

令和 5 年 5 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16980

研究課題名（和文）大腸鋸歯状病変に対する網羅的遺伝子発現解析による悪性化リスクの解明

研究課題名（英文）Comprehensive gene expression analysis for serrated lesions of the colon to elucidate the risk of malignant transformation.

研究代表者

大木 大輔（Ohki, Daisuke）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40843157

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）：大腸鋸歯状腺腫（SSA/P）に対して内視鏡生検検体を用い、網羅的発現解析を行った。得られた結果に対してGSEA解析等のBioinformatic解析を行ったところ、SSA/PにMSI-high癌と強い相関が認められた。この結果によりSSA/Pの悪性化のメカニズムに迫れる可能性が示唆された。またトランスクリプトーム解析の結果、SSA/Pはその初期の段階よりCDX2の発現低下を認めていることが確認され、免疫染色でもCDX2発現がSSA/Pの超初期より明らかに低下していた。CDX2は腸の発生・分化・機能維持に必須とされており、その発現低下がSSA/P発症に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸鋸歯状腺腫は、近年認識されるようになってきた病変であり、癌化に至る機序や担癌率等、まだ十分に分かり切っていない状況であり、現在様々な研究が行われている。大腸鋸歯状腺腫は発育する過程で、その一部に異形成（dysplasia）が生じ、さらに発育することで癌に至るとされており、異形成が生じてから癌に至る速度が速い症例も一部にはあると報告されている。今回の結果により、大腸鋸歯状腺腫より異形成が生じて癌化に至る機序の一端が明らかとなった可能性があり、今後の更なる研究が望まれる。

研究成果の概要（英文）：Comprehensive expression analysis was performed on endoscopic biopsy specimens of serrated adenoma of the colon (SSA/P). Bioinformatic analysis of the obtained results, including GSEA analysis, showed a strong correlation between SSA/P and MSI-high cancer. These results suggest that SSA/P may provide insight into the mechanism of malignant transformation of SSA/P. Transcriptome analysis showed that SSA/P cells have decreased CDX2 expression from the early stage, and immunostaining revealed that CDX2 expression was clearly decreased from the very early stage of SSA/P. CDX2 is essential for the development, differentiation, and maintenance of intestinal function, and its decreased expression may play an important role in the development of SSA/P. development.

研究分野：早期消化管腫瘍に対する内視鏡治療

キーワード：大腸鋸歯状腺腫 網羅的遺伝子発現解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大腸鋸歯状腺腫 (SSL : Sessile serrated lesion) は大腸癌の前駆病変として昨今注目を集めているが、近年の内視鏡の進歩に伴い存在が認識されるようになってきた病変であり、内視鏡発見率などの臨床的特徴から悪性化リスクを含めた背景に関するまで不明な点が多い。鋸歯状病変の中には発癌リスクが低いとされている Hyperplastic polyp(HP)から発癌リスクが高いとされる SSL まであり、各亜系の臨床的特徴及び、分子病理学的な背景の解明が望まれる。

2. 研究の目的

今回の研究の第一の目的はハイボリューム施設として豊富な臨床検体が得られる利点を生かし、多数の大腸鋸歯状病変に対する網羅的遺伝子発現解析、及び BRAF・APC・KRAS を含む癌関連遺伝子の変異解析を行い、SSL・HP 特異的マーカー遺伝子の同定並びに悪性化リスクを明らかにすることである。また、ゲノムインフォマティクス解析を通じて SSL・HP の差異について評価すると共に、大腸鋸歯状病変の病理学的な悪性度予測マーカーを確立し、実臨床に還元することが本研究の最終課題である。

3. 研究の方法

(1)対象は東京大学医学部附属病院で消化器内科医により施行された全大腸内視鏡検査のうち、前回検査所見で内視鏡的もしくは病理学的に SSL と診断されている症例を前向きに集積した。除外基準は 1) 大腸の外科的切除の既往、2) 重複する悪性疾患、3) 家族性大腸腺腫症、4) 炎症性腸疾患、5) 倫理的な配慮を必要とする未成年者・高齢者・障害者、6) 最終病理診断が SSL でなかったものとした。全ての症例は検査施行前に書面での同意書を取得した。また免疫組織化学染色での評価のため当院で過去に内視鏡的に切除された SSL 40 症例・Adenoma 20 症例・Hyperplastic polyp (HP) 20 症例のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織を後ろ向きに集積した。本検討は本学の倫理委員会の承認 (審査番号 11537 及び G10139) を得ており、また UMIN-CTR 登録 (UMIN000027365) も行った。

