

平成30年6月27日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19107

研究課題名(和文)次世代シーケンサーによる大腸前がん病変からがんへの進化に関わる遺伝子の解明

研究課題名(英文)Multiregion analysis for early colorectal tumor

研究代表者

齋藤 衆子(Saito, Tomoko)

九州大学・大学病院・医員

研究者番号：10734741

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍内不均一性は癌の難治性の原因である。今回、大腸癌発生早期における腫瘍内不均一性について検討した。大腸腺腫と早期大腸癌(併せて大腸癌早期病変)10症例について一腫瘍に対して複数か所の全エクソームシーケンス解析(WES)を行った結果、進行病変と比較して早期病変には同程度に遺伝子変異が存在した。また、進行病変では中立進化によって腫瘍内不均一性が獲得されると考えられるのに対し、腫瘍内不均一性は早期病変でやや強い傾向にあり、腫瘍内不均一性の形成には自然選択が強く関わっていることが分かった。また、WESの結果からコピー数変化を推測すると腫瘍が進行することにコピー数変異は増加していることも分かった。

研究成果の概要(英文)：Intratumor heterogeneity causes therapy resistance of cancer. Advanced colorectal cancer harbors extensive intratumor heterogeneity shaped by neutral evolution. We performed multiregion whole-exome sequencing on 10 early colorectal tumors, which contained adenoma and carcinoma in situ. By comparing with sequencing data from advanced colorectal tumors, we found that the early tumors accumulated a higher proportion of subclonal driver mutations than the advanced tumors. We also observed that variant allele frequencies of subclonal mutations tended to be higher in early tumors, suggesting that the subclonal mutations were subject to selective sweep in early tumorigenesis while neutral evolution is dominant in advanced ones. This study establishes that the evolutionary principle underlying intratumor heterogeneity shifts from Darwinian to neutral evolution during colorectal tumor progression.

研究分野：消化器内科

キーワード：早期大腸がん 大腸腺腫 全エクソームシーケンス 腫瘍内不均一性 自然選択 枝分かれ進化

1. 研究開始当初の背景

大腸癌は複数の遺伝子異常が蓄積して発生するとされてきた(多段階発癌)。発癌経路として、adenoma-carcinoma sequence (Vogelstein, et al. N Engl J Med 1988, 図1)などが提唱されてきた。近年、次世代シーケンサーなど遺伝子解析技術の進歩により、大腸癌の遺伝子情報もより詳細に明らかになっているがそれらの遺伝子が発癌や癌の進化のどの過程で発生するかはまだ明らかではない。癌の多様性は、癌の難治性に深く関わっている。大腸癌 (TCGA, Nature 2012) を含め様々な癌種において、TCGA 等による大規模症例を対象としたがんゲノム研究により症例間で癌に多様性 (intertumor heterogeneity) があることが明らかとなった。また、近年では膵癌 (Yachida S, et al. Nature 2010) や腎癌 (Gerlinger M, et al. N Engl J Med 2012.) をはじめ、種々の癌で一病変から数か所サンプルを採取し遺伝子解析を行う手法 (multiregional analysis, MRA) で、腫瘍全体に存在する変異 (founder 変異) や一部のみに存在する変異 (progressor 変異) が明らかとなり、一つの癌の中にも多様性 (intra-tumor heterogeneity, ITH) が存在することが示された。当研究室では 10 症例の進行大腸癌に対して、それぞれ原発巣と転移巣から合わせて 6~20 か所サンプルを採取し、次世代シーケンサーを用いたエキソームシーケンス、SNP アレイを用いたコピー数解析、メチル化アレイを用いたメチル化解析、発現アレイの統合解析を行った。大腸癌ゲノムには腫瘍内多様性があり、中立進化によって多様性が発生することが分かった。しかし、進行癌を用いたこれまでの研究では、発癌初期の変化を捉えることはできず、実際に正常粘膜 ~ 腺腫 ~ 癌と変化する過程における founder 変異や progressor 変異の影響や、真に癌化にかかわる遺伝子を検証することはできなかった。

2. 研究の目的

大腸の前癌病変及び早期大腸癌を対象に MRA を実施し、founder 変異や progressor 変異という 2 種類の遺伝子変異群が発癌にどのように寄与し、前癌病変から癌への変化するメカニズムを解明する。この癌化を引き起こす真の遺伝子や癌細胞の多様性を生み出す最初の契機を明らかにすることは、難治性大腸癌の新たな治療法の提唱につながる。

3. 研究の方法

1) 症例集積

本研究は、大腸癌の初期病変を対象にしたゲノム・エピゲノム解析であり、病理学的に前癌状態と考えられている大腸腺腫および早期大腸癌を解析対象とする。具体的には、2 cm 以上の腺腫もしくは、2 cm 以上でリンパ節転移がなく、細胞の浸潤が粘膜ないまたは粘膜下層に限局した腺癌と診断された計 10 症例。

2) DNA 抽出およびシーケンス

(1) 各症例から数か所ずつサンプルを採取し、凍結保存し、組織型(腺腫もしくは腺癌)に従ってレーザーマイクロダイセクション (LMD) で腫瘍組織を採取。

(2) LMD サンプルに対応する AllPrep DNA/RNA mini kit® (Qiagen) を用いて DNA を抽出。

(3) 次世代シーケンサーを用いて、エキソームシーケンスを行った。

3) データ解析

(1) エキソームシーケンスデータは、東京大学ヒトゲノム解析センターのスーパーコンピュータにおいて Genomon2 プログラムを用いて解析し、変異コールを行った。

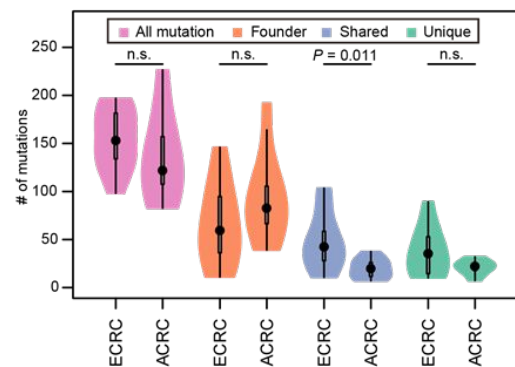
(2) 変異コール結果を用いて、系統樹解析を行った。

(3) エキソームシーケンスデータを利用してコピー数変異解析を行った。

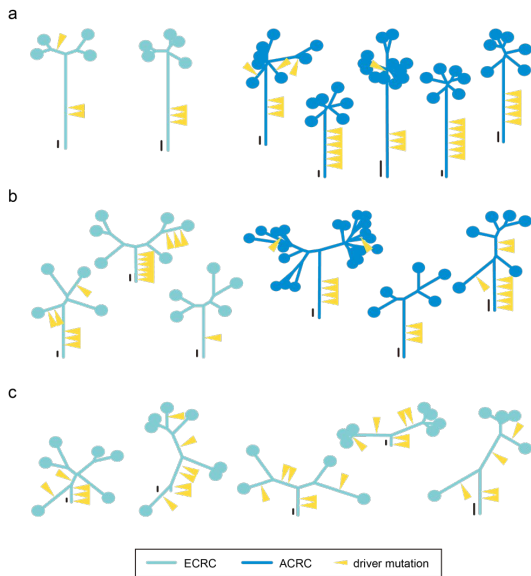
(4) これらの結果を先行の進行大腸癌のデータと比較した。

4. 研究成果

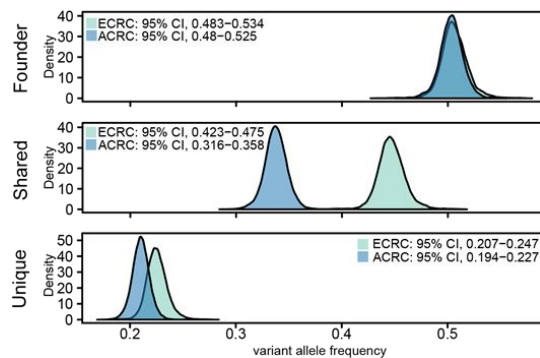
(1) 早期病変において、一塩基置換と短い挿入/欠損を含めた遺伝子変異に関して変異数は、100 万塩基あたり中央値 3.0 (範囲, 1.6-4.9) であり、進行がん (中央値, 2.8; 範囲, 1.2-4.8) と同程度であった。しかし進行病変と比較して、早期病変では一腫瘍の全領域に存在する founder 変異は少なく、部分的に存在する progressor 変異が多い傾向にあった。特に一腫瘍の 2 か所以上で共通している shared 変異は有意に多かった。



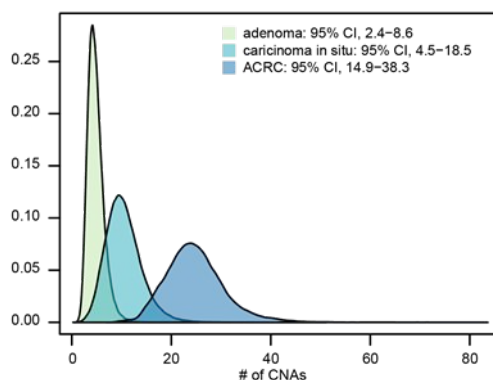
(2) 系統樹を構築すると、早期病変の系統樹の特徴は幹が短く枝の長い形態であった。また、ドライバー遺伝子変異は幹ではなく枝に多く存在した。



(3)早期病変では shared 変異のアレル頻度は有意に高かった。これらの結果からは、大腸がんは早期病変の段階では自然選択を経て進化していることが示唆された。



(4)一方、コピー数変異は腺腫、粘膜内がん、進行がんの順に段階的に増加していた。このことは、腺腫から腺がんへと形質転換したり、悪性度を増したりする上でコピー数変異が遺伝子変異よりも強く寄与していると考えられた。



以上から、大腸癌は発生から進行癌に至るまでの間に進化のパターンを自然選択から中

立進化へと変化することが分かった。

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1件)

1. Saito T,... Mimori K.(41/41) A temporal shift of the evolutionary principle shaping intratumor heterogeneity in colorectal cancer. *Nat Commun.* in press

〔学会発表〕(計2件)

1. 齋藤衆子、新井田厚司、三森功士. ゲノム解析より見えてきた大腸がんの不均一な進化. 第6回生命医薬情報学連合大会 2017/9/27-29 札幌.
2. Tomoko Saito, Atsushi Niida, Ryutaro Uchi, Hidenari Hirata, Hidetoshi Eguchi, Takaaki Masuda, Shuhei Ito, Naoki Hayashi, Hisateru Komatsu, Shotaro Sakimura, Kazunari Murakami, Koshi Mimori. Clonal evolution during the adenoma-carcinoma sequence in colorectal cancer. 第75回日本癌学会学術総会 2016.10/6-8 横浜.

〔図書〕(計2件)

1. 齋藤衆子、新井田厚司、三森功士. 大腸がんの起源とクローン進化. *BioClinica* 第33巻第6号 Page504-509(2018.6)
2. 齋藤衆子、三森功士. がんの不均一性の理解とがんの生存戦略 固形がんのゲノム、エピゲノムにおける空間的・時間的多様性と治療戦略(解説/特集). *実験医学* 36巻2号 Page183-189(2018.02)

〔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

齋藤 衆子 (SAITO Tomoko)
九州大学・大学病院・医員
研究者番号：10734741

(2) 研究分担者

該当なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

該当なし ()

研究者番号：

(4) 研究協力者

該当なし ()