

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：12501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06098

研究課題名(和文) 家族性大腸癌の層別化に基づく発癌分子機構の解明

研究課題名(英文) Two subtypes of colorectal tumor with distinct molecular features in familial adenoma polyposis

研究代表者

高根 希世子 (Takane, Kiyoko)

千葉大学・大学院医学研究院・特任助教

研究者番号：60756112

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：家族性大腸線腫症(FAP)は詳細な発癌分子機構が未だ解明されていない。今回我々はFAP14症例から計127個の検体を採取し、腫瘍の層別化を行った。散発性大腸癌に認めるBRAF変異・DNA高メチル化はFAP腫瘍には認めず、FAP腫瘍はKRAS変異(+)中メチル化群とKRAS変異(-)低メチル化群の2群に大別された。また同じAPC変異を持つ同一家系内においても、あるいは同一症例における異なる結腸部位においても、2つのサブタイプによる腫瘍形成を認めた。FAPの発癌には少なくとも2つの分子経路が存在し、その発癌機構は散発性大腸癌と類似し、サブタイプ形成には胚細胞性変異の有無に関連しないことが示された。

研究成果の概要(英文)：Familial adenomatous polyposis (FAP) tumors is yet to be well investigated. Here, we investigated FAP, through quantitative methylation analysis of 127 samples using 20 methylation markers we previously established, APC, BRAF, and KRAS mutation analysis. FAP tumors lacked BRAF mutation(+) high methylation epigenotype and were classified into two methylation epigenotypes. While 24 of 112 tumor samples showed intermediate methylation epigenotype significantly correlating with KRAS mutation(+), 88 tumor samples showed low methylation epigenotype correlating with the absence of KRAS and BRAF mutations. Whereas some patients showed a single epigenotype in all tumors throughout the colon, tumors with two distinct epigenotypes developed within a family with the same APC mutation or even within one patient. These results indicate that there are at least two distinct molecular subtypes of FAP tumors, resembling sporadic colorectal cancer and independent from the APC germline mutation status.

研究分野：癌エピジェネティクス

キーワード：家族性大腸線腫症 大腸癌 大腸線腫症 DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

(1)大腸癌層別化

大腸癌は網羅的なゲノム情報によりいくつかのサブタイプに分類され(Calon *et al*, *Nature Genet*, 2015)、それぞれ異なった分子異常により発癌する、発癌経路の異なった癌と考えられる。我々は大腸癌においてメチル化DNA免疫沈降法による網羅的解析を行い、60個のメチル化マーカーを樹立、臨床大腸癌症例149検体を階層的クラスタリングで層別化し、大腸癌の3群のエピジェノタイプ (Low-methylation epigenotype:LME, Intermediate-methylation epigenotype:IME, High-methylation epigenotype:HME)の存在を明らかにしている(Yagi *et al*, *Clin Cancer Res*, 2010) (図1)。このような層別

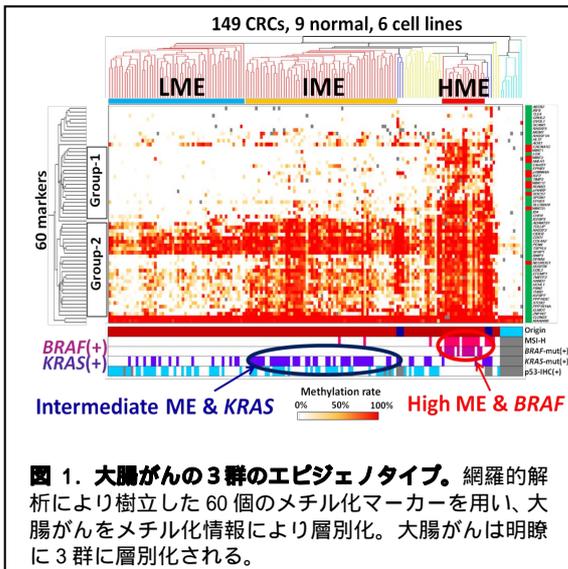


図1. 大腸がんの3群のエピジェノタイプ。網羅的解析により樹立した60個のメチル化マーカーを用い、大腸がんをメチル化情報により層別化。大腸がんは明瞭に3群に層別化される。

化は癌化機構の解明に役立つばかりではなく、マーカーを樹立し、予後診断、存在診断などの臨床現場へ直接応用することが可能である。

(2)家族性大腸癌

このような利点があるにもかかわらず、ほぼ100%と極端に発癌リスクの高い家族性大腸ポリポーシスについては、詳細な層別化は行われていない。その高い大腸癌発症率(100%)を考慮すると発癌分子機構は未解明のまま放置されているに等しい(Renkonen *et al*, *J Clin Oncol*, 2005)(Wynter *et al*, *Int J Cancer*, 2006)。発症年齢、特異的遺伝子など、層別化により得られる情報は多いと考えられ、上記を含む家族性大腸癌に対し、網羅的解析により層別化することは急務であるといえる。

