

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15752

研究課題名（和文）大腸癌におけるRAD17関連遺伝子群一塩基多型のEGFRおよびRAS変異への関与

研究課題名（英文）A single nucleotide polymorphisms of RAD17-related genes in EGFR and RAS mutations in colorectal cancer

研究代表者

保田 雪子（Yasuda, Yukiko）

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：80815499

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）：ヒトRAD17はDNA損傷に応じてチェックポイント活性化のシグナルとして作用し、そのSNPのLeu546Argは、大腸がんへの易罹患性が示されている。この性質が、大腸がんの主要因軸であるEGFRならびにKRAS変異のリスク要因にどのように影響を及ぼすかの関連解析をおこない、大腸がんに対する抗EGFR抗体薬のより効果的なコンパニオン診断のための層別化を試みた。

さらに、もう1つの大腸がん関連遺伝子候補である中心体関連タンパク質NINEINについても同様の解析をおこない、NINEIN Pro1111Ala多型が大腸がんのリスクと関連しており、特に男性の直腸がんにおいてオッズが高いことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸がんに対する分子標的治療薬としては、抗EGFR抗体薬があり、RAS遺伝子検査により、その効果を予見し、適用が決められる。今回大腸がんの易罹患性に関連するRAD17およびNINEINのSNPを対象にして、EGFRの発現亢進およびKRAS変異との関連について解析した。結果、有意な関連が示されず、当初の目的である、抗EGFR抗体薬のより効果的なコンパニオン診断のための層別化はかなわなかった。しかしながら、近年拡充しつつあるin silicoデータと環境を駆使することにより、がん関連遺伝子のSNPをコンパニオン診断に役立たせる可能性は強まっており、さらなる深度の解析を試行続行中である。

研究成果の概要（英文）：Human RAD17 acts as a signal for checkpoint activation in response to DNA damage, and its SNP, Leu546Arg, has been shown to be susceptible to colorectal cancer. We analyzed how this property affects the risk factors for EGFR and KRAS status, which are the main causative axis of colorectal cancer, and attempted to stratify them for more effective companion diagnosis of anti-EGFR antibody drugs for colorectal cancer.

We also analyzed another candidate colorectal cancer-associated gene, the centromeric-associated protein NINEIN, and found that the NINEIN Pro1111Ala polymorphism was associated with colorectal cancer risk, with particularly high odds in men with rectal cancer.

研究分野：分子生物学

キーワード：大腸がん SNP RAD17 NINEIN

1. 研究開始当初の背景

最新の国立がんセンターの統計によると、大腸がんの部位別死亡数（2019年）は、女性で1位、男性で3位を占め、部位別罹患数（2017年）は女性2位、男性3位となっている。大腸がんには抗EGFR抗体薬が有効であるが、KRAS遺伝子に変異がある場合には治療効果が低いとして適応されない。KRAS遺伝子変異は女性、および右側結腸に多いことが知られているが、このような変異が誘導される要因は判っていない。

代表者は、がん修復遺伝子一塩基多型と発がんリスクの関連解析研究から、RAD17コドン546遺伝子多型のArg/Arg型が大腸がんのリスクとなることを報告している（Yasuda Y et al., 2017 Acta Medica Okayama）。ヒトRAD17遺伝子は分裂酵母の細胞周期制御を行うRAD17遺伝子のヒトホモログであり、DNA損傷や不完全なDNA複製の修復においてATRによるリン酸化とCHK1活性化による細胞周期停止に重要な役割を果たす。RAD17はATP分解酵素と結合するPループ（Walker Aモチーフ）とATRリン酸化酵素の標的である二箇所のSQモチーフ（Ser635, Ser645）で構成され、両SQ領域がリン酸化されることで、RAD9-HUS1-RAD1複合体と相互作用し、G2/M期制御を活性化させる。RAD17タンパク質のSQモチーフ近傍に位置するコドン546のロイシンがアルギニンへと置換されることで、ATRリン酸化に影響を及ぼし、大腸がんの腫瘍進展に関連して可能性がある。

