

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 4 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462023

研究課題名(和文) 鋸歯状ポリープのゲノムプロファイルから発がんリスクを評価する

研究課題名(英文) Malignant potential of serrated polyp estimated genomic profile

研究代表者

小西 文雄 (Konishi, Fumio)

自治医科大学・医学部・名誉教授

研究者番号：20142242

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年、鋸歯状ポリープという鋸歯状構造を有するポリープを総称する概念が提唱された。その中でも鋸歯状腺腫(SSA)はマイクロサテライト不安定性(MSI)大腸癌の前癌病変として注目されるようになった。我々は、SSAとMSI大腸癌に共通するメチル化プロファイルに注目し、独自に開発したDNAメチル化アレイを用いて127関連遺伝子を特定した。その一つであるAXINは大腸癌抑制遺伝子であるAPCとともに複合体を形成し、カテニンの分解に携わる。AXINのメチル化の程度は腺腫から癌へ進行すると共に上昇し、それに伴いその遺伝子発現は低下する。AXINは鋸歯状ポリープを介した発癌過程に深く関わっていると考えられる。

研究成果の概要(英文)：A concept of sessile serrated polyp has been proposed as a series of polyps with serration. Recent works led to recognize sessile serrated adenoma as precursor to many of the sporadic colorectal cancers with microsatellite instability (MSI). We focused on the methylation profile sharing between SSA and MSI cancer, which resulted in identification of 127 associated genes by an array-based methylation sensitive amplified fragment length polymorphism (MS-AFLP) method. AXIN is one of those genes, which cooperates with the tumor suppressor gene, APC to dephosphorylate beta-catenin. Its levels of methylation alterations increased along with progression from adenoma to carcinoma, and its expression levels negatively correlated with methylation. These findings suggested that AXIN was involved in the serrated pathway originated from sessile serrated polyp.

研究分野：大腸癌

キーワード：鋸歯状ポリープ 鋸歯状腺腫 マイクロサテライト不安定性 大腸癌 メチル化プロファイル

1. 研究開始当初の背景

従来、大腸ポリープは主に腺腫と過形成性ポリープに分類されていた。腺腫は大腸癌の前駆病変と捉えられ、予防的切除の対象となるが、過形成性ポリープは悪性化することのない良性疾患として扱われ、切除の対象とならないとされていた。

近年、鋸歯状ポリープという鋸歯状構造を有するポリープを総称する概念が提唱され、一般の腺腫とは異なる発癌経路の前癌病変として注目されるようになった。この鋸歯状ポリープの中には、非腫瘍性病変であり癌化することはないと従来考えられてきた過形成性ポリープや腺腫と同様の細胞異型を有しながら鋸歯状構造を呈する鋸歯状腺腫、そして1996年に初めて報告された、拡張した腺管を有し水平方向への進展や分岐した腺管構造を特徴とする sessile serrated adenoma(SSA)が含まれる。特に SSA は、マイクロサテライト不安定性(MSI)大腸癌と類似した臨床病理学的、および分子生物学的特徴を有すると報告され、MSI 大腸癌の前癌病変として注目されるようになった。

この SSA から MSI 大腸癌への発癌過程 serrated pathway は、従来の管状腺腫や絨毛腺管腺腫、絨毛腺腫を経て発生する adenoma-carcinoma pathway とは異なる遺伝子異常や遺伝子修飾異常が関与することが報告されている。特に、MSI 大腸癌と同様 CpG island methylator phenotype(CIMP)というメチル化亜型が認められ、DNA メチル化異常の影響が強いと考えられている。

2. 研究の目的

鋸歯状ポリープの一亜型、sessile serrated adenoma(SSA)は、併発する癌組織への病理組織学的な移行帯の存在、あるいはその組織の腺腫、癌組織間の類似した遺伝子異常 (BRAF 遺伝子変異など) から malignant potential を有する腫瘍性病変であると考えられている。臨床病理、分子生物学的特徴からメチル化異常が大きく関与していると考えられているがその詳細は明らかではない。SSA のメチル化異常に関して、個々の遺伝子におけるプロモーター領域のメチル化異常などは数多く報告されているが、ゲノム全域にわたるメチル化異常の有無を網羅的に検討した報告はない。本研究による serrated pathway の分子生物学的プロファイルの解明は、従来内視鏡治療の対象とならなかった一般の腺腫以外の病変の中から、癌化のリスクの高い genotype を特定し、積極的な切除の必要性を促すことにより大腸癌予防に大きく貢献できると期待される。

