

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07662

研究課題名(和文) 多発鋸歯状病変の分子病態解明と大腸がん高リスク患者のサーベイランス体系の構築

研究課題名(英文) Molecular analysis of multiple sessile serrated lesions and establishment of surveillance system for high-risk patients with colorectal cancer

研究代表者

原田 拓 (Harada, Taku)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：60468030

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、多発鋸歯状病変からの大腸がん発生メカニズムを解明し、大腸がん高リスク患者のサーベイランスにつなげることを目的とした。多発鋸歯状病変および背景粘膜のDNAメチル化とヒストン修飾を解析した結果、多発鋸歯状病変の背景粘膜では、転写抑制のマーカーであるヒストンH3リジン27トリメチル化(H3K27me3)が上昇していた。背景粘膜のH3K27me3は腫瘍部のDNAメチル化と正の相関を示し、逆に背景粘膜のH3K4me3は腫瘍部のDNAメチル化と負の相関を示した。これらのうち、多発鋸歯状病変の背景粘膜において高頻度にH3K27me3を示すマーカー遺伝子候補としてTLX2とGABRA4を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸腫瘍の背景粘膜においてDNAメチル化異常が蓄積するという報告はこれまでも見られるが、本研究ではヒストン修飾が大腸腫瘍のfield defectに関わるという知見を得た。背景粘膜におけるヒストン修飾は、多発鋸歯状病変のリスクマーカーとして応用しうる可能性が示された。また、大腸粘膜におけるヒストン修飾が、大腸腫瘍発生におけるDNAメチル化異常のトリガーとなっている可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Patients with multiple serrated lesions are at high-risk of developing colorectal cancer. The aim of this study was to elucidate the mechanisms underlying the development of colorectal cancer from multiple serrated lesions and to establish surveillance for high-risk patients with colorectal cancer. Analysis of DNA methylation and histone modifications in serrated lesions and background mucosa revealed an elevated level of histone H3 lysine 27 trimethylation (H3K27me3), a marker of transcriptional repression, in the background mucosa of multiple serrated lesions. H3K27me3 in the background mucosa showed a positive correlation with DNA methylation in the tumor area, while H3K4me3 in the background mucosa showed a negative correlation with DNA methylation in the tumor area. Among these findings, TLX2 and GABRA4 were identified as candidate marker genes that frequently exhibit H3K27me3 in the background mucosa of multiple serrated lesions.

研究分野：消化器内科学

キーワード：大腸鋸歯状病変 大腸がん エピゲノム ヒストン修飾 DNAメチル化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大腸がんによる死亡を減らすためには早期発見が重要である。また鋸歯状病変の多発は大腸がんの高リスク因子である。大腸がん高リスク群として大腸鋸歯状病変が多発する Serrated polyposis syndrome (SPS) が知られており、SPS 症例は 5 年間のフォローアップ期間中に約 35% が大腸がんを発症すると報告されている。このことから、SPS 症例に対しては 1~2 年ごとの内視鏡サーベイランスが推奨されている。さらに SPS 診断基準を満たさないが、鋸歯状病変を有する症例 (非 SPS) もまた大腸がんリスクが高いと報告されている。しかし『SPS と非 SPS 症例を区別して対応するべきか、最適なサーベイランス期間をどのように決定するか』など、臨床的取扱いに関して明確な結論はいまだ出ていない。

これまで我々は、内視鏡診断学と分子生物学を組み合わせた研究を行い、大腸発がん機構の解明と診断・治療への応用研究を行ってきた。その結果、鋸歯状病変の発生と進展には DNA メチル化が重要であることを明らかにしたが、鋸歯状病変が多発するメカニズムはこれまで不明であった。

2. 研究の目的

本研究は、多発鋸歯状病変からの大腸がん発生メカニズムを解明し、大腸がん高リスク患者のサーベイランスにつなげることを目的とする。分子異常と大腸がんリスクとの相関を解析することで、これまで未知であった大腸の field defect の解明に取り組むことを目指す。

3. 研究の方法

組織検体

多発性鋸歯状病変症例 18 例の腫瘍部および背景粘膜から生検を採取した。腺腫症例 21 例の腫瘍部および背景粘膜から同様に生検を採取した。腺管分離法を用いて上皮成分を抽出した。

