

令和元年6月5日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15959

研究課題名(和文)大腸鋸歯状病変の分子異常解析からアプローチする内視鏡診断法の開発

研究課題名(英文)Endoscopic and molecular analysis in colorectal serrated lesions

研究代表者

若杉 英樹(Hideki, Wakasugi)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：90784314

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)：鋸歯状腺腫(TSA)の発育進展に関わる遺伝子を同定し、臨床病理学的および分子生物学的特徴を明らかにすることを目的とした。Infinium HumanMethylation450アレイによるDNAメチル化解析を行い、鋸歯状病変のうちTSA特異的にメチル化する遺伝子としてSMOC1を同定した。RT-PCRおよびIHC解析の結果、正常組織およびSSA/Pと比較してTSAで有意なSMOC1発現低下が認められた( $P < 0.001$ )。以上よりSMOC1はTSAにおいて高頻度にメチル化しており、TSAの発育進展に関与する可能性が示唆された。SMOC1発現は、鑑別困難な鋸歯状病変の診断に有用であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SMOC1のメチル化、発現が鑑別困難な鋸歯状病変の診断バイオマーカーとして役立ち、SMOC1のメチル化が大腸がん発症リスクの高い前駆病変の予測マーカーになり得ることが示唆される。発がんリスクの高い前癌病変が同定できれば発がん予防、大腸がん死減少に貢献できるものとする。

研究成果の概要(英文)：We aimed to identify epigenetic alterations that are associated with the development of TSA. The Infinium HumanMethylation450 (HM450) BeadChip array analysis identified that SMOC1 gene was frequently methylated in TSAs. RT-PCR revealed that SMOC1 is abundantly expressed in normal colon and SSA/Ps, but is significantly downregulated in TSAs. Immunohistochemical analysis showed that SMOC1 was expressed in the epithelium of normal colonic tissues and SSA/Ps, but that expression is significantly reduced in TSAs. Methylation of SMOC1 is associated with TSA development but is rarely observed in SSA/Ps. Immunohistochemical analysis of SMOC1 may be a useful marker to discriminate between SSA/Ps and TSAs. Our data suggests SMOC1 methylation may play a role in the neoplastic pathways arising in TSAs.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：大腸がん 前癌病変

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

大腸がんは大腸腺腫を経てがん化するという adenoma-carcinoma シークエンスモデルが広く受け入れられており、近年のゲノム解析技術の向上に伴って多段階発がん過程における分子病態の理解が急速に進んだ。大腸鋸歯状病変(serrated lesion)は従来発がんポテンシャルを持たない過形成性病変と考えられてきたが、重要な前がん病変であることが明らかにされ注目を集めている。とくに鋸歯状病変の一群である sessile serrated adenoma/polyp (SSA/P)は、BRAF 変異および DNA メチル化異常 (CpG アイランドの高メチル化) を高率に示すことから、マイクロサテライト不安定性(microsatellite instability, MSI)および CpG アイランドメチル化形質 (CpG island methylator phenotype, CIMP)陽性がんの前がん病変と認識されるようになった。しかしながら SSA/P 以外の鋸歯状病変、特に鋸歯状腺腫(traditional serrated adenoma, TSA) や鋸歯状変化をきたす大腸腺腫(adenoma with serration)の発がんポテンシャルには不明な点が多い。特に adenoma with serration は、従来は鋸歯状病変として捉えられていたが、現在の WHO 分類では鋸歯状病変に含まれていない。このように鋸歯状病変を巡っては、臨床病理学的な診断基準にコンセンサスが得られていない部分が多く残っており、今後解決すべき問題点と言える。また最近、PTPRK-RSPO3 融合遺伝子や RNF43 遺伝子変異が TSA に特異的であることが報告されたが、その頻度は低く (J Pathol, 2016)、RNF43 遺伝子変異は多発 SSA/P との関連も報告されていることから (Gut, 2016; Gastroenterol, 2014)、その臨床的意義はまだ確立されていない。