RAD17は大腸がん組織で過剰発現し、腫瘍の進展制御との関連が示唆されていることから（Bao S et al., 1999 Cancer Res）、DNA損傷修復の初期に必須である関連遺伝子群の一塩基多型や機能異常が、DNA損傷の蓄積によって誘発される大腸上皮細胞の異常増殖促進のリスク要因となり、結果的にEGFRの発現亢進やKRAS変異へと繋がっていく可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、染色体不安定性やがん化に関わるチェックポイント制御機構に着目し、RAD17関連遺伝子群におけるSNPと、大腸がんのがん分子標的薬選択に重要となるEGFR遺伝子の高発現ならびにKRAS遺伝子変異の組み合わせによる大腸がん発がんリスクとを関連解析するものである。現在、抗EGFR抗体薬の適応はKRAS変異の有無によって決定され、近年は遺伝子パネル検査によりBRAF遺伝子変異の状態による違いも明らかになるなど、効果的な治療のためのコンパニオン診断はますます重要度を増している。その一方で、これらは腫瘍部位における体細胞変異を評価するものであり、変異を誘発する遺伝的素因についての検証には至っていない。このとき、体細胞変異の背景にある個人差のSNPを評価指針として用いることで、分子標的薬の適応をより詳細に判断することができる可能性がある。すなわち、発症前を含む潜在的なリスク集団の層別化が可能となり、ひいてはより効率的な個別化医療につなげることができると期待される。

なお、RAD17を対象にした解析で、KRAS、EGFRとの関連が見出されなかった場合には、やはり大腸がんとの関連が認められたNINEIN遺伝子を対象にした解析を試みる。NINEINは、中心体に局在する微小管関連タンパク質をコードしており、RAD17と同様に、KRAS遺伝子変異と機能的に相関する可能性が考えられる。

3. 研究の方法

（1）RAD17およびNINEINを対象とした大腸がん患者のSNP解析をおこなった。大腸がん患者212名、非がんコントロール1142名を対象とした解析を軸にして、日本人を含めた公共データベースを含めてRAD17のLeu546Arg、およびNINEINのPro1111Alaについて、大腸がんの易罹患性につ

いての関連解析をおこなった。年齢、性別、生活習慣および大腸がんの発生部位について層別化した関連解析をおこなった。

(2) RAD17とNINEINそれぞれのSNPとKRAS変異、EGFR発現との関連性を解析した。また、RAD17との組み合わせで大腸がんリスクの有意な変動が見られた他の遺伝子、TDG (Thymine DNA Glycosylase)、DCLRE1B (DNA Cross-Link Repair 1B)、OGG1 (8-Oxoguanine DNA Glycosylase)などについても、関連性の有無を検討した。

(3) NINEINのPro1111Alaについては実際に細胞を用いて、NINEIN自身の安定性の変化、セントロソームの局在化、および関連タンパク質のCEP170 (Centrosomal Protein 170)、PLK1 (Polo-like kinase 1)、AURKA (Aurora-A kinase) への結合などに及ぼす影響を調べた。細胞株としてはHeLa、HEK293Tを用いたトランスフェクション実験、および大腸がん細胞株HCT8、SW620、RKOについての検証をおこない、Pro1111Alaが大腸がんの発症および進展にどのように寄与するかの可能性を探った。

4. 研究成果

(1) RAD17のLeu546Argは、直腸がんリスク低減、少量喫煙者における大腸がんリスク低減、及び多量喫煙者における大腸がんリスク増大に関連していた。本SNPとKRAS変異、EGFR変異、およびEGFR発現有無との関連解析をおこなったが、有意な関連性は見出せなかった。EGFR発現の強度については、病理診断レベルの標準化・均てん化が十分でないため、in silicoで十分なデータが得られなかったため、直接には解析できなかった。

