

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860547

研究課題名(和文) 早期大腸腫瘍内のゲノム不均一性からアプローチする大腸がん起源の系統解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of the origin of colorectal cancer based on intratumoral genetic heterogeneity

研究代表者

山本 英一郎 (Yamamoto, Eiichiro)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：60567915

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)：同一腫瘍内で形態および分子レベルの多様性を示す腫瘍のゲノム・エピゲノム異常の全容を、次世代シーケンサーを用いて明らかにした。同一病変内で全エクソームシーケンスを施行したところ共通した遺伝子変異は一部であった。共通した遺伝子変異は発癌の起源となる遺伝子異常であり、癌根本治療の標的となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the intratumoral variability of the endoscopic and genetic alterations in colorectal tumors. Our exome sequencing identified a large number of somatic mutations and revealed that most somatic mutations were not commonly observed among the two or more subcomponents with different endoscopic features.

研究分野：消化器病

キーワード：大腸がん

1. 研究開始当初の背景

癌組織を構成する細胞は均一な集団ではなく、多様な遺伝子異常を持つ癌細胞の集合体である。このような腫瘍内不均一性の原因としては確率的に遺伝子異常が加わり腫瘍形成能を獲得し不均一な腫瘍を構築するという確率論モデルや、癌幹細胞仮説が提唱されている。癌幹細胞は自己複製能、多分化能、腫瘍増殖能をもつ細胞とされる。少数の細胞で高い腫瘍形成能があり、癌幹細胞を起点とした階層的構造をもとに癌が増殖することで、腫瘍組織を構成する細胞集団が不均一となる。

いずれにしても腫瘍内不均一性は抗がん剤、分子標的薬、放射線治療抵抗性や癌再発が生じる原因として考えられている。腫瘍内の細胞集団におけるゲノム異常の多様性を解明し、発癌の起源となる遺伝子異常を同定することは、癌根本治療の標的となる遺伝子の発見、新規治療戦略の構築に資すると考えられる。

2. 研究の目的

早期大腸腫瘍内におけるゲノム・エピゲノム背景の多様性および共通性に着目することで、大腸発癌の起源となる遺伝子異常を同定し、それを標的とした治療法につながる知見を得ることを目的とする。

腫瘍内の表面構造別の全エクソンシーケンス、メチローム解析
腫瘍内で共通な遺伝子異常の探索
候補となる遺伝子異常（遺伝子変異、メチル化）を多数の臨床検体を用いて検証
遺伝子異常と臨床病理学的所見との関連、
バイオインフォマティクス解析により絞り込み

3. 研究の方法

早期腫瘍内の形態学的かつ遺伝的に異なる領域ごとのゲノム・エピゲノム異常を明らかにし、領域間で共通してみられる遺伝子変異、メチル化異常を探索する

4. 研究成果

同一腫瘍内、同一個体内で形態および分子レベルの多様性を示す検体を用いて SureSelect Human All Exon V4, V5 キットを用いて全エクソームシーケンスを施行した。同一個体内に存在する複数の大腸がんにおいて異なる遺伝子異常を示しており、また同一腫瘍内においても腫瘍内部位特異的な遺伝子異常が多数存在する一方で共通に認める遺伝子異常や癌部特異的に認める遺伝子変異が存在した。

さらに癌部でのみ認める遺伝子変異、同一個体内の腺腫では認めず大腸癌でのみ認め

る遺伝子変異を抽出、さらに TCGA, ENCODE などの公開データベースから絞り込み、約 50 遺伝子を抽出した。さらにダイレクトシーケンスにて確認した。

つぎに網羅的メチル化解析を用いて大腸癌の発育様式に関わるエピジェネティックな異常の同定を試みた。大腸癌は腫瘍径が大きいほど浸潤率が高くなる。しかし腫瘍径が小さくとも浸潤する小型浸潤癌 (small invasive tumor; small IT)、大きくとも浸潤せず粘膜内に留まる非浸潤癌 (large non-invasive tumor; large NT) が存在する。small IT と large NT におけるメチル化解析により、浸潤に関わるエピジェネティクス異常を明らかとすることを目的とした。

MCA マイクロアレイ解析の結果、large NT でメチル化異常を示す遺伝子群を認めた。この遺伝子群に癌遺伝子と考えられている NTSR1 が含まれていることに注目した。

パイロシーケンス法により臨床検体(浸潤癌 90 例、非浸潤腫瘍 124 例)のメチル化を解析した。アレイ CGH によりゲノムコピー数異常を解析した。TaqMan RT-PCR により遺伝子発現を検討した。NTSR1 を大腸癌細胞に導入またはノックダウンし、MTT アッセイ、マトリゲル浸潤アッセイ及び遺伝子発現マイクロアレイを行った。

