

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K14607

研究課題名(和文)大腸癌の発生基盤の解明

研究課題名(英文)The mutational background in colorectal carcinogenesis

研究代表者

小川 誠司(OGAWA, SEISHI)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：60292900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：我が国では近年大腸癌は増加傾向にあるが、大腸癌に存在する遺伝子変異がどのように生じるのか、そのメカニズムは未だ十分に理解されていない。本研究では正常大腸粘膜を採取し、上皮の最小構成単位である陰窩を単離して全エクソンシーケンスを行うことで正常組織における遺伝子変異を観測した。陰窩に蓄積した遺伝子変異の数は年齢と正の相関を示した。また、変異のパターンは年齢関連の遺伝子変異パターンとして報告されたものと同一であった。これらの結果から正常大腸粘膜では加齢とともに遺伝子変異が蓄積することが示され、大腸癌の初期における遺伝子変異の発生様式について新たな知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：The incidence of colorectal cancer is increasing in Japan. A lot of mutations are acquired during carcinogenesis, the mechanism of which, however, have been poorly understood. In this study, we isolated single crypts from normal colon mucosa obtained from patients with colorectal cancer or adenoma and healthy volunteers. Because a single crypt consists of monoclonal cells, we performed whole-exome sequencing of single crypts to detect somatic mutations at stem cell level. The number of mutations in a crypt increased with age. The mutational signature was the same as age-related mutational signature which have been recently reported in cancer genome analyses. These results reveal that somatic mutations accumulate in normal colon mucosa along with aging. Our study provides novel insights in the carcinogenesis of colorectal cancer.

研究分野：腫瘍生物学

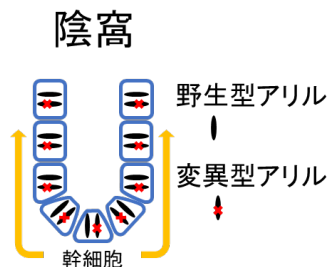
キーワード：大腸癌 遺伝子変異

(1) 研究開始当初の背景

我が国において癌は死因の第1位、総死亡の約3割を占める。中でも大腸癌は男女とも中高年の罹患率が増加し、死亡数第3位、罹患数第2位である(がんの統計'14、国立がん研究センター)。これまでの大腸癌に関する研究から、正常大腸粘膜上皮細胞に APC 変異が加わって腺腫が生じ、その後さらなるゲノム異常が蓄積することで大腸癌へと進展するという多段階発癌モデルが提唱された。また近年、腫瘍の K-ras 変異の有無に基づいた分子標的薬の選択が行われるなど、腫瘍の分子病態に基づいた臨床応用も発展してきている。正常大腸粘膜から腫瘍が発生する機序については、動物実験の結果から成体幹細胞にゲノム異常が蓄積し発癌に至る事が示唆された。しかしながら大腸癌の起源たる正常大腸粘膜におけるゲノム異常について、ヒトにおける詳細は多くが不明であった。

(2) 研究の目的

本研究では、癌の発生起源である正常大腸粘膜にも既にゲノム異常が蓄積しているとの仮説を立て、正常大腸粘膜を解析対象とした。粘膜を構成する最小単位である陰窩は、陰窩の底部に存在する幹細胞とそこから分化した細胞から構成され、遺伝学的にモノクローナルな細胞集団と考えられる。



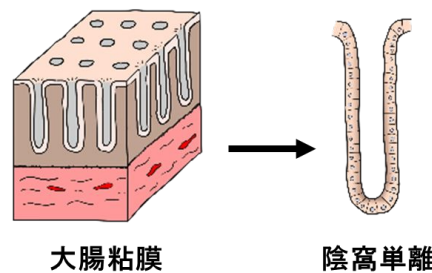
陰窩ごとに網羅的ゲノム解析を行うことで、これまでにない高い解像度で大腸粘膜に蓄積したゲノム異常を観測することとした。これにより大腸癌の発癌メカニズムの理解に貢献し、大腸癌の早期発見・早期治療戦略の向上と発癌予防に向けた展望を得ることを

目指した。

(3) 研究の方法

大腸癌患者、大腸ポリープ患者、下部消化管内視鏡検査受診者、潰瘍性大腸炎患者から正常大腸粘膜を採取し、メチレンブルー生体染色により異型陰窩が存在しないことを確認した。

次に、採取した大腸粘膜をエチレンジアミン四酢酸(EDTA)に浸した後に衝撃を加えることで粘膜上皮を基底膜より分離して1陰窩を単離した。



単離された陰窩は1陰窩ごとに全ゲノム増幅を行いシーケンスに必要なDNA量を確保した。

陰窩由来DNAと末梢血由来DNAについて、全エクソン領域をキャプチャ(Agilent SureSelect Human All Exon kit)したのちにシーケンスライブラリを調整し、次世代シーケンサー(illumine HiSeq 2500)を用いて全エクソンシーケンスを行った。

シーケンスされた塩基配列は東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターのスーパーコンピュータを用いてインフォーマティクスにより血液を対照とした体細胞変異や染色体のコピー数変化を同定し、大腸の陰窩に蓄積したゲノム異常を網羅的に解析した。

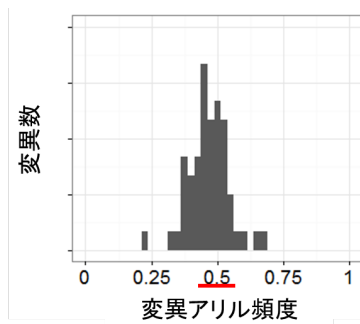
検出された変異については1陰窩の全ゲノム増幅時に別に増幅したもう一方のサンプルを用いて、PCR法により当該変異領域を含むアンプリコンを作成し次世代シーケンサーを用いてシーケンスすることで当該変異の有無について検証し、真の陽性を判定

した。

観測されたゲノム異常を大腸癌患者、大腸ポリープ患者、疾患を有しなかった下部消化管内視鏡検査受診者、潰瘍性大腸炎患者それぞれのコホート内またはコホート間で比較検討することで年齢相関、疾患相関について検討した。また、遺伝子変異のパターンから変異原を推定可能であることが知られており、正常粘膜に遺伝子変異をもたらす変異原について検討した。大腸癌のリスク因子として肥満、喫煙、飲酒、運動不足などが知られており、これらリスク因子とゲノム異常の相関についても解析を行った。

(4) 研究成果

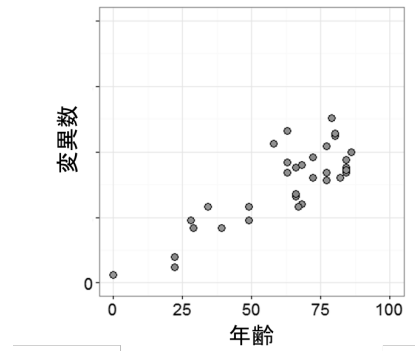
大腸癌患者 10 例、大腸ポリープ患者 3 例、潰瘍性大腸炎 3 症例、健常人ボランティア 4 例から、合計 24 陰窩を単離し、末梢血から抽出した DNA を対照として次世代シーケンサーを用いて全エクソン解析を行った。解析を行った全ての陰窩において体細胞変異を検出し、その変異アリル頻度は平均約 0.5 であり、各陰窩の幹細胞レベルで生じた変異を正確に捉えることに成功した。



さらに解析アルゴリズムの洗練によりこれらの体細胞変異の検証実験において真の陽性率 95%以上の高い正確性を確保し得た。

陰窩に蓄積した体細胞変異の数は年齢と正の相関を示し、正常大腸粘膜では加齢とともに遺伝子変異が蓄積することが判明した(右上図)。

各コホート間で 1 陰窩に蓄積する遺伝子変異の数を比較したところ、潰瘍性大腸炎症例



由来の陰窩では変異数が増加する傾向が示された。

本研究により正常大腸粘膜における 1291 個の体細胞変異が検出され、その変異のパターンは近年の網羅的癌ゲノム解析において年齢関連の遺伝子変異パターンとして報告された、CpG 配列における C>T (G>A)変異と同一であることが判明した。

大腸癌のリスクとして飲酒、喫煙、肥満などが知られているが、今回観察したコホートにおいてこれら大腸癌のリスク因子と陰窩に蓄積した体細胞変異の数との間には明らかな関連は認められなかった。

また、今回観察された遺伝子変異の中には明らかに癌と関連のある遺伝子変異と考えられるものはほぼ認められず、大部分の体細胞変異は細胞にとって無害な遺伝子変異と考えられた。

本研究により癌に至る以前のヒト正常大腸粘膜において加齢と共に遺伝子変異が獲得されることが証明された。遺伝子変異の多くは無害と考えられる遺伝子変異であった。癌に関連する変異が偶然生じた場合にのみ、その細胞は腫瘍へと進化する可能性が示唆された。今回得られた知見は大腸癌の発生基盤をゲノム異常の見地から理解する非常に有益なものとなった。

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0件)

〔学会発表〕(計1件)

Nobuyuki Kakiuchi, Kenichi Yoshida, Yusuke Shiozawa, Kenichi Chiba, Yuichi Shiraishi, Takaki Sakurai, Yoshiharu Sakai, Motoi Uchino, Seiichi Hirota, Hiroki Ikeuchi, Satoru Miyano, Hiroyuki Marusawa, Seishi Ogawa, 潰瘍性大腸炎関連大腸癌の発癌機序.第75回日本癌学会学術総会, 2016/10/7, 横浜

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

なし

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

小川 誠司 (OGAWA, Seishi)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号：60292900

(2)連携研究者

坂井 義治 (SAKAI, Yoshiharu)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号：60273455

(3)連携研究者

丸澤 宏之 (MARUSAWA, Hiroyuki)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号：80324630

(4)連携研究者

吉田 健一 (YOSHIDA, Kenichi)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：80324630