検体は内視鏡的切除を行う直前に腫瘍より 1 か所、周囲正常組織より 1 か所から小児用 2.0mm 生検鉗子 (Radial Jaw 4 PEDIATRIC 2.0 mm: Boston Scientific) を用いて採取した。採取した検体は直ちに RNA later (Invitrogen: ThermoFisher SCIENTIFIC) 入りのエッペンドルフチューブに入れ、十分に浸透するように 3-5 時間常温で保存した。その後冷凍庫に移し、-30°C で保存した。SSL は検体採取後に内視鏡的切除を施行し、FFPE 組織を作成した上で組織学的に評価した。採取検体の組織は内視鏡写真と病理検体で再評価した。

検体は QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, Hilden, Germany) を溶媒として、BioMasher II (Nippi Inc) を装着した Power Masher (Nippi Inc, Tokyo, Japan) を用いてホモジナイズを行った。Total RNA 抽出は miRNeasy Mini Kit (QIAGEN, Japan) を用いて施行した。抽出した RNA は定量 (Total RNA 量、濃度)、純度 (A260/A280 ratio、A260/A230 ratio) 測定を NanoDrop 1000 spectrometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, NC, USA) により施行した。次いで Quality Check (QC) を Agilent 2100 BioAnalyzer (Agilent technologies, Palo Alto, USA) を用いて RNA Integrity Number (RIN)、28S/18S rRNA ratio を測定することで施行し、抽出 RNA の品質を確認した。(macrogen, Japan)。

(2)SSL 症例より抽出した Total RNA に対してマイクロアレイ (Agilent SurePrint G3 Human Gene Expression 8x60k v3; Agilent, Inc., Santa Clara, CA) に提出し、Agilent マイクロアレイスキャナ D (Agilent Technologies, Inc) によりスキャンした。マイクロアレイにより得られた raw data は log base 2 変換し、Gene springsoftware (Agilent Technologies) によりノーマライゼーションを行った。

(3)マイクロアレイにより抽出された発現変動遺伝子の発現変動パターン解析及び機能面の解析のためクラスター解析を行った。クラスター解析は Gene cluster 3.0 (<http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>) を用いて平均連結法で階層的クラスタリングを行った。そして得られた結果は TreeView software (<http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>) を用いて描出した。

平均値+3SD の基準を満たす遺伝子プローブを特定し、unsupervised クラスター分析を行った。

(4) 国際的コンソーシアムによる大腸癌の Consensus Molecular subtype (CMS) 分類を行っているに用いられているツールである CMS classifier (<https://github.com/Sage-Bionetworks/CMSclassifier>) 及び CMS caller (<https://github.com/Lothelab/CMScaller>) を用いて CMS 分類を実施した。

(5) CDX2 タンパク質の発現を調べるため、SSL39 サンプル、メラノーマ 3 サンプル、進行大腸癌

3 サンプルについて免疫組織化学染色を実施した。ホルマリン固定埋没サンプルの2マイクロメートル厚切片を脱パラフィンした。クエン酸緩衝液 (Code. RM102-C ; LSI medience) を用いて、95°Cで20分間抗原賦活処理を行った。切片を流水で洗浄し、TBSに浸漬した。CDX2 (CMC-235R14RU0-0.1ML; cosmobio.co.jp) を1:200希釈で一次免疫染色し、室温で60分間行った。その後、Histofine Simple Stain MAX PO (414154F; Nichirei Biosciences) を用いて切片を室温で30分間インキュベートした。0.006% H₂O₂ を含む20 mg/dL 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride 溶液中で切片を5分間インキュベートすることにより反応生成物を可視化した。免疫染色された切片は、2人の専門病理医によって評価した。

