

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790713

研究課題名(和文) 散発性大腸がん患者におけるMDF発生にかかわる遺伝子異常および分子機序の解明

研究課題名(英文) Investigation of genetic alterations of mucin-depleted foci in patients with sporadic colorectal cancer

研究代表者

酒井 英嗣 (SAKAI, Eiji)

横浜市立大学・附属病院・指導診療医

研究者番号：30600233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、大腸MDF(mucin-depleted foci)の発生に関わる遺伝子異常を解析した。MDFは非常に微小な病変だが、癌化と関連がある。β-cateninの核内異常集積を伴うことがあり、前癌病変としての性質を有していると思われる。本検討で抽出可能であったDNAは少量であり、ホルマリン保存の影響もあり、遺伝子異常を十分には解析できなかった。したがって、発生に関わる分子機序は未だ明らかでない。今後、MDFに関してさらなる解析を進めるためには、生検体が必要であり、内視鏡的な同定が重要である。

研究成果の概要(英文)：Mucin-depleted foci (MDF), formed by dysplastic crypts devoid of mucin production have been recognized to be correlated with colorectal carcinogenesis and to serve as preneoplastic lesions of colorectal cancer (CRC). In the present study, we investigated the genetic and epigenetic alterations of MDF to reveal carcinogenic mechanisms of these lesions. A part of MDF showed aberrant beta-catenin accumulation as well as flat-neoplasms, suggesting that these lesions might be served as precursor of CRC which develop through de novo pathway. However, we could not analyze detail genetic and epigenetic alterations, because of low quality and quantity of DNA. In the future, endoscopic detection may be help to reveal carcinogenic mechanisms of MDF development.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科臨床医学 消化器内科学

キーワード：MDF 前がん病変 大腸発癌 ACF 遺伝子変異 メチル化異常

1. 研究開始当初の背景

大腸がん我が国において近年増加傾向であり、罹患率が高い。従ってその予防対策は急務である。近年、化学発がん予防が注目を集めているが、大腸腺腫をエンドポイントとした臨床試験は要する症例数の多さや長期にわたる観察期間が障壁となる。そこで、我々は、大腸発がん過程においてより早期に出現する病変である ACF (Aberrant crypt foci) や MDF (Mucin-depleted foci) に注目した。

(1) Aberrant crypt foci (ACF):

発がんモデルではすでに前がん病変として確立されている。ヒトでも最も早期に出現する大腸粘膜病変として以前から注目されており、近年では ACF をエンドポイントとした化学発がん予防試験も散見される。

(2) Mucin-depleted foci (MDF):

ACF の中にムチンを欠いたものが存在し、異型を伴う頻度が高いことが報告されていた。そこで研究代表者は同じく大腸発がん過程において早期に出現する病変である Mucin-depleted foci (MDF) に注目した。MDF はアルシアンブルーで染色されない、ムチンを欠いた Crypt 群として定義され、発がんモデルにおいては、核異型や β -catenin の核内異常集積を伴うことおよび、ACF と比し、大腸がんより強く相関することが報告されている。我々は、散发性大腸がん患者でも MDF を認め、病理組織学的に MDF が前がん病変としての性格を有することを明らかにしてきた。しかしながら、その発生に関わる分子機序はほとんど知られていない。

ヒト MDF の病理組織像

図 1

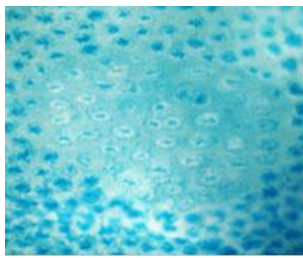


図 2

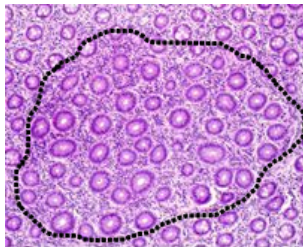
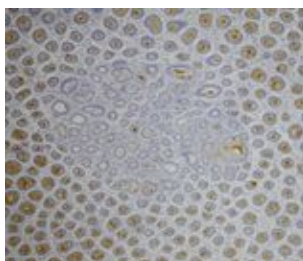


