

令和 4 年 4 月 27 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08463

研究課題名(和文) 表在性非乳頭部十二指腸腫瘍の発癌機構の解明と、進展を予測する内視鏡診断体系の確立

研究課題名(英文) Integrated genetic and epigenetic analysis of cancer-related genes in non-ampullary duodenal adenomas and intramucosal adenocarcinomas

研究代表者

澤田 武 (SAWADA, Takeshi)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員

研究者番号：60345626

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)：十二指腸癌は希少癌であり、発癌の分子機構も未解明である。その解明のため、前癌病変である非乳頭部十二指腸腺腫・粘膜内癌について、ゲノム・エピゲノムの統合解析を行った。粘液形質発現によって胃型腫瘍と小腸型腫瘍に分類すると、両者は臨床病理学的、分子学的に異なっており、独立した2つの発癌経路の存在が示唆された。また、小腸型腺腫・粘膜内癌におけるAPC変異の頻度は57%と高く、従来小腸癌で報告された頻度より高かった。よって、小腸型形質をもつ十二指腸発癌において腺腫の一部しか進行癌に進展しない、つまりadenoma-carcinoma sequenceによる多段階発癌の関与は限定的であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

十二指腸腺腫は希少癌であり、発癌機序は十分解明されていない。特に、その前癌病変である十二指腸腺腫・粘膜内癌の分子学的解析はほとんどなされてこなかった。我々は初めて100以上の前癌病変について75遺伝子の変異解析を行った。結果、非乳頭部十二指腸腫瘍の発癌経路は複数あることを解明した。また、小腸型形質を示す非乳頭部十二指腸発癌においてadenoma-carcinoma sequenceの関与は限定的であることが示唆された。このように本研究は、稀ではあるが近年注目を集めるようになってきた非乳頭部十二指腸発癌の分子学的機序の一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Because non-ampullary duodenal adenocarcinomas are rare, their molecular and clinical characteristics are not fully understood. To clarify these characteristics, we performed genetic and epigenetic analysis of cancer-related genes in premalignant lesions including non-ampullary duodenal adenomas and intramucosal adenocarcinomas. When these lesions are divided into small intestinal and gastric type tumors, there were significant differences in the clinicopathological and molecular variables between two types of tumors, suggesting the presence of at least two separate carcinogenic pathways in non-ampullary duodenal adenocarcinomas. In addition, the higher than previously reported frequency of APC gene mutations in small bowel adenocarcinomas may indicate the adenoma-carcinoma sequence has only limited involvement in duodenal carcinogenesis.

研究分野：消化器癌

キーワード：十二指腸腫瘍 十二指腸腺腫 小腸癌 遺伝子変異 DNAメチル化

### 1. 研究開始当初の背景

十二指腸癌の年齢調整発生率は0.37人/10万人であり、希少癌に該当する。そのため発癌機序は十分解明されておらず、特に、その前癌病変である十二指腸腺腫・粘膜内癌の分子学的解析はほとんどなされてこなかった。十二指腸腺腫は、大腸癌の発生と同様に adenoma-carcinoma sequence を経て腺癌に進行すると考えられているが、分子遺伝学的な確証は得られていない。

十二指腸進行癌のエピゲノム解析では、メチル化プロファイルは胆道癌や乳頭部癌と異なる、またゲノムワイドなDNAメチル化である CpG island methylator phenotype (CIMP) 陽性かつ *MLHI* 遺伝子メチル化陰性の十二指腸癌は予後不良であることが報告されてきた。前癌病変に関しては、非乳頭部腺腫と乳頭部腺腫の計54例を合わせて解析した報告が唯一のものであり、多数例での検討は行われていない (Sun L, et al. *Epigenetics* 9:738-746, 2014)。

一方、小腸腺癌の変異解析に関しては、317病変について236もしくは315の癌関連遺伝子の解析を行った研究が最も大規模なものである (Schrock AB, et al. *JAMA Oncol* 3:1546-53, 2017)。しかし、前癌病変と考えられている十二指腸腺腫の検討は少数例において行われているのみであり (Kojima Y, et al. *Surg Today* 48:765-772, 2018)、多数例による詳細な検討が待たれていた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、非乳頭部十二指腸腺癌の分子学的発癌機序を明らかにすることである。そのために、前癌病変と考えられている非乳頭部十二指腸腺腫、粘膜内癌について、従来報告がなかった規模でDNAメチル化と遺伝子変異・コピー数変化の統合解析を行った (Ota R, Sawada T, et al. *J Pathol* 252:330-342, 2020)。

