

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19059

研究課題名(和文) Distinct G protein-coupled receptors signaling pathway in the serrated neoplasia pathway and the conventional adenoma-carcinoma sequence of the colorectum

研究課題名(英文) Distinct G protein-coupled receptors signaling pathway in the serrated neoplasia pathway and the conventional adenoma-carcinoma sequence of the colorectum

研究代表者

村上 敬 (Murakami, Takashi)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：10568158

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：第1に、NGS解析ではserrated neoplasia pathwayにおいてGNAS変異は認められず、G蛋白共役受容体経路の関与は否定的であった。第2に内視鏡的検討では、SSA/Pは(亜)有茎性病変、2段隆起、陥凹、発赤の所見を認めた場合、Dysplasia/早期癌併存の可能性が考慮され、さらに拡大内視鏡を併用することで内視鏡的に正確に診断できる可能性が示された。第3に病理組織学的解析ではSSA/P由来の大腸癌は、通常型腺腫に由来する大腸癌と比較して小さい病変で深達度は浅いが、リンパ管侵襲やリンパ節転移が高率で、粘液癌を併存することも多いなど、異なる病理組織学的特徴を示すと考えられた。

研究成果の概要(英文)：First, NGS data analysis showed that all the studied SSA/Ps with dysplasia/carcinoma harbored no GNAS mutation, suggesting that serrated neoplasia pathway might not be associated with G-protein-coupled receptor protein signaling pathway. Second, our endoscopic studies indicated that endoscopic characteristics, including (semi)pedunculated morphology, double elevation, central depression, and reddishness, in addition to the use of magnifying endoscopy, might be useful to accurately diagnose advanced histology within an SSA/P. Third, histopathologically, carcinomas arising in SSA/P exhibited a higher potential for lymphatic invasion and lymph node metastasis and have distinct histopathological features, including mucinous component, serrated architecture, tumour-infiltrating lymphocytes, Crohn-like inflammatory reaction, and absence of desmoplastic reaction, compared to counterparts arising in conventional adenoma.

研究分野：消化器内科

キーワード：SSA/P 鋸歯状病変の癌化 異型を伴うSSA/P 癌併存SSA/P 内視鏡的特徴 組織学的特徴 GNAS

1. 研究開始当初の背景

かつて過形成性ポリープは非腫瘍であり治療の対象にならないと考えられていたが、1996年に Torlakovic らは過形成性ポリープの中に癌を併発する亜型が存在することを報告した。現在、World Health Organization (WHO) 分類では癌化のポテンシャルを有する病変として、この病変を sessile serrated adenoma/polyp (SSA/P) と定義し、鋸歯状病変の中でも過形成性ポリープとは別に分類している。分子生物学的には、SSA/P は *BRAF* 遺伝子変異、*MLH1* などミスマッチ修復遺伝子のメチル化、CpG island methylator phenotype (CIMP) などの特徴を有し、高度の microsatellite instability を示す大腸癌へと進行する serrated neoplasia pathway の前駆病変と考えられている。これは、*APC*、*KRAS*、*TP53* などの遺伝子異常が多段階的に積重することにより発生する conventional adenoma-carcinoma sequence とは異なる特徴が認められ、新たな大腸発癌経路として近年注目を浴びている。研究代表者は、これまで serrated neoplasia pathway と conventional adenoma-carcinoma sequence における Wnt/ β -catenin シグナル経路の活性化の違いについて報告し、後者では *APC* 遺伝子や *CTNNB1* 遺伝子の変異に伴う同シグナルの活性化が指摘されていたが、前者では遺伝子変異によるものではなく Wnt/ β -catenin シグナル関連因子である *AXIN2*、*MCC*、*SFRP4* 遺伝子のメチル化に起因することを明らかにした。

GNAS は刺激性 G 蛋白質の subunit (Gs) をコードする遺伝子で、Gs は cyclic AMP (cAMP) 産生を介して G 蛋白共役受容体経路におけるメディエーターとして機能する。*GNAS* 遺伝子異常に基づくシグナルの活性化が、粘液性腫瘍の発生、発育進展に関与することが示唆されている。近年、膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN) や虫垂粘液嚢胞腫瘍などの粘液性腫瘍で *GNAS* 遺伝子異常に基づく G 蛋白共役受容体経路の関与が指摘されており、同様に粘液産生を特徴とする serrated neoplasia pathway においても同経路の関与が推測される。G 蛋白共役受容体経路は Wnt/ β -catenin シグナル経路と crosstalk が想定されているが、serrated

