

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18436

研究課題名(和文)日本人の散发性大腸癌発生におけるMUTYH遺伝子変異の意義の解明と臨床応用

研究課題名(英文)Elucidation of the significance of MUTYH gene mutation in Japanese sporadic colon cancer patients

研究代表者

小峰 啓吾 (Komine, Keigo)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：10725807

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：散发性大腸癌のMUTYH変異を解析した。97検体の全エクソン解析で1検体のみで変異が認められた。また、東北大学病院で行っているMSK-IMPACT検査施行患者の解析で、大腸癌患者でMUTYH変異は検出されなかった。日本人の散发性大腸癌におけるMUTYH変異の関与は低いことが示唆され、また変異の種類と病的意義の検討までは至らなかった。

塩基除去修復に関わる分子機構に着目し、患者血漿におけるmiRNAについて網羅的解析を行った。健常人と大腸癌患者の比較、大腸癌患者におけるがん薬物療法前後の比較を行ったが、塩基除去修復を含めDNA修復に関する報告のあるmiRNAについて有意なものは検出されなかった。

研究成果の概要(英文)：MUTYH mutation in Japanese sporadic colon cancer patients was analyzed. Only one specimen showed mutation in whole exon analysis of 97 specimens. In addition, analysis of patients under going MSK-IMPACT examined at Tohoku University Hospital was conducted, there was no patient with MUTYH mutation detected. These results suggested that the MUTYH mutation in Japanese sporadic colorectal cancer was less involved. In this study, we did not consider the relationship between the variants of mutation and pathological significance.

Focusing on molecular mechanisms involved in base excision repair, comprehensive analysis of miRNA in plasma of colorectal cancer patients was performed. Comparison between healthy people and colorectal cancer patients and between before and after the chemotherapy were performed, no significant miRNA were detected which had been reported to be associated with DNA repair.

研究分野：総合生物

キーワード：腫瘍診断学 オーダーメイド治療 大腸癌 MUTYH

1. 研究開始当初の背景

進行大腸癌のがん薬物療法の治療成績は新規薬剤の導入により少しずつ向上しているものの、満足のいく成績にはほど遠い。導入された新規薬剤による延命効果は数ヶ月であるにもかかわらず非常に高価であり、医療経済を圧迫していることは否めない。そして、効果があるかどうかは、まず投与して反応をみるより他に方法がなく、治療におけるポジティブなバイオマーカーは依然として見いだされていないのが現状である。

大腸癌の発症に関わる遺伝子は様々同定されているが、これまでの研究で DNA 修復機構の破綻が重要な要因となることが明らかになってきた。MUTYH 遺伝子は酸化グアニン(8-oxo-G)による突然変異を防ぐ塩基除去修復に関与する酵素の遺伝子で、2002 年に常染色体劣性遺伝形式を示す家族性大腸腺腫症の家系の解析により、遺伝性大腸癌に関与する遺伝子として同定された。これまで同定された遺伝性大腸癌の複数の原因遺伝子は散発性大腸癌の発症に関しても key となる遺伝子として大きく関与することが証明され、欧米の報告で MUTYH 遺伝子についても散発性大腸癌の発症に関わることが示唆されている(Eur J Cancer. 2010; 46: 1041-8)。また MLH1 や MSH、MGMT などは手術後の予後やがん薬物療法の感受性等、治療効果にも深く関わることも見いだされてきた。以上より塩基除去修復遺伝子である MUTYH 遺伝子は散発性大腸癌の発生や治療効果において重要な働きをもっている可能性が予測される。

MUTYH には多種の変異が同定されているが、変異の報告は人種により異なる。Caucasian では Y179C および G396D の報告が多いが、日本人、韓国人やユダヤ系西洋人にはこの変異は検出されず、人種差や人種内の創始者変異の存在が示唆されている。日本人と韓国人には A359V 変異、オランダ人には P405L 変異、イタリア人には E480del 変異が多くみられる特徴がある。我々はこれまでに、大腸菌における機能的相補能を指標としたヒト MUTYH 遺伝子変異の機能評価を行い、欧米でよくみられる Y179C や G396D よりも病的意義が高いと思われる変異体 12 種 (W103R、W131R、R182C、R182H、R185Q、R245H、R274W、C290W、P295L、L388P、P405L、A473D) を新たに同定した(Human mut. 2015; 36: 704-11)。これらの変異体に実際どれほどの病的意義があるかどうかについては、その変異を同定した患者の診療経過を解析することが最も有効である。そして、変異体による病的意義の強さに違いが認められれば、切除例におけるフォローアップや、切除不能進行例における予後予測、治療の介入方法に応用できる可能性がある。また、MUTYH 変異のある大腸癌

に特徴的な遺伝子変異がみつければ、それをターゲットとした分子標的治療を検討できる。以上より、本研究は日本人における散発性大腸癌への MUTYH 遺伝子変異の関与を解明することを目的とする。

また、MUTYH 変異の大腸癌に対する抗 PD-1 抗体薬の検討も目的とした。これまで大腸癌以外の腫瘍に対する抗 PD-1 抗体薬投与の検討例より、腫瘍の遺伝子変異が多い方が抗 PD-1 抗体の効果が高いという報告があるが、MUTYH 遺伝子変異のある腺腫において G T トランスポージョン型の変異は APC 遺伝子や KRAS 遺伝子によく認められ、MUTYH に変異がある場合、その影響は大腸癌の癌化の早い段階に認められる可能性が示唆されている(BMC Cancer. 2009; 9: 184)。そのため、MUTYH 変異のある大腸癌では、腫瘍の遺伝子変異が多いことが考えられ、抗 PD-1 抗体薬の効果が期待できる可能性がある。すなわち MUTYH 変異の有無が治療のバイオマーカーになる可能性があると言える。抗 PD-1 抗体薬などの免疫チェックポイントに関連する新規薬剤は、治療効果が期待されるものの、非常に高価であり、バイオマーカーの探索が急務である。そこで、本研究では MUTYH 変異のある大腸癌の遺伝子変異を網羅的に解析し、特に免疫チェックポイント阻害薬などを用いた腫瘍免疫療法による治療への導出を図ることも念頭においた。

2. 研究の目的

(1) 日本人における散発性大腸癌への MUTYH 遺伝子変異の関与を解明する。日本人の散発性大腸癌の遺伝子変異を解析し、MUTYH 変異の有無を解析する。認められた MUTYH 遺伝子変異と臨床経過の関連を解析し、MUTYH 変異の散発性大腸癌における病的意義を検討する。また、個々の変異の病的意義も検討する。

(2) MUTYH 遺伝子変異のある大腸癌に対する治療体系を確立することを目的とする。

MUTYH 変異のある腫瘍に特徴的な遺伝子変異が認められれば、それを対象とした分子標的治療薬の臨床試験を組み、治療効果の検討を行う。MUTYH 変異のある腫瘍で、変異の総数が多く、抗 PD-1 抗体薬の効果が期待できる状況であれば、MUTYH 変異のある患者を対象とした抗 PD-1 抗体薬の臨床試験を組み、治療効果の検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 大腸癌組織から抽出した DNA、患者全血 DNA における MUTYH 変異の有無を調べる。
(2) (1) で得られた変異の種類と臨床経過の関連を解析し、病的意義を検討する。
(3) MUTYH 変異のある腫瘍組織の DNA につ

いて全ゲノム解析を行い、全ての遺伝子変異を調べる。

(4)(3)で MUTYH 変異のある腫瘍で遺伝子変異の総数が多いという結果が得られた場合、MUTYH 変異のある腫瘍をもった大腸癌患者に対して、抗 PD-1 抗体薬を投与する臨床試験を施行し、治療効果を検討する。また、(3)で特徴的な遺伝子変異が認められれば、それに対する分子標的治療薬での治療の検討を行う。

