

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16530

研究課題名(和文) 遺伝性大腸癌の層別化に基づく発癌分子機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanism of carcinogenesis based on stratification of hereditary colorectal cancer

研究代表者

高根 希世子 (Takane, Kiyoko)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：60756112

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)：家族性大腸腺腫症(FAP)は、大腸癌を発症する素因を持つ、多数の結腸直腸腺腫を特徴とする遺伝性疾患である。今回我々はFAP腫瘍のゲノムワイドなDNAメチル化解析を行った。比較対象として、公共のデータベースを参照し、散発性大腸癌、散発性大腸腺腫、および正常粘膜のDNAメチル化データを使用した。FAPと散発性大腸癌/腺腫、正常粘膜の階層クラスタリング分析により、FAP腫瘍は少なくとも異常なメチル化を示さないタイプと、KRAS変異を伴うメチル化中等度タイプの2つの分子サブタイプに分類された。さらに散発性腫瘍よりもDNAメチル化頻度が低いことから、散発性腫瘍とは異なる腫瘍形成経路をたどると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌症例を詳細にサブタイプ分類し、各症例へ最も良い治療方針を即座に建立するテーラーメイド治療概念は、癌を克服するための鍵として世界的に研究されている。我々は大腸癌の中でも高リスク群であり早期対応が望まれるにも関わらず疾患の選定や分子機構の解明に乏しかった家族性大腸腺腫症に対して同様の複合的解析を進め、家族性大腸腺腫症の層別化情報を診断や治療へ応用する。日本大腸癌研究会が近年、「遺伝性大腸癌診療ガイドライン」をあえて作成・周知している背景からも、この研究は遺伝性大腸癌の発癌機構解明に大きな寄与をもたらすだけでなく、これまで散発性大腸癌へ誤診されがちであった遺伝性大腸癌患者の救済にも貢献できる。

研究成果の概要(英文)：Familial adenomatous polyposis (FAP) is an inherited disorder characterized by numerous colorectal adenomatous polyps with predisposition to the development of colorectal cancer (CRC). Here, we conducted genome-wide DNA methylation analysis of FAP neoplasms. As controls for sporadic colorectal neoplasms and mucosae, we used data from CRC samples, colorectal adenoma samples, normal mucosa samples with reference to public databases. Unsupervised two-way hierarchical clustering analysis of FAP and sporadic CRC/adenoma revealed that CRC was classified into four DNA methylation epigenotypes. FAP neoplasms were classified into at least two molecular subtypes, i.e., normal like methylation type in the majority of cases showing mostly no aberrant methylation and intermediate methylation type in some cases accompanied by KRAS mutations but less frequent aberrant DNA methylation than sporadic neoplasms, suggesting that FAP may follow a tumorigenesis pathway different from that of sporadic CRC.

研究分野：エビジェネティクス

キーワード：家族性大腸腺腫症 大腸癌 大腸腺腫 DNAメチル化

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

国立がん研究センターが公表した 2014 年のがん統計において、罹患数 1 位・死亡数 2 位に位置する大腸・直腸癌は、日本において最大規模の癌治療研究対象の 1 つである。大腸癌の肉眼的分類としては 0-5 型 (0 型: 表在型、1 型: 腫瘤型、2 型: 潰瘍限局型、3 型: 潰瘍浸潤型、4 型: びまん浸潤型、5 型: 分類不能) の 6 サブタイプに分類され、同じ大腸に存在しても de novo 経路や鋸歯状経路など、個々の腫瘍で発癌経路が異なっている。加えて後述する分子サブタイプなど、多様な特徴を示す大腸癌患者に対し、正しく層別化し、最適な治療を提供することが喫緊の解決点である。

