

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860518

研究課題名(和文)大腸de novo癌に関わる遺伝子異常および発癌分子機序の解明

研究課題名(英文) Investigation of genetic alteration and molecular basis of de novo colorectal cancer

研究代表者

酒井 英嗣 (SAKAI, Eiji)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・客員研究員

研究者番号：30600233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は大腸De novo癌の進展に関わる遺伝子異常を包括的手法を用いて解析した。まずメチル化解析を行ったが、LST-NGは低メチル化であった。また、エクソーム解析を用いた遺伝子変異の解析では、LST-GでKRAS変異を含め、RTK/RAS経路に関わる遺伝子変異が多く見られた。APC変異は腺腫でも癌でも高率に見られたことから、発癌経路のかなり早期に関わる遺伝子変異と考えられた。また、TP53変異はLST-NGの癌症例に特異的に見られた。LST-NGでは粘膜内にとどまる早期癌の段階でTP53変異を認めたことから、LST-NGの癌化における重要な遺伝子であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we revealed molecular basis of laterally spreading tumor (LST), using genome-wide comprehensive analyses. Firstly, we assessed their epigenetic background. Subsequently, we conducted targeted exon sequencing including 38 candidate CRC driver genes. By hierarchical clustering using methylation information, LST was clearly classified into two subtypes; LST-G correlating to LME, and LST-NG correlating to LME. Genes associated with RTK/RAS signaling pathway were mutated more frequently in LST-G than LST-NG ( $P=0.004$ ), especially KRAS mutation. Both LSTs showed high frequency of APC mutation even at adenoma stage, suggesting its involvement in initiation stage of LST, like adenoma-carcinoma sequence. TP53 mutation was specifically detected in cancer samples. TP53 mutation occurred during development of intramucosal cancer in LST-NG, but during development of cancer with submucosal invasion in LST-G, suggesting involvement of TP53 mutation at earlier stage in LST-NG.

研究分野：大腸癌

キーワード：大腸癌 遺伝子変異

## 1. 研究開始当初の背景

散发性大腸癌の多くは隆起型腺腫から adenoma-carcinoma sequence を経て癌化したものと考えられるが、中心陥凹を伴ったいわゆる c 病変を前駆病変とする *de novo* pathway など異なる発癌経路も注目を集めている。我々は大腸癌セルラインの全ゲノム解析の結果同定した2グループのメチル化マーカーを用いることで、大腸癌が3つのサブタイプに分類可能な事を明らかにしてきた。高メチル化群 (HME: high methylation epigenotype) に属する癌は MSI-High, CIMP-High, BRAF 変異を高頻度に認め、SSA/P から serrated pathway を経て癌化したと考えられる。一方、中メチル化群 (IME: intermediate methylation epigenotype) に属する癌は KRAS 変異を高頻度に認め、低メチル化群 (LME: low methylation epigenotype) に属する癌は遺伝子変異の頻度が低い。大腸 De novo 癌は日本から発信された概念であり、平坦な形態・腺腫成分の欠如・早期からの深部浸潤を特徴とし、早期発見が困難で、大腸癌死亡率の増加に寄与する一因となる。現在では世界的に認知されるようになってきたが、その分子生物学的背景はいまだ明らかとなっていない。

## 2. 研究の目的

### (1) De novo 癌をとりまく現状

大腸 De novo 癌の分子生物学的背景に関してはいまだ不明な点が多い。近年、遺伝子異常の解析技術は急速に発展しており、あらゆる癌で網羅的解析が行われている。本研究の目的は最新の遺伝子解析技術を駆使して、大腸 De novo 癌を含む平坦腫瘍の分子生物学的背景を明らかにすることである。近年、いくつかのグループで前癌病変も含め大腸癌領域で包括的遺伝子解析がなされたが、いずれの研究も内視鏡下で得た凍結検体を用いたものであり、この方法では癌と腺腫から正確に DNA を抽出することは不可能である。一方、我々は内視鏡治療後のパラフィン切片からマイクロダイセクションで癌もしくは腺腫細胞のみを選択的に切り出しており、DNA の質が高い。腺腫から癌への進展に関わる遺伝子異常を正確に捉えるため必要不可欠な作業である。欧米を中心に行われているエクソーム解析やインフィニウム解析など包括的遺伝子解析は疾患特異的な遺伝子異常を新たに見つける際には極めて重要な解析だが、結果の解釈が難しく、膨大な費用が掛かる。大腸発癌で重要となるドライバー遺伝子を網羅した target exon sequence やメチル化マーカーを用いたエピジェノタイピングは腺腫から癌への進展の鍵となる遺伝子異常を同定するためには必要十分であり、コストベネフィットも大きい。これまでは TP53 が腺腫から癌への進展で重要な働きを担うとされてきたが、すべての発癌経路で同様とは考えにくく(すべての大腸癌が TP53 変異陽性で

