

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15796

研究課題名(和文)大腸Serrated neoplasia pathwayにおける網羅的遺伝子解析

研究課題名(英文)Comprehensive genetic analysis of the colorectal serrated neoplasia pathway

研究代表者

村上 敬 (Murakami, Takashi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：10568158

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)：免疫組織学的にMLH1発現低下は5病変に認め、 β -catenin核内発現は全例に認められた。粘液形質発現に関して7病変が胃腸混合型で、残り1病変が大腸型であった。NGS解析ではBRAF変異(7病変)を認め、その他FBXW7(3病変)、TP53(2病変)の変異を認めた。さらに、MSI解析では8病変中4病変がMSI-highであり、残りの4病変はMSSであった。興味深いことにMSI-highの4病変はすべてMLH1発現低下を示し、うち3病変がFBXW7変異を有していたが、TP53変異は1病変も認めなかった。他方、MSSの4病変中2病変はTP53変異を有していたが、FBXW7変異は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

serrated neoplasia pathwayはその発育進展にBRAF変異、Wnt/ β -cateninシグナルの活性化、胃腸混合型粘液形質が関与すると考えられた。さらにserrated neoplasia pathwayはMSI大腸癌へと進展する経路のみならずMSS大腸癌へと進展する2つの経路が存在し、前者ではMLH1発現低下やFBXW7変異、後者ではTP53変異が関与するなど異なる分子生物学的特徴を有する可能性が示唆された。BRAF変異MSS大腸癌は組織学的に悪性度の高い病変として知られており、serrated neoplasia pathwayのさらなる解析が望まれる。

研究成果の概要(英文)：Lost MLH1 expression was found in 5 cases. All lesions studied were positive for nuclear β -catenin expression. Regarding phenotypic mucin expression, all lesions were positive for MUC2, but negative for CD10. MUC5AC and MUC6 positivity was observed in 7 cases. Genetically, the most frequently mutated gene was BRAF (7 cases), and other mutations were detected in FBXW7 (3 cases); TP53 (2 cases), and KIT, PTEN, SMAD4, and SMARCB1 (1 case each). Furthermore, 4 of 8 lesions were MSI-high and the remaining 4 lesions were microsatellite-stable (MSS). Interestingly, all 4 MSI-high lesions displayed MLH1 loss, 3 of which harbored a FBXW7 mutation, but not a TP53 mutation. However, 2 MSS lesions harbored a TP53 mutation, although none harbored a FBXW7 mutation.

研究分野：大腸鋸歯状病変

キーワード：serrated pathway 大腸鋸歯状病変 大腸癌発育進展 serrated lesion sessile serrated lesion

1. 研究開始当初の背景

かつて過形成性ポリープは非腫瘍であり治療の対象にならないと考えられていたが、**1996**年に **Torlakovic** らは過形成性ポリープの中に癌を併発する亜型が存在することを報告した。現在、**World Health Organization (WHO)** 分類では癌化のポテンシャルを有する病変として、この病変を **sessile serrated adenoma/polyp (SSA/P)** (新 WHO 基準では **sessile serrated lesion (SSL)**) と定義し、鋸歯状病変の中でも過形成性ポリープとは別に分類している。分子生物学的には、**SSL** は **BRAF** 遺伝子変異、**MLH1** などミスマッチ修復遺伝子のメチル化、**CpG island methylator phenotype (CIMP)** などの特徴を有し、高度の **microsatellite instability** を示す大腸癌へと進行する **serrated neoplasia pathway** の前駆病変と考えられている。これは、**APC**、**KRAS**、**TP53** などの遺伝子異常が多段階的に積重することにより発生する **conventional adenoma-carcinoma sequence** とは異なる特徴を有し、新たな大腸発癌経路として近年注目を浴びている。研究代表者は、これまで **serrated neoplasia pathway** と **conventional adenoma-carcinoma sequence** における **Wnt/ -catenin** シグナル経路の活性化の違いについて報告し、後者では **APC** 遺伝子や **CTNNB1** 遺伝子の変異に伴う同シグナルの活性化が指摘されていたが、前者では遺伝子変異によるものではなく **Wnt/ -catenin** シグナル関連因子である **AXIN2**、**MCC**、**SFRP4** 遺伝子のメチル化に起因することを明らかにした。

また近年、次世代シーケンサー (**Next Generation Sequencer: NGS**) の開発により様々な病変の遺伝子変異を網羅的に解析することが可能となった。通常型大腸癌ではこれまで **APC**、**TP53**、**KRAS**、**PIK3CA**、**SMAD4**、**FAM123B**、**FBXW7**、**CTNNB1**、**NRAS** などの遺伝子変異が報告されている [**Brannon et al. Genome Biol. 2014**]。これまで **Serrated neoplasia pathway** において **NGS** により網羅的に遺伝子変異を解析した報告はなく、本研究は **Serrated neoplasia pathway** の分子遺伝学的機序を解明する上で非常に意義深いものとする。

2. 研究の目的

Serrated neoplasia pathway において **NGS** を用いて遺伝子を網羅的に解析し、その分子遺伝学的特徴を明らかにするとともに、その分子遺伝学的特徴と **Wnt/ -catenin** シグナル経路の関係を解明することである。

