

平成 30 年 5 月 15 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04299

研究課題名(和文) de novo大腸発がんの分子機構解明と解析モデルの構築

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanism underlying de novo colorectal tumorigenesis pathway

研究代表者

鈴木 拓 (Suzuki, Hiromu)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：20381254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：古典的なadenoma-carcinomaシーケンス以外の大腸発がん経路について不明な点が多い。本研究では、表面型大腸腫瘍や側方進展型腫瘍、鋸歯状腺腫における分子異常に着目した。数百例の大腸早期病変の内視鏡所見・病理所見・分子異常を統合的に解析し、新規大腸がん関連遺伝子としてNTSR1、DKGK、SMOC1、ZNF582-AS1を同定した。NTSR1のメチル化は大腸腫瘍の側方進展に相関し、SMOC1は鋸歯状腺腫の新たな診断マーカーとなりうることを示した。大腸腫瘍の分子異常は内視鏡や病理所見と相関し、大腸腫瘍表面構造の不均一性は、分子異常および大腸がんリスクを反映することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Recent advances in the cancer genome study revealed molecular alterations in colorectal cancer (CRC). However, mechanisms underlying the colorectal tumorigenesis in pathways other than the conventional adenoma-carcinoma sequence are not fully understood. To address this issue, we focused on early colorectal lesions with superficial or laterally spreading morphologies and those in the serrated neoplastic pathway. Through performing genetic and epigenetic analysis in a large number of primary colorectal tumors, we identified NTSR1, DKGK, SMOC1 and ZNF582-AS1 as novel CRC-related genes. We found that methylation of NTSR1 is associated with lateral and noninvasive growth of colorectal tumors while methylation of SMOC1 is associated with the development of traditional serrated adenomas. Surface microstructures of early colorectal tumors are associated with genetic and epigenetic alterations, and are associated with the malignant potential.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：大腸がん エピゲノム DNAメチル化 遺伝子変異

1. 研究開始当初の背景

大腸がんは APC、KRAS、p53 などの遺伝子変異が蓄積することで、過形成、腺腫、がんへと段階的に進む。また大腸がんはマイクロサテライト不安定性、染色体不安定性、CpG island methylator phenotype (CIMP)などのゲノム・エピゲノム異常に基づいてサブタイプに分けられることが知られており、The Cancer Genome Atlas (TCGA)による大規模ゲノム解析結果もそのことを裏付けている (Nature 2012)。申請者はこれまで、主に消化器がんにおけるエピジェネティクス異常を解析し、発がんメカニズムの解明および臨床応用を目指した研究を行ってきた。また近年では、大腸前がん病変および早期がんにおけるゲノム・エピゲノム異常と臨床病理像との相関を明らかにしてきた。

大腸がんは隆起型腺腫を経て発生するという adenoma-carcinoma sequence モデルに基づき、分子機構の解明が大きく進んだ。本邦ではそれに加え、平坦型や陥凹型などの表面型腫瘍のがん化が知られており、de novo がんという概念が提唱されている。欧米においてこの考えはまだ普及していないが、近年、表面型早期大腸がんが国際分類に取り上げられ、その悪性度の高さが注目されはじめている。しかし表面型がんの分子異常に関する研究報告は少なく、その発生メカニズムは明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では表面型腫瘍と隆起型腫瘍の分子病態の違いを明らかにすることで、de novo 大腸発がんのメカニズムを解明し、予防・診断・治療につながる知見を得ることを目指す。

3. 研究の方法

(1) 解析対象

内視鏡的に生検あるいは切除された大腸病変 (非がん部大腸粘膜、表面型腫瘍、隆起型腫瘍、進行大腸がん) を解析対象とした。検体の収集においては、内視鏡的所見 (形態、ピットパターン) を元に、それぞれの部位ごとから生検を採取した。特に、大腸早期病変において、平坦部と隆起部が混在している腫瘍や、異なるピットパターンが混在している腫瘍に着目し、生検採取を行った。全ての臨床検体は、秋田赤十字病院消化器病センターで採取され、病理組織診断は岩手医科大学病理診断部にて行われた。

(2) 遺伝子変異解析

KRAS、BRAF、TP53 遺伝子変異をパイロシークエンス法およびダイレクトシークエンス法により解析した。がん関連遺伝子の変異を Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2 (Thermo Fisher Scientific) ならびにカスタムパネルを用いて解析した。