adenoma-carcinoma シークエンスを迎える病変は、拡大内視鏡によるピットパターン分類(工藤・鶴田分類)によりかなり正確に診断を行うことが可能であるが、この分類体系には鋸歯状病変の概念が十分に組み込まれていなかった。そこで申請者らのグループでは、詳細な拡大内視鏡所見および病理組織学的所見に分子生物学的解析手法を加えた橋渡し研究を行い、BRAF 変異および CIMP を伴う SSA/P に特異的な内視鏡所見として、Type -Open (開 II 型)ピットパターンを発見し報告した (Am J Gastroenterol, 2012)。その後も検証を続け、開 II 型ピットパターンが SSA/P の内視鏡診断に有用であるというエビデンスを蓄積しているが (Gastroint Endoscopy 2017)、開 II 型ピットパターンを呈さない鋸歯状病変の内視鏡所見はいまだに不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

大腸前がん病変の臨床病理学的特徴を明らかとし内視鏡診断学に応用することは、大腸がんの予防・早期発見に重要である。近年、鋸歯状病変(serrated lesion)が前がん病変であることが明らかにされ、鋸歯状経路(serrated pathway)と呼ばれる新たな発がん経路が注目されている。しかしながら鋸歯状腺腫(Traditional serrated adenoma, TSA)や、腺腫から鋸歯状変化を来す病変(adenoma with serration)の臨床病理学的特徴にはいまだ不明な点が多い。本研究ではゲノム・エピゲノム解析と臨床的研究を融合することで、鋸歯状経路の分子異常とそれを反映する臨床病理学的特徴・内視鏡所見を明らかにし、鋸歯状病変の内視鏡診断に応用することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 解析対象

内視鏡的または外科的切除された非浸潤性大腸腫瘍、浸潤性大腸腫瘍および隣接する正常大腸組織から得られた。SMOC1 の発現および機能解析のため大腸がん細胞株を用いた。

#### (2) DNA メチル化解析および変異解析

ゲノムワイドな DNA メチル化を Infinium HumanMethylation450 BeadChip を用いて解析し、データを Microsoft Excel および JMP11 で解析した。同定した遺伝子の DNA メチル化を、バイサルファイトシークエンス法およびバイサルファイトパイロシークエンス法により解析した。また CpG アイランドメチル化形質(CIMP)をバイサルファイトパイロシークエンス法、KRAS 変異、BRAF 変異をパイロシークエンス法、TP53 変異をダイレクトシークエンス法により解析した。

#### (3) SMOC1 発現解析

大腸腫瘍組織と大腸がん細胞株における SMOC1 発現を、定量的 RT-PCR 法にて解析した。大腸腫瘍組織における SMOC1 蛋白発現を解析するため、免疫組織化学染色を行い、染色強度をスコア化して定量的に解析した。大腸がん細胞株に過剰発現させた SMOC1 をウエスタンブロットにより解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) TSA の発育進展過程において DNA メチル化が変化する遺伝子の同定

TSA の発育進展中に起こる DNA メチル化変化を同定するため、隆起部と平坦部を有する TSA を対象にゲノムワイドな DNA メチル化解析を行った。その結果、平坦部から隆起部へ進展する間に DNA メチル化が変化する遺伝子として、11 遺伝子 (B3GALNT1、CADPS、FAM92A1、FEZ1、FRMD4B、GABRA4、KIAA1529、OGFRL1、PRDM16、SMOC1、ZNF345) を同定した。正常大腸組織 (n = 61)、HP (n = 52)、SSA/P (n = 107) および TSA (n = 47) において、これらの遺伝子のメチル化をバイサルファイトパイロシークエンス法で解析した結果、TSA において高頻度にメチル化する

