

令和元年5月24日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09318

研究課題名(和文) 包括的遺伝子解析手法を用いた大腸発癌機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of the mechanisms of colorectal carcinogenesis using comprehensive genetic analysis

研究代表者

酒井 英嗣 (Sakai, Eiji)

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：30600233

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)：我々はこれまで大腸側方拡張型腫瘍を集積し、その発生にAPC変異が、癌への進展にTP53変異が深く関わっていることを明らかにしてきた。今回の研究において、いわゆる通常の隆起型腫瘍でも腺腫から癌に伸展するのに深く関わる遺伝子変異として、やはりTP53が深く関わっている可能性が示唆された。一方、鋸歯状腺腫の発生にはBRAF変異が密接に関わっており、その進展にはMLH family遺伝子の関与が示唆された。しかし、同一病変から腺腫と癌、両方のDNAを採取できるサンプルは極めて少なく、追加の検体収集を要した。したがって、本研究は現在進行形であり、最終結果を得るために今後も研究を継続していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまではTP53が腺腫から癌への進展で重要な働きを担うとされてきたが、すべての発癌経路で同様とは考えにくく、経路ごとの相違は興味深い。したがって、本研究は基礎研究として大腸発癌機構の解明につながる重要なものである。さらに、早期癌に特異的な遺伝子異常を捉えることは、大腸癌の早期発見につながる可能性があり、臨床的にも極めて重要である。特にSSA/PやLST-NGはその形態から内視鏡的に見逃されることも多い。近年、血液中を循環する微量な癌細胞由来DNAから遺伝子異常を拾い上げる試みがなされており、本研究で同定した遺伝子異常をターゲットに早期発見のためのキットを作成することが可能かもしれない。

研究成果の概要(英文)：We previously revealed that LST showed high frequency of APC mutation even at adenoma stage, suggesting its involvement in initiation stage of LST, like adenoma-carcinoma sequence. TP53 mutation was never detected by adenoma stage, but specifically detected in cancer samples in both LST-G and LST-NG, suggesting its involvement in cancer development from adenoma. In the present study, we also confirmed TP53 can be key driver gene which initiates protruded adenoma into intramucosal carcinoma. On the other hand, mutation of MLH family was suspected to associate with initiation sessile serrated adenoma (SSA/P) to that with cytological dysplasia. However the lower amount of DNA samples obtained by cancerous lesions both the protruded adenocarcinoma and SSA/P with cytological dysplasia, we need to obtain additional samples, thus the present study is currently in progress.

研究分野：大腸発癌

キーワード：大腸発癌 遺伝子変異 鋸歯状腺腫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

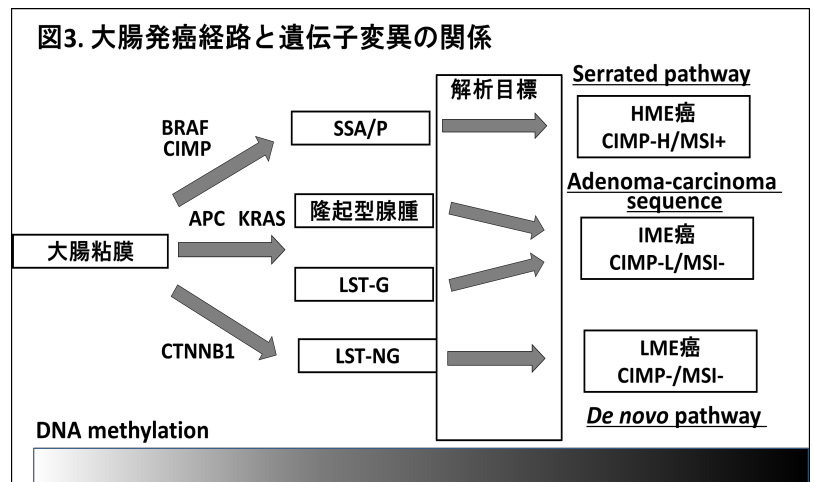
近年の包括的遺伝子解析の結果、進行大腸癌がいくつかの異なる分子生物学的背景を有するサブタイプに分類可能であることが明らかとなってきた。我々はこれまで、隆起型腺腫、側方進展を特徴とする側方伸展型腫瘍：LST (laterally spreading tumor)、鋸歯状腺腫 (SSA/P: sessile serrated adenomatous polyp) など様々な大腸前癌病変の分子生物学的背景を調査してきた。