3. 研究の方法

2014年～**2016**年に当院にて病理学的に **SSL** 併存早期大腸癌と診断された **8** 病変 (**Tis** 癌 **4** 例と **T1** 癌 **4** 例を含む) を対象とし、**-catenin**、**MLH1** および粘液形質 (**MUC2**、**MUC5AC**、**MUC6** と **CD10**) の免疫染色、**NGS**、**MSI** 解析を施行した。

Table 1 Summary of clinicopathological features in each case of sessile serrated adenoma/polyp (SSA/P) with dysplasia and invasive adenocarcinoma

Case No.	Age	Sex	Location	Macroscopic type	Size (mm)	Histological type	Depth of invasion (μm)	Mucinous component	Lymphatic invasion	Vascular invasion	Lymph node metastasis	Removal method
1	67	F	A	Sessile	10	HGD	Mucosa	-	-	-	-	EMR
2	69	M	S	Semipedunculated	10	HGD	Mucosa	-	-	-	-	EMR
3	79	F	C	Sessile	14	HGD	Mucosa	-	-	-	-	EMR
4	61	F	A	Sessile	18	HGD	Mucosa	-	-	-	-	ESD
5	61	M	D	Sessile	31	Well-ACA	Submucosa (400)	-	-	-	-	ESD + OPE
6	75	F	A	Sessile	15	Well-ACA	Submucosa (1100)	-	-	-	-	EMR + OPE
7	73	F	A	Sessile	25	Mod-ACA	Submucosa (2000)	-	+	-	+	OPE
8	65	F	T	Sessile	19	Mod-ACA	Submucosa (4000)	+	-	-	-	OPE

M Male, F Female, C Cecum, A Ascending colon, T Transverse colon, D Descending colon, S Sigmoid colon, HGD High-grade dysplasia, Well-ACA Well-differentiated adenocarcinoma, Mod-ACA Moderately-differentiated adenocarcinoma, EMR Endoscopic mucosal resection, ESD Endoscopic submucosal dissection, OPE Operation, + present; - absent

4. 研究成果

免疫組織学的に **MLH1** 発現低下は 5 病変に認められた。また **-catenin** 核内発現は 8 病変全例に認められた。粘液形質発現に関して 7 病変が胃腸混合型で、残り 1 病変が大腸型であった。NGS 解析で最も高頻度に認めた遺伝子変異は **BRAF** (7 病変) であり、その他 **FBXW7** (3 病変)、**TP53** (2 病変)、**KIT**、**PTEN**、**SMAD4**、**SMARCB1** (各 1 病変) であった。さらに、MSI 解析では 8 病変中 4 病変が **MSI-high** であり、残りの 4 病変は **MSS** であった。興味深いことに **MSI-high** の 4 病変はすべて **MLH1** 発現低下を示し、うち 3 病変が **FBXW7** 変異を有していたが、**TP53** 変異は 1 病変も認めなかった。他方、**MSS** の 4 病変中 2 病変は **TP53** 変異を有していたが、**FBXW7** 変異は認めなかった。

Table 2 Summary of molecular biological features in each case of sessile serrated adenoma/polyp (SSA/P) with dysplasia and invasive adenocarcinoma

Case No.	Group	Immunohistochemistry							Next generation sequencing analysis (Gene mutations)							MSI analysis
		MLH1 loss	β-catenin	MUC2	MUC5AC	MUC6	CD10	BRAF	FBXW7	KIT	PTEN	SMAD4	SMARCB1	TP53		
1	Dysplasia	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	MSS
2	Dysplasia	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	MSI-high
3	Dysplasia	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	MSI-high
4	Dysplasia	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	MSS
5	Carcinoma	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	MSS
6	Carcinoma	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	MSS
7	Carcinoma	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	MSI-high
8	Carcinoma	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	MSI-high

Dysplasia, SSA/P with high-grade dysplasia; Carcinoma, SSA/P with submucosal carcinoma; MSI-high, Microsatellite instability-high; MSS, Microsatellite-stable; +, present; -, absent

serrated neoplasia pathway はその発育進展に **BRAF** 変異、**Wnt/ -catenin** シグナルの活性化、胃腸混合型粘液形質が関与すると考えられた。さらに **serrated neoplasia pathway** は **MSI** 大腸癌へと進展する経路のみならず **MSS** 大腸癌へと進展する 2 つの経路が存在し、前者では **MLH1** 発現低下や **FBXW7** 変異、後者では **TP53** 変異が関与するなど異なる分子生物学的特徴を有する可能性が示唆された。**BRAF** 変異 **MSS** 大腸癌は組織学的に悪性度の高い病変として知られており、**serrated neoplasia pathway** のさらなる解析が望まれる。