### 3. 研究の方法

本研究では、非乳頭部十二指腸腺腫92病変および粘膜内癌15病変の前癌病変合計107病変を対象とした。粘液形質 (CD10, MUC2, MUC5AC, MUC6) の免疫組織化学を行い、計107病変を小腸型腫瘍100病変 (小腸型腺腫90病変、小腸型粘膜内癌10病変)、胃型腫瘍7病変 (幽門腺腫2病変、胃型粘膜内癌5病変) に分類した。

ホルマリン固定パラフィン包埋切片からDNAを抽出し、パイロシーケンス法を用いてCIMPのマーカー遺伝子 (*CACNAG1*, *IGF2*, *NEUROG1*, *RUNX3*, *SOC3*) と *MLHI* 遺伝子メチル化の解析を行った。15%以上のメチル化をメチル化陽性とし、2マーカー以上陽性でCIMP陽性、3マーカー以上陽性で高度CIMP陽性と判定した。また、102検体において、次世代シーケンス法を用いて75癌関連遺伝子の変異解析を行った。

さらに、β-カテニンとミスマッチ修復蛋白 (MLH1, MSH2) の免疫組織化学を行った。

### 4. 研究成果

症例の平均年齢は64歳であり、男女比は3:1であった。粘液形質により小腸型腫瘍と胃型腫瘍に分類し、臨床病理学的特徴を比較すると、胃型腫瘍は高齢者の十二指腸球部に多く、形態学的に隆起型が多かった。一方、小腸型腫瘍は下行部～横行部に多く、表面型が多かった。

メチル化解析では、106病変中25病変 (24%、小腸型腫瘍22病変と胃型腫瘍3病変) がCIMP陽性であり、7病変 (7%、全て小腸型腫瘍) が高度CIMP陽性であった。CIMP陽性病変は腺腫 (21%) と比較して粘膜内癌 (40%) で高頻度であった (表)。

表. 非乳頭部十二指腸腫瘍の各組織型における分子学的特徴とβ-カテニン蛋白発現

Histology	Total	SLA	SHA	SCA	PGA	GCA	P value
		Small intestinal type			Gastric type		(small intestinal type versus gastric type)
Gene mutation (n)	102	32	58	5	2	5	
APC mutation, n (%)	56 (55%)	17 (53%)	34 (59%)	3 (60%)	1 (50%)	1 (20%)	0.24
BRAF mutation, n (%)	5 (5%)	2 (6%)	2 (3%)	1 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	> 0.9999
KRAS mutation, n (%)	13 (13%)	1 (3%)	4 (7%)	2 (40%)	2 (100%)	4 (80%)	< 0.0001
GNAS mutation, n (%)	8 (8%)	0 (0%)	1 (2%)	1 (20%)	1 (50%)	5 (100%)	< 0.0001
Epigenetic alteration (n)	107	32	58	10	2	5	
CIMP*, n (%)	25 (24%)	5 (16%)	14 (24%)	3 (30%)	0 (0%)	3 (60%)	0.36
CIMP-high*, n (%)	7 (7%)	2 (6%)	3 (5%)	2 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	> 0.9999
MLH1 methylation, n (%)	2 (2%)	0 (0%)	2 (3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	> 0.9999
β-catenin expression (n)	102	32	58	5	2	5	
Negative, n (%)	15 (15%)	3 (10%)	5 (8%)	1 (20%)	1 (50%)	5 (100%)	< 0.0001
Focal, n (%)	33 (32%)	11 (34%)	19 (33%)	2 (40%)	1 (50%)	0 (0%)	(focal or diffuse versus negative)
Diffuse, n (%)	54 (53%)	18 (56%)	34 (59%)	2 (40%)	0 (0%)	0 (0%)	

