

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 21 日現在

機関番号：20101
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23790800
 研究課題名(和文) 消化器癌の遺伝子異常の網羅的探索とそれらをターゲットにした標的治療の臨床への応用
 研究課題名(英文) Comprehensive analysis of genetic abnormalities in gastrointestinal cancers and the identification of molecular targeted therapy targeting those alterations
 研究代表者 能正 勝彦 (NOSHO KATSUHIKO)
 札幌医科大学・医学部・助教
 研究者番号：10597339

研究成果の概要(和文)：現在、大腸癌は男女ともに日本人の癌死亡原因の上位を占め、特に高齢者の右側結腸癌の増加が報告されている。欧米では高齢者の右側結腸癌の特徴として、女性、BRAF 遺伝子変異や MLH1 のメチル化、マイクロサテライト不安定性大腸癌が多いと報告されている。また大腸鋸歯状病変はそれらの異常の頻度が高いことからその前癌病変として注目されている。しかしながら本邦において多症例の高齢者大腸癌や鋸歯状病変の臨床病理・分子生物学的特徴を解析した報告はほとんどない。よって今後、日本で更に増加すると推測される高齢者大腸癌の臨床病理学的、また分子生物学的な特性を解明することで病変を早期発見するための有効な診断方法を開発できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The number of elderly colorectal cancer (CRC) patients is expected to increase because of the aging populations in many countries. Previous studies in the U.S. and European countries have shown that the clinical and molecular features of elderly CRC patients were female, right-side colon, BRAF mutation, MLH1 methylation and microsatellite instability (MSI) and that the precursor lesions of those CRCs appeared to be serrated lesions. With regard to Japan, the population is aging much faster than that of any other countries; however, there has been no study on the characteristics of CRCs and serrated lesions in a large population of elderly Japanese patients. We therefore conducted a retrospective large-scale Japanese cohort study and examined the clinicopathological and molecular features of elderly patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：下部消化管学（小腸、大腸）

1. 研究開始当初の背景

我が国において癌は死亡原因の第1位であり、癌好発年齢である中・高年者の増加と共に著しい増加を示している。消化器癌の新規

バイオマーカーの探索としてこれらの役割を明らかにすることは、非常に重要である。消化器癌の中でも、日本人女性の癌死亡原因第

一位は大腸癌であり、特に高齢者の右側結腸癌が増加してきている。

近年、大腸発癌における serrated neoplasia pathway の重要性が世界的に注目され、大腸 serrated lesion (鋸歯状病変)のうち、sessile serrated adenoma/polyp (以下、SSA/P と略)が、臨床病理学的特徴から右側結腸癌の前癌病変である可能性が示唆されている。SSA/P は、BRAF 遺伝子変異の頻度が高く、多くの遺伝子で DNA メチル化が認められるのが特徴であり、右側結腸のマイクロサテライト不安定性大腸癌の前癌病変と考えられているが、SSA/P の遺伝子学的な特徴はまだ不明な点が多いのが現状である。また、大腸癌における遺伝子変異や DNA メチル化のみならず、microRNA (miRNA) の発現異常が報告されているが、SSA/P における解析はほとんどなされていない。

そこで、本邦で増加し続ける高齢者の右側大腸癌の早期診断と早期治療のため、大腸鋸歯状病変の更なる分子生物学的な解析と診断・治療のバイオマーカーの探索が求められている。

2. 研究の目的

本研究では大腸癌や大腸鋸歯状病変等の大腸腫瘍を用いて、癌関連遺伝子変異、LINE-1 メチル化レベル、ならびに miRNA 発現を解析し、早期診断や薬剤感受性に有用な新規バイオマーカーを探索研究する。また大腸癌以外の消化器癌についても LINE-1 や miRNA 等の網羅的な遺伝子解析を行い、診断や治療のバイオマーカーを同定することを目的とする。