(3) エピゲノムおよび遺伝子発現解析

DNA メチル化を Infinium Human Methylation 450 BeadChip (Illumina) を用いて網羅的に解析した。個々の遺伝子の DNA 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って解析した。網羅的な遺伝子発現を Sure Print G3 Human GE array v2 (Agilent) を用いて解析し、個々の遺伝子発現を定量 RT-PCR で解析した。

(4) 遺伝子機能解析

遺伝子の過剰発現、あるいはノックダウンが細胞増殖、細胞周期、遊走能、浸潤能に与える影響を、MTT アッセイ、コロニーフォーメーションアッセイ、フローサイトメトリー、Boyden チャンバーアッセイ、wound healing アッセイ、Matrigel 浸潤アッセイにより解析した。また in vivo での腫瘍増殖に与える影響を、マウス xenograft モデルを用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 新規大腸腫瘍関連遺伝子の同定

内視鏡的に切除された大腸組織 (非がん部大腸粘膜、表面型腫瘍、隆起型腫瘍、進行大腸がん) 合計 40 検体から得たシークエンスデータおよび DNA メチル化アレイデータを元に、新規大腸がん関連遺伝子を抽出した。それらの遺伝子の DNA メチル化を、大腸腺腫、早期大腸がん検体および進行大腸がん検体、合計 1000 例を対象にバイサルファイト・パイロシークエンスで解析した。その結果、新規大腸がん関連遺伝子として B3GALNT1、CADPS、CCDC180、DGKG、FAM92A1、FEZ1、FRMD4B、GABRA4、OGFRL1、PRDM16、SMOC1、ZNF345 を同定した。機能解析の結果、DGKG と SMOC1 が大腸がん抑制遺伝子的に機能することを明らかにした (Mol Carcinog, 2017; Oncotarget, 2017)。

(2) 新規大腸鋸歯状腺腫関連遺伝子の同定

我々は、上記で同定した SMOC1 のメチル化が大腸鋸歯状腺腫 (traditional serrated adenoma, TSA) において高頻度に認められることに着目した。SMOC1 メチル化は TSA に特徴的に認められるが、sessile serrated adenoma/polyp (SSA/P) では低頻度であり、SMOC1 のメチル化およびタンパク発現は TSA と SSA/P を鑑別するマーカーとして有用であることが示唆された。また SMOC1 メチル化は KRAS 変異および CIMP-low と正の相関を示し、KRAS 変異陽性・CIMP-low 大腸がんの発生に関与する可能性が示唆された (Oncotarget, 2017)。

(3) 大腸腫瘍の側方進展と相関する遺伝子の同定

早期表面型大腸腫瘍の発生と進展に関わる遺伝子異常を明らかにするため、非浸潤性でかつ側方に進展する大腸腫瘍と、腫瘍径が小さい (2cm 以下) うちから sm 浸潤を来す大腸腫瘍との間で、DNA メチル化が異なる領

域を網羅的に解析した。その結果、側方進展腫瘍では NTSR1 (neurotensin receptor 1) が高頻度にメチル化することを見いだした。NTSR1 の高メチル化は大腸腫瘍の予後良好と正の相関を示した。NTSR1 の過剰発現は大腸がん細胞の増殖、遊走能、浸潤能を促進した。これらの結果から、NTSR1 のメチル化は大腸腫瘍の側方進展性・非浸潤性に関与していることが示唆された(Oncotarget, 2015)。

(4) 大腸がんにおいてエピジェネティックな制御を受ける長鎖 non-coding RNA の網羅的解析

大腸がんの発生・進展に関わる長鎖 non-coding RNA を同定するため、DNA メチル化酵素 DNMT1 と DNMT3B をノックアウトした大腸がん細胞の網羅的エピゲノム解析を行った。転写活性化マーカーであるヒストン H3K4 トリメチル化(H3K4me3)に着目し、DNA 脱メチル化後に活性化する lncRNA 遺伝子プロモーターを探索した結果、ZNF582-AS1 を同定した。ZNF582-AS1 は大腸腺腫および大腸がんにおいて高頻度に DNA メチル化しており、その発現回復は大腸がん細胞の増殖を抑制した。これらのことから、ZNF582-AS1 は大腸がん抑制遺伝子的に機能する lncRNA である可能性が示唆された (Sci Rep, 2016)。