はない)、経路ごとの相違は興味深い。したがって、本研究は基礎研究として大腸発癌機構の解明につながる重要なものである。

### (2) De novo 癌の前駆病変

LST-NG は、中心陥凹を伴う、腺腫成分が欠如している、高頻度に sm 浸潤を伴う、症例であり、Kudo らが提唱する De novo 癌の概念に一致する腫瘍である。この病変の遺伝子異常の特徴はメチル化率の低さ、KRAS および BRAF 変異陽性率の低さであり、adenoma-carcinoma sequence や serrated pathway に関与する遺伝子異常の特徴と一線を画す。したがって、De novo 癌の発生・進展には異なる発癌経路が関与している可能性が示唆される。

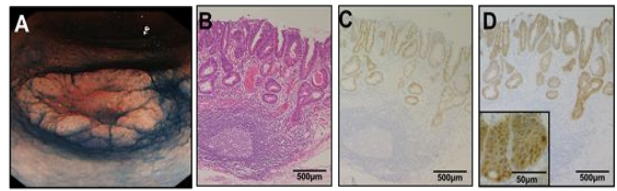


図1. De novo 癌の内視鏡像および病理像  
A. インジゴカルミン染色による内視鏡像  
B. HE 染色  
C. TP53 染色  
D. カテニン染色

## 3. 研究の方法

### (1) 検体の集積

最終解析目標は50症例と設定した。平成26年度内に全症例を集積して遺伝子異常の解析を開始できた。全症例で内視鏡的に一括切除した検体を使用、パラフィン包埋後速やかにマイクロダイセクションによる選択的な腫瘍細胞の切り出しを行っており、抽出された DNA の質は極めて高い。DNA の抽出は QIAamp DNA FFPE Tissue Kit を使用した。

### (2) DNA メチル化解析

我々は上述したクラスタリングの手法を用いて、大腸 De novo 癌の classification を行った。De novo 癌は形態的には LST-NG に相当する病変である。対象として、LST-G (顆粒状の隆起を伴った平坦病変) についても同様に解析した。解析の手法としては、大腸がんセルラインを用いて網羅的なメチル化解析を行い、分類に用いる2グループのメチル化マーカーを作成した。Group-1 マーカーは MSI に関与する遺伝子群で、BRAF 変異と強く相関を示した。Group-2 マーカーは KRAS 変異と強く相関を示した。解析法は低良性の高い pyrosequencing 法を採用した。

### (3) 遺伝子変異解析

当初は全エクソームの解析を予定していたが、コストが膨大となる事、近年大腸癌の大規模な全ゲノム解析が行われ、すでに癌遺伝子が多数報告されていたことから、APC, KRAS,

BRAF, TP53 などを含むキーとなる 38 遺伝子を選択し, target exon sequence 法を用いて解析した. 解析キットは Qiagen 社の GeneRead DNAseq Targeted Panels V2 を使用, Validation は GeneRead Panel Calling を用いて行った. 本研究では正常粘膜からの DNA を十分量採取できなかったため, ペアサンプルでの遺伝子変異の比較が困難であった. したがって, Mutation Taster を用いて polymorphism を除外した.

#### 4. 研究成果

##### (1) 病理像および内視鏡像の比較

最終的に 50 例の LST-NG を対象として評価した. 対照群としては 43 例 LST-G を採用. 腫瘍径は  $41.4 \pm 20.9$  vs  $26.4 \pm 8.6$  ( $P < 0.0001$ ) と LST-NG の方が有意に小さかった. にもかかわらず, 粘膜下層まで浸潤した癌は LST-NG で有意に多かった ( $6/43, 14\%$  vs  $19/50, 38\%$ ,  $P = 0.01$ ).

