

平成30年6月22日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10152

研究課題名(和文) 次世代シーケンサーを用いた統合解析による大腸癌肝転移に関するゲノム解析

研究課題名(英文) Integrated analysis on the metastasis of colorectal cancer using next generation sequence

研究代表者

緑川 泰 (MIDORIKAWA, Yutaka)

日本大学・医学部・准教授

研究者番号：10292905

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：116例の大腸癌サンプルについて発現データ及びDNAメチル化についての統合解析を行った。まず、発現データでは大腸癌患者は3つのクラスター(Cluster-1, -2, -3)に分類され、5年生存率はそれぞれ74.8%、29.2%、29.4%であった。次にDNAメチル化状態により各クラスターは二つのサブグループに分類され、特にCluster-1Hの5年生存率(36.8%)はCluster-1L(96.1%)と比較して有意に予後不良であった。さらに発現データとメチル化状態によるネットワーク解析によりPTX3がCluster-1Hにおいて強くメチル化されていることが示された。

研究成果の概要(英文)：High-throughput biological technologies have been producing a vast amount of multi-omics data regarding cancer genomics. We performed integrated analysis using gene expression and DNA methylation profiles of 116 colorectal cancer samples. First, based on gene expression values, colorectal cancer samples were divided into three clusters (Cluster-1, -2, and -3). The 5-year overall survival rates were 74.8%, 29.2%, and 29.4% in Cluster-1, -2, and -3, respectively. Second, each cluster was divided into two subgroups based on methylation status, and the 5-year overall survival rate of Cluster-1H (36.8%) was significantly shorter than that of Cluster-1L (96.1%). Third, network-based analysis using expression and methylation profiles demonstrated that the PTX3 gene was highly methylated in Cluster-1H. These combined data indicate that integrated analysis can identify disease characteristics that would be missed using single comprehensive analysis.

研究分野：消化器外科学

キーワード：統合解析 ネットワーク解析 DNAメチル化 大腸癌 転移 次世代シーケンス

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 今世紀初頭にヒトゲノム全解読が終了して以降、次世代シーケンス技術の登場によってがんゲノム配列が次々と決定されており、ゲノム研究はいわゆるパーソナルゲノム時代を迎えている。すなわち新しい戦略に基づくサンプル調整技術、次世代シーケンサーのスループット、情報を知識に変えるバイオインフォマティクス技術の3つの要素が組み合わされた結果、シーケンサーから得られる情報にパラダイムシフトが起きた。

(2) 新しいシーケンス技術は、癌ゲノム解析にとって必須かつ共通の技術基盤となり、近い将来デジタルな情報によるゲノム・エピゲノム・トランスクリプトームの統合的な癌ゲノムの記述と解析が標準的なものとなり得る。ゲノムワイドな転写開始点の同定や遺伝子発現プロファイルを得ることが可能であり、現在遺伝子発現解析の主流となっているマイクロアレイ解析、エピゲノム解析はシーケンススペースの手法に移行すると考えられる。

### 2. 研究の目的

(1) 癌はゲノム・エピゲノム異常が多段階に蓄積することによって発生・進行するものと考えられる。これまでに発現プロファイリングによる癌患者の層別化・個別化医療のバイオマーカー開発が試みられたが、再現性などの諸問題が指摘されてきた。

(2) 一方で、様々な細胞内での影響を反映する遺伝子発現変化ではなく、発癌に本質的な染色体異常そのものを検出して発癌原因の解明を行い、それをマーカーとして用いて診断・治療を行うことがより確実な個別化医療に直結するものと考えられる。この手法は次世代シーケンサーにより現実のものとなりつつあり、本研究では塩基配列の記述による大腸癌発癌と肝転移の原因解明、及びそれに基づく診断・治療薬・予後予測・バイオマーカーの確立を目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 研究初年度は大腸癌及び同一患者から採取された30例について次世代シーケンサーによりエクソームの配列を決定する。これらのサンプルは大腸癌原発巣より肝への転移を個体差を差し引いて直接比較できるサンプルであり、責任遺伝子の絞り込みに適する。

(2) 平成28年度では3年間無再発生存する大腸癌患者50例とステージ4の大腸癌50例を含む他のサンプルについて、エクソンシーケンスによってエクソーム解析を行い、原発巣切除時における肝転移予測を行う。エクソン全長は全ゲノムの約1%を占めるに過ぎないが、蛋白翻訳領域であり、変異が疾患原因の85%を説明できると推定される。