(5) 大腸腫瘍の表面構造と遺伝子変異の腫瘍内不均一との相関

大腸早期病変の内視鏡所見と分子異常との相関を明らかにすることで、大腸がん高リスク病変の診断能を向上させることが期待される。これまで我々は Type II-O ピットパターンが SSA/P に特徴的であることを報告した (Am J Gastroenterol, 2012)。この解析をさらに推進し、我々は Type II-O と III/IV 型ピットパターンが混在する病変は、大腸がん高リスク病変であることを明らかにした (GIE, 2017)。さらに腫瘍内におけるピットパターンの heterogeneity は、APC、KRAS、TP53 などの遺伝子変異の heterogeneity と相関することを明らかにした (論文投稿中)。

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 20 件)

Sugai T, Takahashi Y, Eizuka M, Sugimoto R, Fujita Y, Habano W, Otsuka K, Sasaki A, Yamamoto E, Matsumoto T, Suzuki H. Molecular profiling and genome-wide analysis based on somatic copy number alterations in advanced colorectal cancers. **Mol Carcinog**. 57:451-461, 2018. 査読有
Aoki H, Yamamoto E, Takasawa A, Niinuma T, Yamano HO, Harada T, Matsushita HO, Yoshikawa K, Takagi R,

Harada E, Tanaka Y, Yoshida Y, Aoyama T, Eizuka M, Yorozu A, Kitajima H, Kai M, Sawada N, Sugai T, Nakase H, Suzuki H. Epigenetic silencing of SMOC1 in traditional serrated adenoma and colorectal cancer. **Oncotarget**. 9:4707-4721, 2017. 査読有

Niinuma T, Kai M, Kitajima H, Yamamoto E, Harada T, Maruyama R, Nobuoka T, Nishida T, Kanda T, Hasegawa T, Tokino T, Sugai T, Shinomura Y, Nakase H, Suzuki H. Downregulation of miR-186 is associated with metastatic recurrence of gastrointestinal stromal tumors. **Oncol Lett**. 14:5703-5710, 2017. 査読有

Koyama R, Tamura M, Nakagaki T, Ohashi T, Idogawa M, Suzuki H, Tokino T, Sasaki Y. Identification and characterization of a metastatic suppressor BRMS1L as a target gene of p53. **Cancer Sci**. 108:2413-2421, 2017. 査読有

Sugai T, Yoshida M, Eizuka M, Uesugii N, Habano W, Otsuka K, Sasaki A, Yamamoto E, Matsumoto T, Suzuki H. Analysis of the DNA methylation level of cancer-related genes in colorectal cancer and the surrounding normal mucosa. **Clin Epigenetics** 9:55, 2017. 査読有

Tanaka Y, Yamano HO, Yamamoto E, Matsushita HO, Aoki H, Yoshikawa K, Takagi R, Harada E, Nakaoka M, Yoshida Y, Eizuka M, Sugai T, Suzuki H, Nakase H. Endoscopic and molecular characterization of colorectal sessile serrated adenoma/polyps with cytologic dysplasia. **Gastrointest Endosc**. 86:1131-1138.e4, 2017. 査読有

Kai M, Yamamoto E, Sato A, Yamano HO, Niinuma T, Kitajima H, Harada T, Aoki H, Maruyama R, Toyota M, Hatahira T, Nakase H, Sugai T, Yamashita T, Toyota M, Suzuki H. Epigenetic silencing of diacylglycerol kinase gamma in colorectal cancer. **Mol Carcinog**. 56:1743-1752, 2017. 査読有

Eizuka M, Sugai T, Habano W, Uesugi N, Takahashi Y, Kawasaki K, Yamamoto E, Suzuki H, Matsumoto T. Molecular alterations in colorectal adenomas and intramucosal adenocarcinomas defined by high-density single-nucleotide polymorphism arrays. **J Gastroenterol**. 52:1158-1168, 2017. 査読有

Sugai T, Eizuka M, Takahashi Y, Fukagawa T, Habano W, Yamamoto E, Akasaka R, Otsuka K, Matsumoto T, Suzuki H. Molecular subtypes of colorectal cancers determined by PCR-based analysis. **Cancer Sci**. 108:427-434, 2017. 査読有

Arakawa N, Sugai T, Habano W, Eizuka M, Sugimoto R, Akasaka R, Toya Y, Yamamoto

E, Koeda K, Sasaki A, Matsumoto T, Suzuki H. Genome-wide analysis of DNA copy number alterations in early and advanced gastric cancers. **Mol Carcinog**. 56:527-537, 2017. 査読有

Sugai T, Habano W, Takagi R, Yamano H, Eizuka M, Arakawa N, Takahashi Y, Yamamoto E, Kawasaki K, Yanai S, Ishida K, Suzuki H, Matsumoto T. Analysis of molecular alterations in laterally spreading tumors of the colorectum. **J Gastroenterol**. 52:715-723, 2017. 査読有

Kai M, Niinuma T, Kitajima H, Yamamoto E, Harada T, Aoki H, Maruyama R, Toyota M, Sasaki Y, Sugai T, Tokino T, Nakase H, Suzuki H. TET1 Depletion Induces Aberrant CpG Methylation in Colorectal Cancer Cells. **PLoS One**. 11:e0168281, 2016. 査読有

Takahashi Y, Sugai T, Habano W, Ishida K, Eizuka M, Otsuka K, Sasaki A, Matsumoto T, Morikawa T, Unno M, Suzuki H. Molecular differences in the microsatellite stable phenotype between left-sided and right-sided colorectal cancer. **Int J Cancer**. 139:2493-2501, 2016. 査読有

Kumegawa K, Maruyama R, Yamamoto E, Ashida M, Kitajima H, Tsuyada A, Niinuma T, Kai M, Yamano HO, Sugai T, Tokino T, Shinomura Y, Imai K, Suzuki H. A genomic screen for long noncoding RNA genes epigenetically silenced by aberrant DNA methylation in colorectal cancer. **Sci Rep**. 6:26699, 2016. 査読有

Sawada T, Yamamoto E, Yamano HO, Nojima M, Harada T, Maruyama R, Ashida M, Aoki H, Matsushita HO, Yoshikawa K, Harada E, Tanaka Y, Wakita S, Niinuma T, Kai M, Eizuka M, Sugai T, Suzuki H. Assessment of epigenetic alterations in early colorectal lesions containing BRAF mutations. **Oncotarget**. 7:35106-35118, 2016. 査読有

Sugimoto R, Sugai T, Habano W, Endoh M, Eizuka M, Yamamoto E, Uesugi N, Ishida K, Kawasaki T, Matsumoto T, Suzuki H. Clinicopathological and molecular alterations in early gastric cancers with the microsatellite instability-high phenotype. **Int J Cancer**. 138:1689-1697, 2016. 査読有

Kamimae S, Yamamoto E, Kai M, Niinuma T, Yamano HO, Nojima M, Yoshikawa K, Kimura T, Takagi R, Harada E, Harada T, Maruyama R, Sasaki Y, Tokino T, Shinomura Y, Sugai T, Imai K, Suzuki H. Epigenetic silencing of NTSR1 is associated with lateral and noninvasive growth of colorectal tumors. **Oncotarget**. 6:29975-29990, 2015. 査読有

Isosaka M, Niinuma T, Nojima M, Kai M, Yamamoto E, Maruyama R, Nobuoka T, Nishida T, Kanda T, Taguchi T, Hasegawa T, Tokino T, Hirata K, Suzuki H, Shinomura Y. A screen for epigenetically silenced microRNA genes in gastrointestinal stromal tumors. **PLoS One**. 10:e0133754, 2015. 査読有

Ichimura N, Shinjo K, An B, Shimizu Y, Yamao K, Ohka F, Katsushima K, Hatanaka A, Tojo M, Yamamoto E, Suzuki H, Ueda M, Kondo Y. Aberrant TET1 Methylation Closely Associated with CpG Island Methylator Phenotype in Colorectal Cancer. **Cancer Prev Res**. 8:702-711, 2015. 査読有

Ito M, Kanno S, Noshio K, Sukawa Y, Mitsunashi K, Kurihara H, Igarashi H, Takahashi T, Tachibana M, Takahashi H, Yoshii S, Takenouchi T, Hasegawa T, Okita K, Hirata K, Maruyama R, Suzuki H, Imai K, Yamamoto H, Shinomura Y. Association of *Fusobacterium nucleatum* with clinical and molecular features in colorectal serrated pathway. **Int J Cancer**. 137:1258-1268, 2015. 査読有

〔学会発表〕(計14件)

甲斐正広、山本英一郎、佐藤亜紀子、山野泰穂、新沼猛、北嶋洋志、原田拓、青木敬則、仲瀬裕志、菅井有、鈴木拓・大腸がんにおける Diacylglycerol kinase のエピジェネティックな不活化 第76回日本癌学会学術総会, 2017年9月28日~30日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

