

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 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：2011～2013

課題番号：23591974

研究課題名(和文)炎症を母地とする非定型消化器癌の発癌機構の解明と早期診断バイオマーカの開発

研究課題名(英文) Study on molecular carcinogenesis of rare cancer developed from the inflammatory field to find the marker for early diagnosis.

研究代表者

松原 長秀 (Nagahide, Matsubara)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：70314672

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌は、最も解析が進んだ腫瘍のひとつであるが、近年、次世代シーケンスで大腸癌における全ゲノムの変異が明らかにされ、従来の発癌経路のkey遺伝子と大きく変わる所は無かった。一方、特殊な大腸癌、殊に炎症性腸疾患に起因する大腸発癌に関しては研究がなされていない。持続する慢性炎症の関与により、遺伝子プロモーターへのメチル化の誘導が示唆される。そこでcolitic cancerを材料に、網羅的に遺伝子プロモーターのメチル化を検討した。その結果、メチル化のパターンが、散在性大腸癌の2つの発癌経路のパターンと全く異なっていた。現在、統計学的処理をしつつ、原因遺伝子を抽出中である。

研究成果の概要(英文)：Molecular carcinogenesis of colorectal cancer is well studied among other cancers in the world. Recent analysis of colorectal cancer by next generation sequencing showed the frequencies of gene alterations in the signal transductions, showing that driver genes responsible for the carcinogenesis found in NGS is no different from conventional studies. On the other hand, molecular mechanism of carcinogenesis of rare but important colorectal cancer like that based on the inflammatory bowel disease is completely unknown. There were several reports concerning abnormal promoter hypermethylation of several loci caused by exposure of chronic inflammation. Accordingly, we studied the whole genome methylation of colitic cancers compare with 2 types of sporadic colorectal cancers. As the result we found completely different methylation patterns between colitic cancer and other sporadic cancers. We are now elucidating the responsible genes and mechanism of novel carcinogenesis of colitic cancer.

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：ulcerative colitis colitic cancer eigenetic methylation biomarker

1. 研究開始当初の背景

(1) 1980年代、RAS 遺伝子のクローニングの後、1990年より急激に分子腫瘍学が発展し、癌の成因がDNAレベルで解明されてきた。大腸癌は、最も解析が進んだ腫瘍のひとつであるが、西欧で頻度の高い癌であり、病的に分化度が高く、均一で、間質が少ないというのも大きな理由と考えられる。これには、2つの遺伝性大腸癌の原因遺伝子が発見されたことも大きく貢献されている。散在性大腸癌の研究も進み、大きく2つの発癌経路に集約されることとなった。近年、次世代シーケンスの時代に突入し、大腸癌における全ゲノムでの変異が明らかにされたが、基本的には大腸発癌に直接関与する重要な遺伝子 driver gene は、従来の発癌経路の key 遺伝子と大きく変わる所は無かった。シグナル伝達に組み込まれた複数の遺伝子の変異の頻度も明らかにされた。これにより、遺伝子情報の臨床応用が一步近づいた。一方、特殊な大腸癌、殊に炎症性腸疾患に起因する大腸癌に関しては、その発癌機構は全く判ってこなかった。持続する慢性炎症が発癌に関与することは知られている。ヘリコバクター由来の胃の慢性炎症に胃がんが発症するのに、遺伝子プロモーターのメチル化に異常が起こることは牛島らの研究にある。

(2) 我が国では潰瘍性大腸炎が増加の一途をたどっている。散在性大腸癌の分子発癌機構は、この30年間でかなり明らかにされ、臨床応用への取り組みも進んできた。一方、潰瘍性大腸炎を母体とする大腸癌は、これまで稀な癌であるが故に、ほとんど研究がなく、発癌過程が不明である。

2. 研究の目的

本邦での潰瘍性大腸炎患者が増加している。内科的治療法の進歩につれ、長期に緩解に持ち込める症例が増加してきたが、そのような症例は大腸癌の好発母地となることが解ってきた。近年、潰瘍性大腸炎由来の癌 (colitic cancer) の増加が大きな問題となっている。Colitic cancer が一般の大腸癌と大きく異なるのは、癌の悪性度も高く、形態的に一般大腸癌のような限局潰瘍型を示さないことが多く、隆起がなくても深く浸潤する傾向がある点である。従って、診断・治療に苦慮することが多い。これほど重要度の高い病態でありながら、その発癌メカニズムがほとんど解明されていない。

エピジェネティック変異、ことに遺伝子プロモーターのメチル化機構は、炎症によって引き起こされる病態と密接に関連することが示されており、癌化のメカニズムとして注目されている。

本研究では、colitic cancer に生じるメチル化を、全ゲノム網羅的に解析し、通常の大腸

癌に生じているメチル化と比較検討し、colitic cancer のみに生じた大腸癌に特徴的な遺伝子変異を特定することを目的とする。colitic cancer において、癌特異的にメチル化されているマーカーを網羅的探索。

3. 研究の方法

(1) これまでに、教室の「分子分類に基づく大腸癌の診断および治療法の開発」の研究計画に基づいて、切除された大腸がん組織、及び正常大腸粘膜の組織バンクを作成している。