(3) 最終年度ではエピゲノム異常についての解析を加え、大腸癌進展のメカニズムを包

括的に解明するとともに、分子標的治療薬候補遺伝子の同定、術後補助化学療法施行などの個別化医療を視野に入れたバイオマーカーの開発を行う。

### 4. 研究成果

#### (1) 患者背景

今回解析を行った患者116人について術後3年間以上外来で再発の有無についてフォローアップを行った(平均26.5か月、範囲:1-76か月)。57人は無再発生存、41人が同時性再発、18人が異時性再発であった。

#### (2) CpG core

26,328 CpG サイトより14,051 CpG coresの抽出が可能であった。190,593プローブを含み、内訳は96,834(50.8%)プローブがCpG Island、66,642(35.0%)プローブがNorth ShoreまたはSouth Shore、27,117(14.2%)プローブがNorth ShelfまたはSouth Shelfであった。

#### (3) 大腸癌患者の発現及びメチル化プロファイル

まず、発現プロファイルについてk-meansクラスタリングを行い3クラスター(Cluster 1, 2, 3)に分類された。Cluster 2で有意に肝転移の比率が高く5年生存率はそれぞれ74.8%、29.2%、29.4%であった( $P < 0.001$ )(図1)。

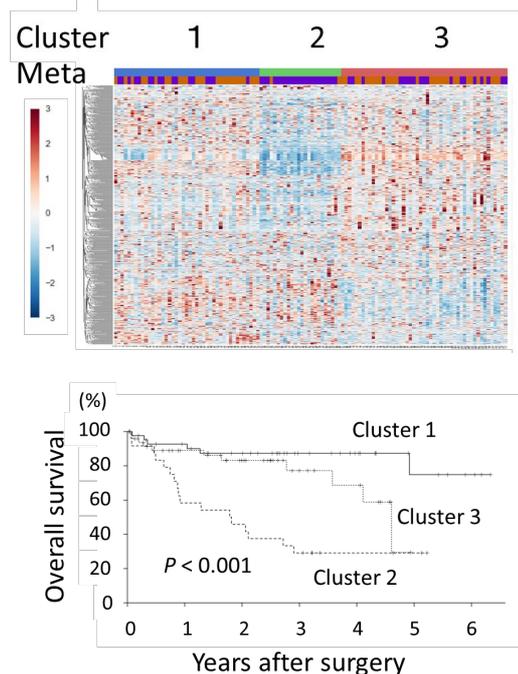


図1. 発現クラスターと全生存

一方で、メチル化プロファイルでは高メチル化と低メチル化群の2クラスター(Cluster H, L)に分類され、5年生存率はそれぞれ38.5%、57.4%であり( $P = 0.056$ )、CpG coreの高メチル化により全生存が短くなる傾向が認められた(図2)。

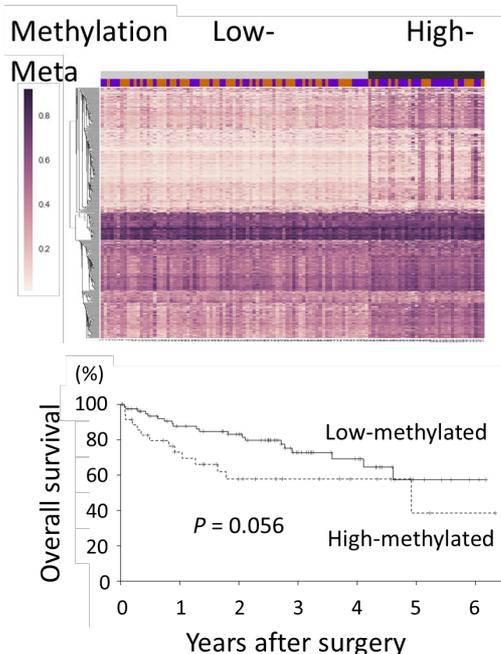


図2 . メチル化プロファイルと全生存

(4) 発現データとメチル化データの統合解析

次に発現データによる3クラスターをそれぞれメチル化状態により2つのサブグループに分類し、計6サブグループについての検討した (Cluster-1/-2/-3H [高メチル化群]、-1/-2/-3L [低メチル化群]) (図3)。