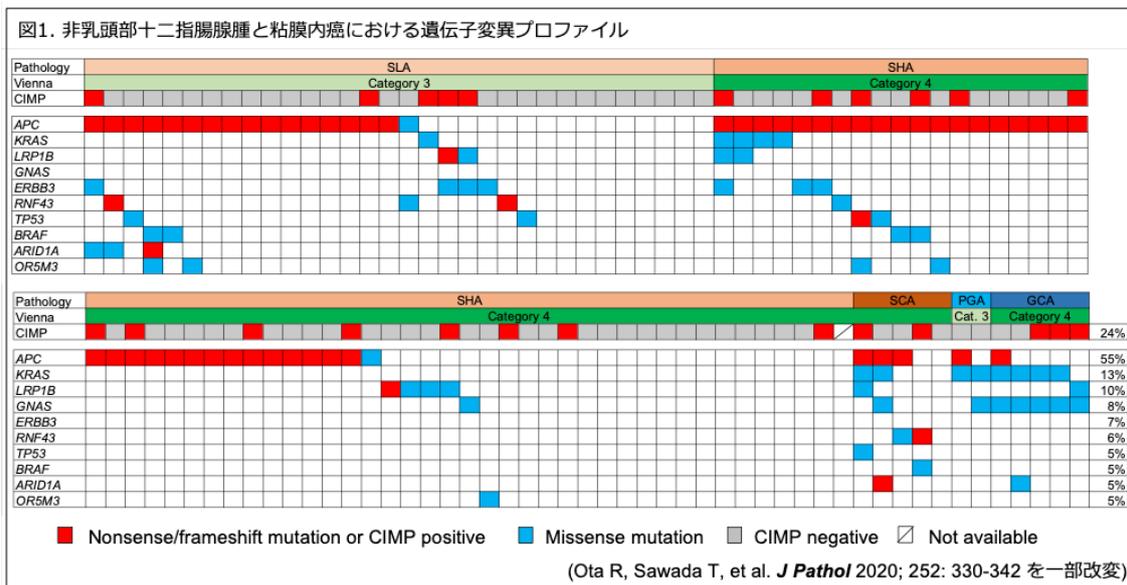
CIMP, CpG island methylator phenotype; GCA, gastric-type intramucosal adenocarcinoma; PGA, pyloric gland adenoma; SCA, small intestinal-type intramucosal adenocarcinoma; SHA, small intestinal-type high-grade adenoma; SLA, small intestinal-type low-grade adenoma.

β-catenin expression was categorized as negative (0-9%), focal (10-49%), and diffuse (> 50%).

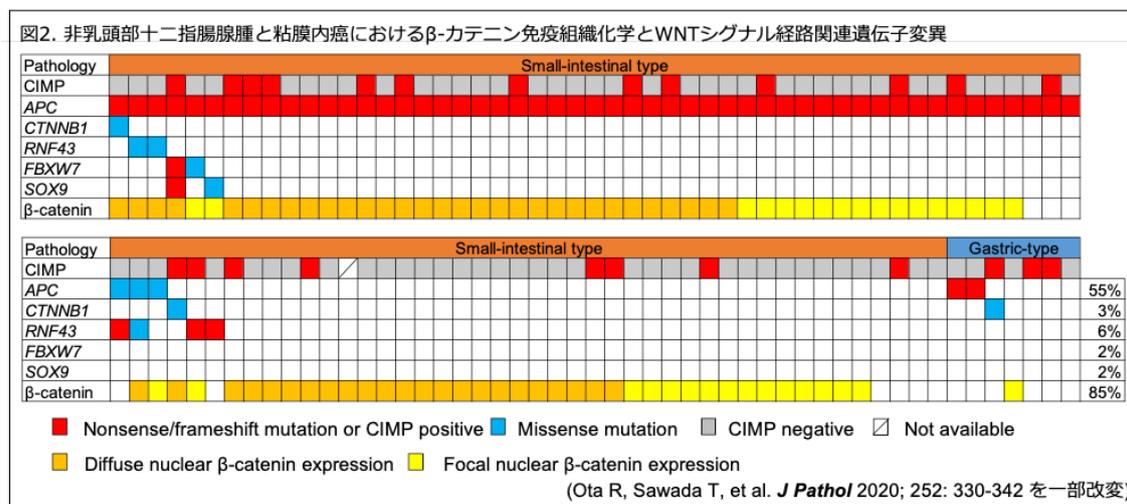
\*CIMP status and CIMP-high status were analyzed in 106 lesions.

