

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 25 日現在

機関番号：34519
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010 ～ 2012
 課題番号：22591497
 研究課題名（和文） 散在性大腸癌発生における塩基除去修復遺伝子 MYH の関与の解明と臨床
 応用への展開
 研究課題名（英文） Study of the causative alterations of the base excision repair gene
 MUTYH on the carcinogenesis of sporadic colorectal cancer and of the
 possible clinical applications.
 研究代表者
 久野 隆史（KUNO TAKASHI）
 兵庫医科大学・医学部・助教
 研究者番号：30441281

研究成果の概要（和文）：

塩基除去修復遺伝子 *MUTYH* は 8-OHG に誤って結合したアデニンを除去するグリコーゲン分解酵素をコードしている。*MUTYH* 遺伝子の両アレルの突然変異が多発ポリープの原因となり、癌遺伝子や癌抑制遺伝子に G:C→T:A 突然変異を起こすことによる大腸癌の発症過程に関与することがわかっている。片方のアレルに *MUTYH* の突然変異があると大腸癌になりやすいと思われるが、大腸癌症例について *MUTYH* の突然変異、allelic imbalance、*KRAS* 遺伝子の突然変異等の解析を行った。*MUTYH* の点突然変異が 3 症例に検出された。正常細胞にも同様の変異がみられたことより生殖細胞系列の変異と考えられた。Allelic imbalance (AI) が 20% の症例にみられたが、AI は *KRAS* 突然変異にみられる G:C→T:A の頻度に関係しなかった。G:C→T:A の頻度は rs3219489 の C アレル dominant な腫瘍に高かった。従って、他の DNA 修復異常に起因する大腸癌と同様に、*MUTYH* 遺伝子の散在性突然変異に由来するものは稀であった。

研究成果の概要（英文）：

The base excision repair gene *MUTYH* encodes glycosylase which removes adenine residues mispaired with 8-OHG. Biallelic germline mutation of the *MUTYH* gene are known to cause multiple colorectal adenomas including polyposis and cancer, mostly due to G:C→T:A transversions in proto-oncogenes or tumor suppressor genes. To investigate the possible role of *MUTYH* mutation in sporadic colorectal cancer (CRC), we examined alterations of the *MUTYH* gene including somatic mutations and allelic loss in sporadic CRC. *MUTYH* mutations in cancer DNA were detected in 3 cases, while mutations were also found in DNA samples from the normal tissue, indicating that all were germline mutations. In conclusion, somatic alterations of *MUTYH* in sporadic CRC were rare, similar to other DNA repair genes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、消化器外科学

キーワード：大腸癌、MYH、発癌、修復遺伝子

1. 研究開始当初の背景

大腸癌は今や、単一ではなく、複数の発癌経路より発生してきた腫瘍の集合体と考えられている。これまでの研究で、DNA 修復機転の破綻が、大腸発癌の重要な要因であることが明らかになってきた。多発大腸ポリープを特徴とする家族性大腸腺腫症に類似した遺伝性大腸癌として MAP (MYH associated polyposis) の存在が明らかとなってきた。その原因遺伝子として、塩基除去修復遺伝子の一つである *MYH* が同定された。これまで見なかった、遺伝性大腸癌の複数の原因遺伝子は、散在性大腸癌の発癌においても key 遺伝子として大きく関与することが証明されてきた。これまでの研究によると、大腸発癌に関与する DNA 修復遺伝子たる mismatches 修復遺伝子 (*MLH1*, *MSH2* 等)、あるいは *MGMT* の破綻は何れにおいても、手術後の予後、さらには抗癌剤の感受性に強くリンクし、手術や化学療法における重要な指針となることが明らかになってきている。比較的新しく、遺伝性大腸癌の原因遺伝子として同定された *MYH* 遺伝子も、DNA 修復遺伝子であり、遺伝に関与していることから、散在性大腸癌においても、重要な働きをしていることが予測される。しかしながら、これまでに散在性大腸癌において、詳細に *MYH* の変異を検討した研究は殆どない。我々は、これまでに、*MYH* 遺伝子の病的変異と想像される polymorphism の 8 箇所を、散在性大腸癌において世界で初めて検討し、報告してきた。しかし、*MYH* 全領域の変異を全て検索した訳ではなく、全貌を明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

