

令和 2 年 5 月 6 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15109

研究課題名（和文）鋸歯状病変由来大腸癌の発生過程におけるWNT関連遺伝子異常の解析

研究課題名（英文）Analysis of WNT pathway gene alteration in colorectal serrated lesions

研究代表者

橋本 大輝（Hashimoto, Taiki）

国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・医員

研究者番号：40773875

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：HPやSSA/Pを伴うTSAをレーザーマイクロダイセクションやISH法を用いて各々の成分について分子異常を解析し、BRAF/KRAS変異は、全病変において両成分に共通して認められるのに対し、WNT経路遺伝子異常は、多くの症例でTSA成分にのみ認められることを示した。また、99例のTSAを解析し、既知のPTPRK-RSP03融合に加えてEIF3E-RSP02融合、PIEZ01-RSP02融合を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、大腸癌の前駆病変と考えられている鋸歯状病変について、分子病理学的解析を行ったものである。本研究の結果、鋸歯状病変の形態変化と遺伝子異常の関係性が明らかになり大腸癌の発生メカニズムの理解が深まった。本成果は大腸癌に対する治療選択や前癌病変に対する適切なサーベイランスの立案に貢献するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：We analyzed precursor polyp-associated TSAs by laser microdissection-based sequencing analysis and RNA in situ hybridization. Our analysis showed that BRAF or KRAS mutations were always shared between TSA and precursor components. However, WNT pathway gene alterations were restricted to the TSA component in most lesions.

We analyzed 99 TSAs and identified three lesions with EIF3E-RSP02 fusion, which is a known recurrent RSP0 fusion in colorectal cancer, and one with novel PIEZ01-RSP02 fusion.

研究分野：大腸鋸歯状病変

キーワード：大腸癌 鋸歯状病変 WNT

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

散発性大腸癌の発生には、conventional pathway (古典的経路) と serrated pathway (鋸歯状経路) という2つの異なる発生経路が存在する。古典的経路は、初期に APC 変異を獲得し管状腺腫や管状絨毛腺腫を経て大腸癌に進展する経路で、比較的早くからその分子メカニズムが解明されてきた。鋸歯状経路は、初期に BRAF あるいは KRAS 変異を獲得し鋸歯状病変を経て大腸癌に進展する経路で、さらにマイクロサテライト不安定性 (microsatellite instability, MSI) 陽性大腸癌に至る経路とマイクロサテライト不安定性のない (microsatellite stable, MSS) 大腸癌に至る経路に二分される。これまで我々は様々な鋸歯状病変の分子病理学的解析を行い、それぞれの病変の遺伝子異常を明らかにし、鋸歯状病変由来大腸癌の発生モデルを提唱してきた (図1)。しかしながら、hyperplastic polyp (HP) や sessile serrated adenoma/polyp (SSA/P) から traditional serrated adenoma (TSA) を経て癌化する経路や、SSA/P から MSS 大腸癌への進展経路には未だ不明な点が多い。鋸歯状病変由来と考えられる、BRAF 変異型 MSS 大腸癌は著しく予後不良であることが知られており (Lochhead P. *J Natl Cancer Inst.* 2013, Sinicrope FA. *Gastroenterology.* 2015) 病態解明が切に望まれている。