(6) SSLの遺伝子発現プロファイルを、GEOシリーズのGSE84650から得られたマウスの結腸粘膜の遺伝子発現プロファイルとGene Set Enrichment Analysis (GSEA 4.1.0)

(<http://software.broadinstitute.org/gsea/>) を用いて比較した。マウスから得られた遺伝子発現プロファイルは、a) CDX2 null mutant colon epithelium, b) BRAF V600E mutant colon epithelium, c) CDX2 null / BRAF V600E mutant colon epithelium, d) APC mutant colon epithelium, and normal colon epitheliumであった。GSE84650はGPL17400をプラットフォームとしているため、HUGO Gene Nomenclature Committee (<https://www.genenames.org/>) を用いて、マウス遺伝子記号をヒト遺伝子記号に変換した。ヒト遺伝子記号に変換された遺伝子発現プロファイルを用いて、各変異体結腸上皮と正常結腸粘膜を比較した。

a) [Ohki mouse CDX2-], b) [Ohki mouse BRAF-], c) [Ohki mouse CDX2-/BRAF-], d) [Ohki mouse APC-]というセットを正常大腸と比較して上昇した遺伝子を用いて作成した。4つの遺伝子セットは、事前に検証されたcurated C2遺伝子セットデータベースに含まれ、本マイクロアレイから得られたSSA/Pの遺伝子発現プロファイルを用いてGSEAを施行した。

腫瘍と対になる周辺粘膜の間で発現に差がある遺伝子を解析し、得られた遺伝子セットをcurated C2遺伝子セットデータベースの遺伝子と比較するためGSEAを施行した。

SSLのマイクロアレイの遺伝子発現結果のうち腫瘍組織とその周囲正常組織を比較して、増加している遺伝子の上位100種類で「OHKI SSAP(SSL) UP」という遺伝子セットを、減少している遺伝子の上位100種類で「OHKI SSAP(SSL) DOWN」という遺伝子セットを作成し、にSSL、Adenoma、MSI 癌の3つの腫瘍の間に双方向Cross-referenceのGSEA解析も施行した。

4. 研究成果

(1) 前向き集積の結果、最終病理組織型がSSLでなかったものを除いた28症例が解析対象となった。RNA抽出後にquality checkを行い腫瘍部・正常部共にRIN値が6以上のものを10症例選出して解析を施行した。

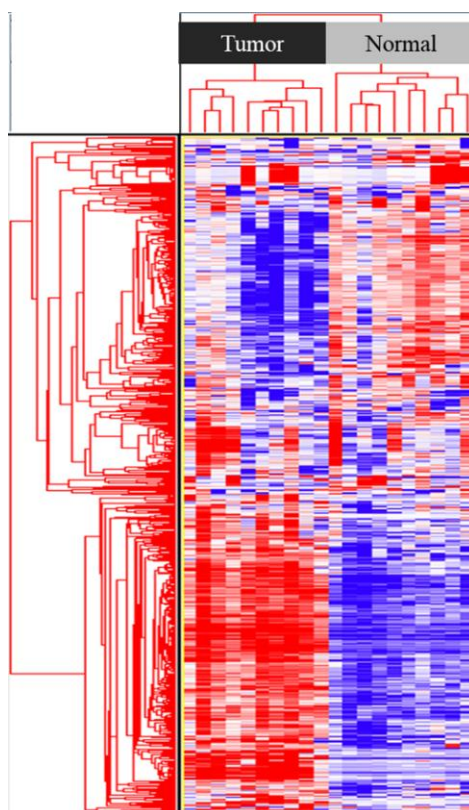
なお、HPに関しては症例が当初予想していた通りの集積に難渋したため断念した。難渋した理由としてはある大きさ以上のHPの数が限られ、実際に治療された結果、最終病理結果がHPであった症例数が極めて低かったことと考えられた。

(2) マイクロアレイに提出した10症例の腫瘍組織とその周囲正常組織における遺伝子発現データを得た。腫瘍組織とその周囲正常組織を比較して、腫瘍で発現が増加している遺伝子及び発現が減少している遺伝子を抽出した。腫瘍で発現が上昇している遺伝子群はANXA10, TM4SM4, VSIG1, SULT1C2, CDH3, KLK7, TFF2, REG4, SERPINB5, KLK11, MUC5AC, TFF1, MUC17, CTSE, CLDN1, S100P など既報でも上昇を認めたものを多く認めた。

