では、若年発症、右側結腸に好発、低分化型・粘液性腺癌が多い、腫瘍浸潤リンパ球の存在、クローン病様の反応、BRAF変異陽性が多いといった臨床病理学的特徴が明らかとなっている[25]

[26] [27]。一方、MSI陽性の子宮内膜癌では高悪性度、子宮筋層浸潤が深い、リンパ管・脈管侵襲が多いなどの報告があるが[28] [29]、大腸癌に比べ報告は限られており一致した見解は得られていない。また、MSI陽性の大腸癌は予後良好であること[30]、進行症例においてMSI陰性群に比べMSI陽性群で予後良好であることが報告されている[31] [32]。化学療法感受性に関する検討では、MSI陽性群ではアルキル化剤や5-FU、白金製剤に抵抗性を示すが、イリノテカンやドセタキセル、ジェムシタビンには感受性が高いことが示されている[33] [34] [35] [36]。一方、MSI陽性子宮内膜癌の予後に関する報告では、一致した見解はまだ得られていない[37] [38] [39] [40] [41]。

これまでMMR機能をMSIで評価し、臨床病理学的因子や予後との相関を検討した研究が大部分であった。これには、いくつか問題がある。子宮内膜癌と関連の深いMSH6遺伝子変異を有する症例においては、MSI解析の感度がIHCに比べて低く、MMR機能異常の評価として不十分であると報告されている[42] [43]。このため、近年ではMMR機能異常の検出に、IHCによるMMR蛋白発現の評価が用いられるようになってきた。更に、MSI陽性子宮内膜癌には、生殖細胞変異に起因する群と、MLH1プロモーター領域の高メチル化に起因する群が混在するため、遺伝性腫瘍としての特徴を含むことにより結果が修飾される可能性がある。過去に一般の子宮内膜癌患者を対象とし、IHCにてMMR蛋白発現を評価し、臨床病理学的因子や予後との解析を行った研究は限られている。特に、MLH1、MSH2、MSH6、PMS2の4つのMMR蛋白発現の結果をもとにした研究は数件しか報告がなく、かつ一致した見解は得られていない[44] [45] [46] [47]。このような背景から、IHCによるMMR蛋白発現にてMMR機能を評価すること、さらにMLH1プロモーター領域のメチル化検査を組み合わせ、精度の高い解析を行うことが必要であると考えられた。

IHCによるMMR蛋白の発現の評価と、MLH1プロモーター領域のメチル化検査

を組み合わせた解析は、子宮内膜癌患者からLynch症候群を絞り込む方策としてもその意義が期待できる。Lynch症候群は、全子宮内膜癌の1.8～2.1%と報告されている[48] [16]。以前は、Lynch症候群は臨床的診断により行われ、改訂アムステルダムクライテリアである①少なくとも3人の血縁者がLynch症候群関連腫瘍(大腸癌、子宮内膜癌、小腸癌、尿管あるいは腎盂癌)に罹患し、1人の罹患者はその他の2人に対して第一度近親者であること、②少なくとも連続する2世代で罹患していること、③少なくとも1人が50歳未満で診断されていること、④家族性大腸腺腫症(FAP)が除外されていることをすべて満たす必要があった[49]。現在は、遺伝子検査がLynch症候群を診断するための、ゴールドスタンダードである。遺伝子検査が必要な症例拾い上げる方策として、これまで、年齢や癌家族歴、本人の同時・異時重複癌の有無による臨床的スクリーニングクライテリアが検討されてきたが、いずれもLynch症候群を正確に拾い上げるには不十分で、腫瘍組織を用いた検査の必要性が報告されてきた[48] [50] [51] [52]。Lynch症候群を拾い上げるための補助検査として、MSI解析とMMR蛋白のIHCが候補に挙がるが、MSI解析ではMSH6遺伝子変異症例の検出率が低いこと[42] [43]、MMR蛋白のIHCではどのMMR遺伝子に変異があるか推測できること、実施の容易さなどから、IHCの方が有用と考えられる。加えて、MLH1プロモーター領域の高メチル化はMLH1の生殖細胞変異を有する症例では稀であることから[53] [54] [55]、MLH1プロモーター領域のメチル化検査を組み合わせることで、MMR機能異常を示す孤発性癌を除外することができる。実際に大腸癌では、Lynch症候群のスクリーニングとして、一般の大腸癌全てを対象に、MMR蛋白のIHCを行うことの有効性が証明されている[56] [57]。子宮内膜癌においても、MMR蛋白のIHCとMLH1プロモーター領域のメチル化検査による絞りこみを行い、Lynch症候群を同定したとの報告があるが[58]、大腸癌と比べ有効性の検討はまだ不十分で、更なる追加研究が必要であろう。また、Lynch症候群の大腸癌では、右側結腸

に好発、低分化腺癌が多い、腫瘍内リンパ球浸潤などの臨床病理組織学的特徴が明らかにされている。一方、子宮内膜癌では様々な報告はあるものの、一定の見解は得られていない。

本研究では Lynch 症候群関連腫瘍としての子宮内膜癌という視点を含め、MMR 機能異常がどのように子宮内膜癌に関与しているかを明らかとし、病態解明や治療法の選択などに関わる情報を得ることを目的に、一般の子宮内膜癌患者を対象に、腫瘍組織の MMR 蛋白に対する IHC、MLH1 プロモーター領域のメチル化検査、MSI 解析を行い、それぞれの検査の結果を比較し、相関性を検討すること、またその結果をもとに、MMR 機能異常を示す子宮内膜癌の臨床病理学的因子や予後との関連性を解析した。

2. 方法

1) 対象

本研究のプロトコールは筑波大学附属病院の倫理委員会により承認を得ている。1999年から2009年の期間に筑波大学附属病院において子宮内膜癌と診断され、初回治療が行われた407症例のうち、当該研究への試料の利用について同意を取得したものあるいは将来の医学研究のためという目的で文書により同意(包括同意)を得て試料を保管したもの221症例を対象とした(Table 1)。なお、研究の実施についての情報を筑波大学産婦人科ホームページに掲載することで研究対象者に同意を撤回する機会を作った。

追跡期間の中央値は92ヶ月で(3~181ヶ月)であった。重複癌の癌種は、乳癌・大腸癌が11例と最も多く、肺癌が3例、膵臓癌・胃癌・胆嚢癌・腎臓癌・甲状腺癌がそれぞれ1例であった。進行期分類および類内膜腺癌の細分類はFIGO(1988)に基づき行った。

2) 治療

手術は、子宮全摘術、両側付属器切除術、骨盤および傍大動脈リンパ節郭清術が施行された。術前のMRIにて子宮頸管間質浸潤が疑われた症例では、広汎性あるいは準広汎性子宮全摘術、その他の症例では単純子宮全摘術が施行された。腹水細胞診陽性、付属器あるいは骨盤腹膜浸潤陽性、骨盤あるいは傍大動脈リンパ節転移陽性症例では、パクリタキセルおよびカルボプラチンによる術後補助化学療法が施行された。小骨盤への術後補助放射線療法は、付属器あるいは骨盤腹膜浸潤陽性、子宮筋層への浸潤が深い(類内膜腺癌G1およびG2では子宮筋層の2/3を超える、類内膜腺癌G3では子宮筋層の1/2を超える)症例に対して施行された。全骨

盤への術後補助放射線療法は、骨盤および傍大動脈リンパ節転移陽性症例に対して施行された。

3) IHCの方法

10%ホルマリンで固定された子宮内膜癌組織を含むパラフィン包埋ブロックを 4 μ m に薄切し、スライドガラスに貼り付けた。脱パラフィン化し、抗原賦活化は MLH1、MSH2、MSH6、PMS2 のスライドガラスについては 0.1M のクエン酸緩衝液 (pH6.0) を用いて 121°C 10 分間オートクレーブ処理、PTEN、p53 のスライドガラスについては同緩衝液を用いて 5 分間のマイクロウェーブ処理を行ったのち、室温で 20 分間インキュベートした。内因性ペルオキシダーゼ活性除去のため 0.3%の過酸化水素にて室温で 15 分間インキュベートし、正常血清によりブロッキングした。1 次抗体には MLH1 に対する抗ヒトマウスモノクローナル抗体(希釈 1:25, BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ)、MSH2 に対する抗ヒトマウスモノクローナル抗体 (希釈 1:100, EMD Millipore corporation, Billerica, MA, USA)、MSH6 に対する抗ヒトラビットモノクローナル抗体(希釈 1:200, Epitomics, Burlingame, CA, USA)、PMS2 に対する抗ヒトマウスモノクローナル抗体(希釈 1:100, BD Pharmingen)、PTEN に対する抗ヒトマウスモノクローナル抗体(希釈 1:100, Cascade, Winchester, MA)、p53 に対する抗ヒトマウスモノクローナル抗体(希釈 1:200, Dako, Glostrup, Denmark)を使用した。それぞれ一次抗体を滴下し、MLH1、MSH2、MSH6 のスライドガラスは室温で 1 時間、PMS2、PTEN、p53 のスライドガラスは室温で一晩インキュベートし、抗原抗体反応を行った。切片にビオチン標識二次抗体を滴下したのち、アビジン-ビオチン標識酵素複合体を滴下した(VECTASTATIN Elite ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA)。酵素基質溶液の DAB(ジアミノベンジンテトラヒドロ

クロール)溶液につけて発色反応を起こし、ヘマトキシリンにて染色を行った。各切片内の正常組織を内因性のポジティブコントロールとし、ネガティブコントロールには MMR 蛋白については MMR 遺伝子の生殖細胞変異保持症例、それ以外は一次抗体を使用せず上記過程を実施したものをを用いた。

4) IHCの評価方法

MMR 蛋白(MLH1, MSH2, MSH6, PMS2)発現レベルの評価に関しては、周囲の正常細胞の核が染色されており、かつ核が染色されない腫瘍細胞の割合が 10%以上の場合に陰性と判定した。MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 の 4 つの蛋白のうち、1 つでも蛋白発現レベルが陰性と判定された症例を「MMR 機能異常群(deficient MMR)」、4 つの蛋白すべての発現レベルが陽性と判定された症例を「MMR 正常群(intact MMR)」と分類した。

PTEN 蛋白発現レベルの評価に関しては、染色強度が正常内膜または正常間質組織と比較して弱い場合を 1、同等の場合を 2、強い場合を 3、染色細胞の割合が 10%未満の場合を 1、10%以上 50%未満の場合を 2、50%以上の場合を 3 とスコアリングし、それらの積を Staining Index として計算し、SI<6 を陰性と評価した[5]。

P53 に関しては染色された核の割合が 10%以上の場合を陽性、それ以外を陰性と評価した。

免疫組織化学染色の評価は、臨床病理学的因子を隠して、独立した 2 名の研究者(志鎌あゆみ、水口剛雄)により別々に行った。評価が異なった症例は、スライドを再評価し共通の判定を適用した。

5) DNA抽出

子宮内膜癌組織および対応する非腫瘍組織(子宮、卵巣、大網)を含むホルマリン固定パラフィン包埋ブロックより5 μ mの切片を作成した。組織切片スライド2～6枚を用いて、blackPREP DNA kit (Analytik Jena, Jena, Germany) を使用し、DNAを抽出した。

6) メチル化特異的PCR(Methylation-specific PCR; MS-PCR)