3. 研究の方法

対象：serrated pathway に関わる MSI 大腸癌とその前癌病変と考えられている SSA、adenoma-carcinoma pathway に関わる通常大腸癌(MSS)とその前癌病変と考えられている管状腺腫 (TA) を用いた。

方法：

1、メチル化アレイを用いて DNA メチル化異常の網羅的検索を行い、serrated pathway に関与する遺伝子を同定する。標的遺伝子の遺伝子発現とメチル化の程度の相関を検証する。

2、クラスター解析、DAVID 解析で関連遺伝子を同定し、メチル化プロファイルを作成する。そして遺伝子の発現の情報を取り入れる事で serrated pathway の分子生物学的プロファイルを構築する。

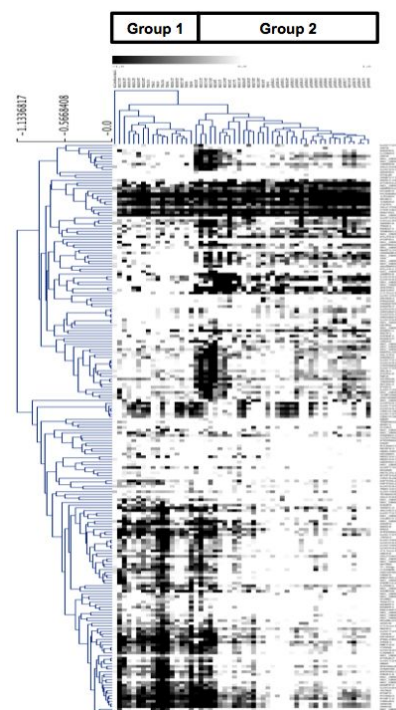
3、serrated pathway の分子生物学的プロファイルと臨床情報を統合させ、鋸歯状ポリープの中で発がんリスクの高い genotype を特定する。

4. 研究成果

メチル化アレイを用いた DNA メチル化異常の網羅的検索により、serrated pathway に関与する 127 遺伝子を同定した。

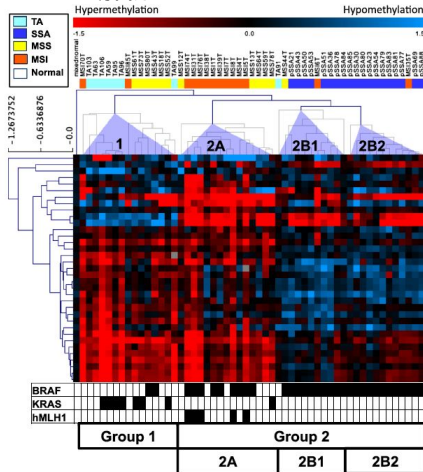
ANOVA 解析のヒートマップ

serrated pathway と adenoma-carcinoma pathway のメチル化プロファイルの違い：MSI +SSA (Group1)と MSS+TA (Group2)の2群で t 検定を行い serrated pathway に関与する 127 遺伝子を同定した。

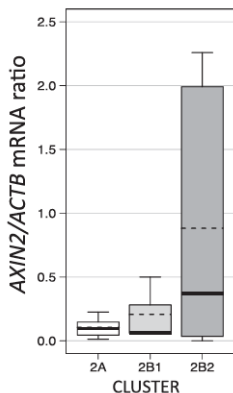


その1つである AXIN 遺伝子は大腸癌抑制遺伝子 APC とともに複合体を形成し、カテニンの分解に携わり（図：ANOVA 解析のヒートマップ）、メチル化の進行（図：AXIN 遺伝子のメチル化の進行）に伴い段階的に遺伝子の発現が低下し（図：段階的な AXIN 遺伝子の発現低下）、鋸歯状ポリープを介した発癌過程、serrated pathway に深く関わっている事を明らかにした。