大腸癌の実臨床においては、key 遺伝子変異の status が、治療法の選択に応用され始めている。大腸癌において、責任遺伝子の一つと考えられる塩基除去修復遺伝子 *MYH* の、散在性大腸癌への関与を明らかにし、臨床応用への展開を図ることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

当科での大腸原発癌手術症例 101 例の癌部と非癌部の凍結標本を用いた。サンプルはすべて、当施設倫理委員会承認のもと、同意の得られたものを用いた。詳細な臨床病理学的情報と比較検討した。家族性大腸腺腫症、リンチ症候群等の遺伝性大腸癌症例は除いて検討した。DNA を抽出後、*MUTYH* 遺伝子の突然変異をサンガー法 (direct sequencing 法) で検索した。Loss of heterozygosity (LOH) を *MUTYH* 遺伝子上の 3 つの single nucleotide polymorphism (SNP) マーカー (プロモーター領域にある rs80323611、IVS10 +2 A→G にある rs77542170、exon 12 にある rs3219489: c972G→C p. Gln324His を検索し

た。*KRAS* 突然変異 (codon 12 and 13) をサンガー法により検索した。

4. 研究成果

散在性大腸癌 101 症例について *MUTYH* 遺伝子上の 6 領域を sequencing した結果、3 種類の突然変異を同定した。2 つが missense mutation、1 つが nonsense mutation であった。missense mutation は c.53C → T p.Pro18Leu と c.74G → A p.Gly25Asp であった。いずれも Human Gene Mutation Database (HGMD) で CM083727 と CM083730 というアクセッション番号がついている。一方、欠失をとまなう変異はみられなかった。NCBI で dbSNP として登録されているものはみられた。nonsense mutation は c.55C → T p.Arg19X であった。これは HGMD に登録されていないものであったので、新規の突然変異と考えられた。同様の突然変異が正常組織にもみられたことから、生殖細胞系列の突然変異と考えられた。2 つの大腸癌において、両方のアレルに別々の突然変異のある、いわゆる compound heterozygous が存在したが、臨床的には大腸ポリポーシスを呈しておらず、さらに詳しく家族歴を取り直しても、遺伝性の要素は確認されなかった。さらに、白人に頻度の高い突然変異である exon 7 に存在する c.494A → G p.Tyr165Cys、exon 13 にある c.1145G → A p.Gly382Asp のいずれの突然変異も、我々の検討では見つからなかった。

rs80323611, rs77542170, rs3219489 の 3 つの SNP を用いた heterozygote の検討では、informative 症例において LOH が判定可能であった。しかし、rs80323611, rs77542170 には LOH が存在しなかった。しかし、rs3219489 において 19.6% に LOH が観察された。LOH 症例はほとんどの因子との相関が見られなかったが、唯一占拠部位として左側大腸・直腸と相関していた。

KRAS の codon 12, 13 の突然変異は 32.7% の症例にみられた。*MUTYH* 遺伝子の塩基除去修復能が欠損すると、G:C → T:A transversion が多く観察されると予測される。G:C → T:A は C アレル dominant で 75% にみつき、G アレル dominant では 15.8% にしか見られなかった。ただし、統計学的有意差にはいたらなかった。

本研究はアジアにおける散在性大腸癌の検討としては初めて *MUTYH* 遺伝子の変異を詳細に解析した報告である。サンガー法を用いて、3 つの突然変異が同定された。全ての患者で大腸癌を発症したのは 70 歳を過ぎていた。またどの患者にも大腸癌・ポリポーシスの家族歴が存在しなかった。

今回の報告は、これまで西欧で報告されたように、大腸癌には *MUTYH* 遺伝子の somatic mutation が稀であるということを示している。これは *MLH1*, *MSH2*, *BRCA2* などのような他の遺伝性に関与する DNA 修復遺伝子と同様に散在性癌には稀なイベントであるという事実とも符合する。

MUTYH 遺伝子は、第一染色体の短腕 1p34.3-p32.1 に存在する。ここでは、大腸癌、大腸腺腫でも LOH の多い部位である。我々の今回の検索で得られた 19.6% はこれまでの報告と矛盾しない。