全221症例を対象とし、MLH1プロモーター領域の高メチル化の解析として、MS-PCRを行った[59]。ホルマリン固定パラフィン包埋子宮内膜癌組織より抽出したDNAは、EpiTect kit (Qiagen, Valencia, CA)を用いて、プロトコール通りにバイサルファイト処理した。MLH1プロモーター領域内のCpGアイランドのメチル化(M)、非メチル化(UM)それぞれのDNA検出に特異的なプライマーペアを使用し、バイサルファイト処理したDNAを増幅した。使用したプライマーの塩基配列は、以下の通りである。

MLH1-UM forward; 5'-TTTTGATGTAGATGTTTTATTAGGGTTGT-3'

MLH1-UM reverse; 5'-ACCACCTCATCATAACTACCCACA-3'

MLH1-M forward; 5'-ACGTAGACGTTTTATTAGGGTCGC-3'

MLH1-M reverse; 5-GACGAAACTCTAATTTTCCGACCCG-3'

200 μ MずつのdNTP、1 \times PCR Buffer II(Perkin-Elmer, Foster City, CA)、2.5mMのMgCl₂、0.5 μ Mずつのプライマー、0.5 UのAmpliTaq Gold DNA Polymerase(Perkin-Elmer) に50ngのバイサルファイト処理したDNAを加えて計25 μ lとし、95 $^{\circ}$ Cで10分間の変性、次に94 $^{\circ}$ C45秒、60-62 $^{\circ}$ C30秒、72 $^{\circ}$ C1分間を40サイクル、最後に72 $^{\circ}$ C5分間の伸長反応によりPCRを行った。PCR産物を3%アガロースゲルにて電気泳動後、エチジウムブロマイド染色により検出した。メチル化のPCR産物は200bp、非メチル化

のPCR産物は125bpであり、メチル化のPCR産物が確認できた症例をメチル化群、非メチル化のPCR産物のみ確認できた症例を非メチル化群と判定した。

7) MSI解析

全221症例を対象に、NCIで推奨された2種のモノヌクレオチドマーカ―(BAT26、BAT25)と3種のダイヌクレオチドマーカ―(D2S123、D5S346、D17S250)からなるベセスタマーカ―を使用し(Table 2) [21]、MSI解析を行った。それぞれプライマ―の5′端をフルオレセインにて蛍光標識した。200μMずつのdNTP、1×PCR Buffer II(TaKaRa Bio, Otsu, Japan)、2.0mMのMgCl₂、2.0μMずつのプライマ―、0.25 UのTaKaRa Ex Taq DNA Polymerase(TaKaRa) に24ngのDNAを加えて計10μlとし、94℃で2分間の変性、次に94℃30秒、56℃30秒、68℃30秒を40サイクル、最後に68℃7分間の伸長反応によりPCRを行った。PCR産物は、Applied Biosystems 3130 xl Genetic analyzerを用いて、フラグメント解析を行った。2マーカ―以上でアレル変動を認めた症例をMSI-H、1マーカ―のみでアレル変動を認めた症例をMSI-L、いずれのマーカ―でもアレル変動を認めない症例をMSSと分類した。

8) MMR解析結果による分類

MMR解析結果に基づき、孤発性(Sporadic)とリンチ症候群疑い(probable Lynch syndrome; PLS)に分類した(Table 3) [60]。IHCにてMLH1、MSH2、MSH6、PMS2全ての蛋白発現低下がない症例は孤発性(Sporadic)に分類した。IHCにてMLH1の蛋白発現低下があるが、MS-PCRにてMLH1プロモーター領域の高メチル化がある症例も孤発性(Sporadic)に分類した。IHCにてMSH2、MSH6、PMS2いずれかの蛋白発現低下がある症例は、MS-PCRの結果に関わらず、リンチ症候群疑い(PLS)に分

類した。IHCにてMLH1の蛋白発現低下があり、かつMS-PCRにてMLH1プロモーター領域の高メチル化がない症例もリンチ症候群疑い(PLS)に分類した。

9) 統計解析

群間の差の検定に Fisher の正確確率検定、生存期間の検定に Kaplan-Meier 法および log-rank 検定を使用、予後因子の単変量・多変量解析は Cox 回帰分析を行い、 $P < 0.05$ の時に有意差ありと判断した。すべての統計解析は SPSS version 21 で行った。

3. 結果

1) IHC による MMR 蛋白発現

MMR 蛋白は、ヘテロダイマーとして機能するため、1 つの MMR 遺伝子が不活化すると、1 つ以上の MMR 蛋白の発現が陰性となる(Fig. 3)。

今回行った IHC の染色パターンは、MLH1/ PMS2 とともに陰性は 36 例(16%)、PMS2 のみ陰性は 2 例(9%)、MSH2/ MSH6 とともに陰性は 7 例(3%)、MSH6 のみ陰性は 13 例(6%)であり、1 つでも MMR 蛋白発現レベルが陰性と判定された deficient MMR は 62 例(28%)であった(Table 4)。

2) MLH1 プロモーター領域の高メチル化

MMR 機能異常を示す子宮内膜癌の一因である MLH1 プロモーター領域の高メチル化を MS-PCR にて検索した(Fig. 4)。

全 221 例中、69 例(31%)に MLH1 プロモーター領域の高メチル化を認めた。IHC での MLH1 蛋白発現陰性と MLH1 プロモーター領域の高メチル化は有意な相関を示した($p=2.2E-15$; Table 5)。

3) MSI 解析

全 221 症例を対象とした MSI 解析の結果は、MSI-H が 40 例(18%)、MSI-L が 7 例(4%)、MSS が 174 例(78%)であった(Fig. 5)。

MMR 蛋白発現により分類された MMR 機能異常群(deficient MMR)では有意に MSI-H が多く、MMR 正常群(intact MMR)では有意に MSS が多く、MSI 解析と IHC による MMR 蛋白発現の結果の相関が示された。($p=1.6E-7$; Table 5)。

IHC による MMR 蛋白発現の結果と MLH1 プロモーター領域の高メチル化および MSI との相関が示されたことにより、IHC により MMR 機能異常を検出することの妥当性が示された。

4) MMR 解析結果と IHC による PTEN, p53 蛋白発現との相関

deficient MMR は、有意に PTEN 陰性と相関し、p53 陽性と逆相関を示した ($p=0.002$ and 0.006 ; Table 6)。

MLH1、PMS2 陰性、MLH1 高メチル化と PTEN 陰性、p53 陽性の間でも、同様の相関を示した (Table 6)。

5) MMR 解析結果と臨床病理学的因子の相関

deficient MMR は、60 歳未満、Lynch 症候群関連重複癌と相関し、未経産、肥満 ($BMI > 30$) および高血圧と逆相関を示した ($p=0.002, 0.03, 0.006, 0.037$, and 0.012 ; Table 7)。

MLH1 高メチル化は、60 歳未満、肥満 ($BMI > 30$) および類内膜腺癌と有意な相関を示した。 ($p=0.018, 0.044$, and 0.019 ; Table 7)。

6) MMR 解析結果による分類

孤発性と遺伝性 (Lynch 症候群関連) の子宮内膜癌の臨床病理学的特徴の違いを明らかにするために、IHC による MMR 蛋白発現の結果と MLH1 プロモーター領域のメチル化検査の結果に基づき、孤発性 (Sporadic) とリンチ症候群疑い (probable Lynch syndrome; PLS) に分類した (Fig. 6)。

28 例(13%)が PLS、193 例(87%)が Sporadic に分類された。

PLS 群の患者背景を Table 8 に示した。重複癌種は、大腸癌が 8 例と最も多く、そのうち 6 例(75%)では子宮内膜癌が先行して発症していた。IHC の結果をもとに推測される MMR 遺伝子の変異が、MSH6 遺伝子である症例は 13 例(5.9%)と最も多く、MSH2 が 8 例(3.6%)、MLH1 が 6 例(2.7%)、PMS2 が 2 例(0.9%)、MLH1 または MSH2、MLH1 または MSH6、PMS2 または MSH6 がそれぞれ 1 例(0.5%)であった。MSH6 遺伝子変異疑い群では、重複癌症例は 1 例のみで、発症年齢が 50～84 歳と比較的高齢であった。

7) Sporadic 群および PLS 群と臨床病理学的因子の解析

Sporadic 群では、60 歳以上、肥満(BMI>30)、1/2 を超える子宮筋層浸潤、FIGO 進行期 III-IV 期と有意に相関し($p=0.008, 0.01, 0.02$ and 0.03 ; Table 7)、PLS 群では、FIGO 進行期 I 期、Lynch 症候群関連重複癌と有意に相関していた($p=0.04$ and 0.001 ; Table 7)。

また、PLS 群と MSI-H は有意な相関を示した($p=1.2E-6$; Table 5)。

8) Sporadic 群および PLS 群と予後の解析

PLS 群では、Sporadic 群に比べ有意に全生存期間(Overall Survival; OS)が良好であった($p=0.038$; Fig. 7A)。興味深いことに、Sporadic 群と比べ PLS 群で OS が良好である傾向は、早期症例より進行症例でより強く認められた($p=0.14$ vs. 0.49 ; Fig. 7B, C)。

予後の有意差が起きた機序を明らかにするために、術後補助療法を受けた患者において無病生存期間(Disease Free Survival; DFS)の解析を行った。PLS 群では、

Sporadic 群に比べて DFS が良好な傾向を認めたが、術後補助療法を施行しなかった症例においては、同様の傾向は認められなかった($p=0.12$ vs. 0.85 ; Fig. 7D, E) 。さらに、同様の傾向は術後補助放射線療法のみを追加した症例に比べて、術後補助化学療法のみを追加した症例においてより強く認められた($p=0.17$ vs. 0.36 ; Fig. 7F, G) 。

Sporadic 群に対して PLS 群が予後に及ぼす影響を検討するために、COX 回帰分析を行ったところ、術後補助化学療法のみを追加した症例と術後補助放射線療法のみを追加した症例で差が認められなかった(HR 0.043, 95% CI 0-66.24 vs. HR 0.043, 95% CI 0-1303.24; Table 9)。

PLS 群(Sporadic 群に対して)、60 歳未満、類内膜腺癌、G1、子宮筋層浸潤 1/2 以下、脈管侵襲がないこと、FIGO 進行期 I/II、術後補助療法が施行されていないことの各因子が、有意に良好な OS との相関を示した($p=0.001$, $2.2E-9$, $1.8E-5$, $5.7E-7$, $2.9E-5$, $9.5E-11$, and $5.0E-9$ by the log-rank test)。これらの因子について OS に関して多変量解析を行ったところ、類内膜腺癌、FIGO 進行期 I/II、術後補助療法が施行されていないこと、の 3 因子が独立した有意な予後良好因子であった($p=1.9E-4$, 0.02 , and 0.017 ; Table 10)。

