

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460956

研究課題名(和文)全エクソンシーケンスによる大腸癌の染色体不安定性の原因となる新規遺伝子の同定

研究課題名(英文) Detection of novel gene mutation causing chromosomal instability using whole exome sequencing in colorectal cancer

研究代表者

澤田 武 (Sawada, Takeshi)

金沢大学・医薬保健学総合研究科・特任准教授

研究者番号：60345626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：検体の確保の問題、費用の問題から研究対象を変更し、特定の大腸前癌病変(鋸歯状病変)において、遺伝子メチル化の解析と、臨床病理学的因子との関連の検討を行った。結果、遺伝子メチル化の多寡と腫瘍の局在に強い関連があることを見出した。それにより、S状結腸より近位に存在する鋸歯状病変は、発癌可能性が高いため、治療が望ましいことが明らかとなった。さらに、病変の背景粘膜において、部位ごとの遺伝子メチル化の差がないことを見出し、鋸歯状病変には領域がん化(field cancerization)の関与が乏しいことを確認した。

研究成果の概要(英文)：Due to the shortage of expense and clinical samples, we had to change initial research plan. Instead, we assessed the DNA methylation of cancer-associated genes in a cohort of BRAF-mutant precancerous lesions. We then compared those results with the lesions' clinicopathological features, especially colorectal subsites. The prevalence of lesions exhibiting frequent DNA methylation was lower in the sigmoid colon and rectum than in other bowel subsites. In addition, several cancer-associated genes showed higher methylation levels within lesions in the proximal to sigmoid colon than in the sigmoid colon and rectum. These results indicate that the methylation status of lesions with BRAF mutation is strongly associated with their location. By contrast, no difference in aberrant DNA methylation was observed in normal-appearing background colonic mucosa along the bowel subsites, which may indicate the absence of an epigenetic field defect.

研究分野：大腸癌

キーワード：大腸癌 鋸歯状病変 遺伝子メチル化

1. 研究開始当初の背景

(1) 大腸癌は、分子生物学的に2種類に大別される。80~85%の大腸癌は、異数性や遺伝子増幅・欠失などのDNAコピー数変化を特徴とする染色体不安定性を伴う癌であり、腺腫-癌連関を介して発生・進展する。染色体不安定性は、大部分の大腸癌との強い関連が示唆されているにもかかわらず、いまだにその原因は明らかではない。発癌早期に染色体分離に関連する遺伝子に変異することにより染色体不安定性が獲得され、その不安定性により更に癌化の過程が推進される事が示唆されている。しかし、ごく一部の染色体不安定性を伴う大腸癌においていくつかの細胞周期関連遺伝子の変異が報告されたのみで、進行大腸癌の大規模な全ゲノムの網羅的解析においても染色体不安定性の原因と考えられる遺伝子は同定されていない。よって、大腸前癌病変である大腸腺腫や腺腫内癌の解析を行うことにより、染色体不安定性の原因となる遺伝子変異の同定を行うことを考えた。

(2) また、以前の申請者らの大腸進行癌における検討では、染色体不安定性陽性の大腸癌といっても、コピー数変化は一様ではなく、染色体欠失が優位な群、増幅が優位な群、変化に乏しい群が存在した(文献①)。興味深いことに、コピー数変化と転移様式の間に関連が認められた。また、腺腫から腺腫内癌に至る過程で、染色体不安定性が獲得され、その時点でも欠失が優位な群、増幅が優位な群、変化に乏しい群がみられ(文献②)、発癌初期に生じた染色体不安定性が進行癌まで引き継がれる可能性が示唆された。そのため、前癌病変の段階で、染色体不安定性の再分類を行い、予後を予測することを考えた。

(3) 一方で、近年、15~20%の大腸癌はゲノムワイドなメチル化の異常である CpG island メチル化形質 (CIMP)によりミスマッチ修復遺伝子 *MLH1* のメチル化が起こり、マイクロサテライト不安定性を伴って発生することがわかってきた。そして、その前癌病変は *BRAF* 遺伝子変異を伴う無茎性鋸歯状腺腫 (sessile serrated adenoma; SSA) であるとされてきた。他の鋸歯状病変である traditional serrated adenoma (TSA) も前癌病変と考えられているが、TSAには *BRAF* 遺伝子変異もしくは *KRAS* 遺伝子変異を伴う病変が存在する。*BRAF* 遺伝子変異を伴う TSA に関しては、SSA と同一の発癌経路なのか (SSA から TSA と SSA の併存病変を経て発癌するのか)、独立した経路から発癌するのかなど、詳細は不明である。