パイロシーケンス法を用い臨床例での NTSR1 メチル化解析を行ったところ large NT、肉眼形態分類での側方発育型腫瘍(LST)で有意に高値を示した。大腸癌細胞株において NTSR1 はメチル化と mRNA 発現の間に逆相関がみられた。NTSR1 の過剰発現は細胞増殖を促進し、浸潤能を亢進した。siRNA によりノックダウンしたところ細胞増殖を抑制し、浸潤能を高度に抑制しうることが確認された。同一病変内の浸潤癌部、腺腫部で NTSR1 のメチル化を検討したところ腺腫部よりも癌部でメチル化レベルが下がっていた。一方で NTSR1 の発現は癌部で亢進、さらに癌部で NTSR1 増幅を認めた。

NTSR1 の高発現は浸潤能を促進し垂直方向へ進展、メチル化による不活化は浸潤を抑制し側方発育する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 12 件)

1. Harada T, Yamamoto E, Yamano H, Nojima M, Maruyama R, Kumegawa K, Ashida M, Yoshikawa K, Kimura T, Harada E, Takagi R, Tanaka Y, Aoki H, Nishizono M, Nakaoka M, Tsuyada A, Niinuma T, Kai M, Shimoda K, Shinomura Y, Sugai T, Imai K, Suzuki H.

Analysis of DNA Methylation in Bowel Lavage Fluid for Detection of Colorectal Cancer. Cancer Prev Res,

- 2014 Oct;7(10):1002-10. 査読あり、
doi: 10.1158/1940-6207
2. Aoki H, Noshō K, Igarashi H, Ito M, Mitsushashi K, Naito T, Yamamoto E, Tanuma T, Nomura M, Maguchi H, Shinohara T, Suzuki H, Yamamoto H, Shinomura Y.
MicroRNA-31 expression in colorectal serrated pathway progression.
World J Gastroenterol, 2014 Sep;20(34):12346-9, 査読あり, doi: 10.3748/wjg.v20.i34.12346.
 3. Naito T, Noshō K, Ito M, Igarashi H, Mitsushashi K, Yoshii S, Aoki H, Nomura M, Sukawa Y, Yamamoto E, Adachi Y, Takahashi H, Hosokawa M, Fujita M, Takenouchi T, Maruyama R, Suzuki H, Baba Y, Imai K, Yamamoto H, Ogino S, Shinomura Y.
IGF2 differentially methylated region hypomethylation in relation to pathological and molecular features of serrated lesions.
World J Gastroenterol. 2014 Aug 7;20(29):10050-61. 査読あり, doi: 10.3748/wjg.v20.i29.10050.
 4. Suzuki H, Yamamoto E, Maruyama R, Niinuma T, Kai M.
Biological significance of the CpG island methylator phenotype.
Biochem Biophys Res Commun. 2014 Dec 5;455(1-2):35-42. 査読あり, doi: 10.1016/j.bbrc.2014.07.007.
 5. Tahara T, Yamamoto E, Madireddi P, Suzuki H, Maruyama R, Chung W, Garriga J, Jelinek J, Yamano HO, Sugai T, Kondo Y, Toyota M, Issa JP, Estécio MR.
Colorectal carcinomas with CpG island methylator phenotype 1 frequently contain mutations in chromatin regulators. *Gastroenterology*. 2014 ;146:530-38.e5. 査読あり、doi: 10.1053/j.gastro.2013.10.060.
 6. Ito M, Mitsushashi K, Igarashi H, Noshō K, Naito T, Yoshii S, Takahashi H, Fujita M, Sukawa Y, Yamamoto E, Takahashi T, Adachi Y, Nojima M, Sasaki Y, Tokino T, Baba Y, Maruyama R, Suzuki H, Imai K, Yamamoto H, Shinomura Y.
MicroRNA-31 expression in relation to BRAF mutation, CpG island methylation and colorectal continuum in serrated lesions.
Int J Cancer. 2014 Dec 1;135(11):2507-15. 査読あり, doi: 10.1002/ijc.28920.
 7. Tahara T, Yamamoto E, Suzuki H, Maruyama R, Chung W, Garriga J, Jelinek J, Yamano HO, Sugai T, An B, Shureiqi I, Toyota M, Kondo Y, Estécio MR, Issa JP.
Fusobacterium in colonic flora and molecular features of colorectal carcinoma. *Cancer Res*. 2014; 74:1311-8. 査読あり、doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1865.
 8. Noshō K, Igarashi H, Nojima M, Ito M, Maruyama R, Yoshii S, Naito T, Sukawa Y, Mikami M, Sumioka W, Yamamoto E, Kurokawa S, Adachi Y, Takahashi H, Okuda H, Kusumi T, Hosokawa M, Fujita M, Hasegawa T, Okita K, Hirata K, Suzuki H, Yamamoto H, Shinomura Y.
Association of microRNA-31 with BRAF mutation, colorectal cancer survival and serrated pathway. *Carcinogenesis*. 2014 Apr;35(4):776-83. 査読あり,doi: 10.1093/carcin/bgt374.
 9. Suzuki R, Yamamoto E, Nojima M, Maruyama R, Yamano HO, Yoshikawa K, Kimura T, Harada T, Ashida M, Niinuma T, Sato A, Noshō K, Yamamoto H, Kai M, Sugai T, Imai K, Suzuki H, Shinomura Y.
Aberrant methylation of microRNA-34b/c is a predictive marker of metachronous gastric cancer risk. *J Gastroenterol*. 2014 ;49:1135-44. 査読あり、doi: 10.1007/s00535-013-0861-7
 10. Suzuki H, Maruyama R, Yamamoto E, Kai M.
Epigenetic alteration and microRNA dysregulation in cancer. *Front Genet*. 2013 Dec 3;4:258. 査読あり, doi: 10.3389/fgene.2013.00258.
 11. Hong SH, Goh SH, Lee SJ, Hwang JA, Lee J, Choi IJ, Seo H, Park JH, Suzuki H, Yamamoto E, Kim IH, Jeong JS, Ju MH, Lee DH, Lee YS.
Upregulation of adenylate cyclase 3 (ADCY3) increases the tumorigenic potential of cells by activating the CREB pathway. *Oncotarget*. 2013 Oct;4(10):1791-803. 査読あり
 12. Sawada T, Yamamoto E, Suzuki H, Nojima M, Maruyama R, Shioi Y, Akasaka R, Kamimae S, Harada T, Ashida M, Kai M, Adachi Y, Yamamoto H, Imai K, Toyota M, Itoh F, Sugai T.
Association between genomic alterations and metastatic behavior of colorectal cancer identified by array-based comparative