遺伝子として SMOC1 ( SPARC-related modular calcium binding 1 ) を同定した。

#### (2) 大腸腫瘍における SMOC1 のメチル化および発現解析

SMOC1 のメチル化と発現の相関を明らかにするため、大腸がん細胞株を用いた解析を行った。その結果、12 株中 10 株の大腸がん細胞株において SMOC1 のメチル化の上昇を検出し、12 株全てにおいて SMOC1 発現の低下を認めた。また DNA メチル化酵素阻害剤である 5-aza-2'-deoxycytidine 処理による SMOC1 発現の回復を認めた。

次に正常大腸組織、SSA/P および TSA を含む臨床検体において、SMOC1 のメチル化と発現を解析した。TSA では SMOC1 のメチル化レベル上昇および発現低下が見られたが、正常大腸組織および SSA/P では SMOC1 はメチル化されておらず、発現低下も見られなかった。以上の結果から、SMOC1 のメチル化は発現抑制と相関することが示された。

続いて TSA ( n = 11 )、SSA / P ( n = 12 ) および隣接する正常大腸粘膜 ( n = 23 ) における SMOC1 蛋白の発現を免疫組織化学染色法にて解析した。正常大腸組織および SSA/P では SMOC1 発現を認めたが、多くの TSA では発現が低下あるいは消失していた。SMOC1 発現レベルをスコア化して定量解析した結果、TSA は正常大腸および SSA/P と比較して、有意な発現低下を示した。これらの結果から、SMOC1 は SSA/P と TSA を鑑別するバイオマーカーとなり得る可能性が示された。

#### (3) SMOC1 の機能解析

大腸がんにおける SMOC1 の機能を明らかにするため、まず大腸がん細胞株に SMOC1 発現ベクターを導入し、細胞増殖に与える影響を解析した。cell viability assay および colony formation assay の結果、SMOC1 の過剰発現が大腸がん細胞の増殖とコロニー形成を抑制することが明らかとなった。一方で、migration assay および invasion assay の結果、SMOC1 は大腸がん細胞の浸潤能、遊走能には影響を与えなかった。また SMOC1 はアポトーシスにも影響を与えなかった。次に SMOC1 を導入した大腸がん細胞をヌードマウスに移植した結果、SMOC1 が xenograft 形成を軽度抑制していることを見いだした。

#### (4) 大腸腫瘍進展における SMOC1 メチル化の検討

TSA から大腸がんへの進展における SMOC1 メチル化の役割を明らかにするために、がんと TSA が混在する病変を解析した。その結果、がんを伴う TSA は、TSA 単独よりも SMOC1 のメチル化レベルが高いことを見いだした。そこで SMOC1 メチル化が、TSA の発がんリスク予測マーカーとなりうるかを検証するため、「TSA+がん」と「TSA 単独」における SMOC1 メチル化レベルを ROC 曲線解析した。その結果、SMOC1 メチル化 ( カットオフ値 36% ) が感度 75%、特異度 66% で両者を識別していることを明らかにした。

次に、非浸潤性大腸腫瘍 ( n = 473 ) を用いて SMOC1 メチル化と臨床病理学的特徴との相関を検証した。その結果、SMOC1 メチル化は年齢および腫瘍径と正の相関を示した。SMOC1 メチル化は TSA のみならず通常型腺腫にも認められ、その頻度は低異型度腺腫よりも高異型度腺腫において有意に高かった。また他の分子異常と比較した結果、SMOC1 メチル化は、KRAS 変異、TP53 変異および CIMP-low と正の相関を示した。さらに浸潤性大腸腫瘍 ( n = 374 ) を用いた解析の結果、SMOC1 メチル化は年齢、近位大腸発生、KRAS 変異および CIMP-low と正の相関を示した。以上の結果から、SMOC1 のメチル化は TSA や通常型腺腫の悪性進展に関わっている可能性が示唆された。この仮説を検証するため、我々は前がん病変 ( TSA、SSA/P、通常型腺腫 ) とがんが混在する混合大腸病変を解析した。SMOC1 メチル化は「TSA+がん」症例のほとんどに認められ、かつがん部は高頻度に CIMP-low を呈した。さらに SMOC1 メチル化は「腺腫+がん」症例にも高頻度に認められ、かつ KRAS 変異と正の相関を示した。一方、SMOC1 メチル化は「SSA/P+がん」症例において低頻度であった。これらの結果から、SMOC1 メチル化は TSA および高異型度腺腫から、CIMP-low / CIMP-negative 大腸がんへの進展に関与する可能性が示された。

