

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07419

研究課題名（和文）早期大腸癌の簇出細胞に特有の後発遺伝子変異の同定

研究課題名（英文）Identification of characteristic gene mutations in tumor budding foci in early colorectal cancers

研究代表者

立石 陽子（TATEISHI, YOKO）

横浜市立大学・医学研究科・客員講師

研究者番号：20644438

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、早期大腸癌の高悪性度成分と考えられる、浸潤部における簇出、低分化胞巣の形態を示す腫瘍細胞の遺伝子変異を明らかにすることである。リンパ節転移を有し、浸潤部に簇出が目立つ大腸癌2症例の凍結検体を用いて、正常粘膜、腫瘍、浸潤先進部の簇出・低分化胞巣をレーザーマイクロダイセクションで切り分け、DNAを抽出し次世代シーケンサーによる全エクソムの網羅的遺伝子変異検索を行った。2症例に共通する簇出・低分化細胞巣成分に特有の変異としてmissense variant 122個、Nonsense variant 1個、insertion/deletion33個が同定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

早期大腸癌の先進浸潤部における個細胞性の腫瘍成分すなわち簇出の有無がリンパ節転移のリスク因子となることは、既に多くの報告がある。簇出はEMTを反映する形態学的特徴とされているが、簇出を示す腫瘍細胞に生じている遺伝子変異については未だ同定されていない。本研究課題は、簇出という組織形態を手掛かりとして早期大腸癌における高悪性度成分に特有の遺伝子変異の同定を試みるという個性的且つ先進的な研究である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the differences in DNA mutation profiles between intramucosal cancer tissue and tumor budding/poorly differentiated foci tissue in colon cancer. This study collected the frozen sections of intramucosal cancer tissues, tumor budding/poorly differentiated foci tissue, and matched paracancerous normal tissues separated by laser microdissection to extract DNA of two colon cancer patients and performed whole-exome sequencing. We identified one nonsense variant, 122 missense variants, 33 insertion/deletion in tumor budding/poorly differentiated foci tissue of both two cases.

研究分野：消化管病理

キーワード：大腸癌 簇出 マイクロダイセクション 次世代シーケンサー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1)本研究の目的は、早期大腸癌の高悪性度成分と考えられる、浸潤部における簇出、低分化胞巣の形態を示す腫瘍細胞の遺伝子変異を明らかにすることである。大腸癌はひとつの腫瘍内でも多彩な組織像を示し、腺腫など前癌病変を背景として、粘膜内癌から粘膜下層に浸潤し、浸潤先進部では低分化な腫瘍胞巣や簇出が認められることが多い。浸潤先進部の低分化胞巣や簇出は、大腸癌のリンパ節転移のリスク因子として古くから知られている(Ueno H, et al. 2004 Gastroenterol., Tateishi Y, et al. 2010 Mod Pathol, Kawachi H, et al. 2015 Mod Pathol)。我々は、病理組織標本の“簇出・低分化胞巣”という形態学的特徴に着目し、その分子基盤に迫るべく研究計画を立てた。

(2)大腸癌の分子異常は体細胞コピー数変化による Chromosomal instability (CIN)型とミスマッチ修復遺伝子の異常を特徴とする microsatellite instability (MSI)型に大別され、CIN型は大腸癌全体の85%、MSI型は15%を占める(WHO)。CIN型は大腸癌発生の腺腫癌関連経路に、MSI型は鋸歯状病変経路に大まかに対応し、MSI型は右半結腸に多いことが知られている。本研究では、大腸癌の多くを占める古典的経路のCIN型病変を対象とした。

2. 研究の目的

大腸癌の浸潤先進部の低分化胞巣を浸潤先進部の簇出・低分化胞巣成分に特有の候補遺伝子変異の同定を試みる。

3. 研究の方法

横浜市立大学附属病院において外科切除された大腸癌症例から、左半結腸に局在する大腸癌で、リンパ節転移を有し、浸潤部に簇出が目立つ2症例の凍結検体を用いて、正常粘膜、腫瘍、浸潤先進部の簇出・低分化胞巣をレーザーマイクロダイセクションで切り分け、DNAを抽出した。このDNAを用いて次世代シーケンサーによる全エクソンの網羅的遺伝子変異検索を行い、浸潤先進部の簇出・低分化胞巣成分に特有の候補遺伝子変異を同定した。