(4) また、従来右側結腸(盲腸~横行結腸)由来の大腸癌と左側結腸(下行~S状結腸)由来の大腸癌とは性質が異なるとされてきた。しかし、近年、*BRAF* 遺伝子変異、CIMP、*MLH1* メチル化を伴う進行大腸癌の頻度は、直腸か

ら上行結腸まで漸増するという報告がなされ、癌の発生母地としての大腸は左右に二分されるのか、それとも連続性があるのかに関して議論となっている。しかし、前癌病変において分子病理学的特徴と部位の関連を調べた報告は現在までほとんどないため、今後の検討が期待されている。

2. 研究の目的

(1) 本研究の主目的は、大腸発癌の主要な分子機構と位置づけられてきた染色体不安定性の原因となる新規遺伝子を同定することであった。早期癌と腺腫が共存する前癌病変に着目し、早期癌部分のコピー数変化と腺腫部分の遺伝子変異プロファイルを比較することにより、発癌・進展予測が可能なバイオマーカーを抽出する予定であった。更に、病変部位や拡大内視鏡像などの臨床病理学的因子との対比を行い、腺腫の段階での臨床所見による発癌・進展の予測可能性の検討を行う予定としていた。

しかし、実際のところ、質の高い臨床検体(腺腫内癌)の確保が困難となり、比較ゲノムハイブリダイゼーション (CGH) アレイ法などの解析を十分行い得なかった。また、全エクソンシーケンス解析を行う予定とされていたが、良質な検体を確保できなかったこと、解析費用が高額となることなどにより、こちらも行い得なかった。

(2) そのため、研究対象を、良質な検体が確保されていた *BRAF* 遺伝子変異を伴う大腸前癌病変(鋸歯状病変)に変更した。鋸歯状病変の分子学的、また臨床病理学的特徴を明らかにするため、*BRAF* 遺伝子変異陽性の前癌病変において、癌関連遺伝子のメチル化解析を行い、臨床病理学的因子、特に病変の発生部位(亜部位)との関連の検討を行うこととした。

3. 研究の方法

94名の大腸ポリープ患者から得られた *BRAF* 遺伝子変異陽性の大腸前癌病変106病変を対象とした。また、106病変のうち83病変の(正常)背景粘膜の解析も併せて行った。

前癌病変(主として鋸歯状病変)の病理診断は臨床情報、分子学的情報を知らされない消化管病理医により行われた。また、臨床情報として、患者の年齢、性別、病変の発生部位(盲腸、上行結腸、横行結腸、下行結腸、S状結腸、直腸)、形態、大きさが記録された。

生検で得られた検体からDNAが抽出され、*BRAF* 遺伝子変異に関して、パイロシーケンス法により前もって変異が確認された。また、癌に関連する14遺伝子(うち5つは古典的なCIMPマーカー)のメチル化がパイロシーケンス法によって定量的に解析された。15%以上でメチル化陽性とし、古典的なCIMPマーカー(*MINT1*, *MINT2*, *MINT12*, *MINT31*, *MLH1*) 5つ

のうち、3 マーカー以上のメチル化陽性で CIMP 陽性と判定した。最終的に、分子学的情報（病変内における各々の遺伝子メチル化の有無と程度、CIMP の状態）と臨床病理学的情報の統合解析を行った。

4. 研究成果

(1) 病変の臨床病理学的特徴

BRAF 遺伝子変異を伴う病変は、病理学的には過形成性ポリープ 16 病変、TSA 15 病変、TSA と SSA の併存病変 6 病変、SSA 49 病変、SSA に細胞異型 (cytological dysplasia, 腺腫性変化) を伴った病変 9 病変、SSA に早期癌 (high-grade dysplasia) を伴った病変 7 病変、従来型の腺腫 3 病変、早期癌 1 病変であった。従来報告同様、病変は右側結腸優位に分布していた。また、SSA は盲腸から横行結腸に、TSA は S 状結腸、直腸に多く同定された。興味深いことに、TSA に SSA を伴った病変は上行結腸、横行結腸に認められた。