DNA メチル化解析

生検組織よりゲノム DNA を抽出し、バイサルファイト処理を行った。CIMP マーカーのメチル化をバイサルファイト・パイロシークエンス法により解析した。また代表的な症例を選択し、DNA メチル化を Infinium BeadChip により解析した。

ヒストン修飾解析

転写活性化のマーカーであるヒストン H3 リジン 4 トリメチル化(H3K4me3)と、転写抑制のマーカーであるヒストン H3 リジン 27 トリメチル化(H3K27me3)を、クロマチン免疫沈降シークエンス(ChIP-seq)法によって解析した。シークエンスデータはヒトゲノム(hg19)にマッピングし、macs2 あるいは epic2 を用いてピークコールした。代表的な遺伝子のヒストン修飾を ChIP-qPCR 法によって検証した。

4. 研究成果

多発鋸歯状病変の背景粘膜におけるヒストン修飾

多発鋸歯状病変 2 例、および大腸腺腫 2 例における DNA メチル化を Infinium BeadChip により解析した。その結果、多発鋸歯状病変では腺腫と比較して、CpG アイランドの DNA メチル化の上昇を認め、CpG island methylator phenotype (CIMP) を獲得していることが示された。次に、これらの症例の背景粘膜における H3K4me3 および H3K27me3 を ChIP-seq により解析した。その結果、多発鋸歯状病変では H3K27me3 ピークの上昇を認めた。多発鋸歯状病変の背景粘膜において H3K27me3 マークが見られた遺伝子の多くは、腫瘍部において DNA メチル化が上昇していた。逆に、背景粘膜における H3K4me3 は、腫瘍部の DNA メチル化と逆相関を示した。さらに、既報の胚性幹細胞(ES 細胞)のヒストン修飾データと比較した結果、背景粘膜において H3K27me3 でマークされた遺伝子の約半数は、ES 細胞において H3K27me3 と H3K4me3 の bivalent 修飾を受けていることが明らかとなった。これらの結果から、背景粘膜における H3K27me3 は、鋸歯状病変における DNA メチル化異常のトリガーとなっている可能性が示された。

マーカー遺伝子の抽出

多発鋸歯状病変の背景粘膜において H3K27me3 マークが上昇している遺伝子のうち、マーカー候補として TLX2 と GABRA4 に着目した。これらの遺伝子は CIMP 陽性の鋸歯状病変において高頻度に DNA メチル化することが、バイサルファイト・パイロシークエンス解析から示された。さらにこれらの遺伝子は、鋸歯状病変の背景粘膜において高頻度に H3K27me3 の上昇を示すことが、ChIP-qPCR 解析から示された。