塩基除去修復遺伝子 *MUTYH* は 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-OHG) に誤って結合したアデニンを除去するグリコーゲン分解酵素をコードしている。*MUTYH* 遺伝子の両アレルの突然変異が多発ポリープの原因となり、癌遺伝子や癌抑制遺伝子に G:C→T:A 突然変異を起こすことによる大腸癌の発症過程に関与することがわかっている。片方のアレルに *MUTYH* の突然変異があると大腸癌になりやすいと思われるが、その可能性を検討するために 101 例の大腸癌症例について *MUTYH* の突然変異、allelic imbalance、*KRAS* 遺伝子の突然変異等の解析を行った。*MUTYH* の点突然変異が 3 症例に検出された。正常細胞にも同様の変異がみられたことより生殖細胞系列の変異と考えられた。Allelic imbalance (AI) が 20% の症例にみられたが、AI は *KRAS* 突然変異にみられる G:C→T:A の頻度に関係しなかった。G:C→T:A の頻度は rs3219489 の C アレル dominant な腫瘍に高かった。

従って、他の DNA 修復異常に起因する大腸癌と同様に、*MUTYH* 遺伝子の散在性突然変異に由来するものは稀であった。ただし、今回検索されていないこれまでに見つかっていない部位、あるいは epigenetic な変異が、発癌に関与している可能性はあり、今後検討を要すると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Takashi Kuno, Nagahide Matsubara, Satoshi Tsuda, Masayoshi Kobayashi, Mie Hamanaka, Daisuke Yamagishi, Kiyoshi Tsukamoto, Tomoki Yamano, Masafumi Noda, Hiroki Ikeuchi, Sanghyuk Kim, Kazuo Tamura, and Naohiro Tomita: Alterations of the base excision repair gene *MUTYH* in

sporadic colorectal cancer. **Oncol. Rep.** 28: 473-480 (2012). 査読有り

2. Nagahide Matsubara: Epigenetic regulation and colorectal cancer. **Dis. Colon Rec.** 55: 96-104 (2012). 査読有り
3. 松原長秀: 大腸癌におけるプロモーターのメチル化と CIMP 癌と化学療法 37 (9): 1569-1664 (2010). 査読有り

[学会発表] (計 4 件)

1. 田村和朗、金相赤赤、喜多瑞穂、石川真澄、伊田和史、久野隆史、山野智基、松原長秀、冨田尚裕: 大腸腺腫及び散在性大腸癌における塩基除去修復遺伝子 *MUTYH* 遺伝子異常の関与 第 23 回日本消化器癌発生学会総会 2012 年 11 月 15-16 日 鳴門
2. 久野隆史、松原長秀、津田聡司、小林政義、濱中美衣、山岸大介、塚本潔、山野智基、野田雅史、池内浩基、田村和朗、冨田尚裕: 散在性大腸癌における塩基除去修復遺伝子である *MUTYH* 遺伝子の変化 第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月 19-21 日 札幌
3. 久野隆史、松原長秀、津田聡司、馬場谷彰仁、濱中美衣、山岸大介、塚本潔、山野智基、野田雅史、吉澤恵、田村和朗、冨田尚裕: 大腸癌発生における塩基除去修復遺伝子 *MYH* の関与 第 17 回日本家族性腫瘍学会学術集会 (遺伝医学合同学術集会 2011) 2011 年 6 月 17-19 日 京都大学百周年時計台記念館
4. 久野隆史、松原長秀、津田聡司、浜中美衣、山岸大介、塚本潔、野田雅史、西上隆之、金友英、田村和朗、冨田尚裕: 散在性ならびに多発性腫瘍発生における塩基除去修復遺伝子 *MYH* の関与 第 16 回日本家族性腫瘍学会学術集会 2010 年 7 月 9~10 日 新潟

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久野 隆史 (KUNO TAKASHI)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号: 30441281

(2)研究分担者

松原 長秀 (MATSUBARA NAGAHIDE)
兵庫医科大学・医学部・准教授
研究者番号：70314672

田村 和朗 (TAMURA KAZUO)
近畿大学・理工学部・教授
研究者番号：20278823

富田 尚裕 (TOMITA NAOIHIRO)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：00252643

(3)連携研究者

()

研究者番号：