neoplasia pathway におけるこのシグナル経路の関与についてはまだ明らかではない。

また通常内視鏡では、SSA/P は過形成性ポリープに類似した褪色調の平坦隆起性病変として捉えられる。過形成性ポリープが左側結腸・直腸に好発し 5mm 以下の病変が多い一方で、SSA/P は右側結腸に好発し 5mm 以上の病変が多い。特に SSA/P では表面の粘液附着が特徴的な内視鏡所見の 1 つとして報告されている。さらに narrow band imaging (NBI) による画像強調内視鏡では varicose microvascular vessel (VMV) や、拡大内視鏡観察では開大した crypts を反映する開 II 型 pit pattern も SSA/P の特徴的な内視鏡所見として報告されている。しかし、serrated neoplasia pathway の初期病変としての Dysplasia または早期癌併存 SSA/P の内視鏡的特徴についてはこれまで詳細な報告はない。

病理組織学的には、SSA/P は鋸歯状構造を有し、陰窩の拡張、陰窩の不規則分岐、陰窩底部の水平方向への変形 (逆 T 字・L 字型陰窩の出現) などを特徴とする。しかし、早期癌併存 SSA/P は粘液癌との関連が指摘されているが、早期癌併存 SSA/P は SSA/P 全体の 0.2 ~ 1.0% とかなり稀な腫瘍であるため、これまでの病理学的特徴に関する報告は症例報告やケースシリーズに限られ、その詳細な病理組織学的特徴は明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、

serrated neoplasia pathway における G 蛋白共役受容体経路の活性化について、conventional adenoma-carcinoma sequence と比較し、さらに Wnt/ β -catenin シグナル経路とのクロストークの有無を明らかにすること、

また serrated neoplasia pathway の初期病変としての Dysplasia または早期癌併存 SSA/P の内視鏡的特徴を明らかにすること、

および、早期癌併存 SSA/P の病理組織学的特徴を明らかにすること、

である。

3. 研究の方法

targeted next-generation sequencing (NGS) による遺伝子解析

対象は、2014年～2016年に当院にて内視鏡的または外科的に切除された Dysplasia/浸潤癌併存 SSA/P 8 病変 (Dysplasia 併存 SSA/P 4 病変と浸潤癌併存 SSA/P 4 病変) である。まず、ホルマリン固定パラフィン包埋組織切片から DNA を抽出し、次に Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2 (Life Technologies) を用いて *GNAS* 遺伝子を含む代表的な 50 個の癌抑制遺伝子、癌関連遺伝子の targeted NGS による遺伝子解析を行った。以下に解析を行った 50 個の遺伝子を示す。

ABL1, AKT1, ALK, APC, ATM, BRAF, CDH1, CDKN2A, CSF1R, CTNNB1, EGFR, ERBB2, ERBB4, EZH2, FBXW7, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FLT3, GNA11, GNAS, GNAQ, HNF1A, HRAS, IDH1, IDH2, JAK2, JAK3, KDR, KIT, KRAS, MET, MLH1, MPL, NOTCH1, NPM1, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, PTEN, PTPN11, RB1, RET, SMAD4, SMARCB1, SMO, SRC, STK11, TP53, VHL。

内視鏡所見の解析

2006年～2015年に当院にて病理学的に SSA/P (Dysplasia あるいは癌併存病変を含む) と診断された 502 病変のうち、内視鏡的評価が可能であった 462 病変を抽出し、後方視的に解析した。通常内視鏡観察では、粘液付着、形態、2 段隆起、陥凹、発赤の 5 つの所見を検討した。さらに拡大内視鏡を施行された 316 病変に対し、pit pattern 分類による検討を行った。

病理組織学的解析

対象は 2006年～2015年に当院または関連施設にて病理学的に粘膜下層浸潤癌併存 SSA/P (CA-SSA/P) と診断された 40 病変で、これを粘膜下層浸潤癌併存 Adenoma (CA-AD) 129 病変と比較した。まず、臨床病理組織学的所見として、腫瘍径、組織型、

異型度、深達度、脈管侵襲の有無、リンパ節転移の有無を検討し、次に、粘液成分、鋸歯状構造、絨毛状構造、Budding grade、Tumour-infiltrating lymphocytes、Crohn-like inflammatory reaction、Desmoplastic reaction、腺腫成分の併存の有無など詳細な病理組織学的特徴を検討した。

