

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08711

研究課題名(和文) 大腸腫瘍におけるWNT関連遺伝子変異の解析

研究課題名(英文) WNT pathway-related genetic alterations in colorectal tumors

研究代表者

関根 茂樹 (Sekine, Shigeki)

国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・医長

研究者番号：10321879

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)：本研究では鋸歯状病変の一つである鋸歯状腺腫を対象として組織学的解析、遺伝子変異解析を行い、MAPK経路、WNT経路の活性化を誘導する遺伝子変異が鋸歯状腺腫の発生に重要な役割を果たしていることを示した。また、多様な鋸歯状病変の解析を通じて、WNT経路に関わる遺伝子変異の鋸歯状病変からの大腸発癌経路における意義を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、新たな大腸発癌経路として注目されている、鋸歯状腺腫を中心とした大腸鋸歯状病変の分子病理学的解析を行い、その遺伝子変異の多様性と形態との相関を明らかにした。特にWNT経路を中心とする分子異常の鋸歯状経路における意義が明らかになったことで、これらの病変を前駆とする大腸癌との関連などの、大腸癌発生過程をより詳細に理解することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We conducted histological and molecular analyses of traditional serrated adenomas and showed that genetic alterations leading to activation of WNT and MAPK pathways play critical roles in their development. We also analyzed various types of serrated lesions for their molecular features, and showed the role of WNT pathway-related gene alterations in the serrated pathway of colorectal tumorigenesis.

研究分野：病理学

キーワード：WNT 鋸歯状病変 大腸ポリープ

1. 研究開始当初の背景

大腸癌の大半が遺伝子変異による WNT シグナル伝達経路の異常な活性化を示すと考えられており、その原因として APC または CTNNB1 変異が 80% 程度の大腸癌に認められる (TCGA Network. *Nature*. 2012)。しかしながら、WNT シグナルの異常は古くから知られているにもかかわらず、薬理的な抑制が困難であるため、分子標的治療の対象とされてこなかった。一方、大腸癌における WNT シグナル活性化の原因として新たに RNF43 変異、RSPO 融合遺伝子が、近年、相次いで同定された (図 1 : Seshagiri S. *Nature*. 2012; Giannakis M. *Nat Genet*. 2014)。これらの遺伝子変異は APC や CTNNB1 変異と異なり、WNT リガンドに依存した WNT シグナル活性化をきたすが、マウスを用いた *in vivo* モデルで抗 RSPO3 抗体や PORCN 阻害薬により腫瘍抑制効果が得られることが示されており、分子標的治療の観点からも注目されている (Storm EE. *Nature*. 2016; Madan B. *Oncogene*. 2016)。

大腸癌の発癌過程には通常の adenoma-carcinoma sequence に加え、鋸歯状病変を前駆病変とする発生経路が存在することが明らかとなっている。鋸歯状病変は高頻度に KRAS, BRAF の遺伝子変異を有することが知られているが、我々はこれに加えて、鋸歯状腺腫に高頻度かつ特異的に RNF43 変異および RSPO 融合遺伝子が認められることを報告している (Sekine S. *J Pathol*. 2016)。この所見は、これらの WNT リガンド依存性のシグナルを増強する遺伝子変異が、鋸歯状病変を介した大腸発癌経路に特異的に関与することを示すものである。また同時に、これらの WNT 関連遺伝子異常が鋸歯状病変を含めた大腸前癌病変の分子病理学的分類に有用であることを示唆するものである。

一方、大腸癌の大半が WNT 関連遺伝子の変異を有していることから、鋸歯状腺腫以外の鋸歯状病変も発癌過程で WNT 関連遺伝子変異を獲得すると考えられるが、その詳細は明らかでない。これまでの検索では鋸歯状経路を介した大腸発癌でもっとも重要な前駆病変と考えられている sessile serrated lesion (SSL) では、少数例において RNF43 変異が認められるほか、WNT 関連遺伝子変異は見つかっていない。また、鋸歯状腺腫については MAPK 関連遺伝子変異として BRAF および KRAS 変異が、更に WNT 関連遺伝子変異としては RNF43 変異、RSPO 融合遺伝子、APC 変異が認められ、変異に多様性がある。しかしながら、この遺伝子変異の多様性が臨床病理学的にどのような意義があるか、不明である。