エンハンサー領域の解析

次に我々はエンハンサー領域の DNA メチル化を解析した。公的データベースに登録された大

腸がん臨床検体のヒストン H3 リジン 27 アセチル化(H3K27ac)の ChIP-seq データを指標にエンハンサー領域を同定し、多発性鋸歯状腺腫の DNA メチル化データと統合した結果、FGF19 遺伝子に存在するエンハンサー領域候補において DNA メチル化の上昇を認めた。この領域のメチル化は BRAF 変異陽性、MSI 陽性の大腸がんにおいても高頻度に認めたことから、腫瘍リスクに関わる可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Sudo Gota, Aoki Hironori, Yamamoto Eiichiro, Takasawa Akira, Niinuma Takeshi, Yoshido Ayano, Kitajima Hiroshi, Yorozu Akira, Kubo Toshiyuki, Harada Taku, Ishiguro Kazuya, Kai Masahiro, Katanuma Akio, Yamano Hiro o, Osanai Makoto, Nakase Hiroshi, Suzuki Hiromu | 4. 巻 112 |
| 2. 論文標題 Activated macrophages promote invasion by early colorectal cancer via an interleukin 1 serum amyloid A1 axis | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Science | 6. 最初と最後の頁 4151 ~ 4165 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15080 | 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 - |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 NIINUMA TAKESHI, KITAJIMA HIROSHI, YAMAMOTO EIICHIRO, MARUYAMA REO, AOKI HIRONORI, HARADA TAKU, ISHIGURO KAZUYA, SUDO GOTA, TOYOTA MUTSUMI, YOSHIDO AYANO, KAI MASAHIRO, NAKASE HIROSHI, SUGAI TAMOTSU, SUZUKI HIROMU | 4. 巻 41 |
| 2. 論文標題 An Integrated Epigenome and Transcriptome Analysis to Clarify the Effect of Epigenetic Inhibitors on GIST | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Anticancer Research | 6. 最初と最後の頁 2817 ~ 2828 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancer.15062 | 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 Ishii Tatsuya, Harada Taku, Tanuma Tokuma, Yamazaki Hajime, Tachibana Yasuhiro, Aoki Hironori, Shinohara Toshiya, Katanuma Akio | 4. 巻 93 |
| 2. 論文標題 Histopathologic features and fragmentation of polyps with cold snare defect protrusions | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Gastrointestinal Endoscopy | 6. 最初と最後の頁 952 ~ 959 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gie.2020.07.040 | 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 Suzuki Yuichiro, Tanuma Tokuma, Nojima Masanori, Sudo Gota, Murakami Yuki, Ishii Tatsuya, Akahonai Masakazu, Kobayashi Yosuke, Hamamoto Hidetaka, Aoki Hironori, Harada Taku, Katanuma Akio, Nakase Hiroshi | 4. 巻 8 |
| 2. 論文標題 Comparison of dissection speed during colorectal ESD between the novel Multiloop (M-loop) traction method and ESD methods without traction | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Endoscopy International Open | 6. 最初と最後の頁 E840 ~ E847 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1055/a-1161-8596 | 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 Suzuki Yuichiro, Tanuma Tokuma, Nojima Masanori, Sudo Gota, Akahonai Masakazu, Hamamoto Hidetaka, Aoki Hironori, Harada Taku, Katanuma Akio, Nakase Hiroshi | 4. 巻 91 |
| 2. 論文標題 Multiloop as a novel traction method in accelerating colorectal endoscopic submucosal dissection | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Gastrointestinal Endoscopy | 6. 最初と最後の頁 185 ~ 190 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gie.2019.08.042 | 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6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 山本英一郎, 吉戸文乃, 須藤豪太, 三橋慧, 北嶋洋志, 新沼猛, 甲斐正広, 原田拓, 佐々木基, 久保俊之, 山野泰穂, 仲瀬裕志, 菅井有, 鈴木拓. |
| 2. 発表標題 Helicobacter pylori除菌後胃がんと背景胃粘膜におけるDNAメチローム解析. |
| 3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 吉戸文乃, 須藤豪太, 北嶋洋志, 新沼猛, 甲斐正広, 原田拓, 佐々木基, 久保俊之, 仲瀬裕志, 菅井有, 鈴木拓. |
| 2. 発表標題 エピジェネティック阻害剤のGIST細胞におけるエピゲノム修飾, 遺伝子発現への影響の統合解析. |
| 3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 新沼猛, 北嶋洋志, 畠中袖衣, 関口翔平, 萬頭, 久保俊之, 佐々木基, 原田拓, 甲斐正広, 仲瀬裕志, 鈴木拓. |
| 2. 発表標題 新規頭頸部癌関連long non-coding RNAの同定と機能解析. |
| 3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 須藤豪太, 山本英一郎, 青木敬則, 高澤啓, 吉戸文乃, 新沼猛, 久保俊之, 原田拓, 萬頭, 北嶋洋志, 甲斐正広, 小山内誠, 仲瀬裕志, 鈴木拓. |
| 2. 発表標題 活性化マクロファージはIL-1 -SAA1 axisを介して早期大腸がんの浸潤を促進する. |
| 3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 山本英一郎, 須藤豪太, 久保俊之, 原田拓, 佐々木基, 青木敬則, 北嶋洋志, 新沼猛, 甲斐正広, 山野泰穂, 菅井有, 仲瀬裕志, 鈴木拓. |
| 2. 発表標題 大腸粘膜の抑制的ヒストン修飾はCIMP陽性の大腸腫瘍リスクと相関する. |
| 3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 青木敬則, 高澤啓, 山本英一郎, 新沼猛, 山野泰穂, 北嶋洋志, 甲斐正広, 久保俊之, 原田拓, 小山内誠, 仲瀬裕志, 菅井有, 鈴木拓. |
| 2. 発表標題 SMOC1の大腸腫瘍診断マーカーとしての臨床的有用性の検討. |
| 3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2022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 |
|-------|---|-------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 山本 英一郎 (Yamamoto Eiichiro) (60567915) | 札幌医科大学・医学部・訪問研究員 (20101) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|