図 3



MDF はアルシアンブルーで染色されないムチンを欠いた Crypt 群として同定される(図 1)。MDF では炎症細胞の浸潤が目立つ(図 2)。MDF は MUC2 を欠いている(図 3)。

2. 研究の目的

本研究の目的は MDF 発生に関する遺伝子異常や分子メカニズムを解明し、発がん過程における位置づけを行い、その臨床的意義を明確にすることである。

我々はヒト MDF における病理組織学的な特徴として、炎症細胞の浸潤と Paneth cell metaplasia を同定した。MUC2 産生が低下すると粘膜バリアが破綻するため局所に炎症細胞が浸潤し、発がんを促進することが想定される。また、Paneth cell は通常小腸のみで発現を認め、大腸では潰瘍性大腸炎など特殊な状況下でしか発現しないことが知られている。さらに興味深いことに Colitic cancer では Flat neoplasm の頻度が高いことが知られている。これらの事象から MDF の一部は Flat neoplasm に移行するという仮説が導かれる。Flat neoplasms は最もよく知られる発癌経路である adenoma-carcinoma sequence とは別の経路 (de novo pathway) を経て癌化すると考えられている。Flat neoplasms の遺伝子異常も同時に調査することで、その関連に関しても調査したい。

3. 研究の方法

(1) 検体の収集

大腸がん手術検体を集積、粘膜部のみを剥がし、アルシアンブルー染色を行う。同定した、MDF をパラフィン切片とし、マイクロダイヤモンドセクションで腺細胞のみを選択的に切り出す。キットを用いて、DNA を抽出する。MDF 50 病変を目標とする。Flat neoplasms に関しては、内視鏡的治療にて得られた検体から、DNA を抽出した。

(2) MDF 発生に関わるメチル化異常の解析

MUC2 promoter 領域の異常メチル化が MUC2 の産生低下と密接に関連することが報告されており、MDF 発生に関わる主な遺伝子異常と考えられる。DNA の Bisulfite 処理後、Pyrosequencing 法を用い、メチル化率を定量的に解析する。同様の解析を flat neoplasm に関しても行うことで、MDF の大腸発がん過程における位置づけをおこなう。メチル化率によるサブタイプの分類は、過去の報告でも用いた、2 種類のメチル化マーカーを用いる。このマーカーを用いることで、高メチル化群 (serrated pathway に関与すると考えられる)、中メチル化群 (KRAS との関連を示す)、低メチル化群に分類可能である。

(3) MDF 発生に関わる遺伝子変異の解析

MDF は微小な病変であり、エクソーム解析は難しい。大腸発癌において、高頻度に出現し、かつ重要な driver-gene であると考えられている、APC、KRAS、BRAF、TP53 を対象として遺伝子変異の解析を行う。APC に関し

では β -catenin の免疫染色で、TP53 に関しても同じく免疫染色で、KRAS と BRAF に関しては MSP 法でそれぞれ変異の有無を評価する。

(4) 下流遺伝子の発現

これらの遺伝子変異の結果、下流遺伝子の発現が変化し、発癌経路が活性化される。本来、mRNA やタンパクなどを用いて解析すべきであるが、MDF を同定するためにはホルマリン保存が必要であり、代替法として免疫染色や in situ hybridization での解析を行う。

4. 研究成果

(1) 我々は研究期間内に 82 症例、計 48 病変の MDF の解析を行った。しかし、そのうち 30 病変は 25 crypt 以下の小病変であり、マイクロダイセクションによってメチル化解析や遺伝子変異解析に必要な DNA を抽出できなかった。Flat neoplasms に関しては、57 症例を集積した。