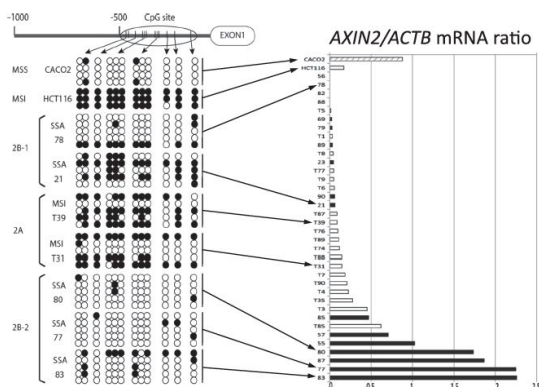
ANOVA 解析のヒートマップ



AXIN 遺伝子のメチル化の進行：



段階的な AXIN 遺伝子の発現低下：



127 遺伝子のアノテーション解析の結果で homeobox gene (二重下線) をはじめとして多くの転写因子 (囲み) が関連づけられた。同定された 4 遺伝子 dihydropyrimidinase-like 2、Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 2、slit homolog 2、dihydropyrimidinase-like 5 (Drosophila) のうち dihydropyrimidinase-like 5 は MSI 大腸癌及び SSA とともにメチル化されていた。一方、残りの 3 遺伝子は、MSS 大腸癌メチル化されていることを明らかにした。また、SSA から MSI の発癌過程でメチル化の異常が認められた遺伝子群、fibroblast growth factor family 5,12,15、Laminin, alpha1,2 そして Wnt シグナル伝達に関わる wingless-type MMTV integration site family member 2 を同定した。

127 遺伝子のアノテーション解析：

Annotation Cluster 1	Enrichment Score: 3.9	Count	P-Value	Background
SP_PIR_KEYWORDS	developmental protein	20	1.5E-7	3.2E-5
SP_PIR_KEYWORDS	homeobox	12	2.1E-7	2.2E-5
GOTERM_MF_FAT	sequence-specific DNA binding	19	2.4E-7	5.8E-5
INTERPRO	homeobox	12	3.2E-7	9.5E-5
INTERPRO	homeobox	12	3.6E-7	5.4E-5
INTERPRO	homeobox-related	12	4.1E-7	4.1E-5
SMART	HD5	12	9.7E-6	9.0E-4
GOTERM_BP_FAT	regulation of DNA metabolic process	28	1.3E-4	9.6E-2
UP_SEQ_FEATURE	DNA-binding region Homeobox	8	1.4E-4	3.6E-2
GOTERM_MF_FAT	transcription factor activity	19	1.6E-4	2.0E-2
SP_PIR_KEYWORDS	dna binding	25	2.1E-4	1.5E-2
GOTERM_BP_FAT	regulation of transcription, DNA-dependent	26	5.7E-4	1.1E-1
GOTERM_MF_FAT	transcription regulator activity	22	2.0E-3	1.5E-1
SP_PIR_KEYWORDS	actin like	38	7.7E-3	2.8E-1
GOTERM_MF_FAT	DNA binding	27	1.1E-2	5.0E-1
SP_PIR_KEYWORDS	transcription regulation	20	2.9E-2	5.0E-1
SP_PIR_KEYWORDS	Transcription	19	6.2E-2	6.2E-1
GOTERM_BP_FAT	regulation of transcription	26	6.9E-2	7.9E-1
GOTERM_BP_FAT	transcription	19	2.4E-1	9.7E-1

その他、接着因子、増殖因子が候補としてあげられる。通常型大腸癌では、APC と homeobox gene である Cdx-2 の相互関与が報告されており、MSI 大腸癌でも、AXIN と homeobox gene の関与が推測される。

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 11 件)

1. Suzuki K, Rikiyama T. Pitfalls of KRAS Testing for Treating Patients with Metastatic Colorectal Cancer. J Clin Epigenet. 2016; 2:2
2. Kato T, Alonso S, Muto Y, Noda H, Miyakura Y, Suzuki K, Tsujinaka S, Saito M, Perucho M, Rikiyama T. Clinical characteristics of synchronous colorectal cancers in Japan. World J of surgical oncol. 2016;14(1):272
3. Muto Y, Suzuki K, Kato T, Tsujinaka S, Ichida K, Takayama Y, Fukui T, Kakizawa N, Watanabe F, Saito M, Futsuhara K, Noda H, Miyakura Y,