一方、大腸癌全体の約 10%には遺伝性大腸癌が存在し、若年発症傾向や多発性および他臓器への発癌を高頻度で合併する高リスク悪性腫瘍群であるが、散発性大腸癌との相違点が解明されておらず、散発性大腸癌と同様に扱うべきか、個別に扱うべきか、対応に困る問題点がある。遺伝性大腸癌は Lynch 症候群と家族性大腸ポリポーシス (familial adenomatous polyposis: FAP) とに大別される。遺伝性大腸癌はリスク対策だけでなく、最適な治療提供、新規治療開発の大前提となる症例の層別化と各群の発癌分子基盤の解明がいまだに非常に不十分であるといえる。

### 2. 研究の目的

遺伝性大腸癌は Lynch 症候群 (遺伝性非ポリポーシス大腸癌) と家族性大腸ポリポーシスの 2 群に大別され、全大腸癌の 10%を占めており、日本でも毎年 1 万人を超える患者が罹患する重要な疾患である。しかしながら、散発性大腸癌に対しては、遺伝子発現パターンに基づく詳細な層別化が行われている一方、遺伝性大腸癌に対しての層別化はいまだ不十分であるといえる。我々はこれまでに、遺伝子変異解析・DNA メチル化網羅的解析により家族性大腸ポリポーシスの層別化を行ない、複数の分子サブタイプから成ることを提唱した。

本申請課題では、より詳細な層別化を進めることで家族性大腸ポリポーシスの本態を詳細に解明し、さらに散発性大腸癌との比較検討を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) 臨床検体準備

千葉大学消化器外科、埼玉県立がんセンター腫瘍・予防科において外科的に摘出された家族性大腸ポリポーシス手術検体 48 例の検体を対象とした。腫瘍部分をレーザーマイクロダイセクションにより回収し RNA、DNA を抽出した。核酸抽出した切片の連続切片を用いて、TP53、CTNNB1 などの免疫組織化学染色を行った。

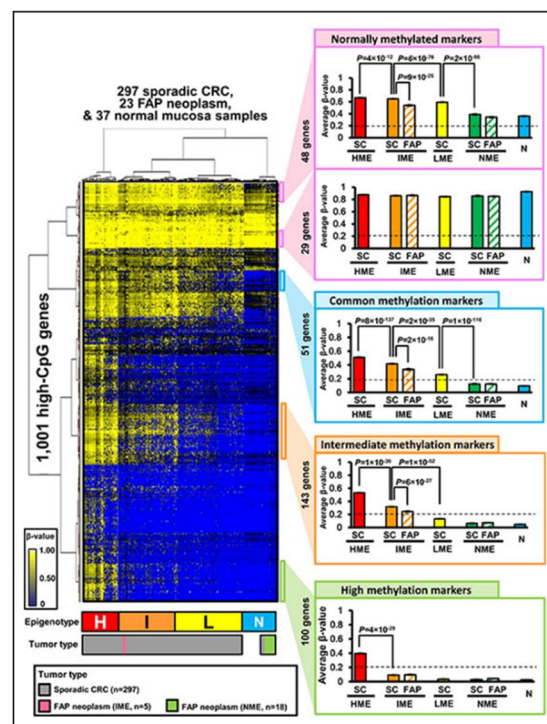
#### (2) 網羅的 DNA メチル化解析

収集した遺伝性大腸癌検体よりゲノム DNA を回収し、バイサルファイト C-T 変換を施す。それらサンプルの中で、DNA のクオリティが高く、特徴的な変異遺伝子や環境因子の存在する 23 例 (7 個の癌と 16 個の腺腫) ものについて、Infinium450K ビーズアレイ法を用いて網羅的 DNA メチル化解析を行った。

比較対象として、散発性大腸腫瘍および正常粘膜について、The Cancer Genome Atlas およびその他のデータベースを参照し、297 個の散発性大腸癌、45 個の散発性大腸腺腫、および 37 個の正常粘膜の Infinium 450k データを使用した。