3. 研究の方法

手術あるいは生検により採取された 1,500 例の大腸癌・大腸腺腫・大腸鋸歯状病変から DNA と miRNA を抽出し、癌関連遺伝子のメチル化・変異、遺伝子発現を網羅的に解析する。

メチル化解析を行う DNA を Bisulfite 処理し、各遺伝子のプロモーター領域を PCR 増幅する。異常メチル化の解析や遺伝子発現の確認方法は Real-time PCR などを用いる予定である。また高感度パイロシークエンサーによる LINE-1 のメチル化レベル、また癌関連遺伝子のメチル化、および遺伝子変異を検討する。更に miRNA 発現に関してはアレイシステムを用いて解析する。

(1)大腸癌における LINE-1 メチル化レベルと miRNA 発現異常の相関と臨床への応用

大腸癌におけるゲノムワイド DNA メチル化の指標として LINE-1 メチル化レベルが使われているが、臨床検体においてそのメチル化レベルを安定して測定するのは容易ではない。よってそのメチル化レベルと強い相関を示す、新規バイオマーカーの探索が必要である。そこで我々はエピジェネティックな変化等で制御される miRNA に着目する。大腸癌症例を対象に LINE-1 メチル化レベルと強い相関を示す miRNA を同定するためアレイシステムで 700 を超える miRNA 発現を網羅的に解析する。

(2)大腸鋸歯状病変を対象とした癌関連遺伝子の DNA メチル化・変異、miRNA 発現の解析

対象は SSA 等の 300 例を超える大腸鋸歯状病変で、DNA および miRNA を抽出する。それらの中でも特に発癌ポテンシャルが高いと考えられている SSA/P の LINE-1 メチル化レベルや遺伝子変異、メチル化マーカーの検討、また miRNA においてはアレイシステムで網羅的発現解析を行い、他の鋸歯状病変や大腸癌との比較・検討を行い、診断・治療のバイオマーカーとなりうる遺伝子異常を明らかにする。また喫煙と鋸歯状病変の相関も報告されているが、本邦ではそのような検討はなされていないため、それらの関係についても合わせて検討する。

(3)大腸多発癌症例における LINE-1 メチル化レベルと miRNA 発現の解析

大腸多発癌症例における癌のペア同士の LINE-1 メチル化レベルと miRNA 発現を解析し、それらを比較検討。また大腸正常粘膜においてもそれらの異常を解析し、field cancerization の観点からも検討を行う。

4. 研究成果

我々は 1438 例の大腸腫瘍を対象にそれらの検討を行った。対象は当施設と関連施設で治療された鋸歯状病変 383 例（過形成性ポリープ 141 例、SSA/P 124 例、鋸歯状腺腫 118 例）と大腸腺腫（230 例）、癌（825 例）の検体でそれらを用いて、臨床病理学的特徴と KRAS、BRAF、PIK3CA 変異、MLH1 メチル化や MSI を検討した。高齢者（75 歳以上）の大腸癌は全大腸癌の 27%（222 例）であり、その 57%が女性、46%が右側結腸、BRAF 変異は 8%、MLH1 メチル化は 48%（75 歳未満では女性 38%、右側結腸 34%、BRAF 変異 4%、MLH1 メチル化 39%）であり、75 歳未満の癌と比べ、いずれも有意差を認めた。また 124 例の SSA/P のうち高齢者は 10 例（8%）で認められ、全例右側結腸であった。また高齢者 SSA/P の MLH1 メチル化は 33%、MSI は 20%（75 歳未満でそれぞれ 9%、0%）で、それらの遺伝子異常は高頻度に認められた。一方、高齢者の過形成性ポリープや鋸歯状腺腫、大腸腺腫では 75 歳未満のそれらの腫瘍と比較して臨床病理・分子生物学的因子で有意差を認めなかった。今回の研究結果から本邦における高齢者大腸癌は女性、右側結腸に多く発症する傾向があり、BRAF 変異や MLH1 メチル化の頻度も高いことが明らかとなった。また高齢者の SSA/P は MLH1 メチル化や MSI 等の異常が高頻度であることから癌化の危険性が高く、それらのほとんどが右側結腸に存在