(2) 病変内のメチル化と病変部位との関連

ゲノムワイドなメチル化の異常である CIMP の頻度は病変部位と強く関連し、盲腸から下行結腸で高頻度であり、S 状結腸、直腸では低頻度であった。また、CIMP の頻度は、直腸から上行結腸まで連続して増加するわけではなく、S 状結腸下行結腸移行部を境界として大きく異なっていた (図 1)。ロジスティック回帰分析では、大腸を S 状結腸下行結腸移行部で分類すると、腫瘍の部位と CIMP の状態が最も有意に関連することが示された (Table 1)。SSA の癌化に大きく関与する *MLH1* 遺伝子のメチル化は、上行結腸、横行結腸、下行結腸の病変においてみられた。

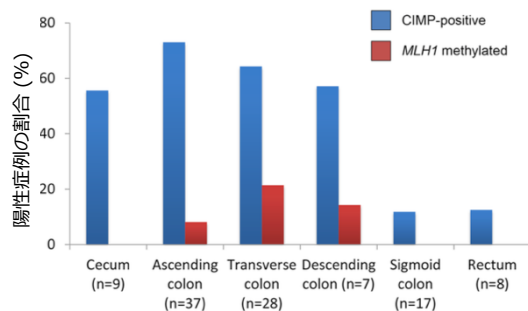


図1. 大腸の亜部位ごとのCIMP, *MLH1*メチル化の頻度

Demarcation	OR (95% CI)	P
C-A	1.39 (0.36-5.46)	0.447
A-T	2.9 (1.37-6.13)	0.004
T-D	7.14 (2.81-18.18)	0.000011
D-S	13.89 (3.91-50.00)	0.000001
S-R	9.52 (1.16-76.92)	0.018

Table1. CIMPの状態と病変部位との関連

(3) 病理組織型、病変の大きさとメチル化の関連

次に各病理組織型について、CIMP、*MLH1* メチル化の頻度を調べた。CIMP は過形成性ポリープ、TSA においては低頻度であったが、SSA、SSA に細胞異型を伴った病変、SSA に早期癌を伴った病変においては高頻度に認められた。興味深いことに、TSA と SSA の併存病変においては、SSA と同様に高頻度に CIMP が認められた (図 2)。また、*MLH1* 遺伝子メチル化は、過形成性ポリープや TSA では認められず、SSA、SSA に細胞異型を伴った病変では低頻度であった。一方、SSA に早期癌を伴った病変では高率に *MLH1* 遺伝子メチル化が認められた。このことは、SSA が CIMP 陽性、マイクロサテライト不安定性陽性大腸癌の前癌病変であり、細胞異型 (腺腫性変化) を伴った病変から早期癌に至る過程で *MLH1* 遺伝子のメチル化が関与するという従来報告に一致していた。

また、病変の大きさとメチル化の関連に関しては、従来報告と同様、(統計学的に有意差は認められなかったが) より大きい病変で CIMP、*MLH1* メチル化の頻度が高い傾向がみられた (図 3)。

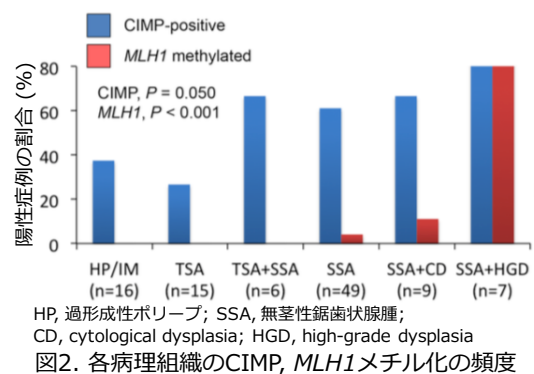


図2. 各病理組織のCIMP, *MLH1*メチル化の頻度

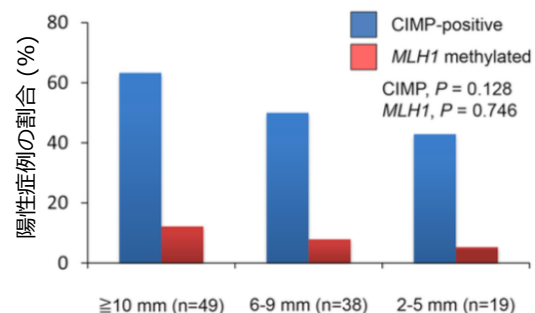


図3. 病変の大きさとCIMP, *MLH1*メチル化の頻度

(4) 腫瘍関連遺伝子メチル化の発生部位別の検討

次に、大腸癌において高頻度にメチル化が報告されている癌関連遺伝子のプロモーターのメチル化を解析した。*RASSF2*, *miR-34b/c*, *CDKN2A*, *IGFBP7*, *SOX5*, *GALNT14*, *LRP1B* 遺伝子の遺伝子メチル化レベルは、S 状結腸、直腸の病変と比較して、盲腸から下行結腸において高かった (図 4, 一部の遺伝子のみ提示)。

