

令和元年6月5日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09309

研究課題名(和文) “Hypermutated-type” 大腸がんの診断バイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Development of diagnostic biomarkers for "Hypermutated-type" colorectal cancer

研究代表者

山田 敦 (YAMADA, Atsushi)

京都大学・医学研究科・特定講師

研究者番号：20569610

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：The Cancer Genome Atlas (TCGA)を用いて“Hypermutated-type”結腸がんを3つの subgroupに細分類して解析したところ、それぞれの subgroupにおいて認められた遺伝子変異のうち塩基置換や挿入・欠失の占める割合が異なるなど特徴的な遺伝子変異のパターンを示した。“Hypermutated-type”大腸がんの代表例としてミスマッチ修復蛋白の発現消失を示した病変を用いて次世代シーケンサーにより遺伝子パネル検査を行ったところ、“Hypermutated-type”大腸がんが分子変化の面から多様な特徴を示す集団であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新しいがん治療薬である免疫チェックポイント阻害剤の効果が期待されるタイプのがんとして、“Hypermutated-type”と呼ばれる遺伝子変異が非常に多いタイプのがんが注目されている。今回の研究では“Hypermutated-type”大腸がんを細分類して特徴を検討することにより、それぞれの subtypeにおける遺伝子変異のパターンが異なるなどの特徴が明らかとなった。この研究成果は大腸がんの病態に対する理解を深める一助となり、さらには個別化医療の確立に役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：We analyzed whole exome sequencing data obtained from the Cancer Genome Atlas (TCGA) dataset. Based on microsatellite instability status and mutations in BRAF, POLE and POLD1 genes, we could divide hypermutated-type colon cancer into three subtypes. In addition, these three subtypes had distinct mutational patterns characterized by difference in proportion of single nucleotide substitutions, insertions and deletions.

We next performed immunohistochemical staining for mismatch repair proteins, and found 7.6% of colorectal cancer tissues showed loss of expression of mismatch repair proteins which represent majority of hypermutated-type colorectal cancer. We then analyzed mutational profile by targeted gene sequencing panel, and showed the heterogeneous molecular characteristics among hypermutated-type colorectal cancer stratified by mismatch repair and BRAF V600E mutational status.

研究分野：消化器内科学

キーワード：大腸がん Hypermutated-type

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 大腸がんは BRAF や KRAS など特定の遺伝子変異の有無、マイクロサテライト不安定性 (microsatellite instability; MSI) やプロモーター領域における DNA メチル化の多発 (CpG island methylator phenotype, CIMP) などの分子変化や、前駆病変であるポリープの種類などに基づいて内因性の subtype に分類される。このような subtype 分類は大腸がんの発がん経路や病態の理解に役立つのみでなく、薬剤の治療効果や患者の予後と関連することが報告されており、臨床的にも重要と考えられる。

(2) 近年の次世代シーケンシング技術の進歩によりがん組織における全ゲノム解析や全エクソーム解析などが可能になり、その結果多くのがん種においてゲノムワイドな遺伝子変異の頻度が非常に高い一群が存在することが明らかになってきた。大腸がんにおいては 100 万塩基につき 12 個を超える遺伝子変異を認める病変が“Hypermutated-type”と定義され、全体の約 15% を占める新たな subtype と考えられている。

(3) 大腸がんにおける“Hypermutated-type”は、ミスマッチ修復蛋白や DNA ポリメラーゼをエンコードする POLE および POLD1 遺伝子の異常などに起因する。前者は DNA 複製の際に生じる塩基のミスマッチを修復する蛋白の異常によってミスマッチ修復機能異常をきたし、マイクロサテライトと呼ばれる塩基の繰り返し配列に高頻度に遺伝子変異を生じてマイクロサテライト不安定性 (MSI) を示す。一方、POLE および POLD1 遺伝子は多発ポリープを併発する遺伝性大腸がんに関与することが報告されており、エキソヌクレアーゼドメインの変異により校正機能の異常をきたしてゲノムワイドな変異を誘導する。

大腸がん組織において、ミスマッチ修復機能の異常は MSI 検査やミスマッチ修復蛋白の免疫染色検査によって診断されるが、POLE/POLD1 遺伝子変異による“Hypermutated-type”大腸がんの診断には次世代シーケンサーを用いた POLE/POLD1 遺伝子変異の検索や腫瘍におけるゲノムワイドな変異頻度を計測することが必要であり、日常臨床において頻用される簡便な方法は確立されていない。

(4) Programmed cell death 1 (PD-1) やそのリガンドである PD-L1 を阻害する免疫チェックポイント阻害剤が、固形がんに対する新しい免疫療法として大きな注目を集めている。“Hypermutated-type”がんでは変異遺伝子から生成される多数の変異蛋白がネオ抗原として免疫系を活性化するために、免疫チェックポイント阻害剤の効果が高いことが期待されている。実際に抗 PD-1 抗体である pembrolizumab は、大腸がんや非小細胞性肺がんにおいて“Hypermutated-type”で有効性が高いことが報告されている。このように大腸がんの subtype 分類は臨床現場において治療戦略を考える上でその重要性が増しており、とくに免疫チェックポイント阻害剤の登場にともなって“Hypermutated-type”が注目されている。