することから、高齢者の内視鏡検査では深部大腸の詳細な観察が必要であることが判明した。マイクロ RNA 発現に関しては、現在アレイシステムを用いて有望な RNA を同定しているところであり、更に大腸腫瘍の症例数を増やして、その研究成果を発表したいと考えている。

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 14 件）

(1) Sukawa Y, Yamamoto H, Nosho K, Kunimoto H, Suzuki H, Adachi Y, Nakazawa M, Nobuoka T, Kawayama M, Mikami M, Matuno T, Hasegawa T, Hirata K, Imai K, Shinomura Y. Alterations in the HER2-PI3K-Akt pathway in gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2012;18:6577-86. 査読有

(2) Waldron L, Ogino S, Hoshida Y, Shima K, McCart Reed AE, Simpson PT, Baba Y, Nosho K, Segata N, Vargas AC, Cummings MC, Lakhani SR, Kirkner GJ, Giovannucci E, Quackenbush J, Golub TR, Fuchs CS, Parmigiani G, Huttenhower C. Expression Profiling of Archival Tumors for Long-term Health Studies. *Clin Cancer Res.* 2012;18:6136-46. 査読有

(3) Liao X, Lochhead P, Nishihara R, Morikawa T, Kuchiba A, Yamauchi M, Imamura Y, Qian ZR, Baba Y, Shima K, Sun R, Nosho K, Meyerhardt JA, Giovannucci E, Fuchs CS, Chan AT, Ogino S. Aspirin use, tumor PIK3CA mutation, and colorectal-cancer survival. *N Engl J Med.* 2012;367:1596-606. 査読有

(4) Ohashi H, Adachi Y, Yamamoto H, Taniguchi H, Nosho K, Suzuki H, Arimura Y, Imai K, Carbone DP, Shinomura Y. IGF-I receptor expression is associated with aggressive phenotypes and has therapeutic activity in biliary tract cancers. *Cancer Sci.* 2012;103:252-61. 査読有

(5) Niinuma T, Suzuki H, Nojima M, Nosho K, Yamamoto H, Takamaru H, Yamamoto E, Maruyama R, Nobuoka T, Miyazaki Y, Nishida T, Bamba T, Kanda T, Ajioka Y, Taguchi T, Okahara S, Takahashi H, Nishida Y, Hosokawa M, Hasegawa T, Tokino

T, Hirata K, Imai K, Toyota M, Shinomura Y. Upregulation of miR-196a and HOTAIR drive malignant character in gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res.* 2012;72:1126-36. 査読有

(6) Morikawa T*, Tanaka N*, Kuchiba A*, **Nosho K***, Yamauchi M, Hornick JL, Swanson RS, Chan AT, Meyerhardt JA, Huttenhower C, Schrag D, Fuchs CS, Ogino S. Predictors of lymph node count in colorectal cancer resections: Data from U.S. nationwide prospective cohort studies. *Arch Surg.* 2012;147:715-23. 査読有 *These authors equally contributed to this work.

(7) Liao X, Morikawa T, Lochhead P, Imamura Y, Kuchiba A, Yamauchi M, **Nosho K**, Qian ZR, Nishihara R, Meyerhardt JA, Fuchs CS, Ogino S. Prognostic Role of PIK3CA Mutation in Colorectal Cancer: Cohort Study and Literature Review. *Clin Cancer Res.* 2012;18:2257-68. 査読有

(8) Lin JH, Morikawa T, Chan AT, Kuchiba A, Shima K, **Nosho K**, Kirkner G, Zhang SM, Manson JE, Giovannucci E, Fuchs CS, Ogino S. Postmenopausal hormone therapy is associated with a reduced risk of colorectal cancer lacking CDKN1A expression. *Cancer Res.* 2012;72:3020-8. 査読有

