

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10630

研究課題名(和文)大腸癌の遺伝子異常の解析～新しい分類を目指して～

研究課題名(英文)Classification of Colorectal Cancer based on genetic alterations

研究代表者

坂井 義治 (Sakai, Yoshiharu)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：60273455

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)：大腸癌検体から抽出したDNAに対して、次世代シーケンサーを用いて体細胞遺伝子変異解析を行なった。変異数による分類を行い、hypermutated群とnonhypermutated-CRCに分類する事ができた。さらに、hypermutated群は、マイクロサテライト不安定性がある大腸癌(MSI-CRC)とPOLE遺伝子に変異を持つ大腸癌(POLE-CRC)に細分類された。POLE-CRCは大腸癌全体の1.5%を占め、稀な群である。POLE-CRCはMSI-CRCおよびnonhypermutated-CRCと比較して、有意に良好な予後を示し、若年発症する事が大きな特徴である事がわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

POLE遺伝子変異を特徴とする大腸癌(POLE-CRC)を同定した。稀な腫瘍であるために、現在までにその遺伝子変異プロファイルや臨床病理学的特徴を明らかにした報告は認めていない。POLE-CRCは若年発症するが、予後は非常に良好である。若年発症した悪性腫瘍に対しては、一般的に、侵襲の強いadjuvant therapyやneoadjuvant therapyが勧められる傾向にあるが、POLE-CRCである事が診断できれば、手術のみで完治が高い確率で見込める事が予想できる様になる。不要な抗がん剤や放射線治療を減らす事ができると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We performed targeted capture sequencing on DNA extracted from colorectal cancer (CRC) samples to investigate somatic mutations. Colorectal cancer can be divided into 2 major categories, which are hypermutated CRC and nonhypermutated CRC. Among hypermutated CRC, further investigation enabled us to detect a distinct subtype with characteristic POLE gene mutations (POLE-CRC), which can be clearly distinguished from microsatellite instable CRC (MSI-CRC). POLE gene encode polymerase epsilon, which is one of the key polymerases used in DNA replication. Only 1.5% of all CRC is POLE-CRC, which is the reason why it was previously difficult to clarify their clinical and genetic characteristics. In our large cohort, we have shown for the first time, that POLE-CRC have a significantly better prognosis than nonhypermutated CRC and MSI-CRC. Also, POLE-CRC is diagnosed mainly in their 40s and 50s, which is significantly younger than nonhypermutated CRC and MSI-CRC.

研究分野：消化器外科学

キーワード：大腸癌 次世代シーケンサー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1)現在の臨床病理学的因子に基づく大腸癌 Stage 分類のみでは、Stage I-III の大腸癌にして根治切除術(大腸癌取り扱い規約による根治度 A 手術)を行った後に、再発をきたすリスクを正確に評価することはできない。

(2)大腸癌の分類において、マイクロサテライト不安定性がある大腸癌を除き、遺伝子変異に基づいた分類で広く受け入れられているものは存在しない。

2. 研究の目的

遺伝子変異情報から得られた分子病態に基づいて、大腸癌の再発リスク因子を解析することを目的とする。大腸癌の遺伝子変異の状態に応じてより適切な治療選択が可能になることが期待される。

3. 研究の方法

(1)大腸癌の driver gene mutation に関する既報を網羅的に調べ、遺伝子の列挙を行う。

(2)列挙された遺伝子のみを抽出するための bait を設計する。

(3)共同研究施設で集めた凍結保存検体から DNA を抽出する。

(4)次世代シーケンサーを用いた大量並列シーケンスを行い、driver gene mutation を同定する。

(5)driver gene mutation の有無に基づいて分類を行い、予後解析を行う。

4. 研究成果

Pubmed 等のデータベースから、大腸癌 (Colorectal Cancer, CRC) に関わる既報を網羅的に調べ、大腸癌の pathogenesis に関わる遺伝子を 139 個列挙した。また 139 個の遺伝子を元に、target capture bait を設計した。共同研究施設において保存されている凍結保存検体から DNA を抽出した。全体の 99%以上の検体から高品質 DNA を抽出する事が可能であった。

大腸癌に認められる遺伝子変異数の解析を行なった。一つの大腸癌検体に認められる変異の数の中央値は 6 個 (平均値: 10.6、1-317) であった。有意に変異数が多い群 (変異数 20 以上、hypermutation 群) と、変異数の増加を認めない群 (nonhypermutated-CRC) に分類することができた。マイクロサテライト領域における塩基の繰り返し回数の変化を解析した結果、hypermutation 群はマイクロサテライト不安定性 (MSI-CRC) を認める群と、マイクロサテライト不安定性がない群にさらに細分化されることがわかった。マイクロサテライト不安定性がない群の全ての検体から *POLE* 遺伝子に変異が検出された (以下 POLE-CRC)。