これまで大腸の発癌機構はよく解析されてきており、主に3つの発癌経路が想定されている。最もよく知られている発癌経路は Vogelstein により提唱された Adenoma-carcinoma sequence である。多段階発癌が特徴であり、一般的には APC は腺腫形成時、KRAS は腺腫進展時、TP53 は癌化時にそれぞれ重要な働きを担うとされる。隆起型腺腫と側方伸展型腫瘍は Adenoma-carcinoma sequence を経て癌化すると考えられる。Serrated pathway は BRAF 変異、癌抑制遺伝子の異常メチル化、マイクロサテライト不安定性を特徴とする発癌経路であり、鋸歯状腺腫を経て癌化すると考えられている。De novo pathway を経て癌化する腫瘍は腺腫の段階を経ないため、早期から高頻度に浸潤を認める生物学的悪性度の高い腫瘍と考えられている。

これらの病変ではその肉眼像を反映して良性腫瘍の段階でそれぞれ APC、KRAS、BRAF など特徴的な遺伝子変異を有することが明らかとなった反面、これまでの研究では癌化に至る決定的な遺伝子異常を同定することはできなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、腺腫成分と癌成分の両方を有する早期大腸癌を対象とし、両者から別々に DNA を抽出・比較することでそれぞれの発癌経路で癌化の鍵となる遺伝子異常を明らかにすることである。この解析手法により、隆起型腺腫、側方伸展型腫瘍、鋸歯状腺腫といったいわゆる前癌病変から癌に至る決定的な遺伝子異常を同定することが可能と考えられる。各発癌経路で癌化に関わる遺伝子を同定できれば、将来的にはその遺伝子をターゲットとして早期発見のマーカーが作成できるかもしれない。また、分子標的薬のターゲットとして創薬につながる可能性も十分考えられる。



3. 研究の方法

検体の収集:

腺腫と癌の混在した隆起型の早期大腸癌 (carcinoma in adenoma) 80 例、癌成分を含む SSA/P (cytological dysplasia) 40 例、腺腫と癌の混在した顆粒型 LST および非顆粒型 LST それぞれ 40 例を集積し、同一病変の腺腫と癌からマイクロダイセクションという手法で別々に抽出した細胞を使用した。マイクロダイセクションでは間質などを避けて腫瘍細胞のみを採取するため、純度の高い DNA サンプルを得ることができる。DNA の抽出はキアゲン社の QIAamp DNA FFPE Tissue Kit を使用。研究開始当初は RNA の抽出も検討していたが、病変によっては癌部が非常に小さかったこともあり予想していたよりも少量の細胞しか採取できなかったため、本研究での解析は見送った。

遺伝子解析:

DNA メチル化異常に関しては我々が過去の研究で同定したメチル化マーカーを用いて pyrosequence 法により定量的に評価した (Sakai E, et al. Int J Cancer 2014;135:1586-95)。遺伝子変異に関しては、APC、KRAS、BRAF、TP53 などすでに癌ドライバー遺伝子としてよく知られたものの他、Wnt シグナル関連遺伝子、RTK/RAS シグナル関連遺伝子、PIK3K シグナル関連遺伝子、MMR family 遺伝子など 150 種類の大腸癌ドライバー遺伝子を独自に選択し、HaloPlex target enrichment system (Agilent 社) により癌遺伝子パネルを作成した。解析手法は target exon sequence 法を用い、網羅的な解析をおこなった。この手法は Hot spot が指摘されていない遺伝子の変異を解析するのに極めて有用である。同定した遺伝子変異は腺腫と癌をペア検体として比較することで、機能に影響を与えない遺伝子異常 (polymorphism) を除外できる。