2. 研究の目的

家族性大腸ポリポーシスは臨床的に診断がつきやすく、APC遺伝子、KRAS遺伝子、TP53遺伝子といった遺伝子が段階を追っ

て変異し大腸癌へと進むという見解が周知のことであるが、診断された症例の20%はAPC陰性であり、LOHも症例の60%にとどまっている。家族性大腸ポリポーシスを層別化し、各サブタイプで要求される分子異常など発癌分子機構の詳細な解明、未知の胚細胞性遺伝子変異の解明を行い、極端に大腸癌発症率の高い家族性大腸ポリポーシスに対する対策を行う。

3. 研究の方法

(1)臨床検体準備

千葉大学消化器外科、埼玉県立がんセンター腫瘍・予防科において外科的に摘出された家族性大腸ポリポーシス手術検体14症例の検体127検体(腺腫96、癌16、非腫瘍粘膜15)を対象とした。腫瘍部分をレーザーマイクロダイセクションにより回収しRNA、DNAを抽出した。核酸抽出した切片の連続切片を用いて、TP53、CTNNB1などの免疫組織化学染色を行った。

(2) DNAメチル化定量的解析

我々が以前に樹立した大腸癌メチル化マーカー60個を用いて、パイロシーケンスにより定量的メチル化解析を行い、階層的クラスタリングによりメチル化網羅的解析を行った。さらに、免疫染色、患者の臨床病理学的因子との相関を解析した。

4. 研究成果

(1) 家族性大腸ポリポーシスには2つのサブタイプが存在

家族性大腸ポリポーシス患者より採取した127個の検体を用い、定量的メチル化解析、遺伝子変異解析によりFAPの層別化を施行した。KRAS遺伝子変異の解析では、FAPは2群に層別化が可能であり、散発性大腸癌と類似した特徴[Yagiら, *Clin Cancer Res*, 2010]を有していた(図2)。

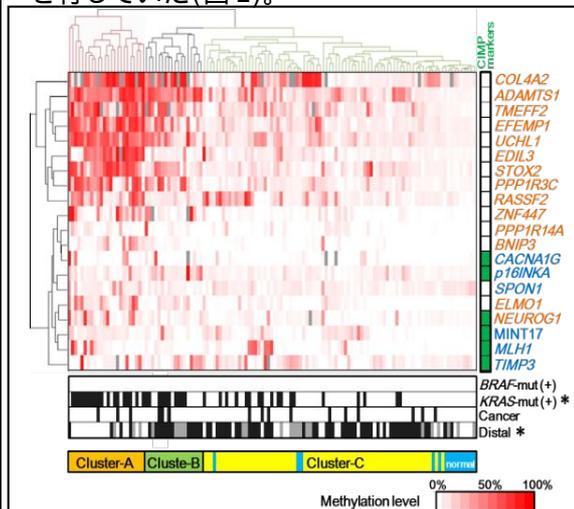


図2. 家族性大腸ポリポーシスの2つのサブタイプ層別化。FAPはKRAS変異を軸とした形で2群に層別化された。

(2) 家族性大腸ポリポーシス腫瘍の変異導入期

CTNNB1 活性化や KRAS 変異の発生時期も散発性大腸癌と類似していた(図3)。

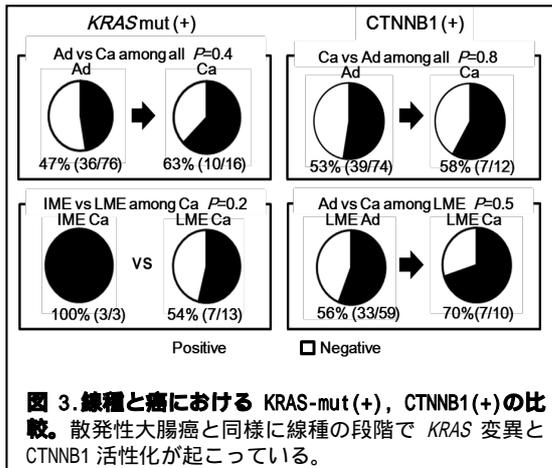


図3. 線種と癌における KRAS-mut(+), CTNNB1(+)の比較。散発性大腸癌と同様に線種の段階で KRAS 変異と CTNNB1 活性化が起こっている。

しかしながら、散発性大腸癌の鋸歯状経路発癌で見られる BRAF 変異陽性高メチル化群は FAP では認められなかった(図2)。BRAF 変異の症例が FAP では極めて少ないという解析結果より、DNA メチル化解析結果を複合させた層別化概念に関しても、FAP においては散発性大腸癌とは異なるユニークな層別化が可能であることが示唆された。

(3) FAP 患者個々の特徴

さらに、同じ APC 変異を持つ同一家系内においても、あるいは同一症例における異なる結腸部位においても、2つの分子サブタイプによる腺腫形成・発癌を認めた(図4)。