4. 考察

今回、IHC により分類された deficient MMR は 62 例(28%)に認められた。過去に一般の子宮内膜癌患者を対象とし、IHC による MMR 蛋白発現を検討した研究でも、21～29%に MMR 蛋白発現低下を認めており[58] [60] [61] [62]、今回の結果と同様であった(Table 11)。また、deficient MMR は、PTEN 陰性と相関し、p53 陽性と逆相関することが示されたが、これもまた過去の報告と矛盾しないものであった[63] [64] [65]。Djordjevi らが子宮内膜癌 154 例を対象に行った研究では、MMR 蛋白発現低下と PTEN 蛋白発現低下および PTEN 遺伝子変異はそれぞれ有意な相関があること、MMR 蛋白発現低下症例の 28/45(62%)に PTEN 遺伝子変異を認め、特にコード領域内に繰り返し配列を多く含む exon 7、8 において異常の頻度が高いことが報告されている[64]。このことは、MMR 機能異常を示す子宮内膜癌の発癌において、PTEN が標的遺伝子となっていることを示唆している。しかし、私たちの検討では、MMR 蛋白陰性群において、未経産、肥満、高血圧が有意に少なかったことは(Table 4)、PTEN 遺伝子変異と野生型 p53 が多いタイプ 1 腫瘍の典型的な特徴とは異なっている。Huang らは、MMR 遺伝子の生殖細胞変異を有する Lynch 症候群女性と一般女性の Case control study において、PTEN、PIK3CA、KRAS などタイプ 1 腫瘍に特徴的な遺伝子の変異を検索したところ、PTEN の遺伝子変異は Lynch 症候群女性、一般女性いずれの子宮内膜癌でも一般的であったが、その他の遺伝子変異は Lynch 症候群女性の子宮内膜癌では稀であったと報告した[65]。また、2 群それぞれの正常子宮内膜、子宮内膜増殖症、子宮内膜癌における PTEN 蛋白発現を IHC で評価したところ、Lynch 症候群女性では正常子宮内膜の段階から PTEN 蛋白発現低下を認めたが、一般女性では稀であった。MMR 機能異常の子宮内膜においては、多様な遺伝子変異の蓄積を経ず、PTEN 遺伝子変異だけでも、発癌を促す要因となりうるのではないかと報告している。MMR 機能異常と PTEN 遺伝子変

異はいずれも子宮内膜癌発癌の早期現象と考えられているが、必ずしも同時発生するものではなく、MMR 機能異常の標的は、PTEN のみならず多様な癌遺伝子・癌抑制遺伝子であることが推測され、MMR 機能異常の子宮内膜癌は独自の発癌過程をもつのかもと検討され、考えられた。

221 例の子宮内膜癌のうち、69 例(31%)が MLH1 プロモーター領域の高メチル化を示した。子宮内膜癌における MLH1 プロモーター領域の高メチル化の頻度は、18~54%と報告されており[21] [59] [66]、私たちの結果はこれらに矛盾しないものであった。MLH1 プロモーター領域の高メチル化群では、IHC による PTEN 陰性と相関し、p53 陽性と逆相関していた。肥満と類内膜腺癌と有意な相関を示した点とあわせ、タイプ 1 腫瘍で典型的な特徴と一致した。しかし、類内膜腺癌 G3 が多く、子宮筋層浸潤が深い傾向を認める点は、MMR 機能異常を示す孤発性子宮内膜癌に特有の特徴である可能性がある。Broaddus らは、MMR 遺伝子の生殖細胞変異による MMR 機能異常の子宮内膜癌 50 例、MLH1 プロモーター領域の高メチル化による MMR 機能異常の子宮内膜癌 26 例、MMR 機能異常のない 50 歳以下の孤発性子宮内膜癌 40 例の 3 群での比較において、MLH1 プロモーター領域の高メチル化群では、類内膜腺癌 G3 が有意に多く、子宮筋層浸潤が深い傾向にあったと報告している[67]。私たちと同様に一般子宮内膜癌を対象とした研究では、MLH1 高メチル化と類内膜腺癌の Grade に差はない[59] [66]、MLH1 高メチル化群で子宮筋層浸潤は浅い[68]、など報告は様々で、見解は一致していない。それに加え、一般子宮内膜癌を対象に、MLH1 高メチル化検査を行った研究は限られており、その臨床病理学的意義はいまだ十分には明らかにされていない。MLH1 高メチル化が、子宮内膜癌の発癌過程の早い段階でおこる事象であることは証明されており[59] [69]、診断への応用も考慮にいたした研究の蓄積が望まれる。

今回、IHC により分類された deficient MMR62 例中 39 例が MSI-H、intact

MMR159 例中 158 例が MSS あるいは MSI-L を示し、一致率は 89.1%であった (Table 5)。intact MMR のうち MSI-H を示した1例は、MLH1 プロモーター領域の高メチル化が認められた症例であった。大腸癌では、IHC と MSI 解析の相関性を示す報告が散見されるが、子宮内膜癌では、McConechy らが子宮内膜癌 89 例における IHC と MSI 解析の一致率を 93.3%と報告した[70]以外に、同様の検討を行ったものはない。MSI-H と deficient MMR の間に高い相関性が認められ、IHC により MMR 機能異常を検出することは妥当であると考えられた。

今回私たちは、IHC による MMR 蛋白発現と MS-PCR の結果に基づき、Sporadic と PLS に分類した(Fig. 6)。同じように Sporadic と PLS に分類し、さらに生殖細胞変異の検索が行われた研究では、PLS 群の 70~80%が Lynch 症候群と診断され[58] [62]、遺伝子検査と腫瘍組織を用いた Lynch 症候群の補助検査の相関性が示されていた。PLS 群 28 症例のうち、IHC の結果をもとに推測される MMR 遺伝子の変異が、MSH6 遺伝子である症例は 13 例(5.9%)と最も多く、MSH2 が 8 例(3.6%)、MLH1 が 6 例(2.7%)、PMS2 が 2 例(0.9%)であった。90%以上に MLH1 または MSH2 遺伝子変異が見つかる Lynch 症候群全体の分布とは異なっており、MSH6 遺伝子変異では子宮内膜癌の発症リスクが高いとする報告を裏付ける結果となった。PLS 群において、大腸癌との重複が 8 例と最も多く、そのうち 6 例(75%)が初発の悪性腫瘍として子宮内膜癌を発症していた。子宮内膜癌がセンチネル癌である可能性があることから、子宮内膜癌患者において正しく遺伝的リスクを評価することは、本人および血縁者の健康管理上重要であると考えられる。

Sporadic 群では、60 歳以上、肥満(BMI>30)、1/2 を超える子宮筋層浸潤、FIGO 進行期 III-IV 期と有意に相関し、PLS 群では、FIGO 進行期 I 期、Lynch 症候群関連重複癌と有意に相関していた(Table 7)。PLS 群では、Sporadic 群に比べて有意に OS が良好であったが(Fig. 7A)、これは PLS 群の腫瘍では、子宮筋層浸潤が浅く、

進行期が早期であることが示唆するように進展が緩徐であるという特徴が影響しているのかもしれない。しかしながら、PLS 群において良好な OS である傾向が、進行期が I-II 期の早期症例では示されず、III-IV 期の進行症例のみで示されたことから (Fig. 7B, C)、良好な予後に関わる因子として、進行期や子宮筋層浸潤だけではなく、その他の因子の影響があると推測された。そこで、術後補助療法の有無と DFS の関連を検討したところ、術後補助療法を施行した症例において、PLS 群の DFS が良好であったのに対し、術後補助療法を施行していない症例では、その傾向を認めなかった ($p=0.12$ vs. 0.85 ; Fig. 7D, E)。このことから、PLS 群では補助療法に対する感受性が高いことが予後に影響しているかもしれないと推測された。理論的には、MMR 機能が破綻した腫瘍では、MMR 機能が正常の腫瘍より DNA 損傷が修復されにくいため、補助療法の効果を受けやすいことが想定される。PLS 群では有意に MSI 陽性腫瘍が多かった (Table 5) ことから、PLS 群では、Sporadic 群に比べ MMR 機能が破綻した腫瘍の割合が多いと考えられ、そのことが予後の差に影響している可能性がある (Figure 7A)。進行症例では、早期症例に比べ補助療法が必要となる患者が多いため、PLS 群において良好な OS である傾向が、進行期が I-II 期の早期症例では示されず、III-IV 期の進行症例のみで示されたと考えられる (Figures 7B, C)。

MMR 機能異常と補助療法の感受性に関しては、Bertagnolli らによる大腸癌の研究結果では、イリノテカン、フルオロウラシル、ロイコボリンによる化学療法を受けた進行期 III 期の患者集団において、MSI 解析あるいは MMR 蛋白の IHC にて評価した MMR 機能異常を有する腫瘍は有意に DFS が良好であった [71]。Zaanan らは、5-FU とオキサリプラチンによる化学療法を受けた進行期 II 期の患者集団において、MMR 機能異常の大腸癌は DFS が有意に良好であったと報告した [72]。Sinicrope らは、Lynch 症候群疑いの大腸癌では 5-FU による治療後の DFS が良好であったのに対し、孤発性大腸癌ではこの傾向が認められなかったと述べている [32]。子宮

内膜癌に関しては、Kato らが、MMR 蛋白の IHC で評価した MMR 機能異常の子宮内膜癌では、プラチナベースのファーストラインの化学療法への奏効率が高く (67% vs. 44%, $p=0.34$)、無増悪生存期間および OS が有意に良好であったと報告した[47]。今回の研究では、IHC による MMR 蛋白発現陰性の子宮内膜癌では、OS が良好な傾向であったが、統計学的有意差は認められなかった($p=0.13$; data not shown)この違いは、IHC による MMR 蛋白発現の評価方法や施設間の治療方針の差によるかもしれない。子宮内膜癌における MMR 機能異常と予後との関連を明らかにするには、さらなる研究が必要であろう。

PLS 群に加えて、若年、類内膜腺癌、G1、浅い子宮筋層浸潤、脈管侵襲がないこと、進行期が早期であること、後療法を受けていないことが、OS に対する有意な予後良好因子であった。これらの因子で多変量解析を行った結果、PLS 群は独立した予後良好因子とはならなかった(Table 10)。おそらく、PLS 群と若年、浅い子宮筋層浸潤、早期癌といった他の予後因子と有意に相関している(Table 7)ことが影響しているものと考えられる。

MMR 機能異常を示す癌と免疫逃避機構との関連が最近注目されている。Le らは、MMR 機能異常の癌において免疫チェックポイント阻害剤である抗 PD-1 抗体ペンプロリツマブの有効性を報告した[73]。MMR 機能正常大腸癌、MMR 機能異常大腸癌、MMR 機能異常大腸癌以外の癌(MMR 機能異常には Lynch 症候群も含む)において、ペンプロリツマブ投与後の奏効率が MMR 機能正常大腸癌で 0%だったのに対し、MMR 機能異常大腸癌で 62%、MMR 機能異常大腸癌以外の癌 60%であった。全エクソームシーケンスにより MMR 機能異常の腫瘍では平均 1782 個、MMR 機能正常の腫瘍では平均 73 個の体細胞変異が見られ、MMR 機能異常の腫瘍において有意に体細胞変異の頻度が高かった ($P=0.007$)。変異が多くなると、異常な蛋白が多く作り出され、癌細胞上に非自己と認識する蛋白が多く発

現する状態になるが、免疫チェックポイントを阻害することにより T 細胞による免疫応答が活性化されることによると考えられている。少ない症例での検討であるため、今後さらなる研究の追加が必要であるが、MMR 機能異常による免疫応答の相違が予後に影響する可能性も示唆され興味深い。