- Konishi F, Rikiyama T. Heterogenous expression of zinc-finger E-box-binding homeobox 1 plays a pivotal role in metastasis via regulation of miR-200c in epithelial-mesenchymal transition. *Int J Oncol*. 2016;49(3):1057-67
4. Mitsushita J, Netsu S, Suzuki K, Nokubi M, Tanaka A. Metastatic Ovarian Tumors Originating From a Small Bowel Adenocarcinoma - A Case Report and Brief Literature Review. *Int J Gynecol Pathol*.2016:Aug 10.
 5. Alonso S, González B, Ruiz-Larroya T, Durán Domínguez M, Kato T, Matsunaga A, Suzuki K, Strongin AY, Giménez-Bonafé P, Perucho M. Epigenetic inactivation of the extracellular matrix metalloproteinase ADAMTS19 gene and the metastatic spread in colorectal cancer. *Clinical Epigenetics*.2015;7:124.
 6. Kato T, Suzuki K, Muto Y, Sasaki J, Tsujinaka S, Kawamura YJ, Noda H, Horie H, Konishi F, Rikiyama T. Multiple primary malignancies involving primary sporadic colorectal cancer in Japan: incidence of gastric cancer with colorectal cancer patients may be higher than previously recognized. *World J Surg Oncol*.2015;13:23
 7. Tago K, Funakoshi-Tago M, Itoh H, Furukawa Y, Kikuchi J, Kato T, Suzuki K, Yanagisawa K. Arf tumor suppressor disrupts the oncogenic positive feedback loop including c-Myc and DDX5. *Oncogene*.2015;34(3):314-22
 8. Saito M, Kiyozaki H, Takata O, Suzuki K, Rikiyama T. Treatment of stage IV gastric cancer with induction chemotherapy using S-1 and cisplatin followed by curative resection in selected patients. *World J Surg Oncol*.2014;12:406.
 9. Muto Y, Maeda T, Suzuki K, Kato T, Watanabe F, Hidenori Kamiyama, Saito M, Koizumi K, Miyaki Y, Konishi F, Sergio Alonso, Manuel Perucho, and Rikiyama T. DNA methylation alterations of AXIN2 in serrated adenomas and colon carcinomas with microsatellite instability. *BMC cancer*.2014;14:466.
 10. Suzuki K, Kato Takaharu, Muto Y, Ichida K, Fukui T, Takayama Y, Tsujinaka S, Junichi Sasaki, Hisanaga Horie, Yutaka J. Kawamura, Konishi F and Rikiyama T. The XELIRI regimen plus continuous treatment with bevacizumab is well tolerated and effective in metastatic colorectal cancer patients in a second-line setting involving the sequential administration of XELOX and XELIRI. *Mol Clin Oncol*.2014;2(5):827-832.
- 〔学会発表〕(計 43 件)
2016 年国際学会
1. Suzuki K, Takayama Y, Ichida K, Fukui T, Kakizawa N, Watanabe F, Hasegawa F, Kikukawa R, Tsujinaka S, Miyakura Y, Rikiyama T: Clinical applications of "Liquid biopsy" in the colorectal cancer treatment. Exosomes and Liquid Biopsies Asia 2016 2016.4.7-8 Taipei Taiwan Poster
 2. Suzuki K, Takayama Y, Ichida K, Fukui T, Kakizawa N, Obitsu T, Muto Y, Hasegawa F, Watanabe F, Kikukawa R, Kato T, Kaneda Y, Saito M, Tsujinaka S, Futhuhara K, Miyakura Y, Noda H, Kiyozaki H, Konishi F, Rikiyama T: Practical applications of "Liquid biopsy" in the colorectal cancer treatment. ASCO Jun 3-7, 2016:Chicago
 3. Fukui T, Suzuki K, Ichida K, Taka Yama Y, Kakizawa N, Muto Y, Watanabe F, Kaneda Y, Miyakura Y, Noda H, Rikiyama T : Morphologic response contributes to patient selection for rescue liver resection of chemotherapy patients with initially unresectable colorectal liver metastasis. International Association of Surgeons, Gastroenterologists and Oncologists. Aug.8 2016:Sendai
 4. Ichida K, Suzuki K, Fukui T, Takayama Y, Kakizawa N, Muto Y, Watanabe F, Saito M, Kato T,