腫瘍で発現が減少している遺伝子群の上位のものうちCWH43, CA1, TRPM6などはTHE HUMAN PROTEIN ATLAS (<https://www.proteinatlas.org/>) を参照すると大腸の正常組織に多く発現している遺伝子であった。

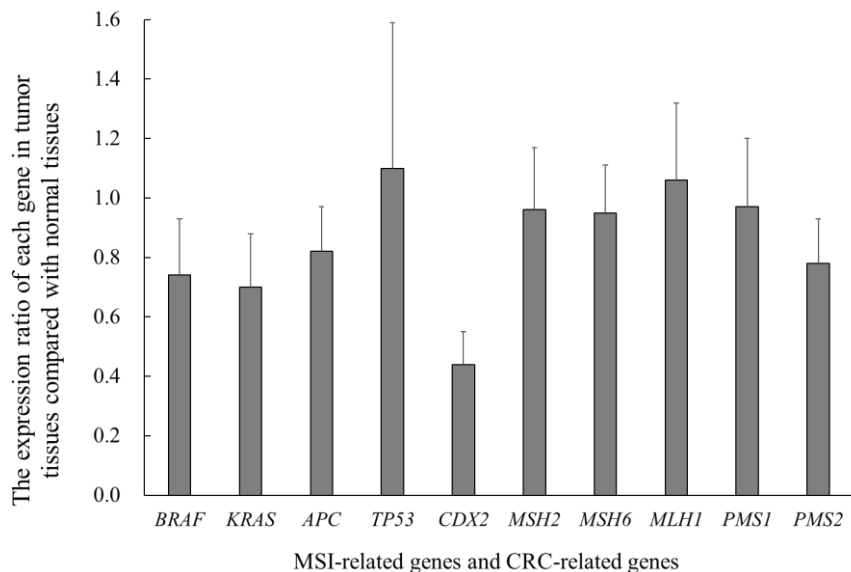
(3) 全プローブ58201個から平均値+3SDを満たした遺伝子プローブは合計694個であった。この特定された694個の遺伝子プローブでクラスタツリーを作成したところ、腫瘍と正常粘膜が明確に分離されること判明した。図を右に示す。