4. 研究成果

NGS 解析結果

8 病変中 7 病変 (88%) で *BRAF* 変異を認めしたが、*APC*、*KRAS*、*GNAS* 変異は 1 例も認めなかった。このことは *BRAF* 変異が serrated neoplasia pathway に関与していることが示され、これまでの報告と一致していた。一方、*GNAS* 変異に伴う G 蛋白共役受容体経路の関与は否定的であった。

また今回の NGS 解析では、*BRAF* 変異のほかに、*FBXW7* (3/8 病変; 38%)、*TP53* (2/8 病変; 25%)、*KIT* (1/8 病変; 13%)、*PTEN* (1/8 病変; 13%)、*SMAD4* (1/8 病変; 13%)、*SMARCB1* (1/8 病変; 13%) 変異が認められた。serrated neoplasia pathway における発育進展と、これらの遺伝子変異との関係については、今後さらなる分子生物学的解析が必要と考えられた。

内視鏡的特徴の解析

SSA/P 462 病変のうち、異型のないもの (SSA/P-ND) 414 病変 (90%)、腺腫相当の異型を含むもの (SSA/P-D) 29 病変 (6%)、早期癌を併存するもの (SSA/P-CA) 19 病変 (4%) (粘膜内癌 12 病変、粘膜下層浸潤癌 7 病変) であった。病変の大きさは、SSA/P-ND 12 ± 8 mm、SSA/P-D 16 ± 9 mm、SSA/P-CA 17 ± 16 mm で、病変の進行に伴い増大が認められたが、SSA/P-D と SSA/P-CA の 19/48 病変 (40%) は 10mm 以下の病変であった。通常内視鏡観察では SSA/P と診断されたほとんど全例 (447/462 病変; 97%) で粘液付着がみられた。また、(亜)有茎性病変、2 段隆起を伴うもの、陥凹を伴うもの、発赤を伴うものの割合は、SSA/P-ND ではそれぞれ 17/414 病変 (4%)、19/414 病変 (5%)、16/414 病変 (4%)、14/414 病変 (3%) であったのに対し、SSA/P-D と SSA/P-CA ではそれぞれ

れ 4 / 29 病変 (14%) と 5 / 19 病変 (26%)、17 / 29 病変 (59%) と 13 / 19 病変 (68%)、3 / 29 病変 (10%) と 3 / 19 病変 (16%)、10 / 29 病変 (34%) と 12 / 19 病変 (63%) で高率であった。これら 4 つの所見のうち少なくとも 1 つの所見が認められた場合の、SSA/P における Dysplasia あるいは早期癌の検出における感度は 92%、特異度は 85% であった。さらに拡大内視鏡観察では、SSA/P-D と SSA/P-CA で II 型 pit 以外に III 型や IV 型、V 型など多彩な pit 構造が確認された。

結論として、SSA/P はその大きさに関係なく、(垂) 有茎性病変、2 段隆起、陥凹、発赤の所見を認めた場合には、Dysplasia 併存あるいは早期癌併存の可能性を考慮し、さらに拡大内視鏡を併用することで内視鏡的に正確に診断できる可能性が示唆された。今回の研究内容を Asian Pacific Digestive Week 2016 などの国内外の学会で発表し、さらに 2017 年 Gastrointest Endosc. に論文として報告した。

病理組織学的解析

臨床的には CA-SSA/P の患者は平均年齢 71.1 ± 8.4 歳で、CA-AD の患者 (66.3 ± 9.8) と比較して有意に高齢であった ($P < 0.001$)。また CA-SSA/P の患者は 23 例 (58%) が女性で、CA-AD の患者 (35 例; 27%) と比較して女性が多かった。局在では CA-SSA/P は圧倒的に近位結腸に好発 (38 例; 95%) していたのに対し、CA-AD では近位結腸はその頻度は低率であった (19 例; 15%)。

組織学的には CA-SSA/P と CA-AD 両群ともに高分化 ~ 中分化管状腺癌が優位であったが、CA-SSA/P では 12 例 (30%) の病変で粘液癌成分の併存が認められた。腫瘍径に関して、CA-SSA/P 群の平均腫瘍径は 15 ± 9 mm で、CA-AD 群の平均腫瘍径 22 ± 16 mm よりも有意に小さかった ($P < 0.001$)。深達度に関して、CA-SSA/P 群の浸潤距離は $1518 \pm 971 \mu\text{m}$ で、CA-AD 群の $2164 \pm 1769 \mu\text{m}$ よりも浅い傾向が認められた。CA-SSA/P ではリンパ管侵襲が 12 例 (30%) で認められ、CA-AD (13%) と比較して高率であった ($P = 0.028$)。同様に CA-SSA/P ではリンパ節転移も高率に認められた (CA-SSA/P 28%; CA-AD 7%, $P = 0.011$)。Budding grade は両群において Grade 1 が大多数であった。