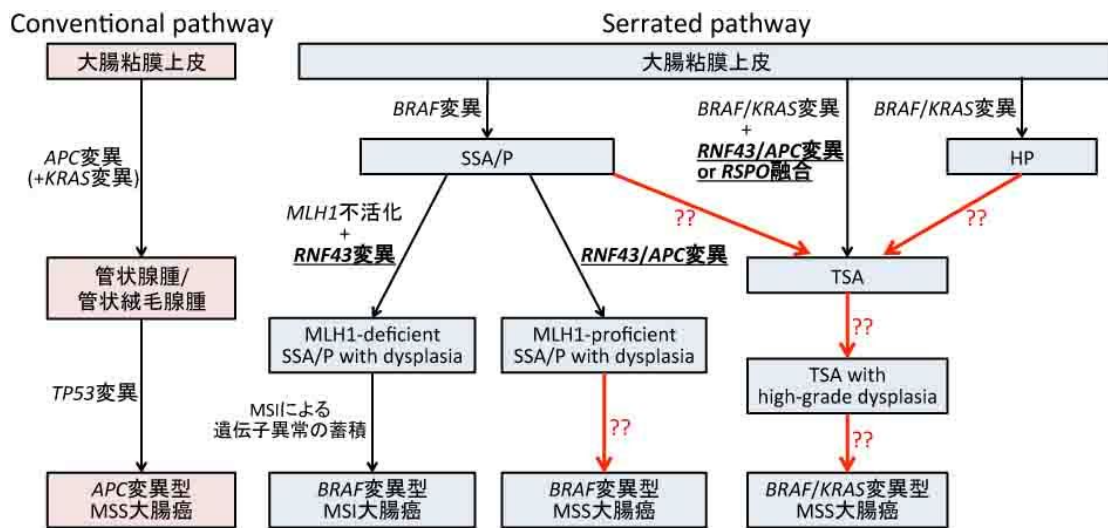


図1 散発性大腸癌の発生経路

太字: 申請者が報告した遺伝子異常、赤矢印: 進展に関わる分子異常が不明な過程

2. 研究の目的

病理検体を用いて鋸歯状病変の組織学的および分子生物学的解析を行い、鋸歯状病変から予後不良な MSS 大腸癌へと至る進展経路を明らかにする。

3. 研究の方法

内視鏡切除によって得られた大腸組織検体のホルマリン固定、パラフィン包埋標本を用い、DNA および RNA を抽出し、変異解析および発現解析を行った。変異解析は次世代シーケンサーを用いたターゲットシーケンスを行った。発現解析は RT-PCR による融合遺伝子の同定および定量 PCR による解析を行った。5'-RACE による未知の融合遺伝子の同定および ISH による mRNA の発現を解析した。また、β-catenin, MYC 等の WNT 経路に関連するタンパク質に対する免疫染色を施行した。

4. 研究成果

(1) 前駆病変から TSA への進展と WNT 経路遺伝子異常

TSA は、MAPK 経路遺伝子 (BRAF/KRAS) 変異に加え、RNF43/APC 変異ないし RSPO 融合遺伝子を高率に有する。HP や SSA/P を伴う TSA (図2) をレーザーマイクロダイセクション

やISH法を用いて各々の成分について分子異常を解析したところ、*BRAF/KRAS* 変異は、全病変において両成分に共通して認められたが、WNT経路遺伝子異常は、多くの症例でTSA成分にのみ認められた。以上より、*BRAF/KRAS* 変異はTSAの発生において最も早期に起こる異常であり、WNT経路遺伝子異常はHPやSSA/PからTSAへの進展に関与すると考えられた。

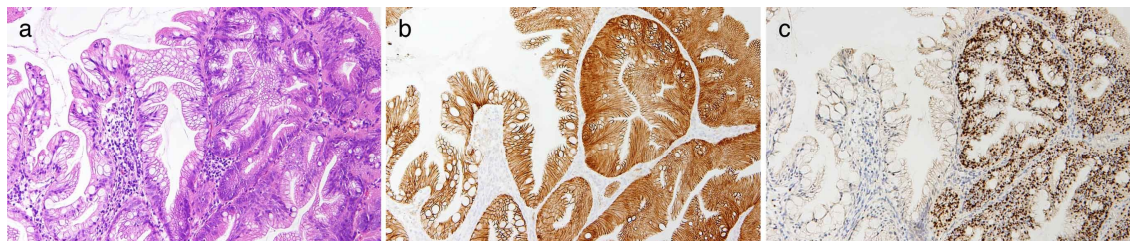


図2 HP(左)からTSA(右)への移行像

a. HE, b. β -catenin免疫染色, c. *RSPO* ISH, TSA部において、 β -cateninの核集積(b)、*RSPO*過剰発現(c)が認められる