2. 研究の目的

本研究では、主に大腸鋸歯状病変を対象として WNT 関連遺伝子、MAPK 関連遺伝子を中心とした遺伝子変異を検索し、その組織学的分類との関連、および、これら遺伝子変異の大腸発癌過程における役割を検討した。特に、(1) 鋸歯状腺腫における WNT, MAPK 関連遺伝子変異の多様性の臨床病理学的の意義、(2) 鋸歯状病変からの発癌過程における WNT 関連遺伝子変異獲得の意義、を明らかにすることを目的として解析を行った。

3. 研究の方法

鋸歯状病変を中心とする大腸前癌病変を対象として、病理診断に用いた後、余剰となったホルマリン固定パラフィン包埋標本を用いて、RNF43 変異、RSPO 融合遺伝子を含む WNT シグナル関連遺伝子変異、BRAF, KRAS を含む MAPK 関連遺伝子変異を検索した。変異検索には次世代シーケンサーによる targeted sequencing および Sanger sequencing を用いた。RSPO 融合に対しては RT-PCR、RSPO 過剰発現に対しては定量 RT-PCR による検索を行った。

さらに、メチル化特異的定量 PCR による、CpG island methylator phenotype (CIMP) の解析、-catenin, MLH1 に対する免疫染色を行った。

鋸歯状腺腫については組織学的な特徴を判定量評価するとともに、異型度、随伴する前駆病変の存在などを評価し、分子病理学的異常と組織学的・臨床病理学的因子との相関を検索した。

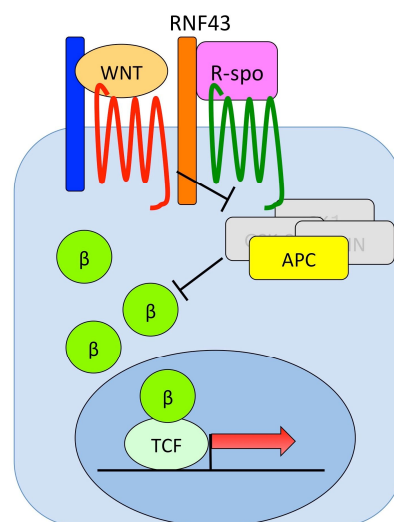


図 1 : WNT シグナル経路
通常型腺腫で高頻度に認められる APC, CTNNB1 変異と異なり、RNF43 変異、RSPO 融合は WNT リガンド依存性のシグナルを増強する。

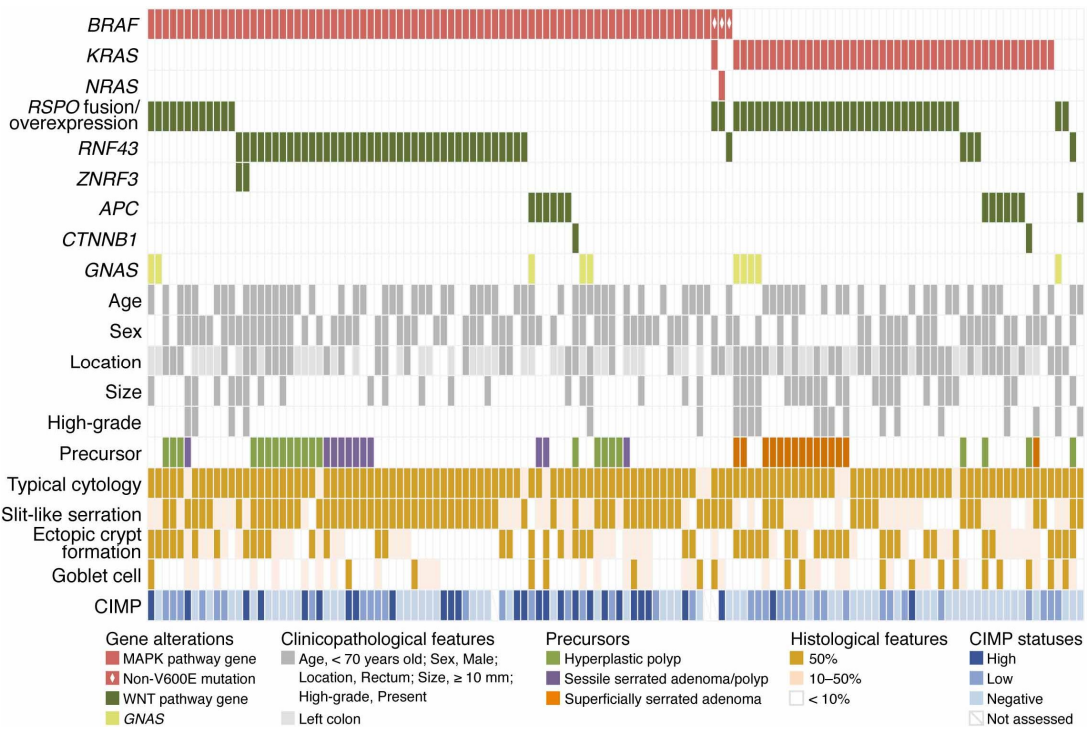


図 2：鋸歯状腺腫 129 例の分子病理学的および臨床病理学的特徴 (Sekine S. *J Gastroenterol.* 2020)