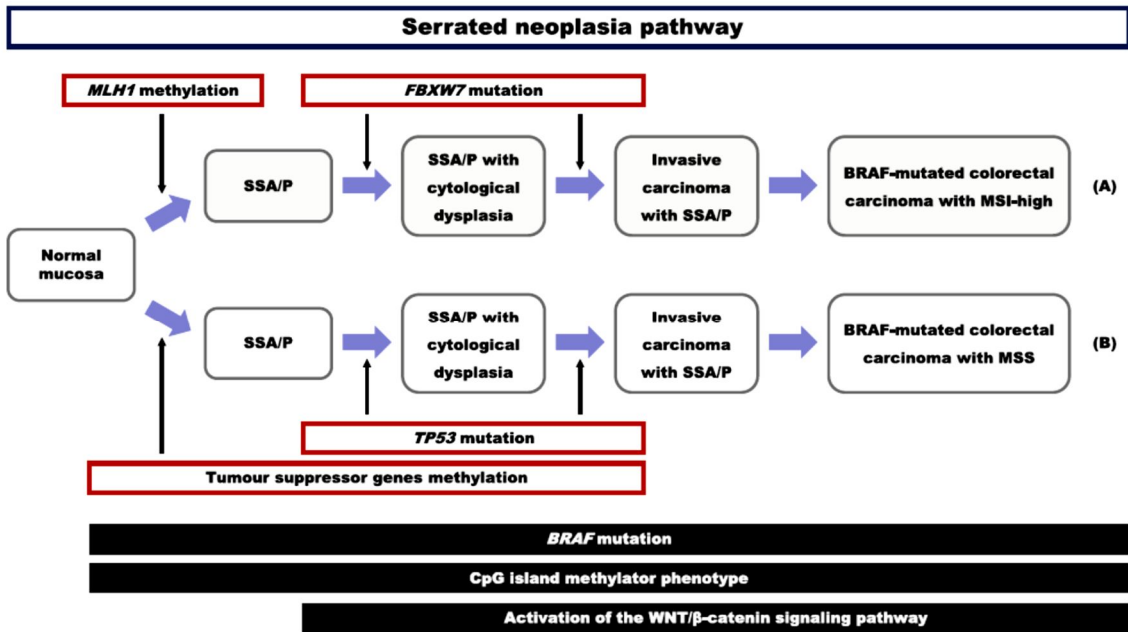


Fig. 4 Schematic representation of differences in the molecular biological expressions and genetic alterations in the serrated neoplasia pathway. Sessile serrated adenoma/polyp (SSA/P) is an early precursor lesion in the serrated neoplasia pathway that progresses to cytological dysplasia and results in *BRAF*-mutated colorectal carcinomas that are commonly high levels of microsatellite instability (MSI-high) (diagram A) or microsatellite-stable (MSS) (diagram B). Both pathways are associated with a CpG island methylator phenotype and WNT/ β -catenin signaling activation. **a** The upper arm, driven by *BRAF* mutation and *MLH1* methylation, indicates progression to *BRAF*-mutated MSI-high carcinoma. *FBXW7* mutations are potentially involved in progression of this pathway. **b** The lower arm, driven by *BRAF* mutation and methylation of unspecified tumor-suppressor genes, involves progression to *BRAF*-mutated MSS carcinoma. *TP53* mutations are potentially involved in progression of this pathway

上記成果を、英文誌に報告した(**Murakami T, et al. Diagnostic Pathology. 2018; 13: 88**)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Murakami Takashi, Akazawa Yoichi, Yatagai Noboru, Hiromoto Takafumi, Sasahara Noriko, Saito Tsuyoshi, Sakamoto Naoto, Nagahara Akihito, Yao Takashi	4. 巻 13
2. 論文標題 Molecular characterization of sessile serrated adenoma/polyps with dysplasia/carcinoma based on immunohistochemistry, next-generation sequencing, and microsatellite instability testing: a case series study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Diagnostic Pathology	6. 最初と最後の頁 1~10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13000-018-0771-3	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 村上 敬、赤澤 陽一、谷田貝 昂、田島 譲、立之 英明、齋藤 剛、坂本 直人、八尾 隆史、永原 章仁
2. 発表標題 免疫組織化学、次世代シーケンシング、MSI解析に基づくSSA/P併存早期大腸癌の分子生物学的特徴
3. 学会等名 日本消化器内視鏡学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村上 敬、赤澤 陽一、谷田貝 昂、田島 譲、立之 英明、齋藤 剛、坂本 直人、八尾 隆史、永原 章仁
2. 発表標題 免疫組織化学、次世代シーケンシング、MSI解析に基づくSSA/P併存早期大腸癌の分子生物学的特徴
3. 学会等名 第97回日本消化器内視鏡学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村上 敬、赤澤 陽一、谷田貝 昂、田島 譲、立之 英明、齋藤 剛、坂本 直人、八尾 隆史、永原 章仁
2. 発表標題 免疫組織化学、次世代シーケンシング、MSI解析に基づくSSA/P併存早期大腸癌の分子生物学的特徴
3. 学会等名 第97回日本消化器内視鏡学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Murakami, Yoichi Akazawa, Tsuyoshi Saito, Tomoyoshi Shibuya, Naoto Sakamoto, Akihito Nagahara, Takashi Yao
2. 発表標題 Molecular biological characteristics of colorectal sessile serrated adenoma/polyp with dysplasia or invasive carcinoma
3. 学会等名 Digestive Disease Week 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------