

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09061

研究課題名（和文）MSS/CIN大腸癌における染色体不安定性（CIN）制御機構の解明

研究課題名（英文）Chromosomal instability in colorectal cancer

研究代表者

早瀬 傑（Hayase, Suguru）

福島県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：00583387

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：大腸癌は、マイクロサテライト不安定性（MSI）、または染色体不安定性（CIN）を示し、後者は通常マイクロサテライト安定（MSS）である。本研究の目的は、CINにより発現異常を来す新規のがん関連遺伝子を同定しその臨床的意義や機能を解析することである。大腸腺腫、大腸癌、大腸癌細胞株に対して、網羅的遺伝子発現およびコピー数解析データを用いてスクリーニングを行い、候補遺伝子を抽出した。それら遺伝子は癌の進展に伴い、染色体レベルでの欠失に関連して発現低下し、それは予後不良に関連していた。一部の遺伝子について、大腸癌細胞株を用いてサイレンシングを行ったが、明らかな機能的意義を解明するには至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの大腸癌は染色体不安定性を示し、染色体不安定性は発癌・進展の過程で増加していく。本研究では、染色体不安定性を示す大腸癌において、特定の染色体の欠失とそれに関連する遺伝子発現低下、さらにその臨床的意義を示すことができた。大腸癌の発癌・進展におけるそれら遺伝子の生物学的機構の解明や、大腸癌治療の個別化を目指す今後の癌研究の礎として寄与し得ると考える。

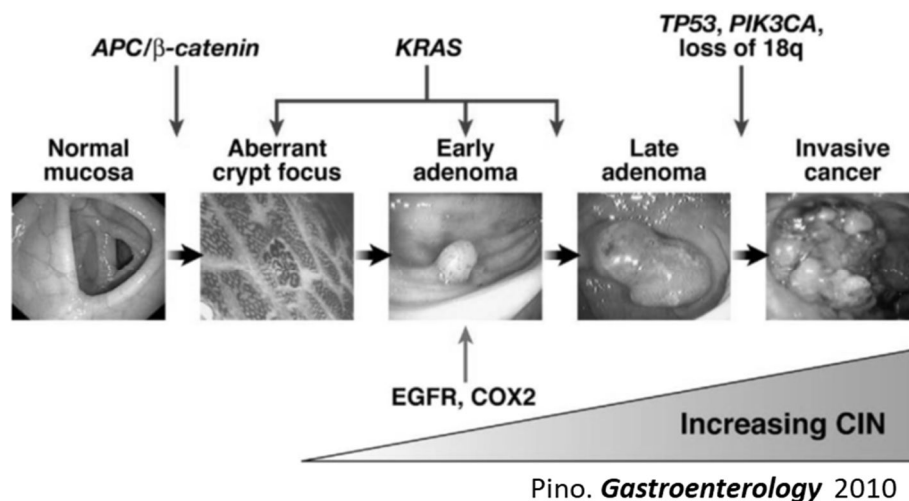
研究成果の概要（英文）：Colorectal cancer (CRC) exhibits either microsatellite instability (MSI) or chromosomal instability (CIN), with the latter typically being microsatellite stable (MSS). The purpose of this study was to identify novel cancer-associated genes whose expression is downregulated due to chromosomal deletions particularly in MSS/CIN CRC and to analyze their clinicopathological significance and functions. Based on comprehensive screening conducted on gene expression and copy number analysis datasets of adenomas, CRCs, and CRC cell lines, we identified a set of candidate genes. These genes were found to be downregulated in association with chromosomal-level deletions as cancer progressed, and this downregulation was related to poor prognosis. However, siRNA-mediated silencing using CRC cell lines demonstrated no clear functional significance.