POLE 遺伝子は主要な DNA ポリメラーゼの内の一つ、ポリメラーゼイプシロンをコードする遺伝子である。ポリメラーゼイプシロンは主に DNA 複製における leading 鎖の合成と延長に関わる。また、正確な DNA 複製を行うために、誤った塩基を leading 鎖に挿入してしまった場合には、直ちに誤りを同定し、正しい塩基を挿入し直す校正機能を有することも特徴である。特筆すべきことに、POLE-CRC に認められた *POLE* 遺伝子変異は全て、missense 変異であり、変異に関わるアミノ酸は全てポリメラーゼの校正機能を担うドメインに集中していた。つまり、変異により損なわれる機能はこの校正機能のみであり、DNA を伸長、合成する機能は保たれる。そのため、POLE-CRC においては、DNA 複製が行われる度に、ポリメラーゼが誤って挿入した塩基が変異として導入されることとなる。POLE-CRC と MSI-CRC を比較した結果、POLE-CRC は MSI-CRC よりも多くの遺伝子変異が起こっている (POLE-CRC: 中央値 94.5 個、平均値 100.4 個、MSI-CRC: 中央値 39 個、平均値 42.2 個) ことがわかった。

POLE-CRC に認められる遺伝子変異を詳細に解析した。MutSig や dNdScv 等のソフトウェアを用いて、POLE-CRC において positive selection を受けている遺伝子変異を同定した。通常の大腸癌と同じく、*APC*、*TP53* 遺伝子変異が POLE-CRC の pathogenesis に大きく関わっていることが確認された。POLE-CRC に特徴的に関わる遺伝子として、*B2M*、*TAP1*、*TAP2*、*CD58* 遺伝子が私たちの研究により初めて同定された。これらの遺伝子変異の内、少なくとも 1 つを有する POLE-CRC は全体の 70%をしめていた。*B2M*、*TAP1*、*TAP2* は細胞における抗原提示に関わる。これらの遺伝子変異により、癌細胞が免疫細胞に対する抗原提示を行わなくなり、免疫による癌細胞の排除機構から逃れることができると考えられる。*B2M*、*TAP1*、*TAP2* に加えて HLA (ヒト白血球抗原) の免疫染色を行い、癌細胞における発現を確認したところ、特に *B2M* 変異例において HLA の完全な発現消失が確認された。POLE-CRC は変異数が非常に多い癌であり、変異数と neoantigen の数が相関しているため、POLE-CRC の pathogenesis において、免疫を回避する方法を獲得することが重要であることが強く示唆された。

POLE-CRC は大腸癌全体の 1.5%を占めていた。これまでは、少数例による報告しか存在しなかったため、臨床経過との関わりが明らかでなかったが、今回の私たちの解析により、初めて詳細に解明することができた。POLE-CRC の 5 年生存率は 97.8%であった。MSI-CRC および nonhypermutated-CRC とそれぞれ比較し、有意に予後良好であった。POLE-CRC は MSI-CRC および nonhypermutated-CRC と比較して若年に発症することが大きな特徴であった (手術時年齢中央値: 50 歳、33-84)。MSI-CRC が右側結腸 (盲腸から横行結腸)、nonhypermutated-CRC が左側結腸 (下行結腸から直腸) に多く認められるのに対し、POLE-CRC には腫瘍の場所の偏りは認められなかった。MSI-CRC は低分化型腺癌を示すことが多いため、多くが中分化型腺癌あるいは高分

化型腺癌を示す nonhypermuted-CRC と病理学的区別する事が時に可能であるが、POLE-CRC は nonhypermuted-CRC と同じく中分化型腺癌あるいは高分化型腺癌を呈するため、病理学的に nonhypermuted-CRC と区別することは困難である事がわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yoshikage Inoue, Yoshiharu Sakai
2. 発表標題 Prognostic impact of POLE mutation in Colorectal Cancer
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Yoshikage Inoue, Yoshiharu Sakai
2. 発表標題 Mutational landscape of colorectal cancer with POLE gene mutation
3. 学会等名 American Association for Cancer research (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Yoshikage Inoue, Yoshiharu Sakai
2. 発表標題 Targeted sequencing of colorectal cancer in search for prognostic biomarkers
3. 学会等名 American Association for Cancer research (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshikage Inoue, Yoshiharu Sakai
2. 発表標題 Clinical and Genetic Characteristics of Colorectal Cancer with POLE gene mutation
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2019年～2020年

〔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
研究協力者	長山 聡 (Nagayama Satoshi)		