(9) Morikawa T, Baba Y, Yamauchi M, Kuchiba A, **Nosho K**, Shima K, Tanaka N, Huttenhower C, Frank DA, Fuchs CS, Ogino S. STAT3 Expression, Molecular Features, Inflammation Patterns and Prognosis in a Database of 724 Colorectal Cancers. *Clin Cancer Res.* 2011;17:1452-62. 査読有

(10) Shima K, Morikawa T, Baba Y, **Nosho K**, Suzuki M, Yamauchi M, Hayashi M, Giovannucci E, Fuchs CS, Ogino S. MGMT promoter methylation, loss of expression and prognosis in 855 colorectal cancers. *Cancer Causes Control.* 2011;22:301-9. 査読有

(11) Baba Y*, **Nosho K***, Shima K*, Hayashi M, Meyerhardt JA, Chan AT, Giovannucci E, Fuchs CS, Ogino S. Phosphorylated AKT expression is associated with PIK3CA mutation, low stage, and favorable outcome in 717 colorectal cancers. *Cancer.* 2011;117:1399-408. 査読有

*These authors equally contributed to this work.

(12) Shima K*, **Nosho K***, Baba Y*, Cantor M, Meyerhardt JA, Giovannucci EL, Fuchs CS, Ogino S. Prognostic significance of CDKN2A (p16) promoter methylation and loss of expression in 902 colorectal cancers: Cohort study and literature review. *Int J Cancer.* 2011;128:1080-94. 査読有 *These authors equally contributed to this work.

(13) Morikawa T, Kuchiba A, Yamauchi M, Meyerhardt JA, Shima K, **Nosho K**, Chan AT, Giovannucci E, Fuchs CS, Ogino S. Association of CTNNB1 (β -catenin) alterations, body mass index, and physical activity with survival in patients with colorectal cancer. *JAMA.* 2011;305:1685-94. 査読有

(14) **Nosho K**, Shinomura Y. The effective molecular targeted therapies for gastroenterological tumors, *Medical Science Digest.*, Japan, 2012;38:154-7. 査読無

[学会発表] (計 7 件)

(1) **能正勝彦**: 大腸腫瘍における KRAS、BRAF、PIK3CA 変異と相関を示す microRNA の同定を目指したアレイシステムによる網羅的: 第 99 回日本消化器病学会総会 2013 年 3 月鹿児島県鹿児島市

(2) **能正勝彦**: マルチバイオマーカー解析に基づく切除不能大腸癌の化学療法・分子標的治療の展望: 第 99 回日本消化器病学会総会 2013 年 3 月鹿児島県鹿児島市

(3) **Katsuhiko Nosho**: The relation of LINE methylation level and macroscopic type in colorectal adenoma and pT1 colorectal cancer: Ninth AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference 2013 年 2 月 Hawaii, USA

(4) **能正勝彦**: 大腸癌における LINE-1 メチル化レベルと microRNA 発現を標的とした診断・個別化治療への応用: 第 9 回日本消化管学会総会学術集会 2013 年 1 月東京都

(5) **能正勝彦**: 大腸癌のグローバル DNA メチル化、microRNA 異常発現の解析とそれらを標的とした新規バイオマーカーの探索と大腸発癌の検討: 第 23 回日本消化器癌発生学会

2012年11月徳島県鳴門市

研究者番号：

(6) 能正勝彦：大腸癌の分子診断学における LINE-1 メチル化レベルの重要性と microRNA 発現の網羅的解析：JDDW2012 2012年10月 兵庫県神戸市

(7) 能正勝彦：Comprehensive analysis of the genome-wide DNA methylation and microRNA expression in gastrointestinal cancers and the identification of new biomarkers targeting those alterations：第71回日本癌学会学術総会 2012年9月北海道札幌市

〔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

能正 勝彦 (Nosho Katsuhiko)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：10597339

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()