図1: 大腸癌における正常粘膜、腫瘍、浸潤先進部の同定の実際

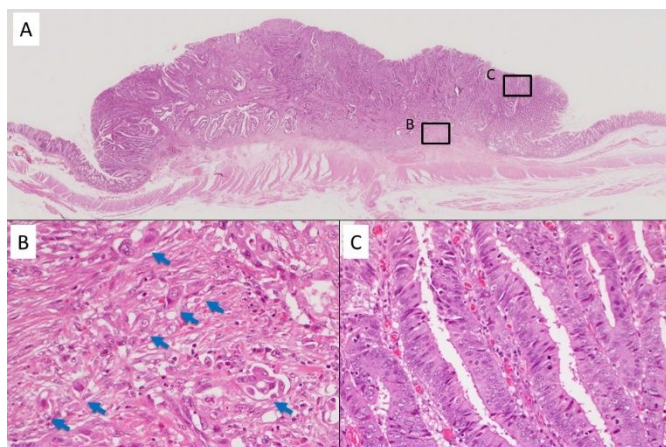
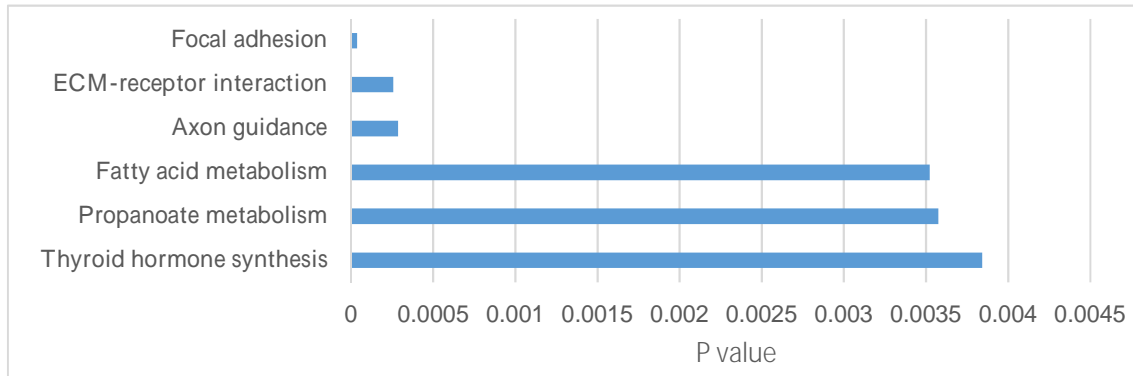


Figure 1. (A) 粘膜下層までの浸潤に留まる早期大腸癌の外科切除材料。(B) 腫瘍浸潤先進部における簇出成分が多くみられる領域。(C) 高分化管状腺癌からなる非簇出成分の領域。

4. 研究成果

リンパ節転移を有する左側結腸癌2症例から非腫瘍粘膜成分、腫瘍成分、浸潤先進部の簇出・低分化細胞巢成分を単離し、次世代シーケンサーを用いた全エクソームの比較解析を行った。2症例に共通する簇出・低分化細胞巢成分に特有の変異としてmissense variant 122個、Nonsense variant 1個、insertion/deletion33個が同定された。その中には細胞接着など、がんの進展に関わる重要な遺伝子が多く含まれていた(図2)。

図2. 左半結腸大腸癌の簇出・低分化細胞巢成分に特異的な変異遺伝子のKEGG pathway 解析結果



細胞接着に寄与するFocal adhesion ($p=0.000038$) やECM-receptor interaction ($p=0.0002$) に関係する遺伝子変異が有意に多く認められた。

今回抽出された Focal adhesion および ECM-receptor interaction に関与する遺伝子のうち、ITGB1 は細胞表面受容体 Integrin のサブユニットをコードしており、発癌や浸潤、血管新生に関与する。臨床検体の FFPE を用いた検討では大腸癌の肝転移巣において ITGB1 が高発現し、予後不良であることが報告されている(Qi-Zhi Liu, et al. 2015 Int J Clin Exp Pathol)。大腸癌の細胞株を用いた研究では in vitro で ITGB1 をサイレンシングすると細胞遊走と細胞浸潤が阻害されることが報告されている(W.-B. Wan et al. 2019 Eur Rev Med Pharmacol Sci)。今回の我々の研究結果から、大腸癌が浸潤する際に転移能を有する高悪性度な簇出・低分化細胞巢へと形態が変化する際に ITGB1 の変異が起きていると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	奥寺 康司 (Okudera Koji) (10326027)	横浜市立大学・医学部・准教授 (22701)	
研究分担者	松村 舞依 (Matsumura Mai) (50812997)	横浜市立大学・医学部・助教 (22701)	
研究分担者	稲山 嘉明 (Inayama Yoshiaki) (10184730)	横浜市立大学・附属市民総合医療センター・教授 (22701)	
研究分担者	大橋 健一 (Ohashi Kenichi) (40231203)	横浜市立大学・医学研究科・客員教授 (22701)	

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