### 4. 研究成果

FAP と散発性大腸癌/腺腫、正常粘膜の階層クラ



スタリング分析により、散発性大腸癌が 4 つの DNA メチル化エピジェノタイプ (ME)、高 ME (HME)、中間 ME (IME)、低 ME (LME)、および通常の ME (NME) に分類されたことが明らかになった(図)。5 個の FAP 腫瘍 (2 個の癌と 3 個の腺腫) は IME とクラスター化されたが、18 個の FAP 腫瘍 (5 個の癌と 13 個の腺腫) は NME にクラスター化された。IME FAP 腫瘍は散発性大腸癌と同様に、KRAS 変異と有意に相関していた。ただし、IME 内における DNA メチル化頻度は、FAP 腫瘍は散発性腫瘍よりも有意に低く、これらの非メチル化遺伝子には、WNT ファミリー遺伝子およびいくつかの発癌関連遺伝子が含まれていた。以上のことから、FAP 腫瘍は少なくとも、異常なメチル化を示さない NME タイプと、KRAS 変異を伴う IME タイプの 2 つの分子サブタイプに分類され、散発性腫瘍よりも DNA メチル化頻度が低いことから、散発性腫瘍とは異なる腫瘍形成経路をたどるといえる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yamaguchi K, Shimizu E, Yamaguchi R, Imoto S, Komura M, Hatakeyama S, Noguchi R, Takane K, Ikenoue T, Gohda Y, Yano H, Miyano S, Furukawa Y.	4. 巻 64
2. 論文標題 Development of an MSI-positive colon tumor with aberrant DNA methylation in a PPAP patient.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 journal of human genetics	6. 最初と最後の頁 729-740
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s10038-019-0611-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ohsugi T, Yamaguchi K, Zhu C, Ikenoue T, Takane K, Shinozaki M, Tsurita G, Yano H, Furukawa Y.	4. 巻 38
2. 論文標題 Anti-apoptotic effect by the suppression of IRF1 as a downstream of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in colorectal cancer cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 6051-6064
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41388-019-0856-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takane K, Fukuyo M, Matsusaka K, Ota S, Rahmutulla B, Matsushita K, Miyauchi H, Nakatani Y, Matsubara H, Kaneda A.	4. 巻 9
2. 論文標題 The frequency of promoter DNA hypermethylation is decreased in colorectal neoplasms of familial adenomatous polyposis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 32653-32666
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.25987	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 Matsuura M, Yamaguchi K, Tamate M, Satohisa S, Teramoto M, Iwasaki M, Sugita S, Hasegawa T, Koubo R, Takane K, Ikenoue T, Furukawa Y, Saito T.	4. 巻 109
2. 論文標題 Efficacy of liquid-based genetic diagnosis of endometrial cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4025-4032
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.13819	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 Hasegawa N, Oshima M, Sashida G, Matsui H, Koide S, Saraya A, Wang C, Muto T, Takane K, Kaneda A, Shimoda K, Nakaseko C, Yokote K, Iwama A.	4. 巻 31
2. 論文標題 Impact of combinatorial dysfunctions of Tet2 and Ezh2 on the epigenome in the pathogenesis of myelodysplastic syndrome	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 861-871
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/leu.2016.268	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takane K, Akagi K, Fukuyo M, Yagi K, Takayama T, Kaneda A.	4. 巻 6
2. 論文標題 DNA methylation epigenotype and clinical features of NRAS-mutation(+) colorectal cancer	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 1023-1035
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.1061	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 Nakagawa T, Matsusaka K, Misawa K, Ota S, Takane K, Fukuyo M, Rahmutulla B, Shinohara KI, Kunii N, Sakurai D, Hanazawa T, Matsubara H, Nakatani Y, Okamoto Y, Kaneda A.	4. 巻 497