(2) NINEINのPro1111Alaは、男性において大腸がんのリスクが増大し、さらに非飲酒者、直腸がんでその傾向が強かった。本SNPとKRAS変異、EGFR発現有無との関連解析をおこなったが、有意な関連性は見出せなかった。RAD17との組み合わせで大腸がんリスクの有意な変動が見られた他の遺伝子、TDG、DCLRE1B、OGG1についても同様の結果が得られた。

(3) NINEIN遺伝子型とがん部位について、有意な関連が見られた男性患者のNINEIN遺伝子型とがん部位との関連を解析した。左結腸と右結腸は発生起源が異なるため、大腸の左側（下行結腸、S状結腸、直腸）と右側（盲腸、上行結腸、横行結腸）を別々に解析したところ、Ala/Ala遺伝子型を持っている場合には、左側の大腸群のみがリスクの増加を示した (OR=2.42、95%CI 1.01-5.82、P=0.049)。さらに、大腸がんと直腸がん（左側）を比較したところ、直腸がんのみがAla/Ala遺伝子型と有意な関連を示した (OR=3.30、95%CI 1.26-8.61、P=0.01)。他の部位のがんや、患者全体および女性患者では、このような関連は認められず、本SNPの直腸がんのリスクは男性群に限られることが示された。

(4) NINEIN遺伝子のPro1111Alaによる影響として、NINEINの中心体への局在の変化、関連タンパク質のCEP170、PLK1、AURKAとの結合性の変化、NINEIN自身の安定性の変化などを想定し、その評価をおこなった。どちらのアミノ酸でもNINEINは中心体に局在し、明らかな変化は見られなかったが、Alaの方が（細胞分裂と微小管形成に必要な中心体タンパク質）ペリセントリンのシグナルが弱い傾向がみられ、このことが安定性に関与する可能性が考えられた。関連タンパク質との結合性には変化がなかったが、NINEIN自身の安定性は、Alaの方が安定性が低く、半減

期が短いことがわかった。また、Western実験に際して、Proタイプにのみ、やや分子量の低い副次的なNINEINバンドが出現した。解析から、これはNINEINの分解産物ではなくNINEINと結合するタンパク質で、Alanineに変異することで結合できなくなったものと考察された。また、この未同定のタンパク質がNINEINの安定性の向上に関与する可能性も考えられる。

以上から、RAD17およびNINのSNPを対象にした、大腸がんにおけるEGFRの発現亢進およびKRAS変異との関連については有意な関連が示されず、当初の目的である、抗EGFR抗体薬のより効果的なコンパニオン診断のための層別化はかなわなかった。しかしながら、がん関連遺伝子のSNPをコンパニオン診断に役立たせるといふ企図については、近年拡充しつつあるin silicoデータと環境を駆使することにより、可能となると考えている。統計解析の方法が重要となるが、専門的な見地からもアプローチや手法が多岐に亘るようであり、決定的といえる方法は確立していない。解析手法そのものの開発などは我々には無理であるが、逆に、どのような要素をどのような順序で選択して解析していくかなどの重要性があらためて認識できた。in silico解析のユーザーインターフェイスも日々進化しており、我々一般のバイオリジストにも開かれた（理解可能な）Web siteも増えつつあり、さらなる深度の解析を試行続行中である。

また、NINEINについては、SNPとの関連で、タンパク質の機能の一端を解析したが、未知の部分も多く、さらなる解析を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yasuda Yukiko, Sakai Akiko, Ito Sachio, Sasai Kaori, Ishizaki Akisada, Okano Yoshiya, Kawahara Seito, Jitsumori Yoshimi, Yamamoto Hiromasa, Matsubara Nagahide, Shimizu Kenji, Katayama Hiroshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Human NINEIN polymorphism at codon 1111 is associated with the risk of colorectal cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedical Reports	6. 最初と最後の頁 1~1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/br.2020.1352	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------