研究分野：大腸癌

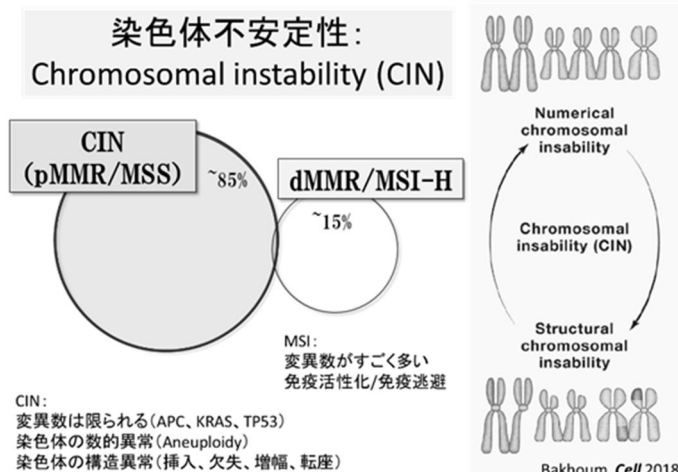
キーワード：大腸癌 染色体不安定性

1. 研究開始当初の背景

大腸癌にはおおまかに 2 つのサブタイプが知られる。約 15%の大腸癌は、高度のマイクロサテライト不安定性 (microsatellite instability high : MSI-H) を示し、残り 85%はマイクロサテライト安定 (microsatellite stable : MSS) であるが、多くは染色体不安定性 (chromosomal instability : CIN) を示す。それぞれ MSI、MSS/CIN と称することができ、その遺伝学的基盤のみならず、臨床的特徴・腫瘍学的予後・治療感受性が大きく異なる。MSS/CIN 大腸癌においては正常粘膜から腺腫形成、癌化、浸潤、転移といった進展の過程で、APC 変異 RAS 変異 TP53 不活化 染色体 18q 欠失 TGF 経路異常が段階的に蓄積する (下図)。すなわち MSS/CIN における発癌とは adenoma carcinoma sequence あるいは conventional pathway



として古くから知られる多段階発癌の概念に沿うものである。CIN により染色体の数的異常 (aneuploidy) 構造異常 (欠失、増幅、転座) が生じ、多段階発癌過程において CIN は顕在化していく。CIN は癌抑制遺伝子の不活化に重要である。例えば、腺腫から癌への移行過程で、染色体 17p 上の癌抑制遺伝子 TP53 は、点変異ともう一方のアレル欠損によりヘテロ接合性の喪失 (loss of heterozygosity: LOH) を来し不活化される。一方、染色体 18q の LOH は腺腫ではまれだが、大腸癌の 60%以上、大腸癌肝転移のほぼ全例に認められ、18q 上には SMAD4 や DCC など TGF 関連の癌抑制遺伝子がコードされている。MSI-H は発癌過程において静的なマーカーと言え、腺腫形成から遠隔転移に至るまで不変と考えられる。一方、CIN は癌進展の cause でありかつ consequence としてその過程で変化し続けるため、マーカーとしては未確立であり、現象としてもとらえどころがない部分がある。CIN は癌の本質的なメカニズムであり、癌進展の中心的な driver であることは疑いがなく (Samuel. Cell 2018, Sansregret. Nat Rev Clin Oncol 2018) CIN 研究にはいまだ大きな可能性が残されているとも言える。



2. 研究の目的

本研究の目的は、特定の染色体上にコードされ、発癌の過程において CIN により不活化される遺伝子 (群) を抽出すること、それら遺伝子の機能的意義を解明すること、またそれらの臨床的意義とバイオマーカーへの応用の可能性を検討すること、である。具体的には、MSS/CIN 大腸癌組織・細胞株において、染色体欠失により発現低下する遺伝子 (群) をマルチオミクスデータ解析により同定したうえで、in vitro の実験系、大腸癌組織での検討に展開するものである。

また、当初の重要な目的として、CIN により段階的に欠失する染色体上に、CIN を抑制する遺伝子がコードされている可能性 (Sakthianandeswaren. *Cancer Discov* 2018, Sun. *J Pathol* 2017, Burrell. *Nature* 2013) から、これを同定することを考えていたものである。

