

令和元年6月17日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07143

研究課題名(和文) マイクロサテライト不安定性を呈する大腸癌のゲノム・エピゲノム解析

研究課題名(英文) Genomic and epigenomic analyses of microsatellite instability-high colorectal cancers

研究代表者

田中 敏明 (Tanaka, Toshiaki)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30647540

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：DNAミスマッチ修復遺伝子の生殖細胞系列変異を有するリンチ症候群随伴大腸腫瘍と、ミスマッチ修復遺伝子の体細胞変異を有するリンチ様大腸腫瘍の変異プロファイルが類似し、それらはMLH1遺伝子メチル化大腸癌とは変異プロファイルが異なることが明らかとなった。KRAS、APC、TCF7L2遺伝子変異はリンチ症候群随伴またはリンチ様大腸癌に多く、BRAF、RNF43遺伝子変異はMLH1メチル化大腸癌に多く認められた。リンチ様大腸癌はMLH1メチル化大腸癌と比べて若年発症であることが示された。また、ERBB2(L755S)およびERBB2(L841I)が発がんドライバー変異であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高頻度マイクロサテライト不安定性を呈する大腸癌のゲノム・エピゲノム解析によりサブタイプ分類を行なったところ、リンチ症候群・MLH1メチル化を有する大腸癌・リンチ様大腸癌の3群に分類されることが明らかになった。そのうち、MLH1メチル化大腸癌において、治療標的となり得る融合キナーゼが比較的高頻度に認められることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Sporadic MSI-H CRCs were further classifiable into somatic mismatch repair (MMR) gene mutation (Lynch-like, LL) or MLH1 methylated (MM) types. Methylation of other MMR genes (MSH2/MSH6/PMS2) was not detected. The mutational and clinicopathological properties of 26 LL CRCs more closely resembled those of 24 LS-associated tumors than those of 99 MM CRCs. There were significant differences between LS/LL and MM groups in age, location, number of insertions/deletions, recurrent mutations of KRAS/APC and BRAF/RNF43. Fusion kinases were detected in 11/20 (55%) MM MSI-H CRCs lacking KRAS/BRAF oncogenes. A 3T3 transformation assay confirmed the tumorigenicity of identified fusion kinases, ERBB2(L755S), and ERBB2(L841I).

研究分野：大腸腫瘍

キーワード：マイクロサテライト不安定性 大腸癌 リンチ症候群 MLH1遺伝子メチル化 リンチ様大腸腫瘍

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大腸癌の死亡率(人口10万人に対する割合)は1955年には男性4.7,女性4.8であったが,2006年には男性36.4,女性28.9に増加し,男性では肺癌,胃癌について第3位,女性では第1位である。癌に対する有効な分子標的治療法を開発するためには,ヒト癌検体におけるゲノム異常・エピゲノム異常を明らかにし,発癌原因となる変異を同定することが重要である。

マイクロサテライト不安定性(MSI)とは,DNA複製エラーを修復する機能の低下によりゲノム上に散在するマイクロサテライト反復配列が,腫瘍組織と正常組織で異なる反復回数を示す現象である(図1)。1塩基反復配列をもつBAT25、BAT26、2塩基反復配列をもつD2S123、D5S346、D17S250の5遺伝子座(マーカー)のうち,いずれか2マーカー以上でMSIを示すことを高頻度MSI(MSI-H)と米国癌研究所は定義している。MSI-Hの原因には遺伝性と散発性があり,遺伝性をリンチ症候群(LS)と呼ぶ。LSではDNAミスマッチ修復(MMR)遺伝子の生殖細胞系列変異を有するため,もう一方のアレルに後天的異常が加わるとMMR機構が損なわれ,MSIが現れると共に癌遺伝子や癌抑制遺伝子に変異が蓄積し癌化する[Vasen et al., Gut 2013]。

2. 研究の目的

全エクソンシーケンス,メチル化解析,融合遺伝子解析を行うことで,MSI-H大腸癌に生じているゲノム異常・メチル化の全体像の解明を進める。さらに,MSI-H大腸癌の発がんに関わる遺伝子変異の同定を目指す。

3. 研究の方法

BAT25、BAT26がMSIであるMSI-H大腸癌149症例に対し,次世代シーケンサーHiSeq2500(Illumina)を用いた全エクソン解析,メチル化解析を行い,そのうち111症例に対し,融合遺伝子解析を行なった(図1A)。