(2) 鋸歯状腺腫における *EIF3E-RSPO2* および *PIEZO1-RSPO2* 融合遺伝子の同定

TSAの多くは *PTPRK-RSPO3* 融合遺伝子による。*PTPRK-RSPO3* 融合遺伝子はR-spondinの過剰発現を介してWNT経路の活性化を誘導するが、これまで、その他の*RSPO*融合遺伝子は一例の *NRIP1-RSPO2* を除き知られていなかった。そこでTSAにおける*RSPO*融合遺伝子の多様性を検索した。TSA99例を対象として、定量PCRにより*RSPO*の発現量を解析するとともに、*PTPRK-RSPO3*融合遺伝子を欠く*RSPO*過剰発現例を対象として、RT-PCRおよび5'-RACEによる新たな*RSPO*融合遺伝子の検索を行った。その結果、*RSPO3*の過剰発現を29例のTSAに認め、その全てが既知の*PTPRK-RSPO3*融合を有していた。さらに、*RSPO2*の過剰発現を示す4例のTSAのうち3例に *EIF3E-RSPO2* 融合、1例に *PIEZO1-RSPO2* 融合を同定した(表1)。*RSPO2*融合を有するTSAはいずれも*KRAS*変異を有し、TSAとして典型的な組織像を呈していた。上記よりTSAにおいて、既知の*PTPRK-RSPO3*融合に加えて *EIF3E-RSPO2* 融合、*PIEZO1-RSPO2* 融合を同定した。TSAは*RSPO2*融合陽性大腸癌の前駆病変でもありと考えられた。

<i>RSPO</i> fusion	病変数
<i>EIF3E-RSPO2</i>	3 (3%)
<i>PIEZO1-RSPO2</i>	1 (1%)
<i>PTPRK</i> (exon 1)- <i>RSPO3</i>	23 (23%)
<i>PTPRK</i> (exon 6)- <i>RSPO3</i>	2 (2%)
<i>PTPRK</i> (exons 6/7)- <i>RSPO3</i>	2 (2%)
<i>PTPRK</i> (exon 13)- <i>RSPO3</i>	2 (2%)

表1 同定された*RSPO*融合

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 0件）

1. 著者名 Hashimoto Taiki, Ogawa Reiko, Yoshida Hiroshi, Taniguchi Hirokazu, Kojima Motohiro, Saito Yutaka, Sekine Shigeki	4. 巻 43
2. 論文標題 Acquisition of WNT Pathway Gene Alterations Coincides With the Transition From Precursor Polyps to Traditional Serrated Adenomas	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The American Journal of Surgical Pathology	6. 最初と最後の頁 132 ~ 139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/PAS.0000000000001149	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 Hashimoto Taiki, Ogawa Reiko, Yoshida Hiroshi, Taniguchi Hirokazu, Kojima Motohiro, Saito Yutaka, Sekine Shigeki	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 EIF3E RSP02 and PIEZ01 RSP02 fusions in colorectal traditional serrated adenoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Histopathology	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/his.13867	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 橋本 大輝
2. 発表標題 大腸鋸歯状病変の分子病理学的解析
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋本 大輝、田中 優作、森 泰昌、吉田 裕、谷口 浩和、平岡 伸介、小嶋 基寛、大野 康寛、斎藤 豊、関根 茂樹
2. 発表標題 Superficially serrated adenoma : 大腸鋸歯状病変の新たなサブタイプの提案
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋本 大輝、小川 玲子、吉田 裕、谷口 浩和、小嶋 基寛、斎藤 豊、関根 茂樹
2. 発表標題 鋸歯状腺腫におけるEIF3E-RSP02およびPIEZ01-RSP02融合遺伝子の同定
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020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