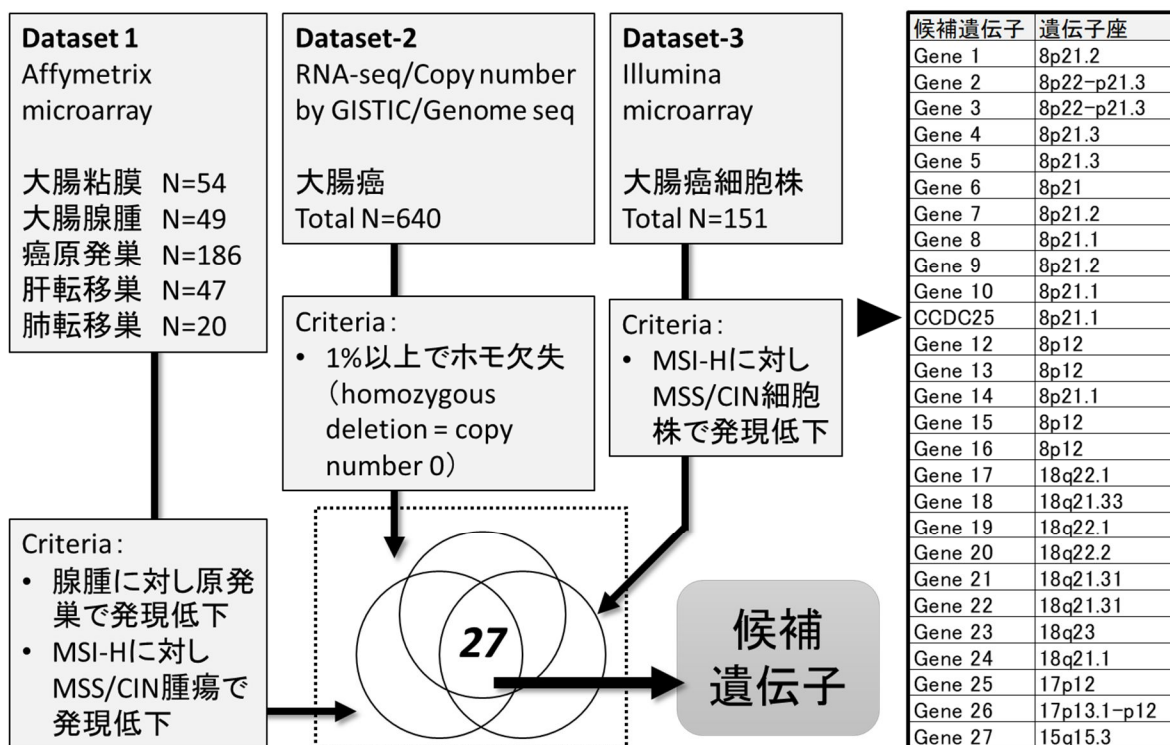
3. 研究の方法

本研究では下記のような方法を用いる (詳細は研究成果の欄に述べる)。

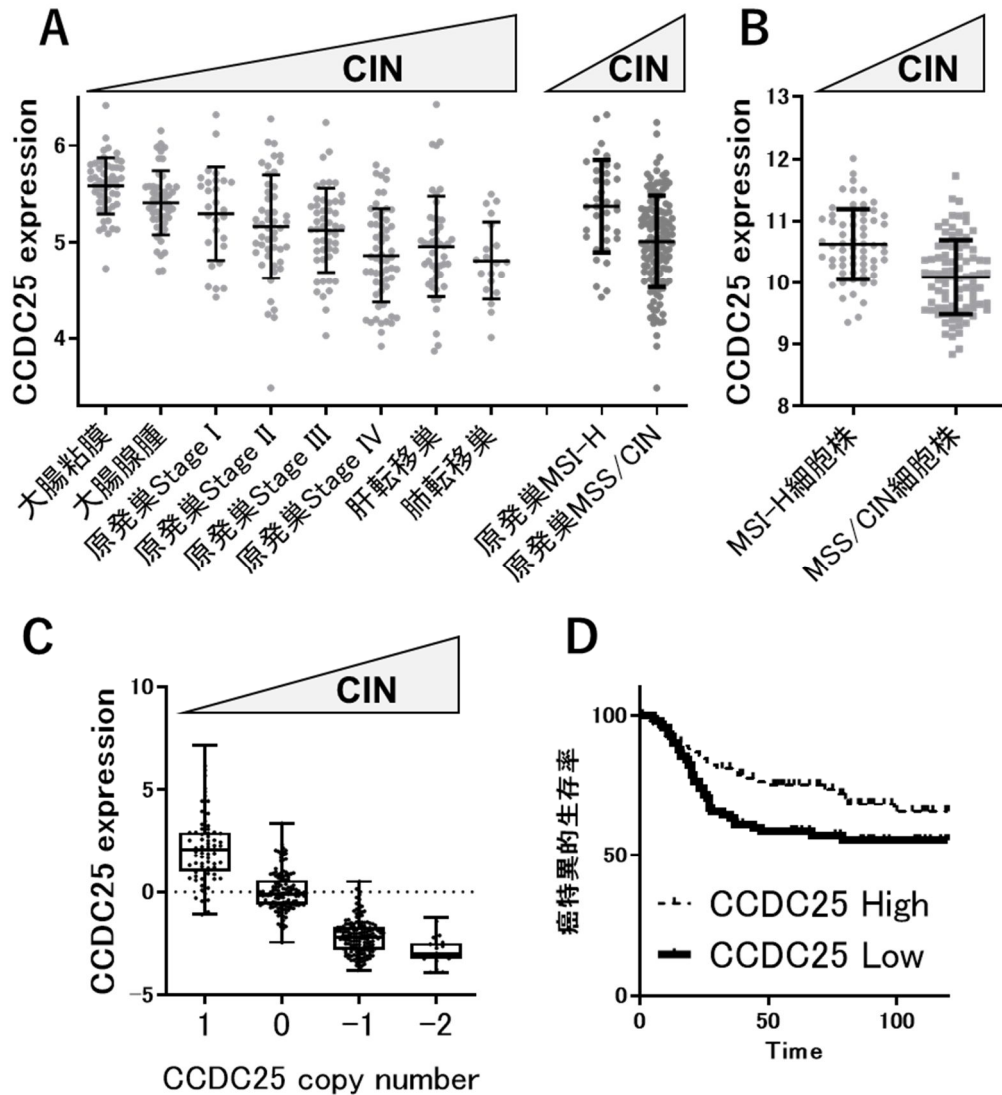
- 網羅的データ解析 (マルチオミクスデータとして、マイクロアレイ、RNA シークエンス、DNA コピー数解析、遺伝子変異解析)
- 各種統計解析
- ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 切片を用いた免疫組織学的検討
- 臨床病理学的情報、予後、CIN、MSS、MSI 等の検討
- 各種機能的検討 (in vitro)