4. 研究成果

(1)日本人における散発性大腸癌への MUTYH 遺伝子変異の関与の解明

散発性大腸癌患者のコホート解析

散発性大腸癌患者のコホート(計 97 例、年齢:中央値 61 歳(29 歳-83 歳)、性別:男性 66 人、女性 31 人、原発部位:盲腸 5 例、上行結腸 14 例、横行結腸 8 例、下行結腸 2 例、S 状結腸 19 例、直腸 49 例、手術時 pStage: pStage II 5 例、pStage III 30 例、pStage IV 62 例)の全エクソンシーケンスのデータ解析を行った。97 検体のうち 1 検体に MUTYH の stopgain SNV が認められた。変異を認めた検体は、原発部位は S 状結腸、pStage IV で肝転移を認めた症例であった。MUTYH の変異は生殖細胞系変異ではなく、体細胞変異として検出された。

クリニカルシーケンスでの MUTYH 遺伝子変異の検出についての解析

現在、本邦ではがんクリニカルシーケンスとして様々な遺伝子パネルを用いたゲノム解析が行われている。東北大学病院では、米国 Memorial Sloan Kettering Cancer Center で行われている MSK-IMPACT 検査を 2017 年 6 月より導入した。MSK-IMPACT 検査は次世代シーケンサーを解析の基盤とした遺伝子パネル検査であり、468 遺伝子の塩基置換、欠失・挿入、コピー数変化、また融合遺伝子 17 種の解析が可能であり、解析対象には MUTYH 遺伝子を含む。前項の全エクソンシーケンス解析では、解析の depth は 100 以下であったが、クリニカルシーケンス 検査では depth は 500 以上が標準であり、より検出頻度が高まると考えられる。今回、遺伝子パネルを用いたクリニカルシーケンス検査での MUTYH 遺伝子変異の検出頻度を調べる目的で、東北大学病院で MSK-IMPACT 検査を施行した成人患者 13 人(2017 年 6 月の導入から 2018 年 3 月までに解析結果が出た全患者)の結果を解析した。大腸がん患者は 7 人(男性 5 人、女性 2 人)で年齢中央値は 59 歳(39 歳-67 歳)、S 状結腸癌は 3 人、直腸癌は 4 人であった。いずれの患者でも MUTYH 変異は認められなかった。

以上より、散発性大腸癌における MUTYH 変異の関与は低いことが示唆された。

(2)血液検体における MUTYH 関連 miRNA の解析

(1)において散発性大腸癌への MUTYH 遺伝子変異の関与が低いことが示唆された。そこで、MUTYH 関連分子の散発性大腸癌への関与を解析することを目的とし、リキッドバイオプシーの手法を用いて MUTYH 関連 miRNA の解析をおこなった。