(Ota R, Sawada T, et al. *J Pathol* 2020; 252: 330-342)

変異解析では、102 病変中 56 病変 (55%) に *APC* 変異が検出され、そのほか *KRAS* (13%), *LRP1B* (10%), *GNAS* (8%), *ERBB3* (7%), *RNF43* (6%) の変異が検出された (図 1)。 *KRAS* 遺伝子変異は、小腸型腺腫と比較して小腸型腺腫内癌で高頻度であり、癌化への関連が示唆された。 *APC* 遺伝子変異は、従来小腸進行癌で報告された変異頻度 (11-27%) より高頻度であり、小腸型腺腫の一部からしか進行癌へは進展しない、つまり非乳頭部十二指腸発癌において adenoma-carcinoma sequence の関与は限定的であることが示唆された。



また、免疫組織化学では  $\beta$ -カテニンの核内蓄積が 85% の腫瘍に観察され、 *APC* 遺伝子を含む WNT シグナル経路関連遺伝子変異が高頻度 (59%) に検出された (図 2)。



胃型腫瘍と小腸型腫瘍の分子学的特徴を比較すると、 *KRAS*、 *GNAS* 遺伝子変異は胃型腫瘍で高頻度であった (表、図 1)。一方、  $\beta$ -カテニンの核内蓄積は小腸型腫瘍で高頻度に観察され、WNT シグナルの異常は小腸型腫瘍の発生に寄与している可能性が示唆された (表、図 2)。臨床病理学的特徴の相違と合わせて、胃型腫瘍と小腸型腫瘍は独立した異なる発癌経路を有していることが示された。

上記の結果から以下と結論づけられた。

- (1) 非乳頭部十二指腸腫瘍の発生には、ゲノムワイドな遺伝子メチル化と癌関連遺伝子、特に WNT 経路関連遺伝子変異の寄与が示唆された。
- (2) 胃型形質と小腸型形質を示す腫瘍では、異なった臨床病理学的特徴を示し、さらに遺伝子変異を含む分子学的特徴の違いを認めたことから、両者は独立した異なる分子経路を介して発癌すると考えられた。
- (3) 十二指腸腺腫・粘膜内癌における *APC* 遺伝子変異の頻度は、小腸腺癌における従来の報告より高いことから、非乳頭部十二指腸発癌において adenoma-carcinoma sequence の関与は限定的であることが示唆された。

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 Ota R, Sawada T, Tsuyama S, Sasaki Y, Suzuki H, Kaizaki Y, Hasatani K, Yamamoto E, Nakanishi H, Inagaki S, Tsuji S, Yoshida N, Doyama H, Minato H, Nakamura K, Kasashima S, Kubota E, Kataoka H, Tokino T, Yao T, Minamoto T	4. 巻 252
2. 論文標題 Integrated genetic and epigenetic analysis of cancer related genes in non ampullary duodenal adenomas and intramucosal adenocarcinomas	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 330 ~ 342
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/path.5529	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 澤田 武、佐々木泰史、太田亮介、津山 翔、八尾隆史、中西宏佳、山本英一郎、久保田英嗣、片岡洋望、鈴木 拓、時野隆至、源 利成
2. 発表標題 非乳頭十二指腸腺腫、粘膜内癌におけるゲノム・エピゲノムの統合解析
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 澤田 武、太田亮介、津山 翔、八尾隆史、波佐谷兼慶、海崎泰治、中西宏佳、吉田尚弘、辻 重継、土山寿志、湊 宏、山本英一郎、久保田英嗣、片岡洋望、佐々木泰史、源 利成、鈴木 拓
2. 発表標題 非乳頭十二指腸腫瘍におけるDNAメチル化と遺伝子変異の統合解析
3. 学会等名 第16回日本消化管学会総会学術総会
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
研究分担者	八尾 隆史  (YAO Takashi)  (20243933)	順天堂大学・医学部・教授    (32620)	
研究分担者	鈴木 拓  (SUZUKI Hiromu)  (20381254)	札幌医科大学・医学部・教授    (20101)	
研究分担者	佐々木 泰史  (SASAKI Yasushi)  (70322328)	札幌医科大学・医療人育成センター・教授    (20101)	

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