## 5 . 主な発表論文等

### [ 雑誌論文 ] ( 計 4 件 )

1. Ishiguro K, Kitajima H, Niinuma T, Ishida T, Maruyama R, Ikeda H, Hayashi T, Sasaki H, Wakasugi H, Nishiyama K, Shindo T, Yamamoto E, Kai M, Sasaki Y, Tokino T, Nakase H, Suzuki H. DOT1L inhibition blocks multiple myeloma cell proliferation by suppressing IRF4-MYC signaling. **Haematologica**. 2018 [Epub ahead of print] 査読あり  
DOI: 10.3324/haematol.2018.191262.
2. Wakasugi H, Takahashi H, Niinuma T, Kitajima H, Oikawa R, Matsumoto N, Takeba Y, Otsubo T, Takagi M, Ariizumi Y, Suzuki M, Okuse C, Iwabuchi S, Nakano M, Akutsu N, Kang JH, Matsui T, Yamada N, Sasaki H, Yamamoto E, Kai M, Sasaki Y, Sasaki S, Tanaka Y, Yotsuyanagi H, Tsutsumi T, Yamamoto H, Tokino T, Nakase H, Suzuki H, Itoh F. Dysregulation of miRNA in chronic hepatitis B is associated with hepatocellular

carcinoma risk after nucleos(t)ide analogue treatment. **Cancer Lett.** 434:91-100, 2018.  
査読あり  
DOI: 10.1016/j.canlet.2018.07.019.

〔学会発表〕(計4件)

(1) Ishiguro K, Kitajima H, Niinuma T, Maruyama R, Ikeda H, Hayashi T, Ishida T, Sasaki H, Wakasugi H, Nishiyama K, Shindo T, Kai M, Sasaki Y, Tokino T, Nakase H, Suzuki H. The histone methyltransferase DOT1L is a potential therapeutic target in multiple myeloma. An AACR Special Conference on Targeting DNA Methylation and Chromatin for Cancer Therapy. March 1-4, 2018, Atlanta, USA.

(2) 鈴木拓, 高橋秀明, 若杉英樹, 新沼猛, 北嶋洋志, 山本英一郎, 佐々木基, 須藤豪太, 甲斐正広, 時野隆至, 仲瀬裕志, 伊東文生. 慢性B型肝炎におけるmiRNA異常は核酸アナログ製剤治療後の肝がんリスクと相関する. 第77回日本癌学会学術総会. 2018年9月27~29日, 大阪.

(3) 佐々木基, 新沼猛, 北嶋洋志, 山本英一郎, 石黒一也, 若杉英樹, 萬頭, 須藤豪太, 甲斐正広, 鈴木拓, 仲瀬裕志. 肝細胞癌におけるBET阻害剤の抗腫瘍メカニズムの解析. 第77回日本癌学会学術総会. 2018年9月27~29日, 大阪.

〔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

<http://web.sapmed.ac.jp/biochem2/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

なし

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名: 鈴木 拓

ローマ字氏名: SUZUKI, Hiromu

研究協力者氏名: 山本 英一郎

ローマ字氏名: YAMAMOTO, Eiichiro

研究協力者氏名: 青木 敬則

ローマ字氏名: Aoki, Hironori

研究協力者氏名: 山野 泰穂

ローマ字氏名: YAMANO, Hiro-o

研究協力者氏名: 菅井 有

ローマ字氏名: SUGAI, Tamotsu

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。