今回の結果から示唆されたように、Lynch 症候群関連子宮内膜癌の自然史として腫瘍の進展が緩徐である可能性がある。これは、患者本人提供する医療を選択する上でも有意義な情報となる。今後、生殖細胞変異を含め MMR 機能異常のより詳細な解析に基づいた検討を行い、明らかにしていく必要がある。

子宮内膜癌は Lynch 症候群の女性に発症する悪性腫瘍のなかで最も高頻度であるため、Lynch 症候群女性を初めて診療するのが婦人科医である可能性があり、子宮内膜癌患者を遺伝的に正しくリスク評価することが重要である。今回、Sporadic 群と比べて PLS 群では、60 歳未満での発症、Lynch 症候群関連腫瘍の合併が多いことが示された(Table 7)。これらは、Lynch 症候群を絞り込むための臨床的クライテリアになりうる因子と考えられる。しかし、PLS 群のなかには、60 歳以上や Lynch 症候群関連重複癌がない症例が含まれていることから(Table 8)、臨床的クライテリアの採用のみでは不十分である。今後、腫瘍組織を用いた補助検査で分類された PLS 群と遺伝子検査で確定した Lynch 症候群の相関を検討することにより、臨床情報と組み合わせた適切な遺伝的リスク評価の方策を確立していくことができると考えられる。

5. 結論

今回の研究において、MMR 機能解析の結果により分類された PLS 群では、Sporadic 群と比較して腫瘍の進展が緩徐で、OS が良好であった。これは、腫瘍の特徴のみではなく、補助療法への感受性が影響している可能性がある。MMR 機能を評価し、Lynch 症候群を拾い上げることは、予後良好な患者集団を同定できる可能性があることが示唆された。今後更に検証していくことにより、子宮内膜癌患者に対し効率的な医療を提供するための有用な情報となると考えられる。

Figure legend

Fig. 1. 日本人女性の婦人科癌罹患率年次推移

Fig. 2. DNA MMR 機構

A, 塩基対のミスマッチあるいは1塩基対の挿入や欠失の場合

B, 1～4塩基対の挿入や欠失の場合

Fig. 3. MMR (MLH1、MSH2、MSH6、PMS2) 蛋白の IHC 染色例 (x100)

Case 49 MLH1、PMS2 および MSH6 蛋白発現陰性症例 (deficient MMR)

Case 123 MLH1 および PMS2 蛋白発現陰性症例 (deficient MMR)

Case 259 MMR 蛋白発現陽性症例 (intact MMR)

Fig. 4. MLH1 プロモーター領域の高メチル化検査である MS-PCR の結果

メチル化のPCR産物は200bp、非メチル化のPCR産物は125bp。

メチル化のPCR産物が確認できた症例をメチル化群、非メチル化のPCR産物のみ確認できた症例を非メチル化と判定した。

Case 49 Methylated にバンドがなく、Unmethylated にバンドがあり (非メチル化)

Case 123 Methylated/ Unmethylated いずれにもバンドがあり (メチル化)

Case 259 Methylated にバンドがなく、Unmethylated にバンドがあり (非メチル化)

Fig. 5. ベセスタマーカを用いた MSI 解析の結果

BAT25, BAT26, D2S123, D5S346, D17S250 の5マーカを用いた。

Normal (非腫瘍組織) と Tumor (子宮内膜癌組織) のフラグメント解析の結果を比較し、アレル変動の有無を評価した。

2 マーカー以上でアレル変動を認めた症例を MSI-H、1 マーカーのみでアレル変動を認めた症例を MSI-L、いずれのマーカーでもアレル変動を認めない症例を MSS と分類した。

Case 49 D17S250 でアレル変動あり (MSI-L)

Case 123 BAT26, D5S346, D17S250 でアレル変動あり (MSI-H)

Case 259 アレル変動なし (MSS)

Fig. 6. MMR 解析結果による Sporadic 群と PLS 群の分類

MMR 全ての蛋白発現陽性症例は Sporadic に分類した。

MSH2、MSH6、PMS2 いずれかの蛋白発現陰性症例は PLS に分類した。

MLH1 蛋白発現陰性症例は、MLH1 プロモーター領域の高メチル化の有無により、さらに分類した。

MLH1 蛋白発現陰性かつ MLH1 の高メチル化症例は Sporadic に分類した。

MLH1 蛋白発現陰性かつ MLH1 の高メチル化がない症例は PLS に分類した。

Fig. 7. Kaplan-Meier 法による生存曲線

A, 全症例における OS;

PLS 群(n=28) vs. Sporadic 群(n=193)

B, FIGO 進行期 III-IV 症例における OS;

PLS 群(n=4) vs. Sporadic 群(n=63)

C, FIGO 進行期 I-II 症例における OS;

PLS 群(n=24) vs. Sporadic 群(n=130)

D, 術後補助療法あり症例における DFS;

PLS 群(n=5) vs. Sporadic 群(n=91)

E, 術後補助療法なし症例における DFS;

PLS 群(n=23) vs. Sporadic 群(n=102)

F, 術後補助療法が化学療法のための症例における DFS;

PLS 群(n=2) vs. Sporadic 群(n=36)

G, 術後補助療法が放射線療法のみ症例における DFS;

PLS 群(n=3) vs. Sporadic 群(n=34)

REFERENCES

1. Matsuda A, Matsuda T, Shibata A et al. Cancer incidence and incidence rates in Japan in 2008: a study of 25 population-based cancer registries for the Monitoring of Cancer Incidence in Japan (MCIJ) project. *Jpn J Clin Oncol* 2014; 44: 388-396.
2. Matias-Guiu X, Prat J. Molecular pathology of endometrial carcinoma. *Histopathology* 2013; 62: 111-123.
3. Doll A, Abal M, Rigau M et al. Novel molecular profiles of endometrial cancer- new light through old windows. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008; 108: 221-229.
4. Zheng W, Xiang L, Fadare O, Kong B. A proposed model for endometrial serous carcinogenesis. *Am J Surg Pathol* 2011; 35: e1-e14.
5. Akiyama-Abe A, Minaguchi T, Nakamura Y et al. Loss of PTEN expression is an independent predictor of favourable survival in endometrial carcinomas. *Br J Cancer* 2013; 109: 1703-1710.
6. Aarnio M, Sankila R, Pukkala E et al. Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. *Int J Cancer* 1999; 81: 214-218.
7. Dunlop MG, Farrington SM, Carothers AD et al. Cancer risk associated with germline DNA mismatch repair gene mutations. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 105-110.
8. Lu KH, Schorge JO, Rodabaugh KJ et al. Prospective determination of

prevalence of lynch syndrome in young women with endometrial cancer. J Clin Oncol 2007; 25: 5158-5164.

9. Lu KH, Dinh M, Kohlmann W et al. Gynecologic cancer as a "sentinel cancer" for women with hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Obstet Gynecol 2005; 105: 569-574.

10. Bronner CE, Baker SM, Morrison PT et al. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. Nature 1994; 368: 258-261.

11. Fishel R, Lescoe MK, Rao MR et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. Cell 1993; 75: 1027-1038.

12. Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N et al. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Cell 1993; 75: 1215-1225.

13. Hendriks YM, Jagmohan-Changur S, van der Klift HM et al. Heterozygous mutations in PMS2 cause hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (Lynch syndrome). Gastroenterology 2006; 130: 312-322.

14. Wijnen J, de Leeuw W, Vasen H et al. Familial endometrial cancer in female carriers of MSH6 germline mutations. Nat Genet 1999; 23: 142-144.

15. Berends MJ, Wu Y, Sijmons RH et al. Molecular and clinical characteristics of

MSH6 variants: an analysis of 25 index carriers of a germline variant. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 26-37.

16. Ollikainen M, Abdel-Rahman WM, Moisio AL et al. Molecular analysis of familial endometrial carcinoma: a manifestation of hereditary nonpolyposis colorectal cancer or a separate syndrome? *J Clin Oncol* 2005; 23: 4609-4616.

17. Martin A, Scharff MD. AID and mismatch repair in antibody diversification. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 605-614.

18. Herman JG, Umar A, Polyak K et al. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 6870-6875.

19. Simpkins SB, Bocker T, Swisher EM et al. MLH1 promoter methylation and gene silencing is the primary cause of microsatellite instability in sporadic endometrial cancers. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 661-666.

20. Salvesen HB, MacDonald N, Ryan A et al. Methylation of hMLH1 in a population-based series of endometrial carcinomas. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 3607-3613.

21. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in

colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 5248-5257.

22. Atkin NB. Microsatellite instability. *Cytogenet Cell Genet* 2001; 92: 177-181.

23. Umar A, Boland CR, Terdiman JP et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 261-268.

24. Goodfellow PJ, Buttin BM, Herzog TJ et al. Prevalence of defective DNA mismatch repair and MSH6 mutation in an unselected series of endometrial cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 5908-5913.

25. Greenson JK, Bonner JD, Ben-Yzhak O et al. Phenotype of microsatellite unstable colorectal carcinomas: Well-differentiated and focally mucinous tumors and the absence of dirty necrosis correlate with microsatellite instability. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 563-570.

26. Deng G, Bell I, Crawley S et al. BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 191-195.

27. Alexander J, Watanabe T, Wu TT et al. Histopathological identification of colon cancer with microsatellite instability. *Am J Pathol* 2001; 158: 527-535.

28. Shia J, Black D, Hummer AJ et al. Routinely assessed morphological features

correlate with microsatellite instability status in endometrial cancer. *Hum Pathol* 2008; 39: 116-125.

29. Honore LH, Hanson J, Andrew SE. Microsatellite instability in endometrioid endometrial carcinoma: correlation with clinically relevant pathologic variables. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16: 1386-1392.

30. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 260: 816-819.

31. Benatti P, Gafa R, Barana D et al. Microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 8332-8340.

32. Sinicrope FA, Foster NR, Thibodeau SN et al. DNA mismatch repair status and colon cancer recurrence and survival in clinical trials of 5-fluorouracil-based adjuvant therapy. *J Natl Cancer Inst* 2011; 103: 863-875.

33. Fink D, Nebel S, Aebi S et al. The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance. *Cancer Res* 1996; 56: 4881-4886.

34. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2003; 349: 247-257.

35. Vilar E, Scaltriti M, Balmana J et al. Microsatellite instability due to hMLH1

deficiency is associated with increased cytotoxicity to irinotecan in human colorectal cancer cell lines. *Br J Cancer* 2008; 99: 1607-1612.

36. Pelosof L, Yerram SR, Ahuja N et al. CHFR silencing or microsatellite instability is associated with increased antitumor activity of docetaxel or gemcitabine in colorectal cancer. *Int J Cancer* 2014; 134: 596-605.

37. Basil JB, Goodfellow PJ, Rader JS et al. Clinical significance of microsatellite instability in endometrial carcinoma. *Cancer* 2000; 89: 1758-1764.

38. Peiro G, Diebold J, Mayr D et al. Prognostic relevance of hMLH1, hMSH2, and BAX protein expression in endometrial carcinoma. *Mod Pathol* 2001; 14: 777-783.

39. Baldinu P, Cossu A, Manca A et al. Microsatellite instability and mutation analysis of candidate genes in unselected sardinian patients with endometrial carcinoma. *Cancer* 2002; 94: 3157-3168.

40. Black D, Soslow RA, Levine DA et al. Clinicopathologic significance of defective DNA mismatch repair in endometrial carcinoma. *J Clin Oncol* 2006; 24: 1745-1753.