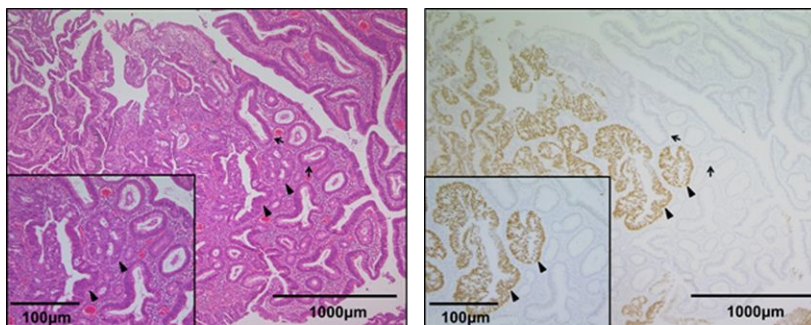
4. 研究成果

隆起型腺腫の遺伝子解析:

隆起型腺腫では腺腫の段階でメチル化異常が集積されており、エピジェノタイプは癌化の比

較的早い段階で決定していることが示唆された。

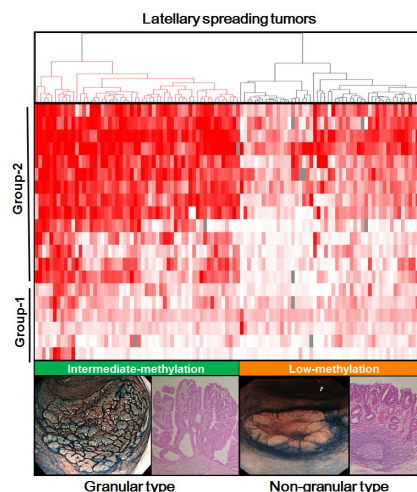
肉眼的な差異はなくても腺腫の段階で中メチル化群と低メチル化群に分かれていたが、いずれの群でも癌化には TP53 変異が深く関わっていることが明らかとなった。まだ研究の途中ではあるが、現時点ではその他に隆起型腺腫の癌化に関して、早い段階で関わっている有意な遺伝子異常は見いだせていない。このことは免疫染色でも確認ができており、隆起型の腺腫内癌では癌部分でのみ免疫染色で TP53 変異が陽性となる症例が多かった。癌化の初期段階ではまだ多数の遺伝子変異は関わっていない可能性が示唆される。



腺腫内癌の組織学的特徴(左:HE, 右:TP53免疫染色)

LST の遺伝子解析：

顆粒型 LST は中メチル化群に、非顆粒型 LST は低メチル化群に分類された。隆起型腺腫と同様に LST でもエピゲノタイプは腺腫の段階で完了していることが示唆された。APC 変異は選手の段階から、いずれの群でも比較的高頻度に見られた。Wnt シグナル関連遺伝子、RTK/RAS シグナル関連遺伝子、PIK3K シグナル関連遺伝子などはいずれの群でも癌化した細胞ですら変異を認める症例は少なく、Vogelstein が提唱していた通り、より後期の発癌過程で重要な役割を担う可能性が示唆された。いずれの群でも比較的高頻度に癌部で TP53 変異が陽性となったが、非顆粒型 LST では有意に陽性率が高かった。このことは非顆粒型 LST では TP53 変異がより重要な働きを担っていることと関連していると思われる。非顆粒型 LST のうち陥凹面を有するものは De novo 発癌経路との関連が示唆されている。DNA が当初予測したよりも少量しか採取できておらず解析を終えるに十分は症例が集まっていないのが現状であり、今後も解析を継続し、上記の結果を確認したいと考えている。



鋸歯状腺腫 (SSA/P) の遺伝子解析：

鋸歯状腺腫は右側結腸に多く位置し、癌化率は極めて低かった。しかも、癌化部分は同一件体内で面積が小さく、いまだ解析に必要な DNA 量が十分には採取できていないのが現状である。したがって、これまで解析を終えた結果から推測できることを記載する。

まず鋸歯状腺腫でもやはりエピゲノタイプは腺腫の段階で完了しており、高メチル化群に分類された。BFAF 変異は腺腫部分、癌部分ともに高頻度に検出され、KRAS 変異の陽性率は低かった。癌化には MMR family が深く関わっていることが予想されるが、今後より多くの症例を集積し、しっかりとした解析結果を提示したい。

5. 主な発表論文等 なし

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ等
なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者
研究分担者氏名：
なし

(2)研究協力者
なし

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。