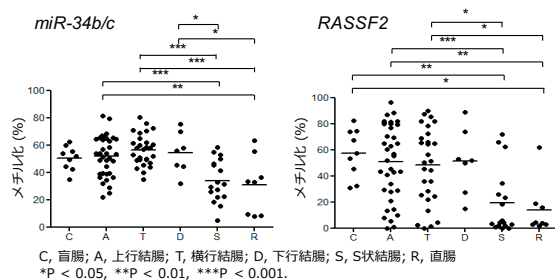


図4. *BRAF*遺伝子変異を伴う病変における部位別の遺伝子メチル化

(5) (正常) 背景粘膜のメチル化の部位別の検討

部位別に検討すると、病変内では特定の遺伝子メチル化に差が認められたが、背景粘膜では部位によって差がなかった(図5, 一部の遺伝子のみ提示)。このことより *BRAF* 遺伝子変異を伴う前癌病変において、メチル化に伴う領域がん化 (field cancerization) の関与が乏しいことを確認した。

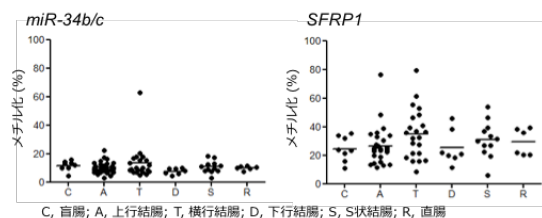


図5. *BRAF*変異病変の背景粘膜における部位別の遺伝子メチル化

本研究で、*BRAF* 遺伝子変異を伴う前癌病変において、癌関連遺伝子のメチル化は病変の亜部位、病理組織学的所見と強く関連していることが示された。それにより、S状結腸より近位に存在する鋸歯状病変は発癌可能性が高いため、早期治療が望ましいと考えられた。

<引用文献>

- ① Sawada T, Yamamoto E, Suzuki H, Nojima M, Toyota M, Itoh F, Sugai T et al. Association between genomic alterations and metastatic behavior of colorectal cancer identified by array-based comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 52:140-149, 2013
- ② Yamamoto E, Suzuki H, Yamano HO, Nojima M, Sawada T, Sugai T, Toyota M et al. Molecular dissection of premalignant colorectal lesions reveals early onset of the CpG island methylator phenotype. *Am J Pathol* 181:1847-1861, 2012

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)

- ① Sawada T, Yamamoto E, Yamano HO,

Nojima M, Harada T, Maruyama R, Ashida M, Aoki H, Matsushita HO, Yoshikawa K, Harada E, Tanaka Y, Wakita S, Niinuma T, Kai M, Eizuka M, Sugai T, Suzuki H. Assessment of epigenetic alterations in early colorectal lesions containing *BRAF* mutations. *Oncotarget* 7:35106-18, 2016. 査読あり。 [DOI: 10.18632/oncotarget.9044.]

[学会発表] (計2件)

- ① Sawada T, Yamamoto E, Yamano HO, Harada T, Sugai T, Suzuki H. Methylation analysis of colorectal precursor lesions with *BRAF* mutations and their background mucosa. 欧州消化器病週間 (UEGW) 2015年10月24日~28日、バルセロナ (スペイン)
- ② 澤田 武, 山本 英一郎, 山野 泰穂, 野島 正寛, 原田 拓, 青木 敬則, 新沼 猛, 丸山 玲緒, 甲斐 正広, 片岡 洋望, 菅井 有, 鈴木 拓, 城 卓志. *BRAF* 遺伝子変異を伴う大腸前癌病変と背景粘膜のメチル解析. 第74回日本癌学会学術総会 2015年10月8日~10日、名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤田 武 (SAWADA, Takeshi)

金沢大学・医学保健学総合研究科・特任准教授

研究者番号: 60345626

(2) 研究分担者

鈴木 拓 (SUZUKI, Hiromu)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号: 20381254

山本英一郎 (YAMAMOTO, Eiichiro)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号: 60345626

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

山野泰穂 (YAMANO, Hiro-o)

札幌医科大学・医学部・准教授

菅井 有 (SUGAI, Tamotsu)

岩手医科大学・医学部・教授

野島 正寛 (NOJIMA, Masanori)

東京大学医科学研究所附属病院・准教授