41. Zigelboim I, Goodfellow PJ, Gao F et al. Microsatellite instability and epigenetic inactivation of MLH1 and outcome of patients with endometrial carcinomas of the endometrioid type. *J Clin Oncol* 2007; 25: 2042-2048.

42. Shia J. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part I. The utility of immunohistochemistry. *J Mol Diagn* 2008; 10: 293-300.
43. Hampel H, Frankel W, Panescu J et al. Screening for Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) among endometrial cancer patients. *Cancer Res* 2006; 66: 7810-7817.
44. Cohn DE, Frankel WL, Resnick KE et al. Improved survival with an intact DNA mismatch repair system in endometrial cancer. *Obstet Gynecol* 2006; 108: 1208-1215.
45. Resnick KE, Frankel WL, Morrison CD et al. Mismatch repair status and outcomes after adjuvant therapy in patients with surgically staged endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2010; 117: 234-238.
46. Shih KK, Garg K, Levine DA et al. Clinicopathologic significance of DNA mismatch repair protein defects and endometrial cancer in women 40years of age and younger. *Gynecol Oncol* 2011; 123: 88-94.
47. Kato M, Takano M, Miyamoto M et al. DNA mismatch repair-related protein loss as a prognostic factor in endometrial cancers. *J Gynecol Oncol* 2015; 26: 40-45.
48. Hampel H, Frankel WL, Martin E et al. Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *N Engl J Med* 2005; 352: 1851-1860.

49. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999; 116: 1453-1456.
50. Ryan P, Mulligan AM, Aronson M et al. Comparison of clinical schemas and morphologic features in predicting Lynch syndrome in mutation-positive patients with endometrial cancer encountered in the context of familial gastrointestinal cancer registries. *Cancer* 2012; 118: 681-688.
51. Lanceley A, Eagle Z, Ogden G et al. Family history and women with ovarian cancer: is it asked and does it matter?: An observational study. *Int J Gynecol Cancer* 2012; 22: 254-259.
52. Tan YY, McGaughran J, Ferguson K et al. Improving identification of lynch syndrome patients: a comparison of research data with clinical records. *Int J Cancer* 2013; 132: 2876-2883.
53. Yuen ST, Chan TL, Ho JW et al. Germline, somatic and epigenetic events underlying mismatch repair deficiency in colorectal and HNPCC-related cancers. *Oncogene* 2002; 21: 7585-7592.
54. Rahner N, Friedrichs N, Steinke V et al. Coexisting somatic promoter hypermethylation and pathogenic MLH1 germline mutation in Lynch syndrome. *J Pathol*

2008; 214: 10-16.

55. Bouzourene H, Hutter P, Losi L et al. Selection of patients with germline MLH1 mutated Lynch syndrome by determination of MLH1 methylation and BRAF mutation. *Fam Cancer* 2010; 9: 167-172.

56. Sinicrope FA, Sargent DJ. Molecular pathways: microsatellite instability in colorectal cancer: prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 1506-1512.

57. Musulen E, Sanz C, Munoz-Marmol AM, Ariza A. Mismatch repair protein immunohistochemistry: a useful population screening strategy for Lynch syndrome. *Hum Pathol* 2014; 45: 1388-1396.

58. Mills AM, Liou S, Ford JM et al. Lynch syndrome screening should be considered for all patients with newly diagnosed endometrial cancer. *Am J Surg Pathol* 2014; 38: 1501-1509.

59. Kanaya T, Kyo S, Maida Y et al. Frequent hypermethylation of MLH1 promoter in normal endometrium of patients with endometrial cancers. *Oncogene* 2003; 22: 2352-2360.

60. Bruegl AS, Djordjevic B, Batte B et al. Evaluation of clinical criteria for the identification of Lynch syndrome among unselected patients with endometrial cancer.

Cancer Prev Res (Phila) 2014; 7: 686-697.

61. Backes FJ, Leon ME, Ivanov I et al. Prospective evaluation of DNA mismatch repair protein expression in primary endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2009; 114: 486-490.

62. Leenen CH, van Lier MG, van Doorn HC et al. Prospective evaluation of molecular screening for Lynch syndrome in patients with endometrial cancer ≤ 70 years. *Gynecol Oncol* 2012; 125: 414-420.

63. Nelson GS, Pink A, Lee S et al. MMR deficiency is common in high-grade endometrioid carcinomas and is associated with an unfavorable outcome. *Gynecol Oncol* 2013; 131: 309-314.

64. Djordjevic B, Barkoh BA, Luthra R, Broaddus RR. Relationship between PTEN, DNA mismatch repair, and tumor histotype in endometrial carcinoma: retained positive expression of PTEN preferentially identifies sporadic non-endometrioid carcinomas. *Mod Pathol* 2013; 26: 1401-1412.

65. Huang M, Djordjevic B, Yates MS et al. Molecular pathogenesis of endometrial cancers in patients with Lynch syndrome. *Cancer* 2013; 119: 3027-3033.

66. Bischoff J, Ignatov A, Semczuk A et al. hMLH1 promoter hypermethylation and MSI status in human endometrial carcinomas with and without metastases. *Clin Exp*

Metastasis 2012; 29: 889-900.

67. Broaddus RR, Lynch HT, Chen LM et al. Pathologic features of endometrial carcinoma associated with HNPCC: a comparison with sporadic endometrial carcinoma. Cancer 2006; 106: 87-94.

68. Bruegl AS, Djordjevic B, Urbauer DL et al. Utility of MLH1 methylation analysis in the clinical evaluation of Lynch Syndrome in women with endometrial cancer. Curr Pharm Des 2014; 20: 1655-1663.

69. Esteller M, Catus L, Matias-Guiu X et al. hMLH1 promoter hypermethylation is an early event in human endometrial tumorigenesis. Am J Pathol 1999; 155: 1767-1772.

70. McConechy MK, Talhouk A, Li-Chang HH et al. Detection of DNA mismatch repair (MMR) deficiencies by immunohistochemistry can effectively diagnose the microsatellite instability (MSI) phenotype in endometrial carcinomas. Gynecol Oncol 2015; 137: 306-310.

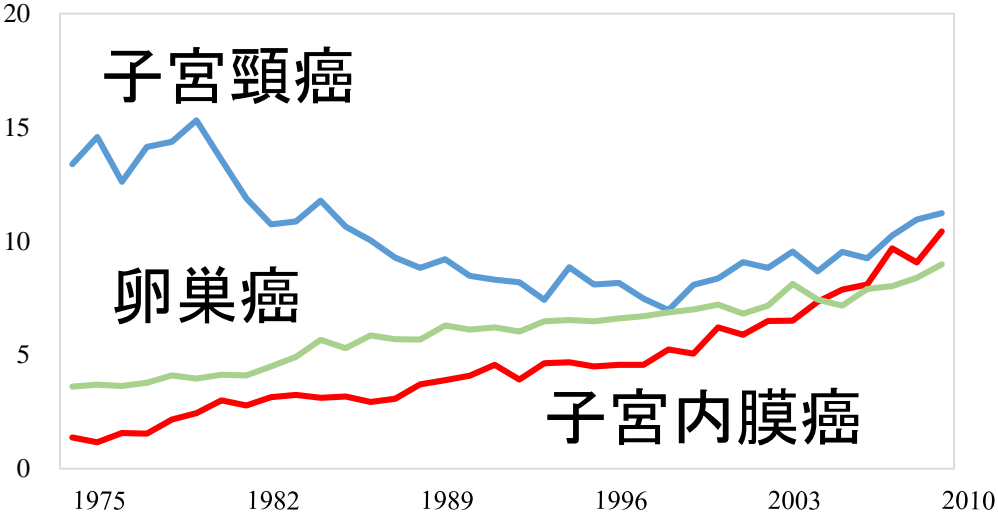
71. Bertagnolli MM, Niedzwiecki D, Compton CC et al. Microsatellite instability predicts improved response to adjuvant therapy with irinotecan, fluorouracil, and leucovorin in stage III colon cancer: Cancer and Leukemia Group B Protocol 89803. J Clin Oncol 2009; 27: 1814-1821.

72. Zaanen A, Flejou JF, Emile JF et al. Defective mismatch repair status as a

prognostic biomarker of disease-free survival in stage III colon cancer patients treated with adjuvant FOLFOX chemotherapy. Clin Cancer Res 2011; 17: 7470-7478.

73. Le DT, Uram JN, Wang H et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. N Engl J Med 2015; 372: 2509-2520.

Fig. 1



Matsuda A, et al. Cancer incidence and incidence rates in Japan in 2008: a study of 25 population-based cancer registries for the Monitoring of Cancer Incidence in Japan (MCIJ) project. Jpn J Clin Oncol 2014; 44: 388-396.