2. 論文標題 Frequent promoter hypermethylation associated with human papillomavirus infection in pharyngeal cancer	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Letter	6. 最初と最後の頁 21-31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2017.08.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件(うち招待講演 0件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 高根 希世子, 山口 貴世志, 池上 恒雄, 藤幸 知子, 米田 美佐子, 甲斐 知恵子, 古川 洋一
2. 発表標題 PVRL4, a receptor of measles virus in cancer cells, is regulated by BACH1.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 劉 洵, 池上 恒雄, 寺門 侑美, 高根 希世子, 山口 喜世志, 古川 洋一
2. 発表標題 Analysis of intracellular signaling in murine intrahepatic cholangiocarcinoma induced by Kras activation and Pten loss
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kiyoko Takane, Masaki Fukuyo, Keisuke Matsusaka, Satoshi Ota, Bahityar Rahmutulla, Kazuyuki Matsushita, Hideaki Miyauchi, Yukio Nakatani, Hisahiro Matsubara, Atsushi Kaneda.
2. 発表標題 The frequency of promoter DNA hypermethylation is decreased in colorectal neoplasms of familial adenomatous polyposis.
3. 学会等名 FAP研究会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kiyoko Takane, Masaki Fukuyo, Keisuke Matsusaka, Satoshi Ota, Bahityar Rahmutulla, Kazuyuki Matsushita, Hideaki Miyauchi, Yukio Nakatani, Hisahiro Matsubara, Atsushi Kaneda.
2. 発表標題 The frequency of promoter DNA hypermethylation is decreased in colorectal neoplasms of familial adenomatous polyposis.
3. 学会等名 The 77th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高根希世子、福世真樹、松坂恵介、太田聡、バハテヤリ・ラヒムトラ、松下一之、宮内英聡、中谷行雄、松原久裕、金田篤志
2. 発表標題 家族性大腸腺腫症の大腸腫瘍におけるプロモーターメチル化頻度の減少
3. 学会等名 第29回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kiyoko Takane, Keisuke Matsusaka, Satoshi Ota, Masaki Fukuyo, Yao Yue, Motoi Nishimura, Eiji Sakai, Kazuyuki Matsushita, Hideaki Miyauchi, Hiroyuki Aburatani, Yukio Nakatani, Tadatashi Takayama, Hisahiro Matsubara, Kiwamu Akagi, Atsushi Kaneda
2. 発表標題 Two subtypes with distinct molecular features in colorectal tumor of familial adenomatous polyposis
3. 学会等名 第76回日本学会学術総会（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takuya Nakagawa, Keisuke Matsusaka, Kiyoshi Misawa, Kiyoko Takane, Masaki Fukuyo, Satoshi Ota, Bahityar Rahmutulla, Naoki Kunii, Daiju Sakurai, Toyoyuki Hanazawa, Yukio Nakatani, Yoshitaka Okamoto, Atsushi Kaneda
2. 発表標題 Correlation between gene promoter hypermethylation and prognosis in pharyngeal cancer
3. 学会等名 第76回日本学会学術総会（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yosuke Yamamoto, Keisuke Matsusaka, Kiyoko Takane, Masaki Fukuyo, Satoshi Ota, Hiroyuki Matsue, Atsushi Kaneda
2. 発表標題 Genetic and epigenetic alteration in malignant melanoma
3. 学会等名 第76回日本学会学術総会（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kiyoko Takane, Keisuke Matsusaka, Satoshi Ota, Masaki Fukuyo, Yao Yue, Motoi Nishimura, Eiji Sakai, Kazuyuki Matsushita, Hideaki Miyauchi, Hiroyuki Aburatani, Yukio Nakatani, Tadatashi Takayama, Hisahiro Matsubara, Kiwamu Akagi, Atsushi Kaneda
2. 発表標題 Two subtypes with distinct molecular features in colorectal tumor of familial adenomatous polyposis
3. 学会等名 第28回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 牛島俊和, 眞貝洋一, 塩見春彦	4. 発行年 2017年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 398
3. 書名 エピジェネティクス実験スタンダード もう悩まない! ゲノム機能制御の読み解き方	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----