これらのデータから、SSLのトランスクリプトーム・プロファイルは、その腫瘍化のごく初期段階においても、隣接する正常上皮細胞のそれとはかなり異なることが示された。

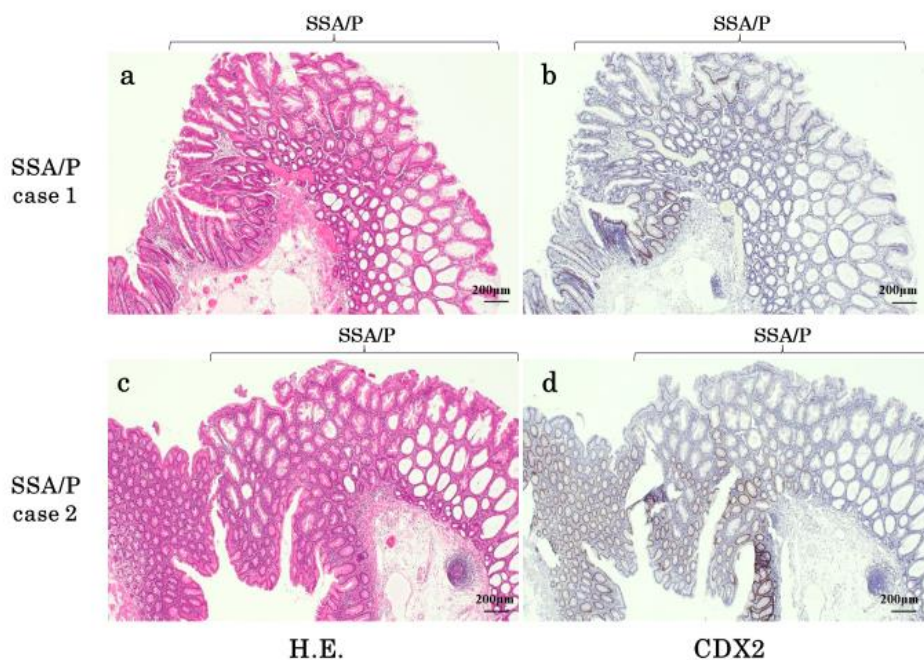


(4) CMS Classifier と CMS caller を用いて、マイクロアレイに提出した 10 症例の SSL の CMS 分類を行った。CMS Classifier では SSL の 70% (7/10) が CMS1 に分類され、CMS caller では SSL の 90% (9/10) が CMS1 に分類される結果となった。つまり SSL が CMS1 と高い相関を持つことが示唆された。

CMS 分類の結果をもとに SSL の遺伝子発現プロファイルを用いて、MSH2、MSH6、MLH1、PMS1、PMS2 といった MSI と関連する遺伝子に着目した。また、大腸腫瘍の発生に重要ながん関連遺伝子として確立されている BRAF、KRAS、APC、TP53、CDX2 にも注目した。腫瘍組織における各遺伝子の発現比率を正常組織と比較した。腫瘍組織における MSI 関連遺伝子の発現比率は、正常組織と比較して有意な差は認められなかった (MSH2 0.96, MSH6 0.95, MLH1 1.06, PMS1 0.97, PMS2 0.78)。一方、多くのがん関連遺伝子は、腫瘍組織で発現が低下する傾向にあった (発現比: BRAF 0.74, KRAS 0.70, APC 0.82, TP53 1.10)。BRAF、KRAS、APC、TP53 は変異が発がんメカニズムとして知られているが、本データでは BRAF、KRAS、APC で転写がわずかに低下していることが示された。10 遺伝子の中では、CDX2 の発現比が最も激しく低下していた (発現比: 0.44)。CDX2 の発現量は、10 例すべてにおいて、腫瘍組織では正常組織よりもかなり低い値であった。



(5) 癌関連遺伝子のうち CDX2 の発現は腫瘍組織では正常組織と比較して著しく低下していることが示されたため、SSL において CDX2 のタンパク質レベルが低下しているかどうかを確認するため、SSL の 39 例について免疫組織化学的染色を行った。免疫組織化学染色では、内視鏡的に切除された SSL のごく初期において、CDX2 タンパク質の発現量が著しく低下していることが明らかになった。



(6)解析の結果、SSLはその初期の段階より CDX2 の発現が著しく低下していることが判明し、また BRAF と APC の発現と機能が低下している可能性も示唆された。これらの結果を *in silico* で解析するため BRAF、APC、CDX2 を欠損させた動物モデル (GSE84650) の mRNA 転写データとの比較を行った。GSEA C2 curated において、今回の SSL 遺伝子発現プロファイルとの相関は、[Ohki mouse CDX2-] (Enrichment score 0.667, $p < 10^{-5}$)、[Ohki mouse CDX2-/BRAF-] (Enrichment score 0.553, $p < 10^{-5}$)、[Ohki mouse BRAF-] (Enrichment score 0.507, $p = 0.008$)、[Ohki mouse APC-] (Enrichment score 0.469, $p = 0.004$) の順で高いことが分かった。これらの結果から、CDX2 の欠失によって誘導される遺伝子発現パターンは、BRAF や APC の変異によって誘導される遺伝子発現パターンと比較して、ヒト SSL のそれとより類似していることが示された。[Ohki mouse CDX2-] 遺伝子セットに含まれる 7 つの遺伝子 (VSIG1、TFF2、FOXQ1、VNN1、PRSS22、IL1RN、MMP7) は、今回得られた SS 遺伝子発現プロファイルで周囲粘膜と比較して上昇した上位 100 遺伝子に含まれていた。これらの結果は、CDX2 の発現低下が SSA/P の腫瘍化初期の分子生物学に大きく影響することを示唆していた。