Fig. 2

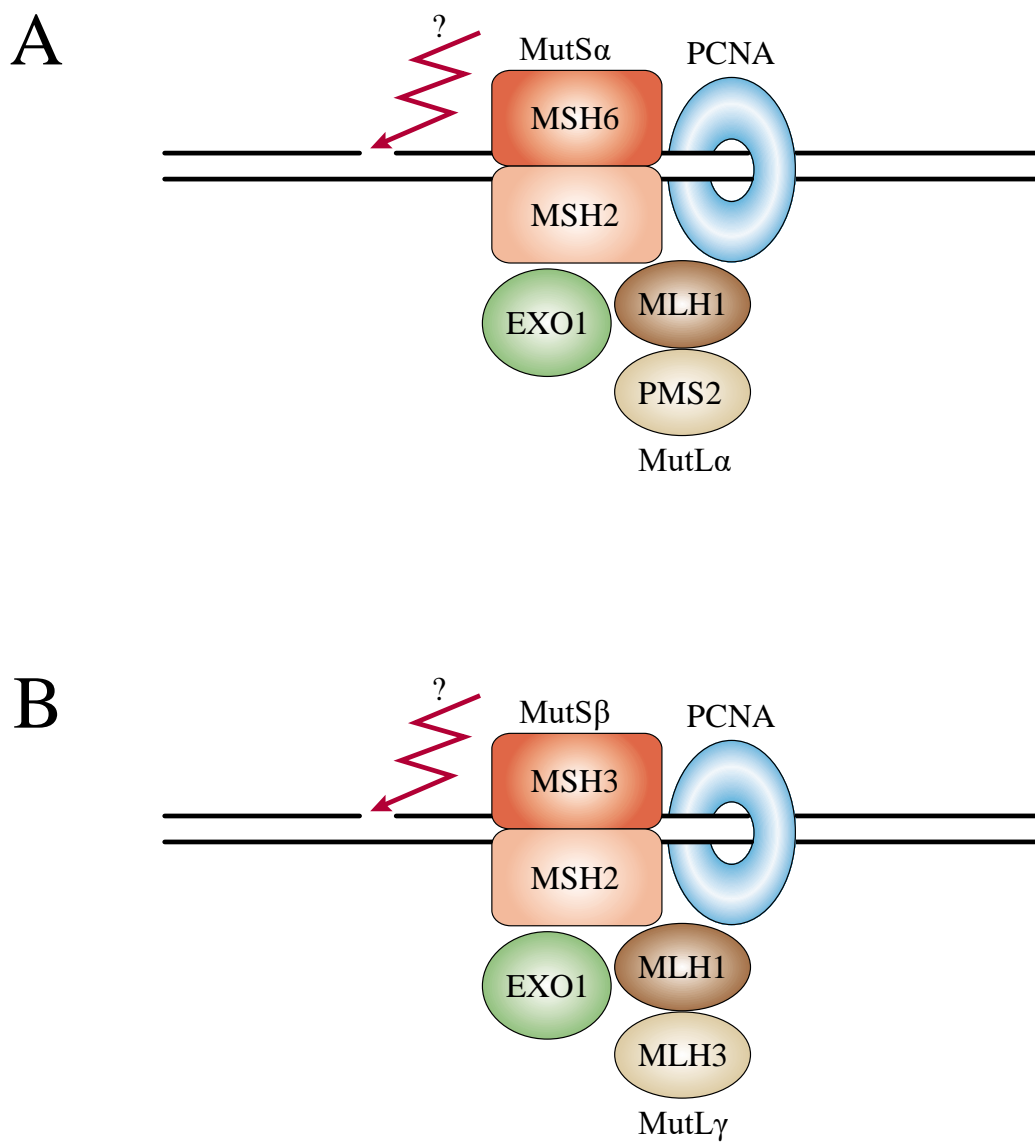


Fig. 3

Case 49

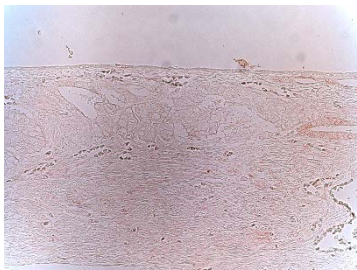
Case 123

Case 259

MLH1



Negative

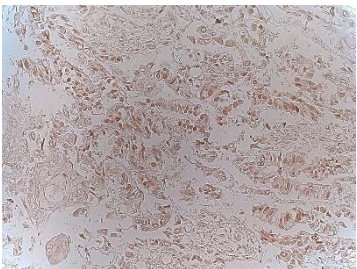


Negative

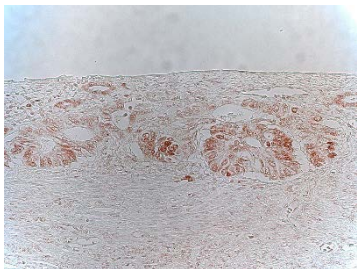


Positive

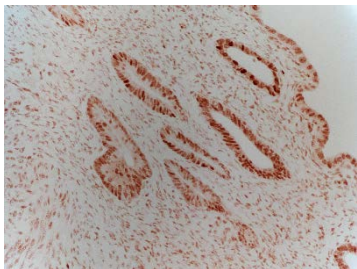
MSH2



Positive



Positive

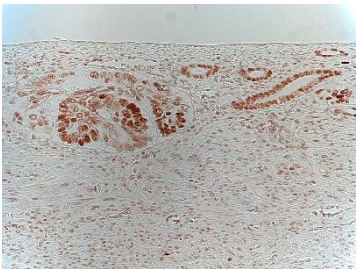


Positive

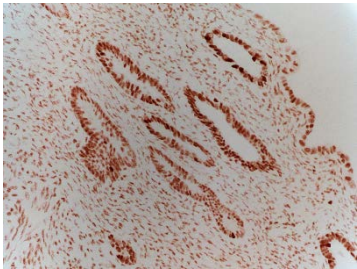
MSH6



Negative

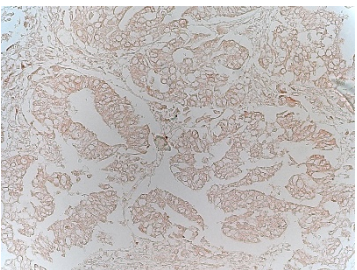


Positive

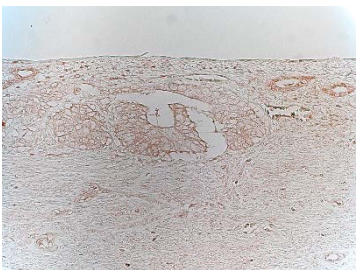


Positive

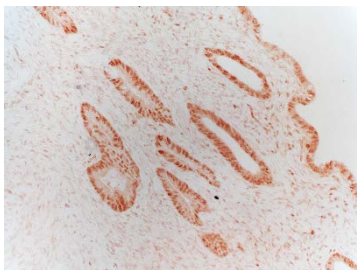
PMS2



Negative

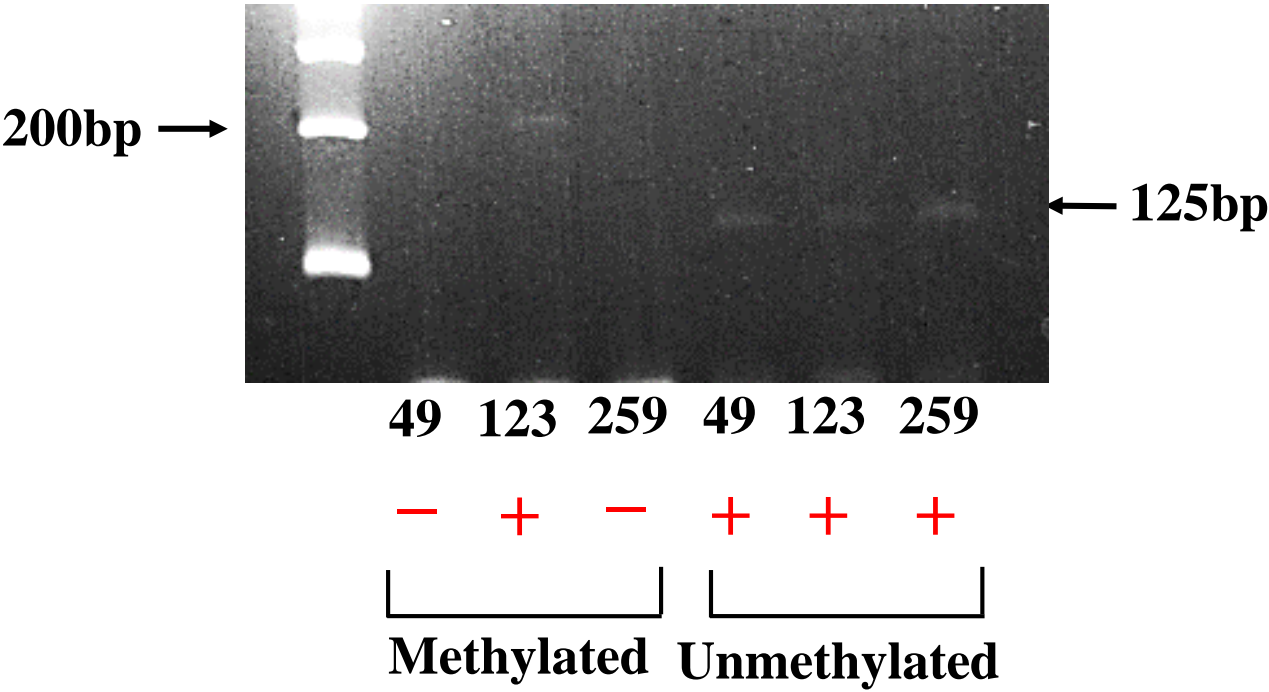


Negative



Positive

Fig. 4



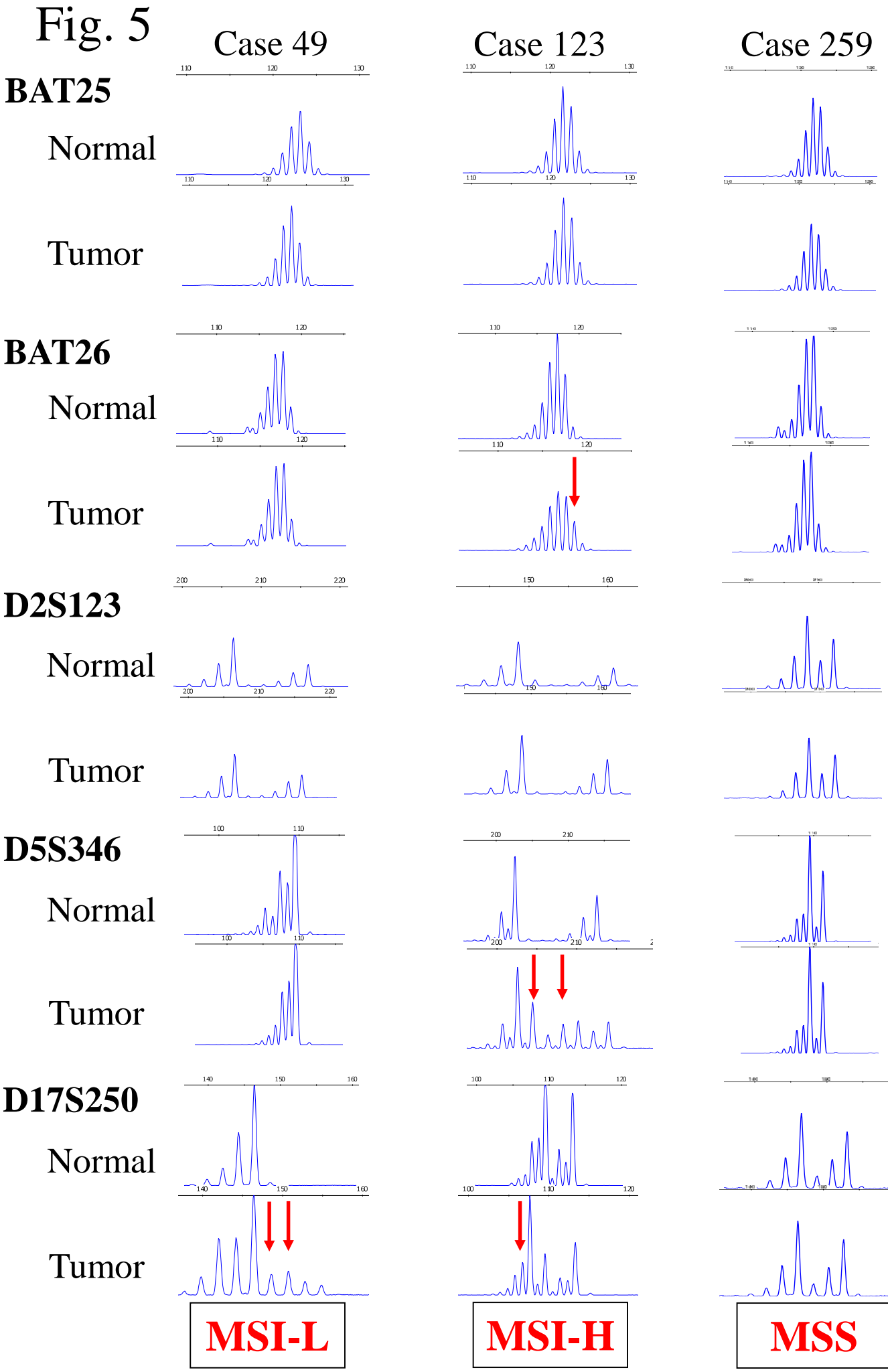


Fig. 6

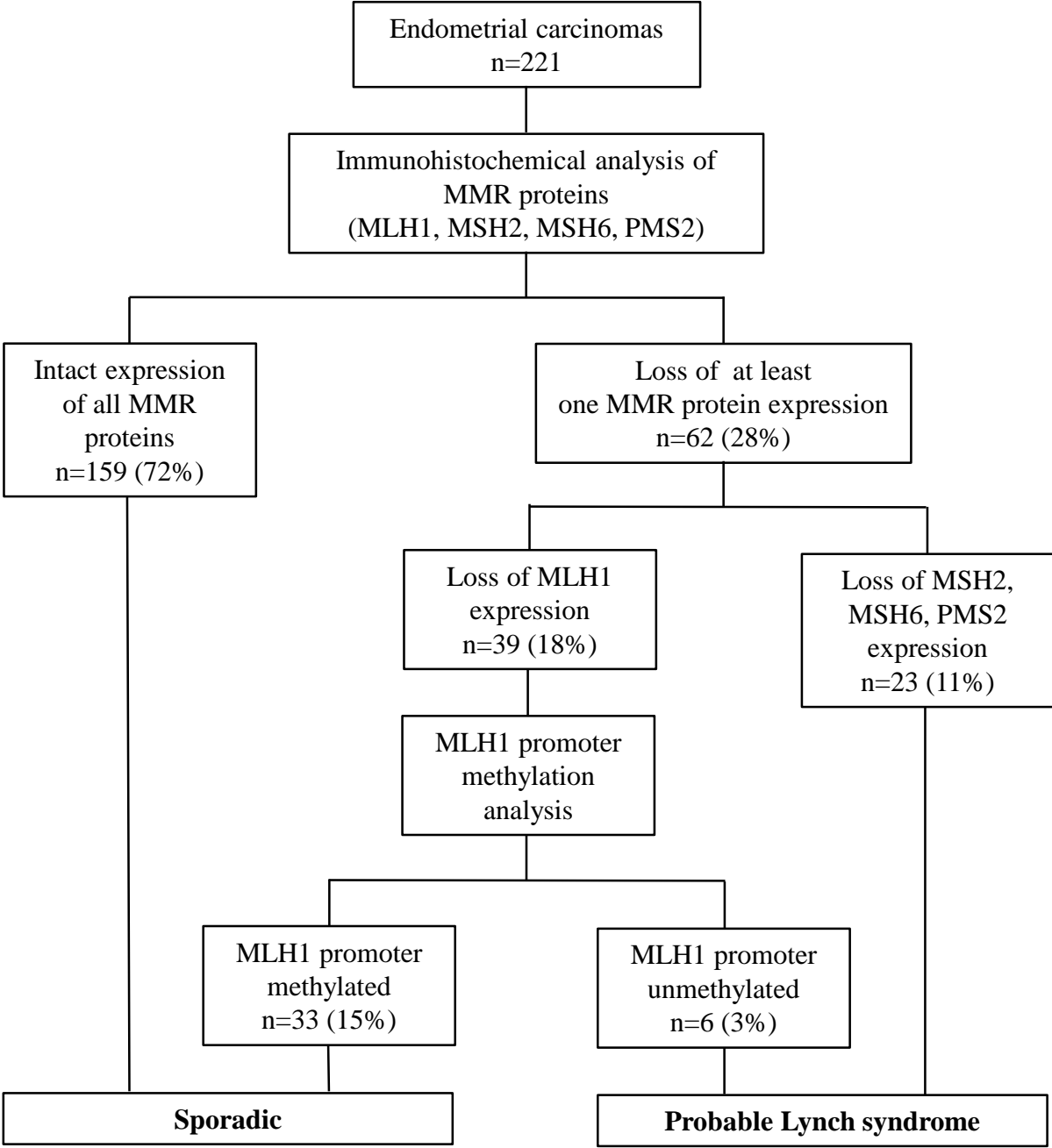


Fig. 7

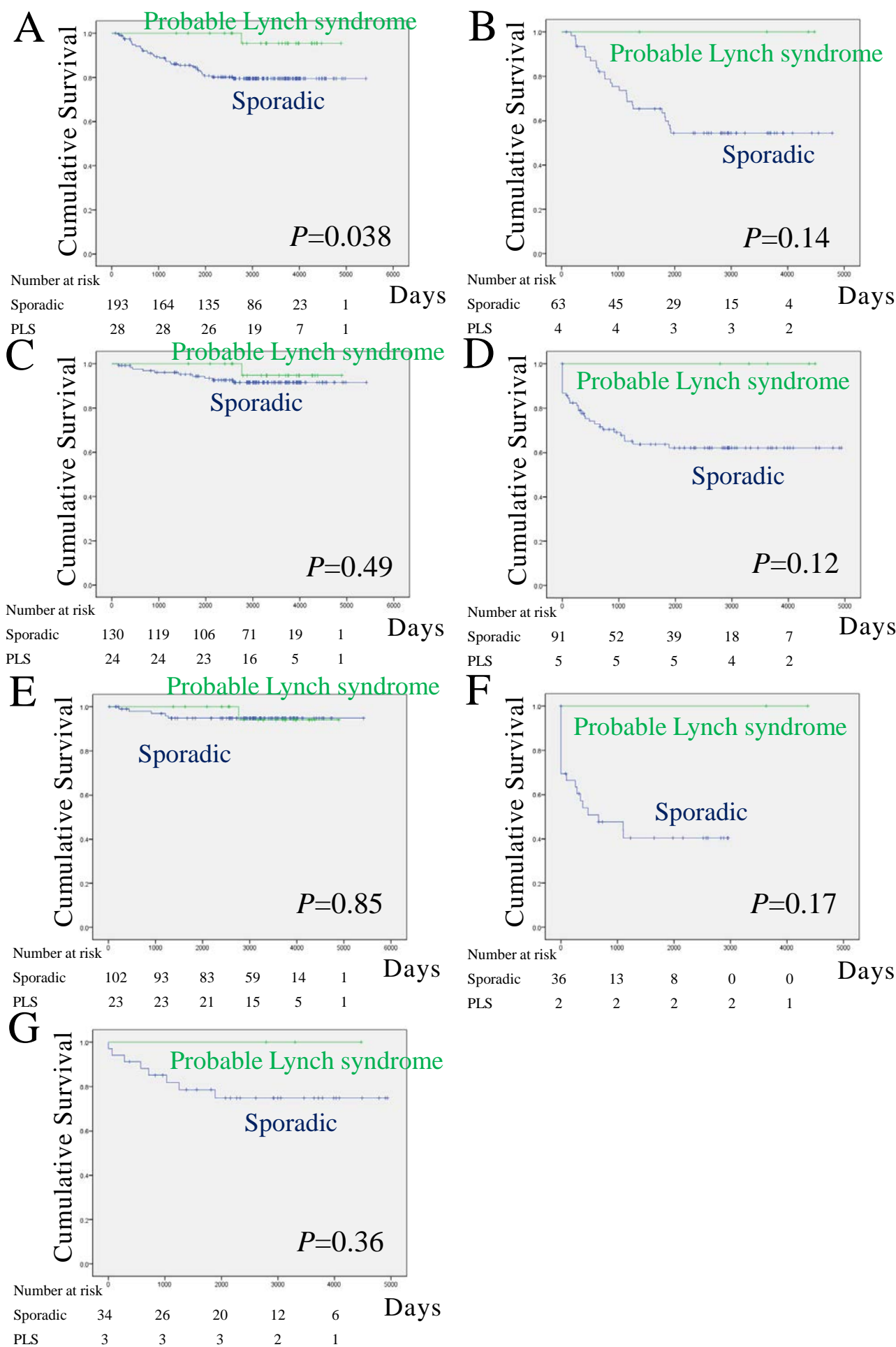


Table 1. Patient characteristics

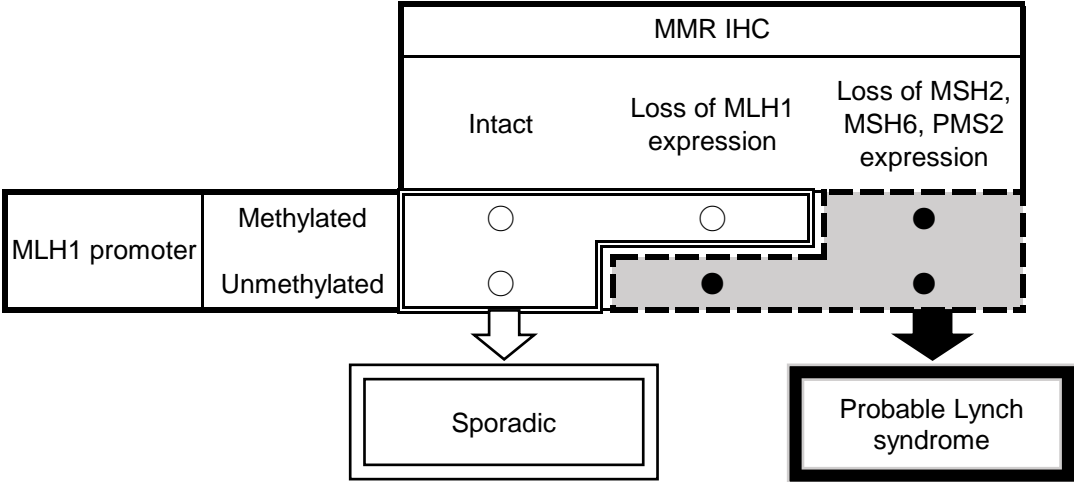
Characteristic	Number (n=221)	%
Median age (range)	57.4 (26-84)	
Median BMI (kg/m range)	23.9 (17.0-43.9)	
FIGO stage		
I	128	58
Ia	22	10
Ib	76	34
Ic	30	14
II	26	12
IIa	10	5
IIb	16	7
III	43	19
IIIa	20	9
IIIc	23	10
IV	24	11
IVa	2	1
IVb	22	10
Histotype		
Endometrioid	196	89
G1	115	52
G2	56	25
G3	25	11
Serous	12	5
Adenosquamous	4	2