(2) 潰瘍性大腸炎に生じた大腸癌 (colitic cancer) の手術切除凍結標本、及び潰瘍性大腸炎背景粘膜凍結組織から抽出したDNAを精製した。

(3) 全ゲノム 450,000 カ所のメチル化を検出可能はメチル化アレイを用いて colitic cancer のDNA上に生じたメチル化を網羅的に検討した。比較の対象として、一般(散在性)大腸癌症例の大腸癌部(メチル化の多い CpG island methylator phenotype: CIMP 及び、メチル化の見られない non-CIMP それぞれ)、及び正常大腸粘膜から抽出したDNAも同様に、同時にメチル化解析を行った。

(4) 散在性大腸癌のうち、2つの典型的な発癌経路である CIN (プロモーターのメチル化の少ない発癌経路) と、MIN (プロモーターのメチル化の多い発癌経路) の腫瘍をコントロールとして解析した。

(5) 主成分解析を行い、colitic cancer でのメチル化全般の傾向を検討した。さらに各群間での有為差検定を行ったが、有為に変動したプローブが抽出されてきている。

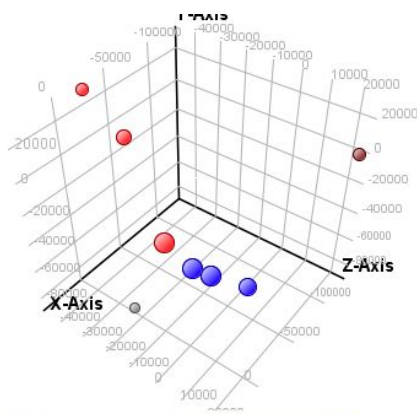
(6) 今後、CpG site の annotation を行う予定である。具体的には CpG-TRANSFAC 転写因子結合サイト情報と、今回の結果をつきあわせて、ベータ差分値が高かった CpG サイトに対して、どのような転写因子が結合する可能性があるのかを網羅的に分析する予定である。

(7) さらに、遺伝子発現カスケード、既知の signaling pass way でのキーとなる遺伝子群を特定しつつある。

4. 研究成果

(1) 主成分解析を行い、colitic cancer でのメチル化全般の傾向を検討した。さらに各群間での有為差検定を行ったが、有為に変動したプローブが抽出されてきている。主成分解析のパターン解析では、colitic cancer におけるメチル化のパターンは、散在性大腸癌の代表的な発癌経路によって分けられる CIN お

よびMINグループ何れのパターンを比較して全く異なるものであった。Colitic cancerにおけるパターンは、炎症を伴った背景粘膜のメチル化パターンとも異なるものであった。従って、全く特異な発癌経路をとって発癌することが示唆される。



Color by Sample Groups

- CC-Cancer
- CC-NonC
- HK091-C
- HK127-C

(2)現在、colitic cancer, 潰瘍性大腸炎背景粘膜、散在性大腸癌 (microsatellite stable)、散在性大腸癌 (microsatellite instability high) 各群3点以上の症例のメチル化アレイによる網羅的解析をおこなっており、統計学的処理をおこなっている。

(3)個々のメチル化遺伝子も従来の CIN、MINで見られるものと全く異なることが解った。Colitic cancer で特異的に高メチル化しているマーカーおよび低メチル化しているマーカーを抽出できた。これらのマーカーが、前駆病変・早期病変の発見、化学予防法の開発、化学療法剤の開発等に多大な貢献ができる可能性がある。

(4)現在、CpG site の annotation を行いつつある。具体的には CpG-TRANSFAC 転写因子結合サイト情報と、今回の結をつきあわせて、ベータ差分值が高かった CpG サイトに対して、どのような転写因子が結合する可能性があるのかを網羅的に分析している。さらに、遺伝子発現カスケード、既知の signaling pass way でのキーとなる遺伝子群を特定することを検討している。

(5)メチル化あるいはエピゲネティックな発癌機構において、colitic cancer は、散在性大腸癌にみられる概念とは全く異なる発癌の仕組みで癌化する可能性が考えられ、全く特異な発癌経路をとって発癌することが示唆された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

松原長秀、小林政義、濱中美衣、山岸大介、塚本潔、山野智基、野田雅史、冨田尚裕 : colitic cancer に対するエピゲネティックマーカーの網羅的探索 第 51 回日本癌治療学会学術集会 2013 年 10 月 24-27 日 京都

松原長秀、小林政義、濱中美衣、別府直仁、山野智基、冨田尚裕 : 潰瘍性大腸炎を母地とするエピゲネティックな大腸発癌機構 第 24 回消化器癌発生学会総会 2013 年 9 月 5-6 日 金沢

松原長秀、池内浩基、山野智基、小林政義、濱中美衣、山岸大介、久野隆史、塚本潔、内野基、野田雅史、冨田尚裕 : ほとんど解ってこなかった潰瘍性大腸炎を母地とする大腸発癌機構 第 113 回日本外科学会定期学術集会 2013 年 4 月 11-13 日 福岡

松原長秀、小林政義、濱中美衣、山岸大介、久野隆史、塚本潔、山野智基、野田雅史、冨田尚裕 : 炎症を母地とした特殊大腸癌 colitic cancer の発癌機構 2012 年 10 月 25-27 日 横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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

池内 浩基 (IKEUCHI, Hiroki)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：80319863

山野 智基 (YAMANO, Tomoki)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：00599318