genomic hybridization. Genes Chromosomes Cancer, 2013;52:140-9. 査読あり、doi: 10.1002/gcc.22013.

〔学会発表〕(計 6件)

Eiichiro Yamamoto, Taku Harada, Hiroo Yamano, Yasuhisa Shinomura, Hiromu Suzuki
UEGW 2014年10月18日-22日 オーストリア(ウィーン)
ANALYSIS OF DNA METHYLATION IN BOWEL LAVAGE FLUID FOR DETECTION OF COLORECTAL CANCER

Eiichiro Yamamoto, Reo Maruyama, Hiroo Yamano, Aoki Hironori, Niinuma Takeshi, Kai Masahiro, Sugai Tamotsu, Shinomura Yasuhisa, Suzuki Hiromu
日本癌学会 2014年9月25日-27日 パシフィコ横浜(横浜)
Histone H3K27 trimethylation in normal colon is associated with developing colorectal tumor with CpG island methylator phenotype

Eiichiro Yamamoto, Hiroo Yamano, Reo Maruyama, Takeshi Sawada, Taku Harada, Tamotsu Sugai, Yasuhisa Shinomura, Hiromu Suzuki
UEGW 2013年10月12日-16日ドイツ(ベルリン)
Intratumoral variations in pit patterns reflect genetic heterogeneity revealed by high-throughput sequencing of colorectal tumor.

Eiichiro Yamamoto, Reo Maruyama, Shintaro Takatusuka, Taku Harada, Akihiro Tsuyada, Takeshi Sawada, Takeshi Niinuma, Akiko Sato, Masahiro kai, Hiroo Yamano, Tamotsu Sugai, Yasuhisa Shinomura, Hiromu Suzuki
日本癌学会 2013年10月3日-5日 パシフィコ横浜(横浜)
Intratumoral variation in surface microstructures reflects genetic heterogeneity revealed by exome sequencing of colorectal tumor.

Maruyama R, Yamamoto E, Kumegawa K, Tsuyada A, Ashida M, Suzuki R, Tokino T, Shinomura Y, Suzuki H.
Integrated analysis of clinical ChIPSeq data and public databases identified candidate long non-coding RNAs critically involved in gastrointestinal cancer.

104th Annual Meeting, American Association for Cancer Research. April 6-10 2013. Washington DC (USA)

鈴木亮、山本英一郎、篠村恭久
*microRNA-34b/c*の異常メチル化は胃癌の異時性多発リスクに關与する
第99回消化器病学会総会 2013年3月21日-23日 城山観光ホテル(鹿児島)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
山本 英一郎 (Yamamoto Eiichiro)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号: 60567915

(2) 研究分担者 ()

研究者番号:

(3) 連携研究者 ()

研究者番号: