

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007 ~ 2009

課題番号：19590715

研究課題名 (和文) 大腸良性腫瘍および早期癌における進行大腸癌への進展に関わる分子生物学的因子の探索

研究課題名 (英文) Molecular biological research on the progression from colorectal benign neoplasm or early cancer to advanced cancer

研究代表者

山地 裕 (YAMAJI YUTAKA)

東京大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号：40376455

研究成果の概要 (和文)：

内視鏡的一括切除を行った大腸腫瘍 104 症例 (LST-G 35 例、LST-NG 19 例、Polypoid 50 例) を対象に臨床病理学的特徴と分子生物学的特徴を検討した。LST-G は LST-NG に比して有意に KRAS 活性型変異の頻度が多く (54.3% vs 21.1%, $p=0.016$)、 β カテニンの核染色の頻度が少なかった (37.1% vs 68.4%, $p=0.027$)。この差が LST の形態差によるのか多変量解析すると、KRAS、 β カテニンとも、年齢、性別、LST の部位、LST の大きさ、癌組織の有無に統計学的有意差はなく、KRAS では肉眼型 (NG/G) でオッズ比 0.222、95%CI 0.056-0.883、 β カテニンでは肉眼型で OR 4.512、95%CI 1.124-18.11 と、肉眼形態のみが KRAS の活性型変異の有無、 β カテニンの活性状態の有無と相関を示した。そこでこの β カテニンの活性化をさらに検討する為、 β カテニン/APC-WNT シグナル経路の検討を行った。進行大腸癌で報告される β カテニンの活性型変異と APC 遺伝子の LOH について検討。本検討では、LST に β カテニンの活性型変異はなく、APC の LOH では、LST-NG は LST-G に比して有意に LOH の頻度が多かった (60% vs 28%, $p=0.030$)。LST はその形態形成に KRAS と APC 遺伝子の LOH が重要な役割を担っている可能性が示唆され、発癌メカニズムを解明する上でも興味深い現象と推察された。

研究成果の概要 (英文)：

Recent advances in colonoscopic techniques have resulted in more frequent detection of superficial-type colorectal tumors, i.e., laterally spreading tumors (LSTs), although little is known about the characteristic clinical features and genetic alterations of LSTs. To elucidate the molecular characteristics of LSTs, genetic alterations in the *KRAS*, *BRAF*, and *PIK3CA* genes and abnormal expression of the p53, β -catenin, and MYC proteins were analysed using direct DNA sequencing and immunohistochemistry for 50 protruded type tumors (Protruded), 35 granular-type LSTs (LST-G) and 19 non-granular-type LSTs (LST-NG). In addition, loss of heterozygosity (LOH) close to the *adenomatous polyposis coli* (*APC*) gene (5q21) was examined in these tumors. In univariate analyses, significant differences were noted in the percentages with *KRAS* mutations (LST-G, LST-NG = 54.3%, 21.1%, respectively, $p=0.016$), nuclear accumulation of β -catenin (LST-G, LST-NG = 37.1%, 68.4%, respectively, $p=0.027$), and LOH at the *APC* gene locus (LST-G, LST-NG = 28.0%, 60.0%, respectively, $p=0.030$). Multivariate analysis demonstrated that the macroscopic subtype of LST was significantly associated with *KRAS* mutation (for LST-NG: odds ratio [OR] 0.222, 95% CI 0.056-0.883) and nuclear accumulation of β -catenin (for LST-NG: OR 4.512, 95% CI 1.124-18.11). Our data revealed that the two subtypes of LST have different molecular characteristics, suggesting that two or more different molecular mechanisms result in colorectal tumors with a similar growth pattern.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：大腸腫瘍、LST、KRAS、BRAF、TP53、 β -catenin

1. 研究開始当初の背景

大腸癌に対しては、便潜血検査などのスクリーニングの有効性が示され、欧米や我が国においても広く実施されるようになってきている。欧米においては、特に左側大腸癌による死亡が減少するなどの一定の成果が得られてきているが、それにともなって多数発見される、良性のポリープや前癌病変に対する処置のために、多額の医療費とマンパワーが割かれることが、内外ともに問題となっている。

一方大腸癌スクリーニングが広く実施されるに従い、早期発見が困難な、rapid growing の病変の存在が close up されてきている。右側結腸の早期癌、表面型の大腸癌がそれであり、内外で注目を集めるようになってきている。これらは特に日本に多くみられる病変ではないかという意見もあり、実際に病変の臨床的・形態的特徴について、我が国を中心に知見が集積されてきている。しかしながら、これら早期大腸癌や表面型大腸癌の発生に関する分子生物学的検討は、国際的にも非常に少ない状況である。

早期大腸癌、表面型大腸癌の診断・治療に関しては、極めて高度な臨床的技術力が必要とされるが、本邦においてその技術は国際的に最高度の水準であり、特に本学においては国内有数の内視鏡的技術により、多数の早期大腸癌の診断および切除を施行している。それにより得られた臨床材料について、分子生物学的に詳細な検討を行うことにより、欧米に先駆けた有益な、大腸癌の発生、ひいてはその対処に対しての知見が得られるものと考えられる。世界に冠たる検診システムを有するわが国であるが、大腸癌の死亡数は増加の一途をたどっており、平成16年の癌死亡数の中で男性の4位、女性では1位の癌となっている。我々は本研究により、より真に効率的な大腸癌の高危険群の設定を行い、本邦

において画期的な大腸癌の死亡減少につながる成果が得られることを目指している。

2. 研究の目的

1)大腸良性腫瘍・早期大腸癌及び進行大腸癌のそれぞれの発生部位や形態等臨床プロフィールと genetic/epigenetic alteration との相関を検討する。

2)特に背景腺腫病変の形態学的組織学的分類からみた大腸腺腫内癌の癌部と周囲非癌良性病変、さらに背景健常大腸粘膜細胞における分子学的特徴の差異を検討する。

3. 研究の方法

東京大学消化器内科において、2005年9月から2006年9月までの1年間に、内視鏡的粘膜切除術 (Endoscopic Mucosal Resection, EMR) または内視鏡的粘膜下層剥離術 (Endoscopic Submucosal Dissection, ESD) にて内視鏡的に一括切除された10mm以上の大腸腫瘍104例 (LST 54例、Polypoid 50例) を対象とした。大腸腫瘍で高頻度に報告されている KRAS, BRAF, PIK3CA, CTNNB1 遺伝子の塩基配列を、LST 検体から PCR ダイレクトシーケンス法を用いて解析した。また、大腸腫瘍で高頻度に報告されている TP53, CTNNB1, MYC について免疫組織化学で検討した。さらに、APC 遺伝子の変異については、大腸癌で報告されるように、2か所のマイクロサテライトマーカを用いた染色体 5q21-22 領域の LOH 解析を行った。統計解析には、カイ 2乗検定、Student-t test、多重ロジスティック回帰分析を用い、 $p < 0.05$ を統計学的有意と判定した。

4. 研究成果

アミノ酸変異については、LST と Polypoid を比較して、KRAS, BRAF, PIK3CA の全て

において統計的な有意差は認めなかった（それぞれ $P=0.182$ 、 $P=0.710$ 、 $P=0.132$ ）。免疫組織化学では、LST と Polypoid を比較して、TP53、CTNNB1 とともに統計的な有意差は認めなかった（それぞれ $P=0.176$ 、 $P=0.850$ ）。LST と Polypoid の比較では、一見すると分子生物学的な特徴に差がないように思われたが、LST には LST-G と LST-NG の 2 種類の形態があり、形態別に解析する必要があった。

形態別に解析すると、KRAS 変異は、LST-G 群 19/35 (42.6%)、LST-NG 群 4/19 (21.1%) と統計学的に有意な差を認め ($P=0.0156$)、CTNNB1 陽性は、LST-G 群 13/35 (37.1%)、LST-NG 群 13/19 (68.4%) と統計学的に有意な差を認めた ($P=0.0267$)。他の背景因子による影響ではないことを確かめるため、さらにロジスティック回帰分析を用いて多変量解析を行った。KRAS では、年齢 (/歳) でオッズ比 1.001、95%CI 0.947-1.058、性別(男性/女性)でオッズ比 0.502、95%CI 0.118-2.131、LST の部位 (左/右) でオッズ比 1.597、95%CI 0.415-6.140、LST の大きさ (mm) でオッズ比 0.987、95%CI 0.942-1.034、肉眼型 (NG/G) でオッズ比 0.222、95%CI 0.056-0.883、癌組織の有無でオッズ比 0.483、95%CI 0.105-2.217 であり、肉眼形態のみが KRAS の恒常活性型変異の有無と相関を示した。CTNNB1 では、年齢 (/歳) でオッズ比 0.992、95%CI 0.935-1.053、性別(男性/女性)でオッズ比 4.313、95%CI 0.830-22.41、LST の部位 (左/右) でオッズ比 2.578、95%CI 0.617-10.78、LST の大きさ (mm) でオッズ比 1.008、95%CI 0.959-1.059、肉眼型 (NG/G) でオッズ比 4.512、95%CI 1.124-18.11、癌組織の有無でオッズ比 5.105、95%CI 0.881-29.58 であり、肉眼形態のみが CTNNB1 の活性状態の有無と相関を示した。

LST の形態による分子生物学的特徴の差について、CTNNB1 の免疫組織化学染色の差に着目して、Wnt シグナル系の遺伝子についての解析を追加した。CTNNB1 のアミノ酸変異、APC 遺伝子の 2 か所のマイクロサテライトマーカーを用いた LOH 解析、Wnt シグナル系の下流である MYC 遺伝子の免疫組織化学染色を検討した。CTNNB1 の恒常活性型変異は、Exon3 領域で報告されているが、LST 54 症例の中には、1 例も変異を認めなかった。MYC 陽性症例は、LST-G 6/35 (17.1%)、LST-NG 8/19 (42.1%) であり、統計学的に有意差があった ($P=0.0491$)。APC 遺伝子の LOH は、LST-G で 7/25 (28%)、LST-NG で 9/15 (60%) に認め、LST-NG で 5q21-22 領域の欠失が有意に多いという結果であった ($P=0.0302$)。

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 3 件)

① 杉本貴史、大田幹、池上恒雄ほか：Macroscopic morphologic subtypes of laterally spreading colorectal tumors showing distinct molecular alterations. Int J Cancer. 2010 (in press) 査読有

② 大田幹、瀬戸元子、伊地知秀明ほか：Decreased expression of the RAS-GTPase activating protein RASAL1 is associated with colorectal tumor progression. Gastroenterology. 2009 Jan; 136(1):206-16. 査読有

③ 大田幹、杉本貴史、瀬戸元子ほか：Genetic alterations in colorectal cancers with demethylation of insulin-like growth factor II. Hum Pathol. 2008 Sep; 39(9):1301-8 査読有

[学会発表] (計 2 件)

① 杉本貴史、大田幹、小俣政男：大腸発癌過程における側方発育型大腸腫瘍(LST). 第 94 回日本消化器病学会総会 2008/5/10 福岡

② 杉本貴史、大田幹、山田篤生ほか：Differences of Genetic Features in Two Types of Laterally Spreading Tumors of the Colorectum. DDW 2009, Chicago. 2009/5/31

[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

山地裕 (YAMAJI YUTAKA)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40376455

(2) 研究分担者

大田幹 (OHTA MIKI)

東京大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：50422283

(H19：研究分担者)

金井文彦 (KANAI FUMIHIKO)

東京大学・医学部附属病院・客員准教授

研究者番号：70334399

(H19：研究分担者)

杉本貴史 (SUGIMOTO TAKAFUMI)

東京大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40534920

(H21：研究分担者)

(3) 連携研究者

なし