BRAF 変異を有する病変は *RNF43* 変異を有するとともに、前駆病変である過形成性ポリープ、SSL を伴うことが多い。一方 *KRAS* 変異を有する病変には *RSPO* 融合が高頻度に見られ、しばしば SuSA を前駆病変として伴う。

4．研究成果

(1) 鋸歯状腺腫における WNT，MAPK 関連遺伝子変異の多様性の臨床病理学的的意義

鋸歯状腺腫 129 例を対象として組織学的解析、遺伝子変異解析などを行い、臨床病理学的特徴と分子異常の相関を解析した。MAPK 経路の活性化に関わる変異は 97%、WNT 経路の活性化に関わる変異は 84% の病変に認められ、これらの 2 つの経路の活性化が鋸歯状腺腫の発生に重要な役割を果たしていることが示唆された。また、*KRAS* 変異は *RSPO* 融合、*BRAF* 変異は *RNF43* 変異との共存が有意に認められ、MAPK，WNT 経路に関わる遺伝子変異の間に関連があることが示された。さらに、TSA に特徴的な Slit-like serration は *BRAF*，*RNF43* 変異、Ectopic crypt は *RSPO* 融合、*GNAS* 変異と有意に相関し、鋸歯状腺腫の形態的な多様性は分子異常の多様性を反映しているものと考えられた (Sekine et al. *J Gastroenterol.* 2020)。

家族性大腸腺腫症 (familial adenomatous polyposis, FAP) における腺癌の発生は腺腫から腺癌への進展が主体であるが、鋸歯状病変の存在も過去に報告されている。本研究では FAP に発生した鋸歯状腺腫 37 病変の解析を行い、散発例と共通する特徴として高頻度の *BRAF*，*KRAS* 変異の存在を示すと同時に、他の FAP 関連腫瘍と同様に *APC* に生殖系列細胞変異に加えて体細胞変異が加わっていることを示した。また、FAP に伴う鋸歯状腺腫の分子病理学的な特徴として、メチル化異常が少ないことを示した (Okamura et al. *Am J Surg Pathol.* 2020)。

(2) 鋸歯状病変からの大腸発癌過程における WNT 関連遺伝子変異獲得の意義

異型のない SSL、異型を伴う SSL の比較解析を行い、WNT 関連遺伝子変異が SSL からの異型の獲得に伴って起きることを示した (Hashimoto T. *Am J Surg Pathol.* 2017)。また、鋸歯状腺腫についても、異型のない前駆ポリープから鋸歯状腺腫への進展に伴って WNT 関連遺伝子変異が獲得されることを明らかにし (Hashimoto T. *Am J Surg Pathol.* 2019)、鋸歯状病変からの発癌過程においては一般に、WNT 関連遺伝子変異が MAPK 関連遺伝子変異に続いておきる、異型性の獲得に関与する遺伝子異常であることが示唆された。

また、これまで記載されていなかった、腺腫様の細胞異型を伴い、表層に局限した鋸歯状変化を示す病変を同定し、superficially serrated adenoma (SuSA) として報告した (Hashimoto T. *Mod Pathol.* 2018)。SuSA は大半の病変で *KRAS* 変異、*RSPO* 融合を伴っており、鋸歯状腺腫と共通する遺伝子変異を有する。さらに、*KRAS* 変異、*RSPO* 融合を有する鋸歯状腺腫にはしばしば SuSA を伴っており、SuSA が *KRAS* 変異陽性鋸歯状腺腫の前駆病変であることが示唆された。さらに、