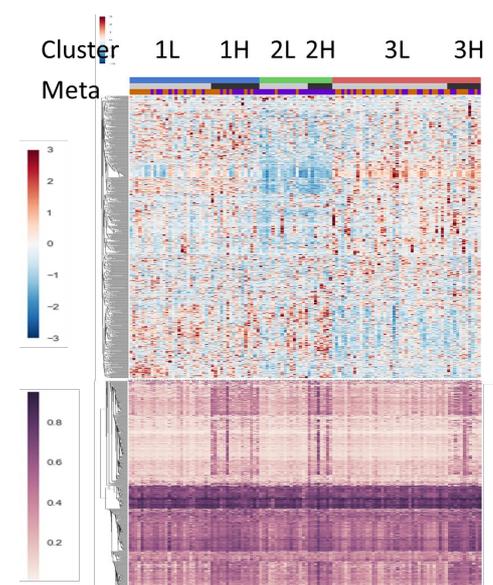


図3 . 発現及びメチル化による統合解析

生存率についてはCluster-1でメチル化の状態により全生存に有意な差を認めた (36.8% [1H] vs 96.1% [1L];  $P = 0.014$ ) (図4)。その一方で、Cluster-2, -3についてはメチル化状態による全生存の差は認められず、さらに各クラスターにおける発現プロファイルとメチル化プロファイルの偏りは認められなかった ( $P = 0.280$ )。

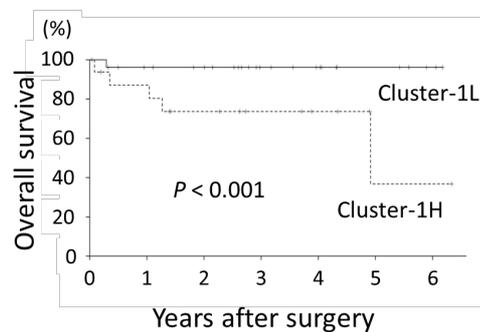


図4 . Cluster-1のメチル化による全生存

(5) 大腸癌肝転移における責任遺伝子の同定  
大腸癌肝転移の転移メカニズムを解明する目的で発現データについて GSEA を行い、遺伝子セット : GINESTIER\_BREAST\_CANCER\_20Q13\_AMPLIFICATION\_DN が Cluster-2 で有意に発現データしていることが分かった (図5)。

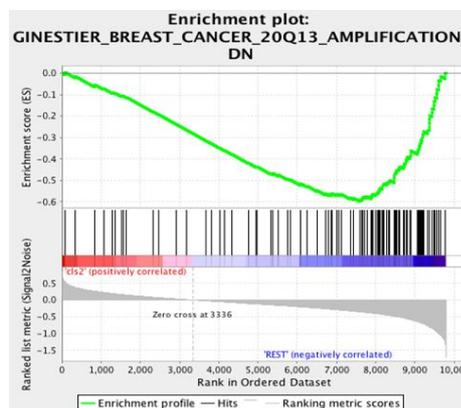


図5 . GSEA による遺伝子セットの同定

これらの遺伝子セットで、癌関連遺伝子である *RANBP2*, *RANGAP1*, *NUP107*, *NUP133* についてネットワーク解析を行ったところ、*PTX3* の高メチル化により肝転移が促進される可能性が認められた (図6)。

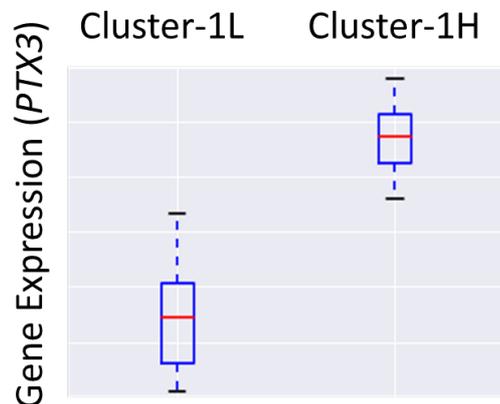


図6 . 大腸癌肝転移群における *PTX3* の高メチル化

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

Higaki T, Aramaki O, Moriguchi M, Nakayama H, Midorikawa Y, Takayama T. Arterial infusion of cisplatin plus S-1 against inoperable intrahepatic cholangiocarcinoma. *Biosci Trends*. 2018; 12: 73-78. (査読有)