4. 研究成果

本研究では、下記のような複数データセットを用いたマルチオミクス解析を出発点とした。大腸発癌の各過程を代表するように、非腫瘍部として大腸粘膜、前癌病変として大腸腺腫、大腸癌

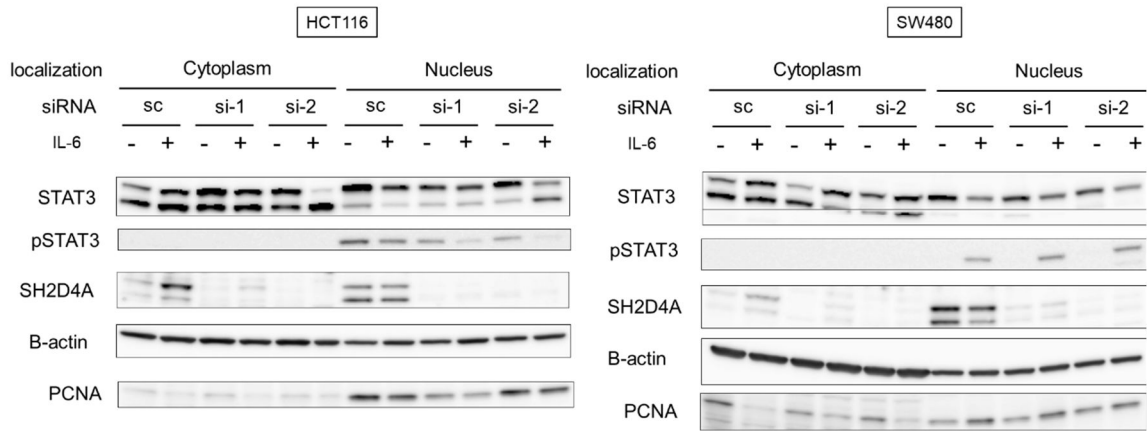


原発巣 (MSI および MSS) と転移巣 (Dataset-1)、各遺伝子のコピー数情報 (Dataset-2)、大腸癌細胞株 (MSI および MSS) のサンプルを集積し解析した。それぞれの dataset について、標記のような criteria を設け、CIN において、特にホモ欠失によって発現低下を来すと推定できる遺伝子群を抽出した。図のように 27 の遺伝子を抽出することに成功した。リスト内に示すようにそれら遺伝子の多くは染色体 8 番短腕 (8p)、あるいは 18 番長腕 (18q) にコードされるものであった。本解析を踏まえて染色体 8p 上の複数の候補遺伝子について着目するに至ったが、その解析の一例として CCDC25 についての結果を示す (上図、下図 A-D)。