(2) DNA 抽出可能であった MDF 18 例に関しては、pyrosequence 用に設計した primer で MUC2 promoter 領域の CpG island のメチル化率を測定したが、ホルマリン保存による DNA の劣化のためか、測定不可能な病変が多く、わずかに解析できたものは MUC2 promoter の異常メチル化は指摘できなかった。また、我々は以前の研究で、大腸癌の classification に用いた 2 種類のメチル化マーカーを用いて、MDF のタイピングも行ったが、やはり解析可能な検体はわずかであり、観察可能であったもののメチル化率は低く、低メチル化群に属する可能性が示唆された。Flat neoplasms に関しては、ほとんどすべての症例が低メチル化群に属することが分かった。

(3) MDF の遺伝子変異に関しては、KRAS、BRAF 陽性となる病変はなく、TP53 免疫染色も陰性であった。また、3 病変で β -catenin の核内への異常集積を認めた。Flat neoplasms に関しては、KRAS や BRAF との関連性は低く、病変が小さい段階から、 β -catenin の核内異常集積を非常に高頻度 (51%) に認めた。TP53 は flat neoplasms における癌化との関連を認めた。

(4) 下流遺伝子の発現に関しては、やはり、mRNA の抽出は困難であり、ホルマリン固定の影響か、in situ hybridization による評価も難しかった。

以上より、本研究では、MDF の発生に関わる遺伝子変異およびメチル化異常を詳細に検討したが、MDF の頻度の低さ、小ささ、抽出した DNA の質の低さが原因となり、その根幹となる分子機序にまでは迫ることができなかった。我々の過去の研究から、大腸腺腫の段階では大方の DNA メチル化は完了しているが、ACF ではメチル化異常がほとんど起こっていないことが示されている。したがって、MDF 発生にはメチル化異常が関わらないのか、もしくはまだ完了していないのかは

現時点では明らかではない。また、我々は本検討において、flat-neoplasm で早期から β -catenin の核内への異常集積を認めることを明らかにした。MDF に関しては、少数例しか解析できず、統計学的な検討は不可能であったが、動物モデルと同様、 β -catenin の核内への異常集積を認めるものも存在することから、Flat-neoplasm の前駆病変となる可能性は残されている。今後、MDF に関してさらなる解析を進めるためには、生検体が必要となる。したがって、なんらかの方法で内視鏡的な同定が必要になってくる。今後の内視鏡技術や遺伝子解析技術の発展が待たれる。

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 2 件)

— Sakai E, Ohhata K, Chiba H, Matsuhashi N, Doi N, Fukushima J, Endo H, Takahashi H, Tsuji S, Yagi K, Aburatani H, Nakajima A, Kaneda A. Methylation epigenotypes and genetic features in colorectal laterally spreading tumors. *Int J Cancer*. in print. doi: 10.1002/ijc.28814. 査読有。

— Sakai E, Nakajima A, Kaneda A. Accumulation of aberrant DNA methylation during colorectal cancer development. *World J Gastroenterol*. 2014; 28; 20(4): 978-87. doi: 10.3748/wjg.v20.i4.978. 査読有。

[学会発表](計 2 件)

— Sakai E, Ohata K, Chiba H, Matsuhashi N, Fukushima J, Endo H, Takahashi H, Aburatani H, Nakajima A, Kaneda A. The characteristics of genetic and epigenetic alterations in laterally spreading colorectal tumors. UEGW annual meeting, 2013.10.15, ICC Berlin.

— Sakai E, Ohata K, Chiba H, Matsuhashi N, Fukushima J, Endo H, Takahashi H, Aburatani H, Nakajima A, Kaneda A. The

genetic alterations and unique epigenotype
of laterally spreading colorectal tumors.

第72回日本癌学会総会 口演発表 2013

年10月5日, パシフィコ横浜.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし。

6. 研究組織

(1)研究代表者

酒井 英嗣 (SAKAI Eiji)

横浜市立大学・附属病院・指導診療医

研究者番号: 30600233

(2)研究分担者

なし。