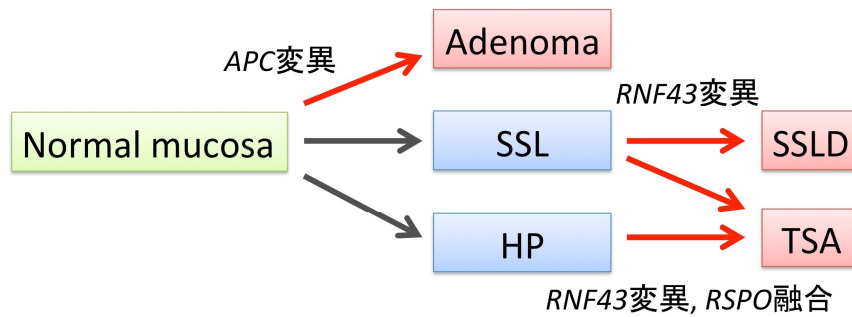


図3：鋸歯状病変の進展における WNT 関連遺伝子異常

通常型腺腫の発生では WNT 関連遺伝子である *APC* 変異が最も早期に起きる遺伝子変異であるが、鋸歯状経路では MAPK 経路関連遺伝子について、異型性の獲得と同時に起きる変異であることが明らかとなった。

KRAS 変異、*RSPO* 融合による SuSA 発生と鋸歯状腺腫への進展はオルガノイド培養を用いた遺伝子改変とマウスへの正所性移植により再現することが可能であった (Kawasaki K. *Gastroenterology*. 2020)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sekine Shigeki, Yamashita Satoshi, Yamada Masayoshi, Hashimoto Taiki, Ogawa Reiko, Yoshida Hiroshi, Taniguchi Hirokazu, Kojima Motohiro, Ushijima Toshikazu, Saito Yutaka	4. 巻 55
2. 論文標題 Clinicopathological and molecular correlations in traditional serrated adenoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 418 ~ 427
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-020-01673-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okamura Takuma, Hashimoto Taiki, Naka Tomoaki, Yoshida Teruhiko, Tanabe Noriko, Ogawa Reiko, Yamada Masayoshi, Saito Yutaka, Yatabe Yasushi, Sekine Shigeki	4. 巻 Publish Ahead of Print
2. 論文標題 Clinicopathologic and Molecular Characteristics of Familial Adenomatous Polyposis?associated Traditional Serrated Adenoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Surgical Pathology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/PAS.0000000000001502	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Cho H, Hashimoto T, Yoshida H, Taniguchi H, Ogawa R, Mori T, Hiraoka N, Saito Y, Sekine S	4. 巻 73
2. 論文標題 Reappraisal of the genetic heterogeneity of sessile serrated adenoma/polyp	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Histopathology	6. 最初と最後の頁 672-80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/his.13688	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hashimoto T, Tanaka Y, Ogawa R, Mori T, Yoshida H, Taniguchi H, Hiraoka N, Kojima M, Oono Y, Saito Y, Sekine S	4. 巻 31
2. 論文標題 Superficially serrated adenoma: a proposal for a novel subtype of colorectal serrated lesion	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mod Pathol	6. 最初と最後の頁 1588-98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41379-018-0069-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hashimoto Taiki, Yamashita Satoshi, Yoshida Hiroshi, Taniguchi Hirokazu, Ushijima Toshikazu, Yamada Tesshi, Saito Yutaka, Ochiai Atsushi, Sekine Shigeki, Hiraoka Nobuyoshi	4. 巻 41
2. 論文標題 WNT Pathway Gene Mutations Are Associated With the Presence of Dysplasia in Colorectal Sessile Serrated Adenoma/Polyps	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The American Journal of Surgical Pathology	6. 最初と最後の頁 1188 ~ 1197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/PAS.0000000000000877	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kojima Motohiro, Shimazaki Hideyuki, Iwaya Keiichi, Nakamura Takahiro, Kawachi Hiroshi, Ichikawa Kazuhito, Sekine Shigeki, Ishiguro Shingo, Shimoda Tadakazu, Kushima Ryoji, Yao Takashi, Fujimori Takahiro, Hase Kazuo, Watanabe Toshiaki, Sugihara Kenichi, Lauwers Gregory Y., Ochiai Atsushi	4. 巻 66
2. 論文標題 Intramucosal colorectal carcinoma with invasion of the lamina propria: a study by the Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Human Pathology	6. 最初と最後の頁 230 ~ 237
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.humpath.2017.04.031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Cho Hourin, Sekine Shigeki, Sekiguchi Masau	4. 巻 30
2. 論文標題 Adenocarcinoma of the colon presenting as a submucosal tumor	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Digestive Endoscopy	6. 最初と最後の頁 114 ~ 115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/den.12949	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----