萬頭、山本英一郎、沼田有斗、新沼猛、北嶋洋志、甲斐正広、青木敬則、若杉英樹、時野隆至、仲瀬裕志、菅井有、鈴木拓・大腸がんにおける腫瘍血管内皮関連遺伝子の同定 第76回日本癌学会学術総会, 2017年9月28日~30日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

沼田有斗、萬頭、山本英一郎、新沼猛、北嶋洋志、甲斐正広、青木敬則、若杉英樹、時野隆至、仲瀬裕志、菅井有、鈴木拓・新規大腸がん線維芽細胞関連遺伝子の同定 第76回日本癌学会学術総会, 2017年9月28日~30日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

青木敬則、山本英一郎、高澤啓、新沼猛、山野泰穂、原田拓、萬頭、北嶋洋志、甲斐正広、澤田典均、仲瀬裕志、菅井有、鈴木拓・SMOC1のエピジェネティックなサイレンシングは大腸鋸歯状腺腫の発育進展に關与する 第76回日本癌学会学術総会 2017年9月28日~30日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

山本英一郎、山野泰穂、青木敬則、新沼猛、甲斐正広、佐々木泰史、時野隆至、

菅井有、仲瀬裕志、鈴木拓・大腸腺腫の表面構造が反映する腫瘍内不均一性．第76回日本癌学会学術総会，2017年9月28日～30日，パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

新沼猛、北嶋洋志、山本英一郎、甲斐正広、仲瀬裕志、時野隆至、今井浩三、鈴木拓．消化管間質腫瘍においてエピジェネティックに制御される長鎖 non-coding RNA の探索．第76回日本癌学会学術総会，2017年9月28日～30日，パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

鈴木拓．CpG アイランドメチル化形質：発生機序と臨床的意義．第75回日本癌学会学術総会，2016年10月6日～8日，パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

青木敬則、山本英一郎、山野泰穂、萬頭、石黒一也、原田拓、新沼猛、甲斐正広、足立靖、遠藤高夫、菅井有、鈴木拓．大腸鋸歯状腺腫の進展に関わる DNA メチル化異常の同定．第75回日本癌学会学術総会，2016年10月6日～8日，パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

甲斐正広、新沼猛、北嶋洋志、丸山玲緒、山本英一郎、鈴木拓．大腸がんにおける diacylglycerol kinase zeta 遺伝子バリエーションのエピジェネティックな制御．第75回日本癌学会学術総会，2016年10月6日～8日，パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

萬頭、山本英一郎、津矢田明泰、沼田有斗、甲斐正広、新沼猛、北嶋洋志、青木敬則、若杉英樹、時野隆至、仲瀬裕志、菅井有、鈴木拓．大腸癌における腫瘍血管内皮関連遺伝子の同定．第75回日本癌学会学術総会，2016年10月6日～8日，パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

鈴木拓、新沼猛、甲斐正広、丸山玲緒、山本英一郎、今井浩三．がん細胞の DNA メチル化維持における UHRF1 の関与．第74回日本癌学会学術総会，2015年10月8日～10日，名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）

山本英一郎、丸山玲緒、山野泰穂、青木敬則、檜森亮吾、萬頭、新沼猛、甲斐正広、菅井有、今井浩三、篠村恭久、鈴木拓．正常大腸粘膜におけるヒストン H3K27 トリメチル化は CIMP 大腸がんの発生に関与する．第74回日本癌学会学術総会，2015年10月8日～10日，名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）

澤田武、山本英一郎、山野泰穂、野島正寛、原田拓、青木敬則、新沼猛、丸山玲緒、甲斐正広、片岡洋望、菅井有、鈴木拓、城卓志．BRAF 遺伝子変異を伴う大腸前癌病変と背景粘膜のメチル化解析．第74回日本癌学会学術総会，2015年10月8日～10日，名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）

萬頭、山本英一郎、丸山玲緒、津矢田明

泰、甲斐正広、新沼猛、檜森亮吾、廣橋良彦、西館敏彦、古畑智久、平田公一、菅井有、鈴木拓．大腸癌における腫瘍血管内皮特異的遺伝子の新規同定．第74回日本癌学会学術総会，2015年10月8日～10日，名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）

〔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：
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

鈴木拓 (SUZUKI, Hiromu)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号：20381254

(2)研究分担者

山本英一郎 (YAMAMOTO, Eiichiro)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号：60567915

甲斐正広 (KAI, Masahiro)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号：80260777

丸山玲緒 (MARUYAMA, Reo)
札幌医科大学・医学部・研究員
研究者番号：60607985

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者 なし