Rikiyama T : Target chromosomes impaired by overexpression of Satellite alpha transcript in vitro . International Association of Surgeons, Gastroenterologists and Oncologists. Aug.8 2016:Sendai

5. Ichida K, Suzuki K, Muto Y, Fukui T, Takayama Y, Futsuhara K, Tsujinaka S, Miyakura Y, Noda H, Rikiyama T : 208P-Significance of the difference in size of liver tumors in management of patients with colorectal liver metastases . ESMO Asia 2016 Congress.Dec. 16-19 2016: Singapore

2015 年国際学会

6. Takayama Y, Suzuki K, Daito T, Ichida K, Fukui T, Muto Y, Nao Kakizawa, Imoto H, Taniyama Y, Kaneda Y, Tanaka H, Watanabe F, Kato T, Hasegawa F, Saito M, Tsujinaka S, Miyakura Y, Noda H, Konishi F, Rikiyama T; Emergence of KRAS mutation in detection of circulating tumor DNA during treatments for metastatic gastrointestinal cancer patients. ASCO, May 29-Jun 2, 2015:11026 Chicago
7. Ichida K, Suzuki K, Takayama Y, Muto Y, Fukui T, Kato T, Saito M, Watanabe F, Kakizawa N, Hirofumi Imoto, Tanaka H, Kaneda Y, Yusuke Taniyama, Shingo Tsujinaka, Osamu Takata, Miyakura Y, Noda H, Kiyozaki H, Konishi F, Rikiyama T; Detection of satellite alpha transcript in sera, as a surrogate marker for the risk of development of multiple cancers in colorectal cancer patients. ASCO May 29-Jun 2, 2015: e22044 Chicago
8. Suzuki K, Takayama Y, Daito T, Ichida K, Fukui T, Muto Y, Kakizawa N, Yuji Kaneda, Watanabe F, Hasegawa F, Saito M, Tsujinaka S, Futsuhara K, Miyakura Y, Noda H, Hirokazu Kiyozaki, Konishi F, Rikiyama T; Liquid biopsy leads to a paradigm shift in cancer treatment. ASCO-GI Jan 21-23, 2016
9. Kakizawa N, Suzuki K, Takayama Y, Ichida K, Fukui T, Watanabe F, Muto Y, Rikiyama T; Clinical and

molecular assessment of response to Regorafenib. ASCO-GI Jan 21-23, 2016

2016 年国内学会

1. 鈴木浩一、高山裕司、市田晃佑、福井太郎、柿澤奈緒、渡部文昭、武藤雄太、齋藤正昭、辻仲眞康、宮倉安幸、力山敏樹 : Liquid biopsy leads to a paradigm shift in cancer diagnosis . 第 116 回日本外科学会学術集会 2016.4.14-16 大阪 口演
2. Suzuki K, Takayama Y, Ichida K, Fukui T, Kakizawa N, Obitsu T, Muto Y, Hasegawa F, Watanabe F, Kikukawa R, Kato T, Kaneda Y, Saito M, Tsujinaka S, Futuhara K, Miyakura Y, Noda H, Takada O, Kiyoszaki H, Rikiyama T: Practical applications of "Liquid biopsy" in the colorectal cancer treatment . 第 37 回癌免疫外科研究会 2016.5.12-13 川越 シンポジウム
3. 鈴木浩一、武藤雄太、市田晃佑、柿澤奈緒、齋藤正昭、力山敏樹 : リキッドバイオプシーによる癌治療のパラダイムシフト . 第 20 回日本がん分子標的治療研究会 2016.5.30-6.1 別府 ポスター
4. 鈴木浩一、市田晃佑、福井太郎、高山裕司、柿澤奈緒、長谷川芙美、菊川利奈、渡部文昭、齋藤正昭、辻仲眞康、蓬原一茂、宮倉安幸、野田弘志、清崎浩一、力山敏樹 : 「Liquid biopsy」によるがん診療のパラダイムシフト . 第 21 回日本外科病理学会学術集会 2016.9.2-3 さいたま 口演