相補的DNAを各試料のRNAから逆転写ポリメラーゼ連鎖反応により増幅し,pMXsレトロウイルスベクターにライゲーションし,サンガーシーケンスで配列を確認した。3T3細胞に各遺伝子を導入し,12日後にギムザ染色を行なった。

ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。pFL700レポータープラスミドとpGL4.74内部コントロールプラスミド(hRenilla-luc/TK, Promega, Madison, WI, USA)と野生型キナーゼおよび融合型キナーゼが293T細胞にリポフェクションで導入された。ルシフェラーゼ活性はトランスフェクションの2日後に測定された。内部コントロールで標準化された値である。

同様に,測定24時間前に培地をOpti-MEM(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)に置換することで,24時間飢餓状態にして測定したのが(C)である。

ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを3 μ mの厚さにスライスし,ミスマッチ修復タンパク(MLH1, MSH2, MSH6, PMS2)の免疫染色を行なった。用いた抗体は次の通りである。

- mouse monoclonal anti-MLH1 antibody (clone ES05, dilution 1:50; Leica, Wetzlar, Germany)
- mouse monoclonal anti-MSH2 antibody (clone FE11, dilution 1:50; Dako, Glostrup, Denmark)
- rabbit monoclonal anti-MSH6 antibody (clone EPR3945, dilution 1:200; GeneTex, Hsinchu, Taiwan)
- mouse monoclonal anti-PMS2 antibody (clone EPR3947, no dilution; Roche, Basel, Switzerland)

4. 研究成果

遺伝性MSI-H大腸癌であるリンチ症候群(LS)は23例に見られ,孤発性MSI-H大腸癌は,さらにMLH1遺伝子メチル化の有るMLH1メチル化群(MM, n=99),および,MLH1メチル化の無いリンチ様(LL, n=27)大腸腫瘍に分類された(図1B)。

リンチ様(LL)はメチル化,MMよりもリンチ症候群(LS)に近いプロファイルを持つことがわかった。臨床的に,LS/LLとMMの間には,占居部位,年齢,再発後の予後に明確な違いがあった。KRASやAPC遺伝子の変異はLS/LLに多く,BRAFやRNF43遺伝子の変異はMMに多かった。

11の融合キナーゼがKRAS/BRAF両野生型のMLH1メチル化群に集約していた。

3T3細胞を用いた機能解析で,融合遺伝子SLC12A2-INSR, RUFY1-RET, TPM3-NTRK1, LMNA-NTRK1, EML4-NTRK3, KANK1-NTRK3, AGAP3-BRAF, ARMC10-BRAF, ERBB2(L755S), ERBB2(L8411), RRAS2(G23D), HRAS(A155T)は,各野生型と比べて,有意に増殖し,造腫瘍能を持つことを示した(図2A)。

ルシフェラーゼアッセイの結果,融合遺伝子SLC12A2-INSR, TPM3-NTRK1,

KANK1-NTRK3, EML4-NTRK3, NCOA4-RET, RUFY1-RET, ARMC10-BRAF, AGAP3-BRAFは各野生型と比べ有意にpFL700レポーター活性が高かった(図2B,2C;データは3回の独立した実験結果の平均 \pm 標準偏差)。各融合遺伝子によってMitogen Activated Protein Kinaseパスウェイが活性化していることが示された。

免疫組織化学染色の結果,MLH1遺伝子が機能喪失型変異を起こしてい

る腫瘍では,MLH1陰性,PMS2陰性,MSH2陽性,MSH6陽性であった(図3

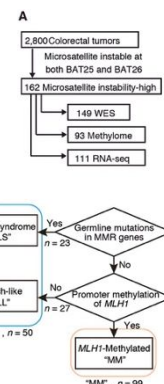


図1

上) *MSH2* 遺伝子が機能喪失型変異を起こしている腫瘍では、*MLH1* 陽性、*PMS2* 陽性、*MSH2* 陰性、*MSH6* 陰性であった (図3下)

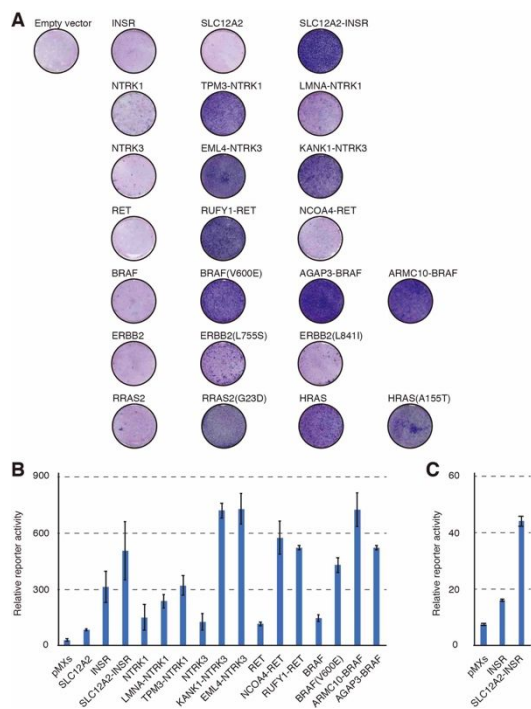


図 2

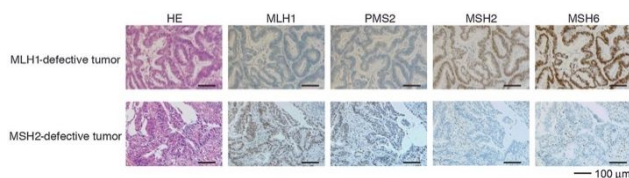


図 3

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Arakawa K, Hata K, Nozawa H, Kawai K, Tanaka T, Nishikawa T, Sasaki K, Shuno Y, Kaneko M, Hiyoshi M, Emoto S, Muroto K, Sonoda H, Okada S, Ishihara S. Molecular Subtypes Are Frequently Discordant Between Lesions in Patients With Synchronous Colorectal Cancer: Molecular Analysis of 59 Patients. *Anticancer Res.* 39(3):1425-1432, 2019
2. Sato K, Kawazu M, Yamamoto Y, Ueno T, Kojima S, Nagae G, Abe H, Soda M, Oga T, Kohsaka S, Sai E, Yamashita Y, Iinuma H, Fukayama M, Aburatani H, Watanabe T, Mano H. Fusion kinases identified by genomic analyses of sporadic microsatellite instability-high colorectal cancers. *Clinical Cancer Research.* 25(1) 378–389, 2019
3. Namba S, Sato K, Kojima S, Ueno T, Yamamoto Y, Tanaka Y, Inoue S, Nagae G, Iinuma H, Hazama S, Ishihara S, Aburatani H, Mano H, Kawazu M. Differential regulation of CpG island methylation within divergent and unidirectional promoters in colorectal cancer. *Cancer Sci.* 110(3) 1096–1104, 2019

〔学会発表〕(計 1 件)

佐藤一仁、河津正人、山本陽子、上野敏秀、小島進也、曾田学、永江玄太、高阪真路、山下義博、飯沼久恵、油谷浩幸、渡邊聡明、間野博行、高頻度マイクロサテライト不安定性を呈する大腸癌のゲノム解析により同定された融合キナーゼ、第 77 回日本癌学会学術総会、E-2004、大

阪、2018年9月

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：石原 聡一郎
ローマ字氏名：Ishihara, Soichiro
所属研究機関名：東京大学
部局名：医学部
職名：教授
研究者番号(8桁)：00376443

研究分担者氏名：河津 正人
ローマ字氏名：Kawazu, Masahito
所属研究機関名：国立研究開発法人国立がん研究センター
部局名：研究所
職名：ユニット長
研究者番号(8桁)：20401078

研究分担者氏名：野澤 宏彰
ローマ字氏名：Nozawa, Hiroaki
所属研究機関名：東京大学
部局名：医学部附属病院
職名：准教授
研究者番号(8桁)：80529173

研究分担者氏名：川合 一茂
ローマ字氏名：Kawai, Kazushige
所属研究機関名：東京大学
部局名：医学部附属病院
職名：講師
研究者番号(8桁)：80571942

研究分担者氏名：畑 啓介

ローマ字氏名：Hata, Keisuke
所属研究機関名：東京大学
部局名：医学部附属病院
職名：特任講師
研究者番号(8桁)：60526755

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。