CCDC25 遺伝子は大腸粘膜に比して大腸腺腫で、大腸腺腫に対して大腸癌原発巣で発現低下し、ステージの進行に伴い低下する。さらに原発巣に比して肺肝転移巣での低下している。また MSI 大腸癌に対し MSS/CIN 大腸癌においてその発現低下が著明である (A)。これら組織での結果は大腸癌細胞株においても同様で、MSI 大腸癌細胞株に対し、MSS/CIN 細胞株で発現低下が明らかである (B)。CCDC25 発現低下は CCDC25 遺伝子コピー数低下と明瞭な負の相関がある (C)。つまり、CCDC25 遺伝子の DNA レベルでの loss、deletion によりその発現低下を来すと言える。ここには示していないが、CCDC25 コピー数低下および発現低下は染色体 8p の loss、deletion に関連しており、MSS/CIN 大腸癌において、染色体 8p 欠損に伴い CCDC25 コピー数低下、発現低下を生じると言える。また、CCDC25 発現低下を示す症例の予後は不良であった (D)。

上記に示した遺伝子とは別に、染色体 8p 上の SH2D4A についてより詳細な解析を行った。SH2D4A 発現は上記同様に MSI 大腸癌に比して MSS/CIN 大腸癌で低く、癌の進展に伴い低下し、また予後不良と関連していた。また、SH2D4A 発現低下は染色体 8p の loss と関連していた (Matsumoto et al. *Br J Cancer* 2022)。この遺伝子について、肝細胞癌における報告 (Ploeger et al. *Hepatology* 2016) から、IL6 に反応性の STAT3 による転写活性を抑制することで腫瘍抑制的な機能を持つことが推測された。複数の大腸癌細胞株を用いて同遺伝子をノックダウンしたが、増殖や浸潤などに明らかな変化は見られなかった。また、核内分画における IL6 依存的な STAT3 リン酸化レベルについても一貫した結果は得られなかった。



上述のように、同遺伝子について臨床的意義は明確であった。一方、*in vitro* の実験系においては重要な limitation が挙げられる。同遺伝子の発現低下は染色体レベルでの変化（欠失）に由来するものである。そのような大きな染色体欠失は同染色体上にコードされる多数の遺伝子発現に影響するため、染色体レベルでの異常に伴う表現型を、単一遺伝子の機能喪失で説明することは困難であったものと推測できる。したがって、同遺伝子の発現低下はそれ単独では大腸癌細胞の機能的変化を誘導しなかったという可能性が指摘できる。一方で、臨床的には、同遺伝子の発現は予後バイオマーカーとして有用な可能性があると言える。

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 0件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Matsumoto Takuro, Okayama Hirokazu, Nakajima Shotaro, Saito Katsuharu, Ito Misato, Kaneta Akinao, Kanke Yasuyuki, Onozawa Hisashi, Hayase Suguru, Fujita Shotaro, Sakamoto Wataru, Saito Motonobu, Seze Zenichiro, Momma Tomoyuki, Mimura Kosaku, Kono Koji | 4. 巻 126 |
| 2. 論文標題 SH2D4A downregulation due to loss of chromosome 8p is associated with poor prognosis and low T cell infiltration in colorectal cancer | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 British Journal of Cancer | 6. 最初と最後の頁 917 ~ 926 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41416-021-01660-y | 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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 松本拓朗, 岡山洋和, 中嶋正太郎, 齋藤勝治, 菅家康之, 小野澤寿志, 藤田正太郎, 坂本渉, 齋藤元伸, 佐瀬善一郎, 門馬智之, 三村耕作, 河野浩二 |
| 2. 発表標題 大腸癌における染色体8p上の遺伝子SH2D4Aの不活化 |
| 3. 学会等名 第59回日本癌治療学会学術集会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 岡山洋和, 遠藤英成, 加瀬晃志, 山内直人, 松本拓朗, 早瀬傑, 藤田正太郎, 遠藤久仁, 坂本渉, 齋藤元伸, 佐瀬善一郎, 門馬智之, 三村耕作, 大木進司, 河野浩二. |
| 2. 発表標題 Chromosomal instability causes deletion of tumor suppressor genes in colorectal cancer |
| 3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会 |
| 4. 発表年 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 |
|-------|---|--|----|
| 研究分担者 | 岡山 洋和 (Okayama Hirokazu) (20583397) | 福島県立医科大学・医学部・講師 (21601) | |
| 研究分担者 | 坂本 渉 (Sakamoto Wataru) (40622337) | 福島県立医科大学・医学部・講師 (21601) | |

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