2015 年国内学会

1. 鈴木浩一、武藤雄太、市田晃佑、高山裕司、福井太郎、柿澤奈緒、渡部文昭、齋藤正昭、宮倉安幸、力山敏樹 血中遊離核酸のモニタリングとその臨床応用 第 24 回癌病態治療研究会 2015.6.25-26 栃木 シンポジウム
2. 渡部文昭、鈴木浩一、武藤雄太、市田晃佑、高山裕司、福井太郎、辻仲眞康、宮倉安幸、小西文雄、力山敏樹 マイクロサテライト不安定性 (MSI) 大腸癌の発癌に関わるゲノムプロファイルの同定 第 24 回癌病態治療研究会 2015.6.25-26 栃木

口演

3. 市田晃佑、鈴木浩一、武藤雄太、高山裕司、福井太郎、長谷川英美、田中宏幸、辻仲眞康、宮倉安幸、力山敏樹 血中で測定する大腸癌における多発癌発生のリスクマーカー 第24回癌病態治療研究会 2015.6.25-26 栃木 口演
4. 武藤雄太、鈴木浩一、市田晃佑、高山裕司、福井太郎、長谷川英美、田中宏幸、辻仲眞康、宮倉安幸、力山敏樹 上皮間葉移行に関わる遺伝子の腫瘍内不均一性の検討 第24回癌病態治療研究会 2015.6.25-26 栃木 口演
5. 齊藤正昭、鈴木浩一、市田晃佑、福井太郎、高山裕司、武藤雄太、加藤高晴、力山敏樹 DNA 脱メチル化異常を介した染色体不安定性の解明 第24回癌病態治療研究会 2015.6.25-26 栃木 口演
6. 齊藤正昭、鈴木浩一、力山敏樹：非癌部組織のエピゲノム異常とがん治療．第4回消化器合同 Cancer Board 2015.7.8 埼玉 口演
7. 鈴木浩一、市田晃佑、福井太郎、高山裕司、武藤雄太、齊藤正昭、辻仲眞康、宮倉安幸、野田弘志、力山敏樹：血中遊離核酸のモニタリングとその臨床応用その臨床応用．第70回日本消化器外科学会総会 2015.7.15-17 浜松 口演
8. 武藤雄太、鈴木浩一、市田晃佑、高山裕司、福井太郎、齊藤正昭、辻仲眞康、宮倉安幸、小西文雄、力山敏樹：腫瘍内不均一性を考慮した大腸癌の上皮間葉移行の検討および血中マイクロRNAと転移の関係．第70回日本消化器外科学会総会 2015.7.15-17 浜松 口演
9. 鈴木浩一：Liquid biopsy leads to a paradigm shift in cancer diagnosis．第14回自治医科大学シンポジウム 2015.9.3 栃木（本院） 口演
10. 武藤雄太、鈴木浩一、市田晃佑、高山裕司、福井太郎、齊藤正昭、柿澤奈緒、渡部文昭、辻仲眞康、宮倉安幸、小西文雄、力山敏樹：大腸癌臨床検体における遺伝子発現プロファイルの腫瘍内不均一性と上皮間葉移行の関係．第26回日本消化器癌発生学会総会 2015.11.19-20 米子

口演

〔図書〕(計3件)

- 1 鈴木浩一,力山敏樹.腫瘍性大腸炎のゲノム・エピゲノム解析.医学のあゆみ.2015;255(6):661-665
- 2 鈴木浩一,力山敏樹.DNAメチル化プロファイルによる膵癌診断膵癌治療 up-to-date.2015;105-112

〔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：
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

小西文雄 (KONISHI Fumio)
自治医科大学・医学部・客員教授
研究者番号：20142242

(2)研究分担者

鈴木浩一 (SUZUKI Koichi)
自治医科大学・医学部・准教授
研究者番号：70332369

(3)連携研究者

()

研究者番号：