

令和元年6月25日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15670

研究課題名(和文)次世代シーケンサーによる大腸De novo癌の進化に関わる遺伝子の解明

研究課題名(英文)Elucidation of genes involved in the evolution of de novo colorectal cancer using next-generation sequencer

研究代表者

神山 勇太(Kouyama, Yuta)

昭和大学・医学部・助教

研究者番号：40621719

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌のメインルートは腺腫から発生すると考えられたが、平坦型や陥凹型大腸癌が発見されるようになり、そうした病変から大腸癌が発生することが認識されてきた。陥凹型大腸癌は発見が困難だが、悪性度が高いと考えられている。しかし検体数が少なく、分子生物学的特徴は明らかではない。陥凹型癌は悪性度の高い臨床病理学的特徴を示し、腺腫成分が少なかった。陥凹型T1癌19検体に対し、exome sequenceを施行し、隆起型と比較したところ、KRAS変異率は5%と隆起型50%に比べて少なかった。一方で、13番染色体の増幅は陥凹型で多く見られた。遺伝子発現は上皮間葉転換や血管新生関連の遺伝子発現が優位に高かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、大腸癌の多くはポリープからできると考えられてきたが、ポリープからではなく、正常粘膜から発生するDe novo癌と考えられる陥凹型大腸癌が存在し、その臨床病理学的、分子生物学的悪性度の高さが示された。陥凹型大腸癌は、KRAS野生型だが癌の進展に大きく寄与する染色体増幅を早期より認めており、さらに癌の進行に寄与する上皮間葉転換や血管新生の遺伝子発現が上昇していることが示され、陥凹型大腸癌を発見することの重要性が示された。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have advocated that colorectal cancer might arise not only from polyp, but also from flat and depressed colorectal neoplasms (CRNs). Such depressed CRNs have been described as the most difficult lesions to detect endoscopically, presenting the highest risk of a malignant phenotype at the time of diagnosis. Clinicopathological and molecular features of depressed CRNs are not fully elucidated due to the scarcity of sample biopsies. Depressed type T1 CRCs showed a significantly malignant potential, and a lower rate of adenoma than those of flat and protruded types. We conducted whole exome and RNA sequencing for 19 depressed T1 CRCs. The rate of KRAS mutations was only 8.6% in depressed CRCs, while it was 50% in protruded CRCs. Amplification of chromosome 13 was higher in depressed CRCs than in protruded CRCs. The expression of genes related to angiogenesis and epithelial mesenchymal transition were higher in depressed CRCs than in protruded CRCs.

研究分野：医学

キーワード：陥凹型大腸癌 早期大腸癌 染色体増幅 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

（1） Interval cancer の臨床的意義と責任病変

近年、内視鏡検査技術および機器の向上により、早期癌発見および、治療が可能となった。一方で、発見困難な病変や進行が早い癌の存在により、定期検査までに自覚症状や転移により発見される Interval cancer の存在が問題視されている。Interval cancer の原因病変として一般的に見つかるポリープ型とは異なる陥凹型大腸癌が考えられている (RJC Steel, et al. UEGJ 2016)。さらに、大腸検診で用いられる便潜血反応の陰性症例において陽性例に比べ陥凹型の頻度が高い (Wakamura K, Kouyama Y, et al. Mol Clin Oncol 2015)。

（2） 陥凹型大腸癌の臨床的悪性度と遺伝子背景

陥凹型大腸癌は、ポリープタイプの隆起型大腸癌と比べ、同 Size において粘膜下層に浸潤する率が高く (Kouyama Y, et al. Int J Colorectal Dis 2016)、隆起型大腸癌と比べ、腫瘍径が小さいうちから、早期に進行すると考えられている。また、粘膜下層浸潤癌と比較すると、陥凹型大腸癌において、静脈およびリンパ管侵襲陽性率が高く、また、遠隔転移率や再発率も高い。遺伝子学的背景に関しては、これまでの報告では、陥凹型大腸癌 (De novo pathway) は、従来の Adenoma-Carcinoma sequence (Vogelstein, et al. N Engl J Med 1988) とは異なり KRAS 変異の陰性が特徴的とされている。そのため、KRAS 変異陰性 (60%) の進行癌の前駆病変とも考えられている。次世代シーケンサーなど遺伝子解析技術の進歩により、大腸癌の遺伝子情報も明らかになっているが、陥凹型癌においてそれらの遺伝子が発癌や癌の進行のどの過程で発生するかは、明らかではない。