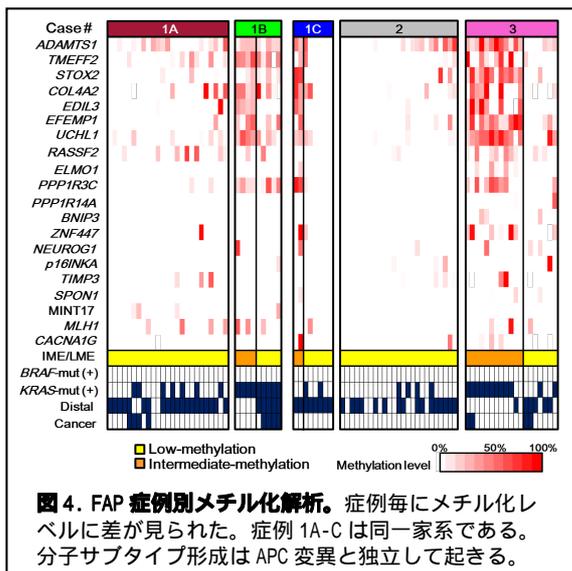


図4. FAP 症例別メチル化解析。症例毎にメチル化レベルに差が見られた。症例 1A-C は同一家系である。分子サブタイプ形成は APC 変異と独立して起きる。

このことは FAP の分子サブタイプ形成が APC 変異と独立して起きることを示唆している。実際に遺伝子毎に網羅的に異常メチル化の蓄積と年齢、結腸部位について相関を確認したところ、高齢・右側結腸と有意に相関していた(図5)。

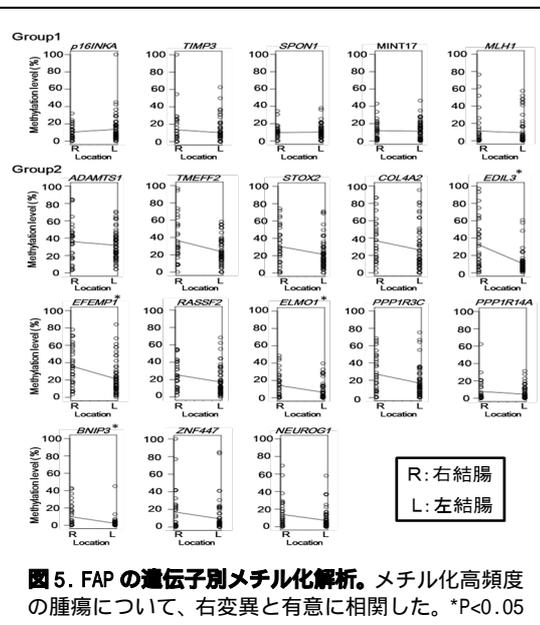


図5. FAP の遺伝子別メチル化解析。メチル化高頻度の腫瘍について、右変異と有意に相関した。*P<0.05

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Takane Kiyoko, Matsusaka Keisuke, 他 13 名. Two subtypes of colorectal tumor with distinct molecular features in familial adenomatous polyposis. *Oncotarget*, 7:84003-84016, 2016 査読有 doi:10.18632/oncotarget.11510

Sakai Eigi, Takane Kiyoko, 他 8 名 6 番目. TP53 mutation at early stage of colorectal cancer progression from two types of laterally spreading tumors. *Cancer Sci*, 107:820-827, 2016 査読有

Sakai Eigi, Takane Kiyoko, 他 12 名 7 番目. Genetic and epigenetic aberrations occurring in colorectal tumors associated with serrated pathway. *Int J Cancer*, 138:1634-1644, 2015 査読有

Kaneda Atsushi, Takane Kiyoko. Molecular alterations accumulated during colorectal carcinogenesis and hereditary colorectal cancer. *Jpn J Genet Council*, 36:125-130, 2015 査読無

[学会発表](計4件)

高根希世子. 家族性大腸ポリポーシスの層別化. 再生システムと疾患・癌エピゲノム公開シンポジウム, 2016年9月15日, 千葉大学亥鼻キャンパス同窓会館(千葉県千葉市)

高根希世子. NRAS 変異陽性大腸癌のメチル化サブタイプと臨床的特徴. 第

75 回日本癌学会学術総会, 2016 年 10 月 7 日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

高根希世子. DNA メチル化情報による遺伝性大腸癌の層別化. 第 70 回日本消化器外科学会総会, 2015 年 7 月 15 日, アクトシティ浜松(静岡県浜松市)

高根希世子. DNA メチル化情報による遺伝性大腸癌の層別化. 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015 年 10 月 9 日, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕(計 0 件)

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高根 希世子 (TAKANE, Kiyoko)
千葉大学・大学院医学研究院・特任助教
研究者番号: 60756112

(2) 研究分担者

なし ()
研究者番号: