

平成 30 年 5 月 2 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19097

研究課題名(和文) 鋸歯状病変、特に鋸歯状腺腫を由来とする大腸癌の発生経路の解明

研究課題名(英文) Pathways of colorectal carcinogenesis from serrated lesions (especially from traditional serrated adenomas).

研究代表者

橋本 大輝 (Hashimoto, Taiki)

国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・医師

研究者番号：40773875

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)：大腸Sessile serrated adenoma/polyp (SSA/P) with dysplasiaに高頻度のWNT関連遺伝子変異を同定した。SSA/P with dysplasiaはMLH1の発現状態によって臨床病理学的・分子病理学的にも異なる特徴を示した。WNT関連遺伝子の変異はSSA/Pのdysplasia出現に相関し、SSA/Pは発癌過程における早期のMLH1の発現状態により異なる経路を経て大腸癌に至ることが示唆された。腺腫様構造と鋸歯状構造の混合した形態を示し、KRAS変異とRSPO融合/過剰発現を特徴とする新規の大腸腫瘍を同定した。

研究成果の概要(英文)：We identified frequent WNT pathway gene mutations in colorectal sessile serrated adenoma/polyps (SSA/Ps) with dysplasia. SSA/Ps with dysplasia exhibit distinct clinicopathological and molecular features depending on the MLH1 statuses. It is suggested that WNT pathway gene mutations are associated with the presence of dysplasia in SSA/Ps and SSA/Ps progress to carcinoma via two distinct pathways depending on the MLH1 statuses in the early stages of carcinogenesis.

We proposed a novel type of colorectal polyps characterized by mixed adenomatous and serrated features with KRAS mutation and RSPO fusion/overexpression.

研究分野：病理学

キーワード：大腸腫瘍 WNT 分子病理学 SSA/P 癌 RNF43 RSPO MLH1

1. 研究開始当初の背景

散発性大腸癌の発生には、conventional pathway(古典的経路)と serrated pathway (鋸歯状経路)という2つの異なる発生経路が存在する。古典的経路は、初期に APC 変異を獲得し管状腺腫や管状絨毛腺腫を経て大腸癌に進展する経路で、比較的早くからその分子メカニズムが解明されてきた(Fearon ER. *Cell* 1990)。一方、鋸歯状経路は、後から提唱された発癌経路で、当初非腫瘍性病変と思われていた過形成性ポリープなどの鋸歯状病変から大腸癌に至る経路である(Jass JR. *Gut* 2000)。鋸歯状経路由来大腸癌は散発性大腸癌の約 25%を占めると言われている。

2010年のWHO分類では、鋸歯状病変には、Hyperplastic polyp (HP)、Sessile serrated adenoma/polyp (SSA/P)、Traditional serrated adenoma (TSA)、SSA/P with dysplasia の4病変が含まれるとされ(図1)、鋸歯状病変は初期に BRAF あるいは KRAS 変異を獲得し、マイクロサテライト不安定性陽性(microsatellite instability, MSI)大腸癌あるいはマイクロサテライト不安定性のない(microsatellite stable, MSS)大腸癌に至ると考えられている(図2)。

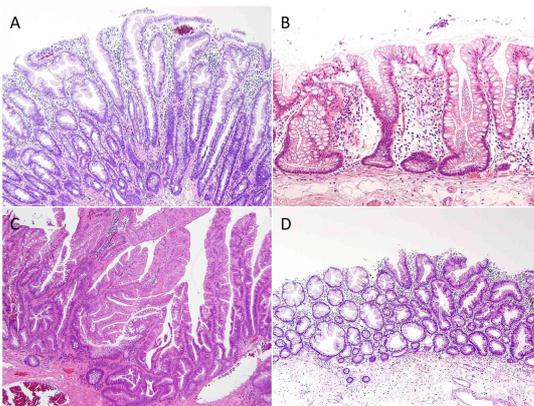


図1 鋸歯状病変 (A: HP, B: SSA/P, C: TSA, D, SSA/P with dysplasia)

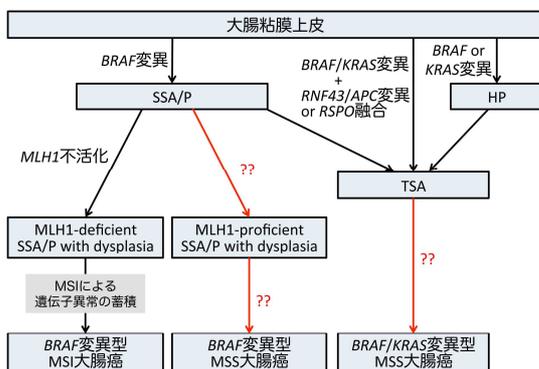


図2 鋸歯状経路の概要

鋸歯状病変から MSI 大腸癌に至る経路は、SSA/P から MLH1-deficient SSA/P with dysplasia を経て癌化するもので、その進展メカニズムの一部は解明されている(BRAF 変異と MSI の獲得)。一方、鋸歯状病変から MSS 大腸癌に至る経路は MLH1-proficient SSA/P with dysplasia や TSA から癌に至ると考えられている。これらの病変から癌への進展には WNT 経路の活性化や、p16 の不活化、TP53 変異などの異常が関与すると推測されているが、その詳細については未だ十分には解明されていない(Bettington M. *Histopathology* 2013)。BRAF/KRAS 変異陽性 MSS 大腸癌は他の群と比して予後が悪く(Sinicrope FA. *Gastroenterology*. 2015)、病態解明が切に望まれている。

2. 研究の目的

鋸歯状病変の分子病理学的解析を行い、それぞれの病変の遺伝子異常を明らかにし、鋸歯状病変由来大腸癌の発生経路を解明する。

3. 研究の方法

内視鏡切除によって得られた大腸組織検体のホルマリン固定、パラフィン包埋標本を用い、DNA および RNA を抽出し、変異解析および発現解析を行った。変異解析は次世代シーケンサーを用いたターゲットシーケンスを行った。発現解析は RT-PCR による融合遺伝子の同定および定量 PCR による解析を行った。また、β-catenin, MYC, MLH1 等の腫瘍関連タンパク質に対する免疫染色を施行した。

4. 研究成果

(1) SSA/P with dysplasia における WNT 関連遺伝子変異 (論文 1)

鋸歯状病変の一つである SSA/P からの進展メカニズムを解明するために、大腸癌への進展過程の端緒と考えられる、SSA/P with dysplasia と呼ばれる病変を蒐集し、臨床病理学および分子病理学的検討を行った。

遺伝子解析の結果、SSA/P with dysplasia の半数以上 (28/46 例、61%) に WNT 経路遺伝子の変異を認め、そのうちの多くは RNF43 変異 (23 例) であった(図 3)。一方、異型のない SSA/P では WNT 経路遺伝子の変異は稀であった(3/45 例、7%)。免疫染色では、SSA/P with dysplasia の大部分で、β カテニンの核集積 (35/46 例、76%) や MYC の過剰発現 (42/46 例、91%) が認められたのに対し、異型のない SSA/P ではそれらは稀であった(β カテニン 5/45 例、11%; MYC 4/45 例、9%)。これらの結果から、WNT 経路の活性化は SSA/P における異型の出現に関与

しており、そのメカニズムの大部分は WNT 経路遺伝子の変異であることが示唆された。

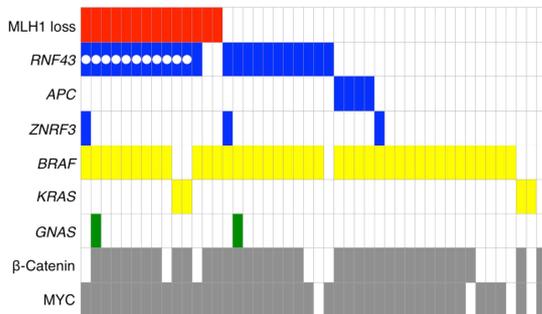


図3 SSA/P with dysplasiaの分子病理学的特徴

また、MLH1 の免疫染色では、SSA/P with dysplasia のうち、MLH1 発現消失例は 14 例、発現保持例は 32 例認められた。両者を比較すると、MLH1 発現消失例は高齢者に発生し、女性に多い傾向が認められ、全例が近位結腸に発生していた。一方、MLH1 発現保持例は、比較的若年者に発生し、男女差は見られず、近位結腸発生が多いものの遠位結腸にも認められた。WNT 経路遺伝子の変異はどちらの群でも半数以上に認められ、特に MLH1 発現消失例は高頻度に RNF43 の変異を有していた (12/14 例、86%)。一方 MLH1 発現保持例では RNF43 変異 (11/32 例、34%) に加えて APC 変異 (4 例、13%) も一部で認められた。また、MLH1 発現消失例の RNF43 の変異はコドン 659、117 という特定の部位に集中していたのに対し、MLH1 発現保持例では特定の hot spot は認められなかった。これらの結果から、SSA/P with dysplasia は MLH1 の発現状態によって 2 つの異なるサブグループに分けられることが示唆された。

以上の所見から、SSA/P から大腸癌へと至る進展経路には、MLH1 の不活化と RNF43 変異を獲得し MLH1 発現消失型 SSA/P with dysplasia を経て BRAF 変異型 MSI 陽性大腸癌へ進展する経路、および MLH1 の不活化なしに WNT 経路遺伝子変異を獲得し MLH1 発現保持型 SSA/P with dysplasia を経て BRAF 変異型 MSS 大腸癌へ進展する経路という 2 つの経路の存在が想定された (図 4)。

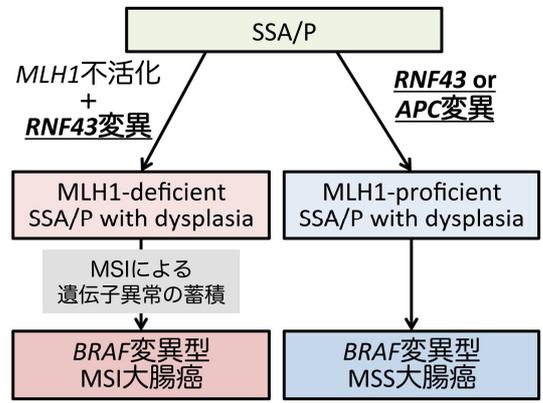


図4 想定されるSSA/Pから大腸癌への進展経路

(2) 腺腫様構造と鋸歯状構造の混合した形態を示し、KRAS 変異と RSPO 融合/過剰発現を特徴とする新規大腸腫瘍の同定 (論文 2)

大腸癌の前駆病変である鋸歯状病変から大腸癌への進展経路の探索のために、鋸歯状病変の組織学的解析を行っていたところ、既知の管状腺腫や鋸歯状病変に分類困難な特異な一群を発見した (図 5)。これらを Superficially serrated adenoma (SuSA) と名付け、蒐集した 20 例について臨床病理学的および分子生物学的解析を行った。

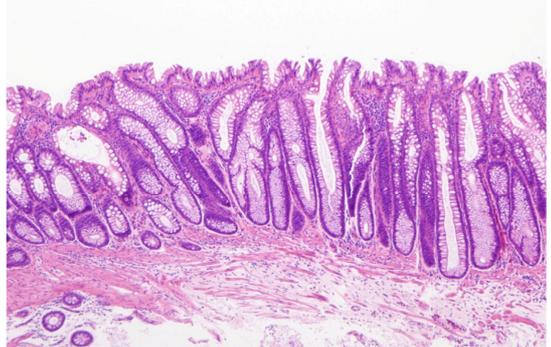


図5 Superficially serrated adenomaの組織像

SuSA の大部分は、内視鏡的に小型の無茎性病変として捉えられ、S 状結腸または直腸に存在していた。組織学的には、SuSA は、主に直線状の腺腫様腺管から構成されるが表層に局限して鋸歯状の構造が見られるという特徴を示した。免疫組織化学染色では、表層において CK20 の発現が認められ、増殖能の指標となる Ki-67 陽性像は腺管底部～中層に認められた。WNT 経路活性化の代替マーカーである、β カテニンの核集積像は全例で認められた。また、SuSA は、高頻度で KRAS 変異 (19/20 例) および RSPO 融合/過剰発現 (18/20 例) という遺伝子異常を有していた。このことから、SuSA は分子生物学的にほぼ均質な一群であり、形態的・分子生物学的に管状腺腫や鋸歯状病変とは異なる独立した病変であると考えられた。

さらに、以前の研究で解析した TSA の組織学的解析を再度行ったところ、129 例中 15 例 (12%) に SuSA 成分が認められ、そのうち 14 例は KRAS 変異および RSPO 融合/過剰発現を有していた。このことから SuSA は組織発生の点で TSA に関連していると考えられた。

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 2 件)
Hashimoto T, Yamashita S, Yoshida H, Taniguchi H, Ushijima T, Yamada T, Saito Y, Ochiai A, Sekine S, Hiraoka N. WNT pathway gene mutations are associated

with the presence of dysplasia in colorectal sessile serrated adenoma/polyps. *Am J Surg Pathol.* 41:1188-1197:2017.

Hashimoto T, Tanaka Y, Ogawa R, Mori T, Yoshida H, Taniguchi H, Hiraoka N, Kojima M, Oono Y, Saito Y, Sekine S. Superficially serrated adenoma: a proposal for a novel subtype of colorectal serrated lesion. *Mod Pathol.* 2018 (in press)

〔学会発表〕(計1件)

橋本大輝、山下聡、吉田裕、谷口浩和、牛島俊和、山田哲司、斎藤豊、落合淳志、関根茂樹、平岡伸介 Dysplasia を伴う大腸 SSA/P における WNT 関連遺伝子変異 第106回日本病理学会 2017年4月29日 京王プラザホテル

6 . 研究組織

(1)研究代表者

橋本 大輝 (HASHIMOTO Taiki)

国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・医員

研究者番号：40773875