2. 研究の目的

（1） 陥凹型癌の癌化における真のドライバー遺伝子とその遺伝的背景

これまでの進行癌で獲得したデータベースと比較して、ドライバーとなりうる真の founder 遺伝子変異を同定する。また、ある遺伝子変異が発生し存続していくにはそれに必要な遺伝的背景が必要であるという報告があり (Ashworth A, et al. Cell 2011)、ドライバー遺伝子変異の背景にある遺伝子の存在を明らかにする。

（2） 陥凹癌における遺伝子発現の違い

陥凹型大腸癌は早期に浸潤傾向を示し、静脈およびリンパ管、遠隔転移や再発を起しやす。隆起型および陥凹型の RNA 発現を比較することで、その原因となる遺伝子を調べる。

3. 研究の方法

（1）内視鏡治療 (EMR/ESD) や手術で摘出された陥凹型大腸癌から各症例につき癌部および正常部から検体を採取し DNA および RNA を抽出する。

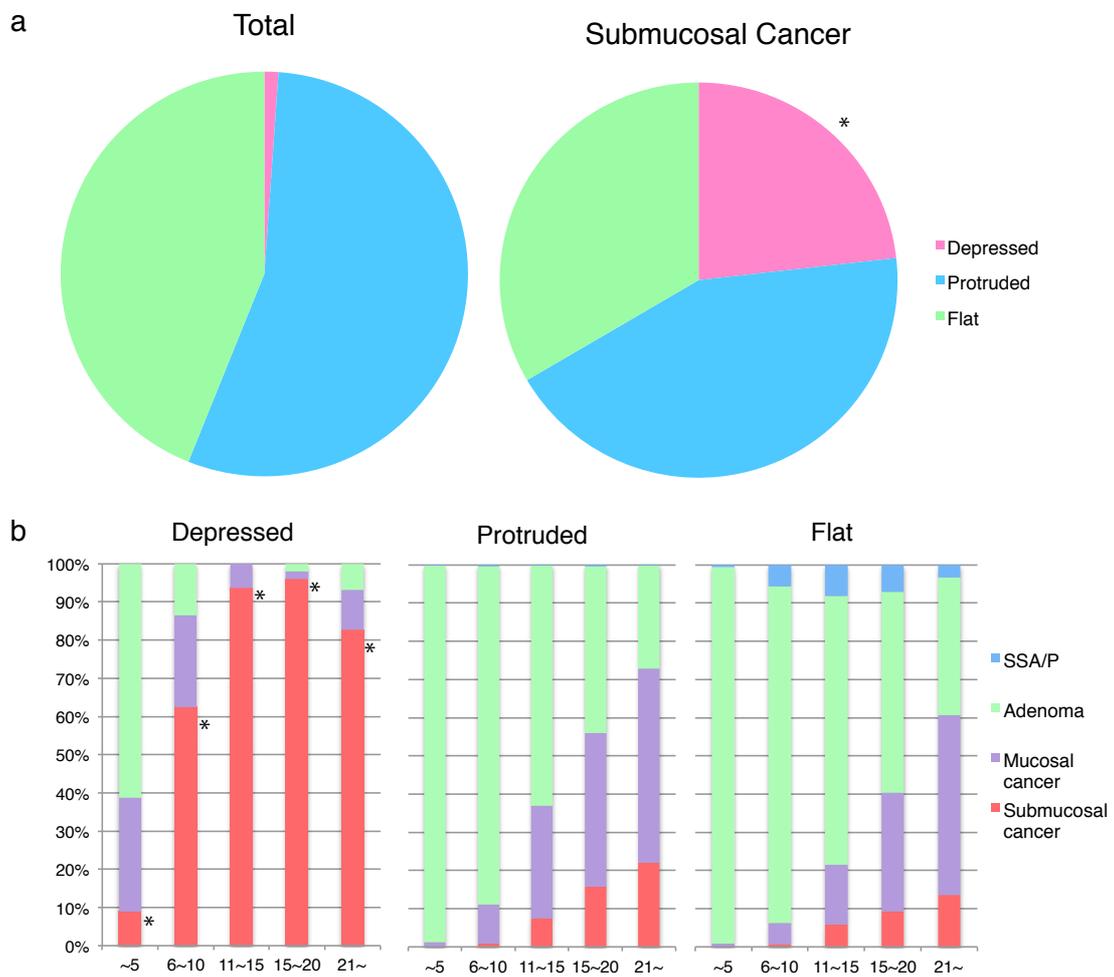
（2）得られた DNA および RNA に対してエキソームシーケンス、RNA シーケンスを施行する。スーパーコンピュータを用い、遺伝子変異および RNA 発現を求める。また、エキソームシーケンスの結果から、染色体 copy 数変異を予測する。通常の大腸癌由来癌との比較を行い、陥凹型癌における発癌早期に重要な変異を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 陥凹型大腸癌の臨床病理学的特徴

進行大腸癌を除いた昭和大学横浜市北部病院消化器センターで切除された 27129 症例を陥凹型 (Depressed)、隆起型 (Protruded)、平坦型 (Flat) の 3 つに分類し、それぞれの大きさにおける病理組織学的所見を検討した。陥凹型は腫瘍数が少ないが、腫瘍径の小さいうちに粘膜下層浸潤癌となっており、高い浸潤傾向を示した。(Figure 1a, b) また、陥凹型において、他の肉眼型に比較して、SM 深部浸潤率、静脈侵襲率、リンパ管侵襲率、簇出陽性率、粘膜筋板断裂率および再発遠隔転移率が優位に高く、悪性度の高さを認めていた。一方、腺腫成分陽性率は少なく、De novo 癌の可能性が考えられた。

Figure 1

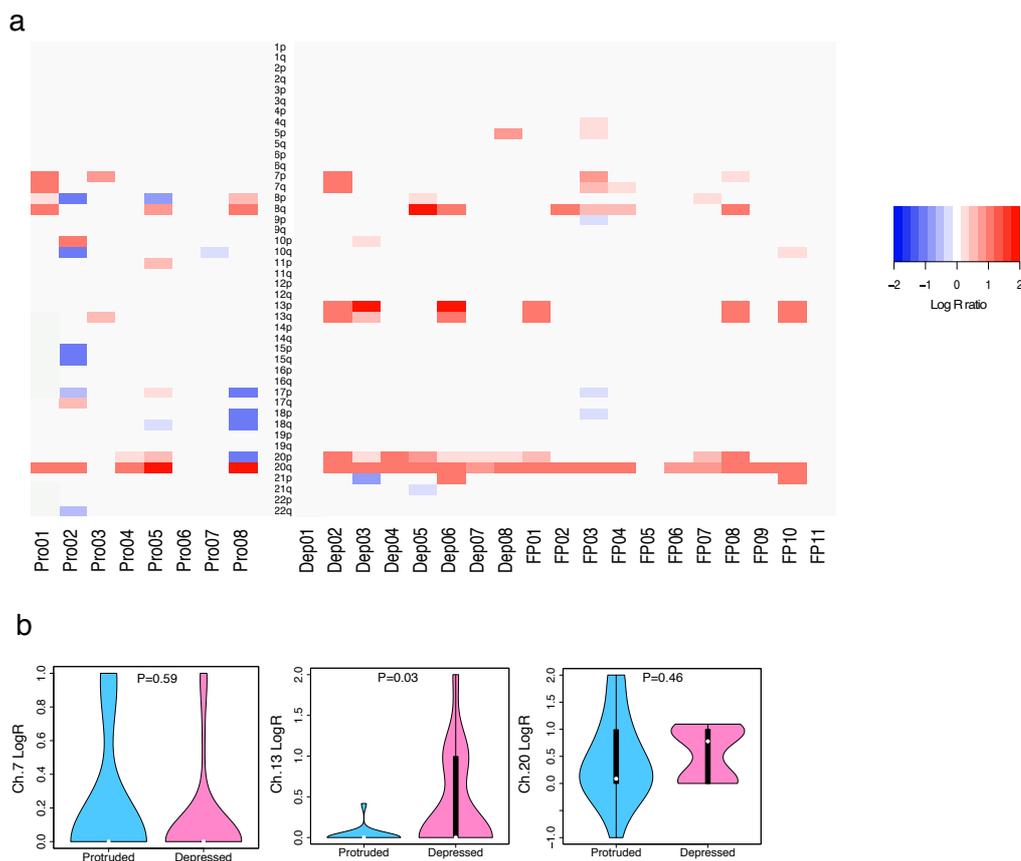


(3) 陥凹型大腸癌の染色体 copy 数変異

陥凹型と隆起型大腸癌における、染色体 copy 数変異を比較した。

陥凹型では多くの症例で 7pq, 13pq, 20pq の染色体増幅を認めていた。特に、20q の染色体増幅は約 80%の症例で増幅を認めていた。(Figure 3a)また、13pq 増幅は隆起型に比べて、陥凹型で優位に多く増幅を認めていた。一方、隆起型では数例で染色体欠失を認めていたが、陥凹型大腸癌においては、染色体欠失はほとんど認めていなかった。(Figure 3a)