Clear cell	4	2
Poorly differentiated	1	0
Undifferentiated	1	0
Mixed epithelial	3	1
Myometrial invasion>1/2	81	37
Lymphovascular space invasion	84	38
Carcinoma of the lower uterine segment	13	6
Primary treatment		
Surgery	221	100
Lymphadenectomy	171	77
Lymphnode sampling	21	10
Lymphnode not removed	29	13
Adjuvant chemotherapy	60	27
TC	55	25
CAP	4	2
Adjuvant radiotherapy	58	26
Lynch syndrome-associated multiple cancer	15	7

Abbreviations: FIGO=International Federation of Gynecology and Obstetrics; TC=paclitaxel and carboplatin combination; CAP=cyclophosphamide, doxorubicin, and cisplatin combination.

Table 2. Primer sequences for the Bethesda markers

Locus symbol	Location	Forward primer sequences (5'→3')	Reverse primer sequences (5'→3')	size (bp)
BAT25	4q12	TCGCCTCCAAGAATGTAAGT	TCTGGATTTTAACTATGGCTC	124
BAT26	2p16.3-p21	TGACTACTTTTGACTTCAGCC	AACCATTCAACATTTTAAACC	117-130
D2S123	2p22.3-p16.1	AAACAGGATGCCTGCCTTTA	GGACTTTCCACCTATGGGAC	197-227
D5S346	5q21-22	ACTCACTCTAGTGATAAATCGGG	AGCAGATAAGACAGTATTACTAGTT	96-122
D17S250	17q11.2-q12	GGAAGAATCAAATAGACAAT	GCTGGCCATATATATTTTAAACC	151-169

Table 3. Categorization based on results of IHC and MS-PCR



Abbreviations: IHC=immunohistochemistry; MMR=mismatch repair.