##### (2) DNA メチル化の比較

LST-G は中メチル化群に, LST-NG は低メチル化群に分類される腫瘍であった. いずれの群でも腺腫と癌でメチル化率に差はなく, 腺腫の段階で DNA メチル化はほぼ完了していることが明らかとなった. Wnt シグナルにおいて重要な働きをする SFRP 遺伝子のメチル化を評価したが, LST-G と LST-NG で有意差を認めなかった.

##### (3) 遺伝子変異の比較

LST-G, LST-NG いずれの群でも coverage は良好であった. 平均の depth は 1179 と DNA 量は十分であった. 全部で 2860 個の変異が検出されたが, そのうち Nonsense 変異は 179 個, Missense 変異は 813 個, Indels は 75 個であった. 変異数を LST-G と LST-NG で比較すると, 両群間に変異数の差は認めなかった ( $16.7 \pm 19.7$  vs  $15.9 \pm 19.1$ ,  $P = 0.85$ ). また, 腺腫と癌の間にも変異数の差を認めなかった. また, 平均の nonpolymorphic パリアント数は 11.5 であった. MMR 変異の有無で変異数を比較したところ, MMR 遺伝子の変異を有する症例では, 変異数が有意に多かった ( $22.4 \pm 23.8$  vs  $9.6 \pm 9.0$ ,  $P = 0.001$ ).

LST では, APC, KRAS, ERBB2, DMD, MSH2, EP300, DCC, TP53, FBXW7 の順に高頻度に遺伝子変異を認めた. APC 変異は LST-G と LST-NG の間で変異頻度に有意差がなく, 腺腫の段階で高頻度に変異を認めた. このことから, adenoma-carcinoma sequence と同様に平坦腫瘍においても APC は発癌の早い段階で関与していると考えられた. BRAF 変異はほとんど認めず, LST は SSA/P と同様に平坦な発育形態をとるが, その分子生物学的背景は全く異なることが予想された. KRAS 変異は LST-G で有意に高頻度に指摘され ( $30/43, 70\%$  vs  $13/50, 26\%$ ,  $P < 0.0001$ ),

RTK/RAS 経路に関わる遺伝子の変異頻度も有意に高かった ( $38/43, 88\%$  vs  $31/50, 62\%$ ,  $P = 0.004$ ). TP53 変異は腺腫では認めず, 癌の段階で指摘された. LST-G では粘膜下層まで浸潤した癌でのみ TP53 変異が指摘されたが, LST-NG では粘膜内癌の段階でも TP53 変異を認めた. このことから De novo 癌の前駆病変と考えられる, LST-NG では発癌の早い段階から TP53 変異が関与している可能性が示唆された.

#### (4) 結論

De novo 癌の前駆病変と考えられる LST-NG では DNA メチル化の関与はほとんどなく, 腺腫の段階では APC 変異が, 癌化する過程では TP53 変異が深く関わっている可能性が示唆された.

#### 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 1 件)

Sakai E, Fukuyo M, Matsusaka K, Ohata K, Doi N, Takane K, Matsubashi N, Fukushima J, Nakajima A, Kaneda A. TP53 mutation at early stage of colorectal cancer progression from two types of laterally spreading tumors. *Cancer Sci*. 2016 Mar 17. doi: 10.1111/cas.12930. 査読有.

[学会発表](計 3 件)

Sakai E, Atsushi K, Nakajima A. Molecular Basis of Colorectal Tumors Developed Through Serrated Pathway. 23Th UEGW annual meeting, Barcelona, October 15-19, 2015, .

酒井英嗣, 金田篤志, 中島淳. DNA メチル化マーカーおよび癌遺伝子パネル解析を用いた大腸 LST の分子生物学的背景の解明. 第 101 回消化器病学会 総会 パネルディスカッション 4 「大腸 LST の病態生理と診断・治療戦略」, 仙台国際センター (宮城県仙台市), 2015 年 4 月 24 - 25 日.

Sakai E, Kaneda A, Nakajima A. Genetic and epigenetic alterations of preneoplastic lesions of colorectal cancer. 第 73 回日本癌学会総会 ポスタープレゼンテーション, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市), 2014 年 9 月 25 - 27 日.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

酒井 英嗣 (SAKAI Eiji)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・

客員研究員

研究者番号: 30600233

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし