

令和 2 年 4 月 30 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09476

研究課題名(和文) serrated pathway由来大腸癌の個別化医療の確立に向けて

研究課題名(英文) Establishment of tailor-made medicine for colorectal cancer arise in serrated pathway

研究代表者

田中 信治 (Shinji, Tanaka)

広島大学・病院(医)・教授

研究者番号：00260670

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)：鋸歯状腺癌のなかで予後不良な発癌経路に関する内視鏡所見、病理組織所見、分子生物学的特徴やゲノム変異を明らかにするために本研究を行なった。本研究では発癌早期の変化を検討するために、早期癌を使用した。本研究の結果は癌部に鋸歯状構造を伴う早期鋸歯状腺癌は悪性度が高い可能性があることと、早期鋸歯状腺癌は分子生物学的に異なる3群に分類され、各群で臨床病理学および遺伝子学的に相違があることを見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Serrated pathwayは大腸癌の主な発癌経路の一つであり、予後不良な発癌経路として知られている。一方で、鋸歯状構造を有する腫瘍である鋸歯状腺腫からの大腸癌は全てserrated pathwayの様式をとって発癌するとは限らない。本研究の結果、鋸歯状腺癌は遺伝学的・病理学的に多様な発癌機序を持つ疾患が混在していると考えられるため、鋸歯状腺癌の診断基準の細分化が必要となる可能性が示唆された。また、鋸歯状構造を伴う早期鋸歯状腺癌については悪性度が高いと考えられ、大腸内視鏡の治療選択の方針を選択する一つの指標となり得る可能性があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to clarify the characteristics for endoscopic, pathological, and molecular biological findings, and genomic alteration, associated with the poor prognosis pathway in serrated carcinogenesis. We examined the features in initial carcinogenesis development by early-stage serrated carcinomas (SACs). The results of this study found that Epithelial serration in the cancerous area indicated aggressive behavior in early-stage SACs, and Early-stage SACs were classified into three molecularly distinct subtypes with different clinicopathological and genetic characteristics.

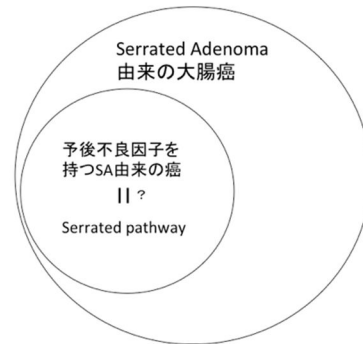
研究分野：大腸癌

キーワード：鋸歯状腺癌 serrated pathway

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、大腸癌における発癌経路として adenoma-carcinoma sequence, de novo pathway に継ぐ serrated pathway が注目させている。Serrated pathway とは、過形成ポリープ(HP)や HP に類似した鋸歯状の構造を有する腫瘍である鋸歯状腺腫 serrated adenoma(SA)から発生したと考えられる発癌経路のことである。また SA 由来の癌では粘液形質を呈しており、従来の大腸癌とは異なることも報告されている。SA における



SA 由来の大腸癌の疑問点

遺伝子解析としては、ミスマッチ修復遺伝子の変異やこれに伴う microsatellite instability(MSI)が発生に関与しており、さらに BRAF 遺伝子変異の頻度が高く、LINE-1 や IGF2 DERO などの癌関連遺伝子のメチル化も高頻度に存在することも報告されている。さらに SA のなかでも sessile serrated adenoma/polyp(SSA/P)と traditional serrated adenoma(TSA)は発育形式が異なるとされており、SSA/P では BRAF 変異陽性、KRAS 変異陰性、TSA では BRAF 変異陰性、KRAS 変異陽性であることが報告されている。

近年の研究機器の進歩に従い、大腸癌における網羅的なゲノム解析の報告がたてつけにされている。このような報告では解析により同定されたゲノム情報をもとに Cluster 解析によって、発癌経路のパターン化を行っている。なかでも Felipe らはマイクロアレイにて解析したゲノム情報を用いて、3つのクラスターに大腸癌のゲノム変異をわけ、これらが Chromosome instability、MSI とその他の3群に分類できると報告し、これらのクラスターは4種類の免疫染色によって分けることが可能であり、その他の群は遺伝子変異の解析パターンが SA の遺伝子変異パターンと類似しているため serrated pathway による発癌であるとしている。さらにこのクラスターは、解析の結果、予後不良であると報告している(*Nat Med.* 2013; 19: 614-8)。他の報告においても Felipe らの報告と同様に serrated pathway は予後不良群であると位置づけられている。このような背景から SA 由来の癌は予後不良であると考えられるが、SA は様々な病理組織所見をもつ腫瘍が混在した概念であり、すべての腫瘍がゲノム解析で同定された予後不良な serrated pathway によって癌化しているとは考えにくい。このため SA 由来の癌のなかでゲノム解析によって同定された予後不良な serrated pathway の内視鏡所見や病理組織所見の特徴、ゲノム変異を明らかにする。

2. 研究の目的

1. 内視鏡切除をおこなった SA 由来の T1 癌においてリンパ節転移例や脈管侵襲例を予後不良群と規定して、これらの因子を持つ腫瘍の病理組織所見、内視鏡所見の特徴について解明する。
2. 免疫染色と MSI 解析を用いて SA 由来の癌のグループ分けを行い、ゲノム解析上での serrated pathway を同定する。さらにゲノム解析上の serrated pathway と病理組織所見を比較検討し病理所見とゲノム変化が関連するか検討する。
3. 同一検体内で SA 部と癌部を比較することによって SA 由来の癌で認める遺伝子変異を同定し、発癌にどのようなゲノム変異が SA 由来の癌で関与しているか解明する。

3. 研究の方法

SA 由来の癌のなかで予後不良群の特徴を病理組織所見や内視鏡所見、ゲノム変異などから体系的に解明するため、以下の実験を企画し行なった。

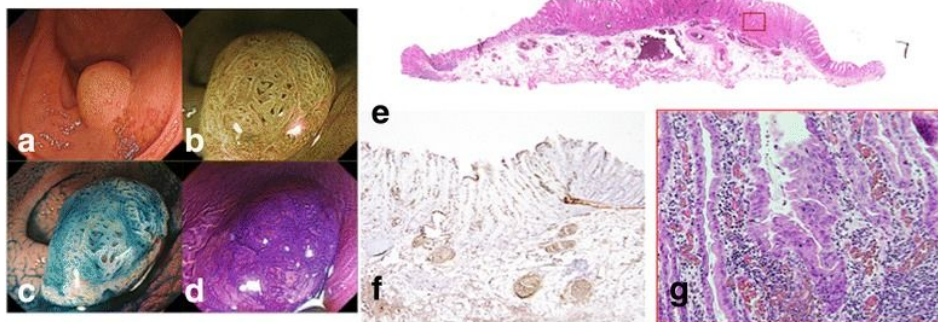
最初に予後不良因子を持つ SA 由来の癌における病理組織所見や内視鏡所見について同定した。次に既報の報告で提唱された大腸癌のゲノム変異を免疫染色と MSI 解析によってグループ分けを行い、予後不良な serrated pathway が実際の SSA/P 由来の癌と一致しているか検証した。次に SA 由来の T0, T1 癌内視鏡切除材料の癌部と SA 部より gDNA を抽出する。これを次世代シーケンサーにて癌関連遺伝子シーケンスを行い、Driver 変異を同定し、免疫染色によってグループ分けされた予後不良群と Driver 変異との関連について検証した。同定された遺伝子変異が SA におこることで、癌の組織型に影響を与えないか、オルガノイドや免疫不全マウスに移植し、ヒトで認めた SA 由来の癌の病理組織所見と比較を試みた。

4. 研究成果

1) 早期 serrated adenocarcinoma(SAC)の臨床病理学的所見から検討した予後不良群の内視鏡所見の特徴について

2009年1月～2016年1月の間に当院にて治療し、病理学的に早期 SAC と診断した 40 例を対象とした。癌上皮に鋸歯状構造を伴う群 (A 群 N=17) と伴わない群 (B 群 N=23) に分類し、それぞれの臨床病理学的特徴と内視鏡的特徴について比較検討した。さらに癌に隣接する組織型を TSA (Traditional serrated adenoma), SSA/P (sessile serrated adenoma/polyp), 分類不能の鋸歯状病変, 非鋸歯状病変型の 4 群に分類し、臨床病理学的特徴について比較検討した。臨床病理学的特徴を比較した検討では、A 群は B 群より平均腫瘍径が小さく (27.6 mm vs. 43.1 mm), T1 癌の割合が高かった (71% vs. 13%)。内視鏡所見の特徴としては、A 群は B 群より正色調 (47% vs. 17%), NBI JNET 分類 Type 3 (18% vs. 0%), V 型 pit pattern (70% vs. 39%) を呈する割合が高かった。また B 群は A 群より IV 型 pit pattern を呈する割合が高かった (44% vs. 12%)。4 群間の比較では、SSA/P 型は全例 (5/5) が近位結腸に局在し、TSA 型 (7/27) と比較して有意差 ($p < 0.01$) を認めた。腫

瘍径は、
TSA 型
(42.6 mm)
は SSA/P 型
(17.2mm),
非鋸歯状病
変型



(18.3mm) に比較し、有意 ($p < 0.01$) に大きかった。T1 癌の割合は、TSA 型 (11%) は他の型に比較して有意 ($p < 0.01$) に低かった。

2) ゲノム解析上の serrated pathway と病理組織所見を比較検討し病理所見とゲノム変化が関連の検討

2009年1月～2016年1月の間に当院にて治療を施行し、病理学的に早期 SAC と診断された症例のうち、検討に必要な DNA 量が抽出可能であった 24 例を対象とした。

以前に報告された大腸癌の分類方法 (CDX2, HTR2B, FRMD6, ZEB1 の免疫染色および MSI 分析) によって 3 群 (CCS1: CDX2 positive, HTR2B negative, FRMD6 negative, ZEB1 negative, and MSS/MSI-L, CCS2: MSI-H, and CCS3: CDX2 negative, HTR2B positive, FRMD6 positive, ZEB1 positive, and MSS/MSI-L) に分類し, 各群での臨床病理学的特徴および Next Generation Sequencer による 15 癌関連遺伝子 (NRAS, FOXL2, PIK3CA, PDGFRA, KIT, EGFR, MET, RET, KRAS, AKT1, TP53, ERBB2, BRAF, GNA11, GNQ) の変異数およびパターンについて検討した。この結果、早期 SAC 24 例は CCS1: 14 例, CCS2: 5 例, CCS3: 5 例に分類され, serrated adenoma に関連するとされた CCS3 は 5 例のみであった。臨床病理学的検討について, T1 癌は 12 例 (CCS1: 3/14, CCS2: 4/5, CCS3: 5/5) に認め, CCS3 で CCS1 よりも有意に高頻度であった ($p=0.0048$)。Ki67LI 陽性率は, CCS3 ($83.0 \pm 5.8\%$) は CCS1 ($65.4 \pm 4.0\%$) より高い傾向であった ($p=0.031$)。癌部の鋸歯状構造の存在率は, CCS3 (5/5) は CCS1 (3/14) より有意に高く ($p=0.0048$), CCS2 (4/5) は CCS1 (3/14) より高い傾向であった ($p=0.038$)。遺伝子の解析では, 癌に隣接する良性鋸歯状病変の変異 20 例に認め, そのうち

Variable	CCS1 ^a	CCS2 ^b	CCS3 ^c	p-value (a vs b, a vs c, b vs c)
Sex (male/female)	6/8	3/2	3/2	0.6285, 0.6285, 1.0
Age (years)	72.6 \pm 2.6	67.6 \pm 4.4	71.2 \pm 4.4	0.1782, 0.3928, 0.7092
Location (proximal/distal + rectum)	5/9	4/1	4/1	0.1409, 0.1409, 1.0
Size (mm)	43.1 \pm 6.0	28.0 \pm 10.1	25.0 \pm 10.1	0.1254, 0.0847, 0.3613
Depth (Tis/T1)	11/3	3/4	0/5	0.0379, 0.0048, 1.0
Macroscopic type (protruded/superficial)	12/2	3/2	4/1	0.2722, 1.0, 1.0
Ki67 LI (%)	65.4 \pm 4.0	68.0 \pm 5.8	83.0 \pm 5.8	0.6307, 0.9847, 0.9468
Epithelial serration (present/absent)	3/11	4/1	5/0	0.0379, 0.0048, 1.0

We analyzed 24 SACs that were classified into each CCS group

CCS1: CDX2+, HTR2B-, FRMD6-, ZEB1- and MSS/MSI-L, CCS2: MSI-H, CCS3: CDX2-, HTR2B+, FRMD6+, ZEB1+ and MSI-L/MSS

18 例で BRAF/KRAS 変異を認めた。15 癌関連遺伝子変異の蓄積を検討したところ, CCS2 は CCS1 または CCS3 よりも有意に変異数が多かった。

3) 同一検体内で SA 部と癌部を比較し、発癌におけるゲノム変異と SA 由来の癌との比較

癌部と正常粘膜部で遺伝子変異の頻度について比較したところ, KRAS/BRAF 変異の蓄積に関して, CCS3 (80.0%) は CCS1 (21.4%) よりも有意に多かった ($p=0.038$)。さらにこの結果について機能解析を行うべく、細胞を用いた実験を行なったが、現在までのところ優位と言える結果は出ていない。

以上の結果をまとめるとより, 本研究は癌部に鋸歯状構造を伴う早期 SAC は悪性度が高い可能性があり, 早期 SAC は分子生物学的に異なる 3 群に分類され, 各群で臨床病理学的および遺伝子学的に相違があることを見いだした。よって, SAC とは遺伝学的・病理学的に多様な発生機序を持つ疾患が混在していると考えられるため, SAC の診断基準の細分化が必要となる可能性がある。また, 鋸歯状構造を伴う早期 SAC については悪性度が高いと考えられ, 大腸内視鏡の治療選択の方針を選択する一つの指標となり得る可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hirano D, Urabe Y, Tanaka S, Nakamura K, Ninomiya Y, Yuge R, Hayashi R, Oka S, Kitadai Y, Shimamoto F, Arihiro K, Chayama K.	4. 巻 14
2. 論文標題 Early-stage serrated adenocarcinomas are divided into several molecularly distinct subtypes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0211477
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0211477.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hirano D, Oka S, Tanaka S, Sumimoto K, Ninomiya Y, Tamaru Y, Shigita K, Hayashi N, Urabe Y, Kitadai Y, Shimamoto F, Arihiro K, Chayama K.	4. 巻 17
2. 論文標題 Clinicopathologic and endoscopic features of early-stage colorectal serrated adenocarcinoma.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 BMC Gastroenterol	6. 最初と最後の頁 158
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12876-017-0702-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yuji Urabe, Shinji Tanaka, Daiki Hirano, Koki Nakamura, Yuki Ninomiya, Ryohei Hayashi, Shiro Oka, Yasuhiko Kitadai, Fumio Shimamoto, Koji Arihiro, Kazuaki Chayama
2. 発表標題 Examination for genetic and clinicopathological findings for early-stage serrated adenocarcinoma using CCS classification
3. 学会等名 The 77th Annual Meeting of the Japanese Cancer Associa
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 卜部祐司、平野大樹、岡 志郎、田中信治、茶山一彰
2. 発表標題 大腸早期鋸歯状腺癌における 遺伝学的分類を用いた悪性度評価の有用性
3. 学会等名 第109回 消化器病学会 中国地方会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 卜部祐司、田中信治、茶山一彰
2. 発表標題 早期大腸鋸齒状腺癌にたいする分子生物学的検討
3. 学会等名 第97回日本消化器内視鏡学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuji Urabe, Shinji Tanaka, Daiki Hirano, Koki Nakamura, Yuki Ninomiya, Ryo Yuge, Ryohei Hayashi, Shiro Oka, Yasuhiko Kitadai, Fumio Shimamoto, Koji Arihiro, Kazuaki Chayama
2. 発表標題 Malignant potential of early-stage serrated adenocarcinoma based on genetic analysis
3. 学会等名 UEGW2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平野大樹, 田中信治, 茶山一彰.
2. 発表標題 早期大腸鋸齒状腺癌の臨床病理学および内視鏡的特徴.
3. 学会等名 第103回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 平野大樹, 卜部祐司, 岡 志郎, 田中信治, 茶山一彰, 有廣光司.
2. 発表標題 臨床病理・分子生物学検討からみた早期大腸鋸齒状腺癌の特徴.
3. 学会等名 第72回日本大腸肛門病学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	卜部 祐司 (Urabe Yuji) (10648033)	広島大学・病院(医)・助教 (15401)	
研究 協力者	岡 志郎 (Oka Shiro) (30403538)	広島大学・病院(医)・講師 (15401)	