Desmoplastic reaction は、CA-SSA/P 群は low-grade のもの 26 例 (65%) と多かったが、一方 CA-AD 群では high-grade のもの (67%) が多かった ($P < 0.001$)。また、CA-SSA/P 群では Tumour-infiltrating lymphocytes と Crohn-like inflammatory reaction をそれぞれ 28 例 (70%) と 12 例 (30%) に認め、CA-AD 群の 40 例 (31%) と 11 例 (9%) よりともに高頻度であった ($P = 0.001$)。

結論として、SSA/P 由来の大腸癌は、通常の adenoma-carcinoma sequence に由来する大腸癌と比較して小さい病変で深達度は浅いが、リンパ管侵襲やリンパ節転移が高率で、粘液癌を併存することも多い。さらに SSA/P 由来の大腸癌は Desmoplastic reaction は軽度だが、Tumour-infiltrating lymphocytes や Crohn-like inflammatory reaction を高頻度に伴うなど腺腫に由来する癌と異なる病理組織学的特徴を示した。これまで SSA/P は一度癌化すると急速に進展することが指摘されており、今回の結果と併せて、SSA/P 由来の大腸癌は高悪性度の癌へと進展していく可能性が示唆された。今回の研究内容を Digestive Disease Week 2015 などの国内外の学会で発表し、さらに 2018 年 Virchows Arch. に論文として報告した。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

Murakami T, Sakamoto N, Ritsuno H, et al. Distinct endoscopic characteristics of sessile serrated adenoma/polyp with and without dysplasia/carcinoma. Gastrointest Endosc. 2017; 85: 590-600. doi: 10.1016/j.gie.2016.09.018. (査読有)

Murakami T, Mitomi H, Yao T, et al. Distinct histopathological characteristics in colorectal submucosal invasive carcinoma arising in sessile serrated adenoma/polyp and conventional tubular adenoma. Virchows Arch. 2018; 472: 383-393. doi: 10.1007/s00428-017-2234-8. (査読有)

村上 敬 等. 大腸癌の分子生物学と発癌機序 発癌機序 大腸鋸歯状病変と発癌. 日本臨床 (0047-1852) 73 巻増刊 4 最新臨床大腸

〔学会発表〕(計 9 件)

○海外学会

Murakami T, et al. Clinicopathologic characteristics and molecular associations of WNT/ β -catenin signal in the serrated neoplasia pathway of the colorectum. Digestive Disease Week 2015.

Murakami T, et al. Adenocarcinoma arising in sessile serrated adenoma/polyp may histologically have high-grade malignancy: a study of 35 cases. Digestive Disease Week 2016.

Murakami T, et al. Endoscopic characteristics of dysplasia and invasive carcinoma arising from sessile serrated adenoma/polyp: a retrospective study. Asian Pacific Digestive Week 2016.

○国内学会

村上 敬 等. SSA/P 併存早期大腸癌の臨床病理学的検討. 第 89 回日本消化器内視鏡学会総会 2015.

村上 敬 等. SSA/P 併存早期大腸癌の臨床病理学的検討. 日本消化器関連学会週間 JDDW 2015.

村上 敬 等. Dysplasia または早期癌併存 SSA/P の臨床病理学のおよび内視鏡的特徴. 第 91 回日本消化器内視鏡学会総会 2016.

村上 敬 等. Dysplasia または早期癌併存 SSA/P の臨床病理学のおよび内視鏡的特徴. 第 103 回日本消化器病学会総会 2017.

村上 敬 等. SSA/P 併存粘膜下層浸潤癌の病理組織学的特徴. 日本消化器関連学会週間 JDDW 2017.

村上 敬 等. SSA/P 併存粘膜下層浸潤癌の病理組織学的特徴. 第 72 回日本大腸肛門病学会学術集会 2017.

6 . 研究組織

研究代表者

村上 敬 (MURAKAMI, Takashi)

順天堂大学・医学部・助教