また C2 curated に登録されている遺伝子セットデータベースを用いて SSL の遺伝子発現を GSEA で分類したところ 265 の遺伝子セットが SSA/Ps で有意に発現量が増加し ($p < 0.05$)、一方 12 の遺伝子セットが SSA/Ps で低下していた ($p < 0.05$)。SSA/Ps で発現が増加した上位 3 つの遺伝子セットは [HINATA_NFKB_TARGETS_KERATINOCYTE_DN] (Enrichment score 0.865, $p = 0.004$)、[SABATES_COLORECTAL_ADENOMA] (Enrichment score 0.846, $p < 10^{-5}$)、[WATANABE_COLON_CANCER_MSI_VS_MSS_UP] (Enrichment score 0.826, $p < 10^{-5}$) であった。[SABATES_COLORECTAL_ADENOMA] は大腸腺腫で周囲の正常粘膜と比較して発現量が増加した遺伝子からなり、[WATANABE_COLON_CANCER_MSI_VS_MSS_UP] は MSI-high CRC で MSS CRC と比較して上昇する遺伝子からなる。今回作成した「OHKI SSAP(SSL) UP」及び「OHKI SSAP(SSL) DOWN」との遺伝子セットで SSL、Adenoma、MSI 癌の 3 つの腫瘍を用いて双方向 Cross-reference の GSEA 解析も施行したところ SSA/P の遺伝子発現は MSI-H CRC と有意に関連していたが、大腸腺腫とは関連していなかった。

(7) 本研究では、SSLのごく初期段階を用いて、マイクロアレイによる包括的な遺伝子発現解析を行った。欧米諸国では、SSLのトランスクリプトーム解析について記載した報告もある。しかし、我々の知る限り本研究は東アジアにおけるバイオインフォマティクス解析を起った最初の研究である。日本における非常に高い内視鏡治療レベルに基づき、解析した SSL はすべて腫瘍形成の初期段階であった。

CMS 分類では SSL が CMS1 に分類されることが示された。これらの結果は、SSL が MSI-H の CRC に進行する可能性があることを示唆している。

また本研究では、CDX2 の減少が SSL の腫瘍形成のごく初期に起こることを明確に示した。CDX2 は、腸の発生、分化、機能維持に不可欠なマスター遺伝子としてよく知られている。したがって、CDX2 の発現低下は、SSL の腫瘍形成のごく初期段階において重要な役割を担っていると推測される。

今回の研究では網羅的遺伝子発現解析の対象となったのは SSL のみであった。Serrated pathway では MVHP が SSL の前駆病変であり SSL が DNA メチル化の MSI 蓄積を受け、*dysplasia* を伴う SSL を経て MSI-H CRC になると考えられている。MVHP、SSL with *dysplasia*、MSI-H cancer のそれぞれの遺伝子発現解析を網羅的に行うことができれば、今回の SSL の結果と比較して、発癌のメカニズムに迫る結果を得ることができのかもしれない。しかし SSL with *dysplasia* の有病率は非常に低く、さらに、SSL with *dysplasia* の *dysplasia* は病変全体を占めておらず、内視鏡所見に基づいて *dysplasia* から正しく内視鏡生検標本を採取することは困難であった。そのため今後は SSL、SSL with *dysplasia*、SSL cancer の各大腸鋸歯状病変に対する次世代ゲノムシーケンシング (wholeexome sequencing) を行い、BRAF・APC・KRAS などの癌関連遺伝子を含めた遺伝子の発現解析を行い、大腸鋸歯状病変の発生・発癌に関わる特異的な DNA 配列異常を明らかにすることを検討したい。

結論として、本研究は、SSL の遺伝子発現プロファイルが MSI-H 大腸癌の遺伝子発現プロファイルと強い相関があること、CDX2 発現のダウンレギュレーションが SSL の腫瘍形成の最初のステップに必須であることを示した。

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 Ohki Daisuke, Yamamichi Nobutake, Sakaguchi Yoshiki, Takahashi Yu, Kageyama Yahara Natsuko, Yamamichi Mitsue, Takeuchi Chihiro, Tsuji Yosuke, Sakai Yasuhiro, Sakurai Kouhei, Tomida Shuta, Koike Kazuhiko, Fujishiro Mitsuhiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Transcriptome of sessile serrated adenoma/polyps is associated with MSI high colorectal cancer and decreased expression of CDX2	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 5066 ~ 5078
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cam4.4810	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
---------	---------