Table 4. Results of IHC expression

MMR IHC				Number
MLH1	PMS2	MSH2	MSH6	
N	N	P	P	36 (16%)
P	N	P	P	2 (9%)
P	P	N	N	7 (3%)
P	P	P	N	13 (6%)
N	N	N	N	1 (0.5%)
P	N	N	N	1 (0.5%)
N	N	P	N	1 (0.5%)
N	P	P	N	1 (0.5%)
Total number of deficient MMR cases				62 (28%)

Abbreviations: IHC=immunohistochemistry; MMR=mismatch repair; P=positive; N=negative

Table 5. Relationships between results of IHC and MMR analyses

MMR IHC	MSI-H	MSI-L	MSS	<i>P</i> -value
Intact	1 (0.5%)	1 (0.5%)	157 (71%)	1.6E-07
Deficient	39 (18%)	6 (3%)	17 (8%)	
PLS	15 (7%)	4 (2%)	9 (4%)	1.2E-06
Sporadic	25 (11%)	3 (2%)	165 (74%)	
MLH1 IHC	MLH1 promoter			<i>P</i> -value
	Methylated	Unmethylated		
Positive	36 (16%)	146 (66%)		2.2E-15
Negative	33 (15%)	6 (3%)		

Abbreviations: IHC=immunohistochemistry; MMR=mismatch repair; MSI=microsatellite instability; MSS=microsatellite stable; PLS=probable Lynch syndrome.

Table 6. Results of IHC and MLH1 MS-PCR

Expression	Negative PTEN	<i>P</i> -value	Positive p53	<i>P</i> -value
MLH1				
Negative (n=39)	32 (82%)	0.034	2 (5%)	0.021
Positive (n=182)	120 (66%)		35 (19%)	
PMS2				
Negative (n=42)	36 (86%)	0.005	2 (5%)	0.012
Positive (n=179)	116 (64%)		35 (20%)	
MSH2				
Negative (n=9)	8 (89%)	0.170	1 (11%)	0.538
Positive (n=212)	144 (68%)		36 (17%)	
MSH6				
Negative (n=24)	20 (83%)	0.077	2 (8%)	0.193
Positive (n=197)	132 (67%)		35 (18%)	
MMR				
Defecient (n=62)	52 (84%)	0.002	4 (6%)	0.006
Intact (n=159)	100 (63%)		33 (21%)	
MLH1 promoter				
Methylated (n=69)	54 (78%)	0.028	6 (9%)	0.021
Unmethylated (n=152)	98 (65%)		31 (20%)	
Sporadic/PLS				
Sporadic (n=193)	128 (66%)	0.027	35 (18%)	0.113
PLS (n=28)	24 (86%)		2 (7%)	

Abbreviations: IHC=immunohistochemistry; MS-PCR=methylation-specific PCR; MMR=mismatch repair; PLS=probable Lynch syndrome.

Table 7. Relationships between clinicopathologic variables and results of MMR analyses

Clinicopathologic variables	MMR			MLH1 promoter			Sporadic/ PLS		
	Deficient n=62	Intact n=159	P-value	Methylated n=69	Unmethylated n=152	P-value	Sporadic n=193	PLS n=28	P-value
Age≥60	15 (24%)	73 (46%)	0.002	20 (29%)	68 (45%)	0.018	83 (43%)	5 (18%)	0.008
Pre-menopopause	15 (24%)	48 (30%)	0.21	24 (35%)	39 (26%)	0.11	55 (29%)	8 (29%)	0.58
Null Parity	4 (6%)	33 (21%)	0.006	9 (13%)	28 (18%)	0.21	35 (18%)	2 (7%)	0.11
BMI>30	4 (6%)	26 (16%)	0.037	14 (20%)	16 (11%)	0.044	30 (16%)	0 (0%)	0.01
Hypertension	13 (21%)	60 (38%)	0.012	23 (33%)	50 (33%)	0.53	67 (35%)	6 (21%)	0.12
Hyperlipidemia	4 (6%)	15 (9%)	0.34	7 (10%)	12 (8%)	0.38	18 (9%)	1 (4%)	0.27
Diabetes	10 (16%)	35 (22%)	0.22	18 (26%)	27 (18%)	0.11	43 (22%)	2 (7%)	0.05
Endometrioid (vs. Non-endometrioid)	56 (90%)	140 (88%)	0.41	66 (96%)	130 (86%)	0.019	173 (90%)	23 (82%)	0.19
G3	9 (15%)	16 (10%)	0.24	11 (16%)	14 (9%)	0.11	24 (12%)	1 (4%)	0.14
MI>1/2	22 (35%)	59 (37%)	0.48	29 (42%)	52 (34%)	0.17	76 (39%)	5 (18%)	0.02
LVI	27 (44%)	57 (36%)	0.18	27 (39%)	57 (38%)	0.47	73 (38%)	11 (39%)	0.52
LUS	2 (3%)	11 (7%)	0.24	2 (3%)	11 (7%)	0.17	11 (6%)	2 (7%)	0.51
FIGO stage I	39 (63%)	89 (56%)	0.22	39 (57%)	89 (59%)	0.45	107 (55%)	21 (75%)	0.04
FIGO stage III-IV	18 (29%)	49 (31%)	0.47	22 (32%)	45 (30%)	0.42	63 (33%)	4 (14%)	0.03
Lynch syndrome-associated multiple cancer	8 (13%)	7 (4%)	0.03	5 (7%)	10 (7%)	0.53	8 (4%)	7 (25%)	0.001

Abbreviations: MMR=mismatch repair; PLS=probable Lynch syndrome; BMI=body mass index; MI=myometrial invasion; LVI=lymphovascular space invasion; LUS=carcinoma of the lower uterine segment; FIGO=International Federation of Gynecology and Obstetrics.

Lynch syndrome-associated multiple cancers include colorectal, endometrial, gastric, small bowel, ovarian, pancreatic, ureter and renal pelvic, biliary tract, and brain (glioblastoma in Torcot syndrome), sebaceous gland adenomas, and keratoacanthomas in Muir-Torre syndrome.

Table. 8. Characteristics of 28 cases which were categorized as PLS.

Case	Age	Loss of MMR protein (IHC)	MSI	Patho	Grade	Stage	Multiple cancer
1	50	MLH1/ PMS2	MSI-H	E	1	1b	–
2	56	MLH1/ PMS2	MSI-L	E	2	1b	–
3	57	MLH1/ PMS2	MSS	E	2	3a	–
4	57	MLH1/ PMS2	MSI-H	AS	2	1b	BC (58yo)
5	65	MLH1/ PMS2/ MSH6	MSI-L	E	1	3a	BC (65yo)
6	47	MLH1/ PMS2/ MSH2/ MSH6	MSI-H	E	3	1c	CC (50yo)
7	56	PMS2	MSI-H	E	2	1b	–
8	58	PMS2	MSI-L	S	–	1b	LC (66yo)
9	56	PMS2/ MSH6	MSS	E	1	1b	–
10	51	PMS2/ MSH2/ MSH6	MSI-H	E	1	1b	CC (55yo)
11	39	MSH2/ MSH6	MSS	E	1	1b	CC (37yo)
12	42	MSH2/ MSH6	MSI-H	E	1	1c	CC (48yo)
13	53	MSH2/ MSH6	MSI-L	E	2	1a	CC (58yo)
14	54	MSH2/ MSH6	MSI-H	E	2	1b	–
15	59	MSH2/ MSH6	MSI-H	E	1	1b	–
16	62	MSH2/ MSH6	MSI-H	E	1	1b	CC (61yo)
17	50	MSH6	MSS	E	2	1b	–
18	51	MSH6	MSI-H	E	1	2b	–
19	52	MSH6	MSS	E	1	1a	–
20	53	MSH6	MSI-H	E	2	1c	–
21	54	MSH6	MSI-H	AS	2	2b	–
22	55	MSH6	MSI-H	E	2	1a	–
23	55	MSH6	MSS	E	1	1a	CC (63yo)
24	56	MSH6	MSS	E	1	3c	–
25	57	MSH6	MSS	AS	2	1b	–
26	69	MSH6	MSS	E	2	1a	–
27	78	MSH6	MSI-H	C	–	2b	–
28	84	MSH6	MSI-H	E	1	3a	–

Abbreviations: PLS=probable Lynch syndrome; IHC=immunohistochemistry; MMR=mismatch repair; MSI=microsatellite instability; MSS=microsatellite stable; E=Endometrioid; AS=Adenosquamous; S=Serous; C=Clear cell; BC=Breast cancer; CC=Colon cancer; LC=Lung cancer; yo=years old

Table 9. Univariate analysis of PLS vs . Sporadic for OS/DFS in patient subsets

Prognostic factor	Subset	HR	95% CI	<i>P</i> -value
PLS (vs. Sporadic) for OS	Advanced-stage	0.044	0-23.57	0.33
	Early-stage	0.49	0.063-3.83	0.50
	Any AdjTx received	0.045	0-20.29	0.32
PLS (vs. Sporadic) for DFS	No AdjTx received	0.81	0.095-6.97	0.85
	AdjCTx alone	0.043	0-66.24	0.40
	AdjRTx alone	0.043	0-1303.24	0.55

Abbreviations: PLS=probable Lynch syndrome; OS=overall survival; DFS=disease-free survival; HR=hazard ratio; 95% CI=95% confidence interval; AdjTx=adjuvant therapy; AdjCTx=adjuvant chemotherapy; AdjRTx=adjuvant radiotherapy.

Table 10. Multivariate analysis of favorable prognostic factors for overall survival

Prognostic factor	HR	95% CI	P-value
PLS (vs. Sporadic)	2.0E-06	0-∞	0.97
Age <60 (vs. ≥60)	0.94	0.49-1.80	0.85
Endometrioid (vs. Non-endometrioid)	0.23	0.11-0.50	1.9E-04
G1 (vs. Others)	0.61	0.29-1.32	0.21
MI ≤1/2 (vs. >1/2)	1.01	0.44-2.32	0.97
LVI absent (vs. present)	0.93	0.47-1.82	0.82
FIGO stage I/II (vs. III/IV)	0.35	0.15-0.85	0.02
AdjTx not recieved (vs. recieved)	0.19	0.05-0.74	0.017

Abbreviations: HR=hazard ratio; 95% CI=95% confidence interval;
 PLS=probable Lynch syndrome; MI=myometrial invasion;
 LVI=lymphovascular space invasion; FIGO=International Federation of
 Gynecology and Obstetrics.

Table 11. Comparison of our results to similarly designed, unselected endometrial carcinomas studies

	Present study n=221	Bruegl AS, et al n=408	Backes FJ, et al n=140	Leenen CH, et al n=179	Mills AM, et al n=605
% IHC loss	28	29	21	24	23
% MLH1 loss	18	22	17	18	16
% MLH1 methylated	85	83	NP	97	98
% PLS	13	11	6.7-10.1	6	7
% Lynch syndrome	NP	NP	NP	70	81

Abbreviations: IHC=immunohistochemistry; PLS=probable Lynch syndrome; NP=not performed