2. 研究の目的

(1) 本研究は“Hypermutated-type”大腸がんの診断に有用なバイオマーカーを同定することを目的として開始した。

(2) 研究の進行に伴い、“Hypermutated-type”大腸がんにおける分子変化の特徴を明らかにすることも目的とした。

3. 研究の方法

(1) 大腸がんの分子変化についての網羅的データベースを用いた解析

公開データベースである The Cancer Genome Atlas (TCGA, <https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/>) にアクセスし、結腸がん症例における Whole exome sequencing や MSI に関するデータ、臨床データなどを取得する。

TCGA データセットにおける Whole exome sequencing データから得られる個々の腫瘍組織における遺伝子変異情報を用いて、結腸がんの中から“Hypermutated-type”を同定する。さらに MSI や POLE、POLD1、BRAF 遺伝子変異などのキーとなる分子変化の有無に基づいて“Hypermutated-type”結腸がんを細分類する。

“Hypermutated-type”結腸がんを細分類した各 subgroup において、変異を認める遺伝子の種類や塩基変化のパターンなど遺伝子変異の特徴を解析する。

(2) 大腸がん組織におけるミスマッチ修復機能の解析

2016年から2018年の期間中に京都大学医学部附属病院において手術あるいは内視鏡的切除による治療を受けた大腸がん患者を対象として、その切除組織を用いてミスマッチ修復蛋白および BRAF V600E 蛋白の免疫染色を行う。なおミスマッチ修復蛋白の発現消失を示す病変は、ミスマッチ修復機能異常を示すと考えられる。

“Hypermutated-type”大腸がんの主要な subgroup であるミスマッチ修復機能異常を示す大腸がんを同定し、BRAF V600E 蛋白の免疫染色やミスマッチ修復蛋白の生殖細胞系列変異の有無などのデータに基づいて細分類する。

(3) “Hypermutated-type” 大腸がんにおける遺伝子変異プロファイルの検討

上記で同定したミスマッチ修復機能異常を示す大腸がん組織を用いて、FFPE 検体から DNA を抽出する。

次世代シーケンサーを用いて APC や AXIN2 などの Wnt シグナル系に關与する遺伝子、MSH2 や MLH1、POLE、POLD1 などの DNA 修復や校正に關与する遺伝子などを含む遺伝子など、大腸発がんにおいて重要な役割を果たすことが知られている遺伝子パネルを作成して遺伝子変異解析を行う。

Bisulfite 処理を行い、real-time PCR 法により MLH1 や CACNAG1 など CIMP に關連する遺伝子のプロモーターメチル化解析を行う。

4. 研究成果

(1) TCGA データベースの解析

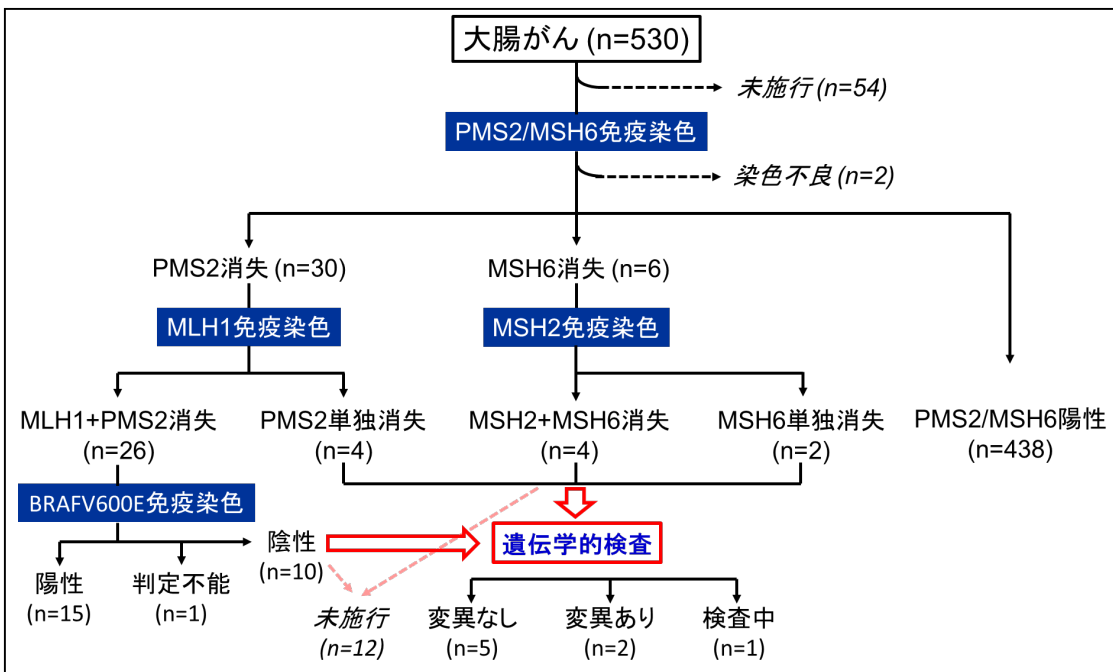
結腸がんの Whole exome sequencing データから各症例における遺伝子変異数を解析して、“Hypermutated-type” 結腸がんを同定した。さらに“Hypermutated-type” 結腸がんを MSI や POLE/POLD1 遺伝子変異の情報により層別化したところ (a) ミスマッチ修復機能の異常により遺伝子変異が促進される MSI がん (b) POLE/POLD1 遺伝子変異陽性で DNA ポリメラーゼの校正機能の異常により遺伝子変異が促進されるがん (c) 上記以外 の3つの subgroup に細分類された。

これらの結腸がんでは認められた遺伝子変異のパターンについて解析したところ、上記の(a)では約80%が一塩基置換であり残りの約20%が塩基の挿入や欠失であったのに対して、(b)および(c)ではほとんどが一塩基置換で挿入や欠失はまれであった。また一塩基置換のうち(b)では「A to C」や「G to T」が多かったのに対して、(c)では「A to G」や「G to C」が多い傾向であった。

このように“Hypermutated-type” 結腸がんの中でもミスマッチ修復蛋白の異常に關連する病変と DNA ポリメラーゼの異常に關連する病変とは異なる遺伝子変異のパターンを示した。また上記の(c)は(a)や(b)とは異なる遺伝子変異のパターンを示しており、ミスマッチ修復機能異常や DNA ポリメラーゼの異常とは異なる未知の機序が“Hypermutated-type” がんの発生に寄与している可能性も考えられた。

(2) 大腸がんにおけるミスマッチ修復機能異常と“Hypermutated-type” 大腸がんの細分類

京都大学医学部附属病院において手術あるいは内視鏡切除を施行された大腸がんの連続症例を対象とした免疫染色の検討により、7.6%でミスマッチ修復蛋白の発現消失を認め、ミスマッチ修復機能異常を示す病変と考えられた。ミスマッチ修復蛋白の免疫染色結果の内訳は MLH1 の異常が疑われる病変が 5.5%で、MSH2・MSH6・PMS2 のいずれかの異常が疑われる病変が 2.1%であった。



MLH1 の異常を示す大腸がんの 38.5%が BRAF V600E 変異蛋白陰性であり、そのうちリンチ症候群の診断に至ったのは 1 例のみであった。従来は MLH1 の異常を示す大腸がんの大多数は鋸歯状ポリープに由来する BRAF V600E 変異陽性の病変であり、一部が MLH1 の生殖細胞系列変異によるリンチ症候群と考えられていたが、今回の我々の検討から“Hypermutated-type” 大腸がん

のうち MLH1 の異常によりミスマッチ修復機能異常を示す subgroup の中でも、BRAF V600E 遺伝子変異陽性の孤発性大腸がんとリンチ症候群に加えて、BRAF V600E 遺伝子変異陰性の孤発性大腸がんも相当数存在すると考えられた。

以上より “Hypermutated-type” 大腸がんが分子変化の面から不均一な集団であることが確認され、分子変化に基づいて細分類したうえでそれぞれの特徴を検討することが重要と考えられた。

(3) ミスマッチ修復機能異常を示す大腸がんにおける分子変化の特徴

京都大学医学部附属病院において手術あるいは内視鏡切除を施行した大腸がんのうちミスマッチ修復機能異常を示した病変を対象として次世代シーケンサーである Illumina MiSeq を用いた遺伝子パネル解析を行ったところ、BRAF V600E 変異陽性と BRAF V600E 変異陰性、リンチ症候群に関連する病変とで異なる遺伝子変異プロファイルを示した。

以上の結果から、“Hypermutated-type” 大腸がんをミスマッチ修復機能異常や BRAF V600E 変異の有無により細分類することによって、それぞれの subgroup において異なる分子変化の特徴が明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

山田 敦, 堀松 高博, 河田 健二, 坂井 義治, 南口 早智子, 妹尾 浩, 鳥嶋 雅子, 小杉 眞司. 当院におけるリンチ症候群のスクリーニング体制の現状. 第 22 回日本家族性腫瘍学会学術集会. 2016 年 6 月,

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://oncology.kuhp.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：奥野 恭史

ローマ字氏名：OKUNO, Yasushi

所属研究機関名：京都大学

部局名：医学研究科

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：20283666

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：小杉 眞司

ローマ字氏名：KOSUGI, Shinji

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。