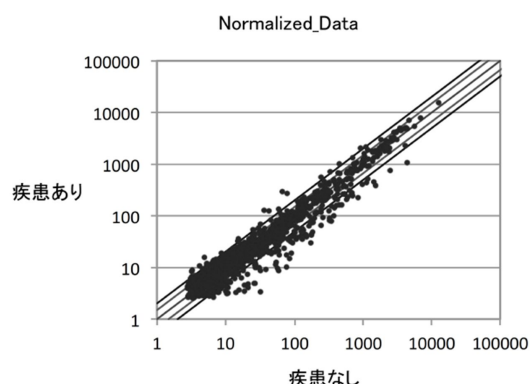
血液検体の収集システムの構築

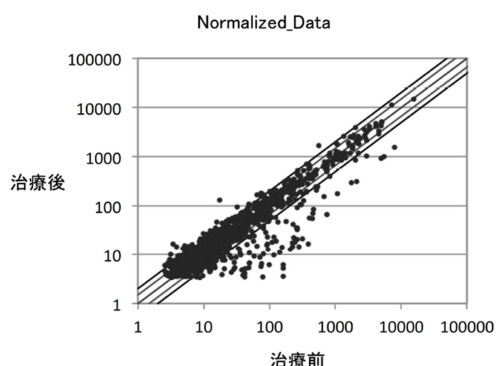
血液検体を用いて、MUTYH 関連の分子を解析するため、患者の血液検体を前向きに効率的に収集するシステムを構築した。循環腫瘍 DNA の解析も可能となるよう、効果的な cell free DNA 抽出の条件の検討を行った。分離剤と EDTA2K が添加された真空採血管(BD バキュティナ[®] PPT[™] 遺伝子核酸増幅検査用採血管)に採血後、2 時間以内に 1100 xg で 10 分間遠心分離を行い、血漿を分離し、凍結、保存する方法とした。腫瘍組織にてサンガー法で KRAS G12D 変異が認められている大腸癌患者において、本方法にて保管した血漿を BIO-RAD 社の QX200 ddPCR システムを用いた digital PCR にて解析し、同変異を検出することができた。また、腫瘍組織にてサンガー法で BRAF V600E 変異が認められている大腸癌患者においても同様の方法で BRAF 変異を検出することができ、上記の収集・保存方法が妥当と判断した。大腸がん患者 49 人、のべ 128 ポイントの検体を収集した。

大腸がん患者血漿における MUTYH 関連 miRNA の解析

TORAY 3D-Gene[®] Human miRNA Oligo Chip(搭載プローブ数:2565)を用いて健常人 2 例、抗 EGFR 抗体薬の効果を得られた大腸がん患者 4 例の網羅的な解析をおこなった。大腸がん患者 4 例については治療前、治療後、治療無効後のポイントで経時的な解析を行なった。

健常人と大腸がん患者を比較したところ、発現量の異なる miRNA を同定した。また、大腸がん患者の治療前と治療後の比較においても発現量の異なる miRNA を同定した。





図：血漿より抽出した miRNA の網羅的解析結果

上：大腸がん患者と健常人の比較

下：大腸がん患者の治療前と治療後の miRNA の発現の比較

塩基除去修復に関する報告のある miRNA (miR-16, miR-34c, miR-199a, miR-499) の発現について、健常人と大腸がん患者で有意差は認められなかった。また、大腸がん患者で経時的に有意な変化を認めなかった。他にも DNA 修復に関する報告のある miRNA (ミスマッチ修復に関連する miRNA : miR-21, miR-155、ヌクレオチド除去修復に関連する miRNA : miR-192, miR-373、損傷乗り越え DNA 複製に関連する miRNA : miR-21, miR-155, miR-96) について解析を行なったが、健常人と大腸がん患者の比較で有意な miRNA は検出されなかった。また、大腸がん患者における治療前と治療後の比較においても有意な miRNA は検出されなかった。DNA 二本鎖切断修復に関する報告のある miRNA (相同組換えに関連する miRNA : miR-125b, miR-193b, miR-148b, miR-210, miR-302, miR-239、非同相端接合に関連する miRNA : miR-101, miR-34a) についても解析を行なった。健常人と大腸がん患者の比較、大腸がん患者における治療前と治療後の比較において有意な miRNA は検出されなかった。

本研究では、散発性大腸癌における MUTYH の頻度は低く、変異ごとの病的意義の臨床的検討を行うことはできなかった。現在、本邦ではがんゲノム医療が急速な広まりをみせており、今後 MUTYH 変異の情報についてもがんクリニカルシーケンス検査による解析、データの蓄積がなされていくと考えられる。散発性大腸癌における MUTYH 変異の意義については、このようながんクリニカルシーケンスによって実臨床ベースでの解明が期待される。

また、本研究において血漿を用いて塩基除去修復を含め DNA 修復に関する miRNA の解析をおこなったが、有意な miRNA は検出されなかった。今回用いたキットでは微量な miRNA の検出は困難であり、解析の限界がある。また、

解析数が少ないことも有意な miRNA が検出されなかった原因となりうる。リキッドバイオプシーは今後がん治療のバイオマーカー探索の手法として重要であることは間違いない。患者検体の更なる収集と、より検出能の高い方法での解析が重要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

小峰啓吾、がん臨床研究開発とバイオバンク、日本臨床、査読なし、75 巻 9 号、2017、pp.1459-1463

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小峰 啓吾 (Komine, Keigo)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：10725807