Figure 3



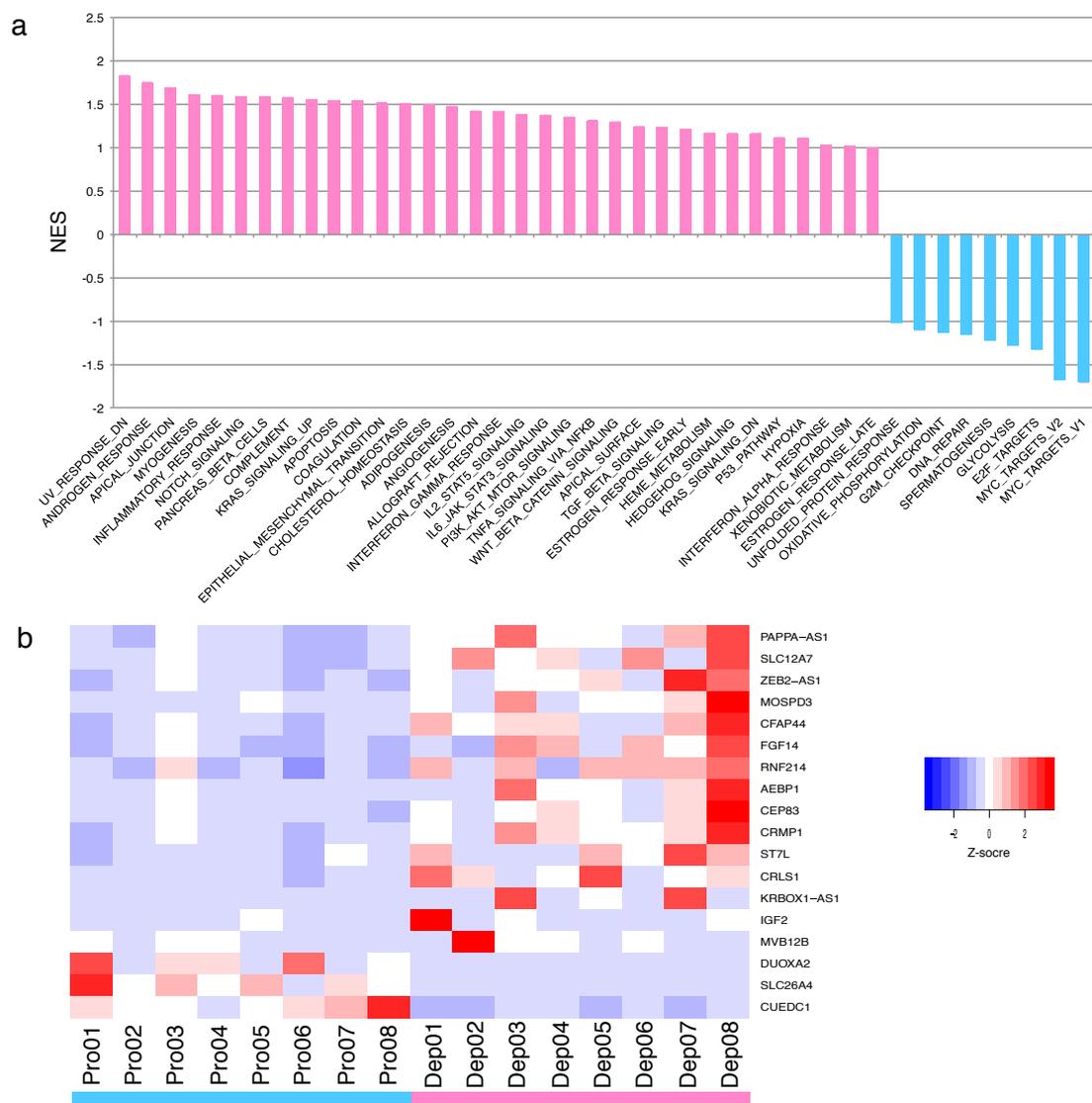
(4) 陥凹型大腸癌の遺伝子発現

陥凹型 8 例と隆起型 8 例で RNA 発現を比較した。

GSEA(Gene Set Enrichment Analysis)を施行したところ、様々な遺伝子セットにおいて、発現の差を認めていた。(Figure 4a)特に、epithelial mesenchymal transition や angiogenesis 関連遺伝子の発現が陥凹型において発現上昇しており、転移や脈管侵襲陽性率の高さに寄与していると考えられる。

また、遺伝子をそれぞれ比較すると、FGF14 や IGF2 といった、増殖因子関連の遺伝子発現が陥凹型において上昇しており、陥凹型の発育進展に寄与している可能性が示唆された。(Figure 4b)

Figure4



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 2 件)

- 1) Yuta Kouyama、The molecular characteristics of early depressed colorectal cancers、第 77 回日本癌学会学術総会、2018 年
- 2) Yuta Kouyama、Molecular characteristics of the depressed early colorectal cancers (depressed CRC)、第 27 回 **United European Gastroenterology Week**、2018 年

6. 研究組織

研究協力者

研究協力者氏名： 三森 功士

ローマ字氏名： Koshi Mimori

※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。