DOI: 10.5582/bst.2017.01320

Higaki T, Yamazaki S, Mitsuka Y, Aoki M, Yoshida N, Midorikawa Y, Nakayama H, Takayama T. Neither ischemic parenchymal volume nor severe grade complication not correlate transient high transaminase elevation after liver resection. *Biosci Trends*. 2018; 12: 68-72. (査読有)

DOI: 10.5582/bst.2018.01004

Ohkubo T, Midorikawa Y, Nakayama H, Moriguchi M, Aramaki O, Yamazaki S, Higaki T, Takayama T. Liver resection of hepatocellular carcinoma in patients with portal hypertension and multiple tumors. *Hepatol Res*. 2018; 48: 443-41. (査読有)

DOI: 10.1111/hepr.13047

Mitsuka Y, Midorikawa Y, Abe H, Matsumoto N, Moriyama M, Haradome H, Sugitani M, Tsuji S, Takayama T. A prediction model for the grade of liver fibrosis using magnetic resonance elastography. *BMC Gastroenterol*. 2017; 17: 133. (査読有)

DOI: 10.1186/s12876-017-0700-z

Higaki T, Midorikawa Y, Nakashima Y, Nakayama H, Matsuoka S, Moriyama M, Sugitani M, Takayama T. Clinical correspondence to hepatocellular carcinoma-related lesions with atypical radiological pattern. *Biosci Trends*. 2017; 11: 340-5. (査読有)

DOI: 10.5582/bst.2017.01110

Abe H, Midorikawa Y, Mitsuka Y, Aramaki O, Higaki T, Matsumoto N, Moriyama M, Haradome H, Abe O, Sugitani M, Tsuji S, Takayama T. Predicting postoperative outcomes of liver resection by magnetic resonance elastography. *Surgery* 2017; 162: 248-55. (査読有)

DOI: 10.1016/j.surg.2017.02.014

Ichida A, Hasegawa K, Takayama T, Kudo H, Sakamoto Y, Yamazaki S, Midorikawa Y, Higaki T, Matsuyama Y, Kokudo N. Should energy devices be associated with clamp crushing method to improve liver parenchymal transection?: A two-center randomized controlled trial. *Br J Surg*. 2016; 103:

1795-803. (査読有)

DOI: 10.1002/bjs.10297

Tsuji S, Midorikawa Y, Seki M, Takayama T, Sugiyama Y, Aburatani H. Network-based analysis for identification of candidate genes for colorectal cancer progression. *Biochem Biophys Res Commun* 2016; 476: 534-40. (査読有)

DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.05

Ebisawa K, Midorikawa Y, Higaki T, Nakayama H, Tsuji S, Nishimaki H, Sugitani M, Moriyama M, Takayama T. Treatments for marginal lesions incidentally detected during the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Surgery* 2016; 160: 654-60. (査読有)

DOI: 10.1016/j.surg.2016.04.019

Kajiwara T, Midorikawa Y, Yamazaki S, Higaki T, Nakayama H, Moriguchi M, Tsuji S, Takayama T. Clinical score to predict the risk of bile leakage after liver resection. *BMC Surg*. 2016; 16: 30. (査読有)

DOI: 10.1186/s12893-016-0147-0

[学会発表](計 3 件)

緑川 泰、高山忠利、中山壽之、檜垣時夫、森口正倫、荒牧 修、山崎慎太郎 . 再発肝細胞癌における手術適応 . 第 79 回日本臨床外科学会 (東京) 2017.11.24  
阿部 勇人、緑川 泰、高山 忠利 . 肝細胞癌術前患者の MR エラストグラフィによる食道静脈瘤評価 . JDDW 2017 (福岡) 2017.10.12

緑川 泰、高山忠利、檜垣時夫、森口正倫、中山壽之、大久保貴生、金本 彰、荒牧 修、山崎慎太郎、青木 優 . 高度門脈腫瘍栓 (Vp3/4) を伴う進行肝細胞がんに対する外科治療 . 第 72 回日本消化器外科学会 (金沢) 2017.7.22

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

緑川 泰 (MIDORIKAWA, Yutaka)  
日本大学・医学部・准教授  
研究者番号: 10292905

(2)研究分担者

檜垣 時夫 (HIGAKI, Tokio)  
日本大学・医学部・准教授  
研究者番号: 70246883  
(平成 29 年度より研究分担者)