

令和元年6月3日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09304

研究課題名(和文) 大腸鋸歯状腺腫を前癌病変とする新たな大腸発癌経路の同定と発癌メカニズムの解明

研究課題名(英文) Molecular analysis of traditional serrated adenoma as a candidate precursor of alternative serrated pathway

研究代表者

澤田 武 (Sawada, Takeshi)

金沢大学・附属病院・医員

研究者番号：60345626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：新たな大腸発癌経路の同定と分子機構の解明のため、その前癌病変と考えられている大腸鋸歯状腺腫(TSA)を含む大腸鋸歯状病変を対象として、主としてWntシグナル経路に属する遺伝子変異解析、およびメチル化解析を行った。無茎性鋸歯状腺腫(SSA)と比較し、TSAではWntシグナル関連分子の遺伝子変異とSMOC1遺伝子メチル化が高頻度にみられ、SSAとは異なるTSA独自の発癌経路の存在が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、従来より想定されてきた大腸鋸歯状腺腫(TSA)を前癌病変とする発癌経路の存在が示された。また、他の鋸歯状病変と比較してWntシグナル経路の異常が大きく関与していることが明らかとなった。今後、大腸鋸歯状病変の進展・発育により形成されると考えられている高悪性度大腸癌と分子プロファイルを比較することにより、TSAから高悪性度大腸癌に至る新たな発癌経路が確立できる。また、予後不良の高悪性度大腸癌に対する分子標的治療の開発に応用できる。

研究成果の概要(英文)：To clarify the molecular and clinicopathological characteristics of colorectal serrated lesions, we examined the mutation and methylation of cancer-associated genes in 78 serrated lesions, including traditional serrated adenomas (TSAs) and sessile serrated adenomas (SSAs). The prevalence of mutations in genes associated with Wnt signaling pathway was significantly higher in TSAs than SSAs. In addition, SMOC1 methylation was detected in 54.1% of TSAs but in no SSAs. These results suggest the presence of distinct carcinogenic pathways of TSAs from other precursor lesions. Furthermore, we detected significant differences in clinicopathological and molecular variables between TSAs with KRAS or BRAF mutation, which may indicate the presence of separate carcinogenic pathways among TSAs.

研究分野：消化器癌

キーワード：大腸癌 大腸鋸歯状腺腫 遺伝子メチル化 遺伝子変異

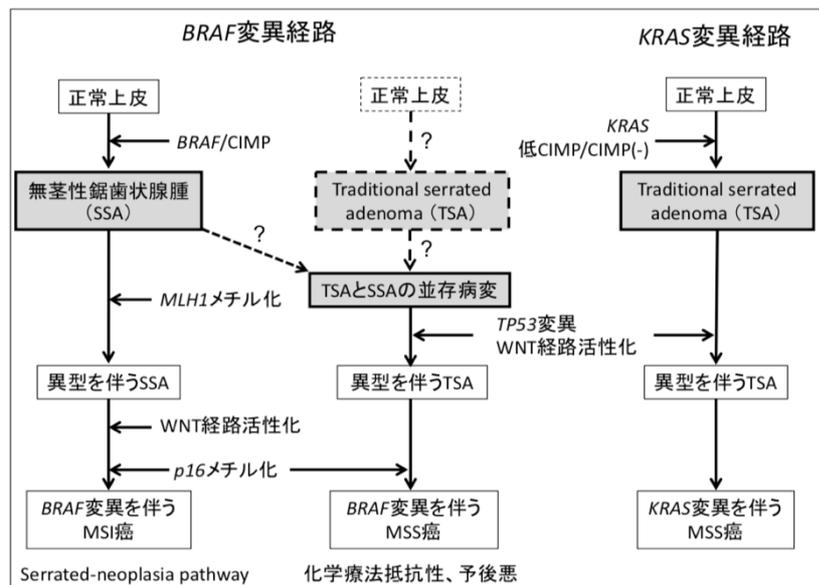
様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

従来、古典的な大腸発癌経路として、腺腫から段階的に遺伝子変異と染色体不安定性（遺伝子の欠失、増幅）を伴って発生、進展する腺腫-癌連関（adenoma-carcinoma sequence）が提唱されてきた。近年、第2の発癌経路として、無茎性鋸歯状腺腫（sessile serrated adenoma, SSA）を前癌病変とし、*BRAF* 遺伝子変異、ゲノムワイドな DNA メチル化である CpG island methylator phenotype (CIMP)、マイクロサテライト不安定性（microsatellite instability, MSI）を伴って発癌する経路（serrated-neoplasia pathway）が確立された。さらに、大腸鋸歯状病変から発癌する第3の経路（alternative serrated pathway）が存在すると考えられているが、詳細は不明である。

大腸鋸歯状病変は過形成性ポリープ、SSA、鋸歯状腺腫（traditional serrated adenoma; TSA）に分類される。SSA 同様、TSA も前癌病変とされているが、発癌経路は明らかにされていない。TSA は分子学的に不均一であり、*BRAF* 遺伝子変異を伴う病変、*KRAS* 遺伝子変異を伴う病変が存在する。

近年になって、serrated-neoplasia pathway に加えて、SSA から TSA と SSA の並存病変を介して異型を伴う TSA が生じ、化学療法抵抗性で予後の悪いマイクロサテライト安定（microsatellite stable; MSS）進行癌に至る経路が提唱された（両経路を併せて *BRAF* 変異経路という名称も提唱された）。しかし、TSA は SSA から生じて発癌するのか、SSA とは別の発癌ルートが存在するのかが明らかになっていない（右図）。



2. 研究の目的

本研究の当初の目的は、大腸鋸歯状病変（TSA、SSA、TSA と SSA の並存病変）の網羅的な遺伝子発現プロファイルの解析により、各々の大腸鋸歯状病変と、従来報告された鋸歯状病変由来の高悪性度大腸癌のプロファイルを比較し、どの病変が予後不良の進行癌へ進展するのかを明らかにすることであった。また、鋸歯状病変同士の発現プロファイルの類似性を検討し、鋸歯状病変の新たな発癌経路を明らかにすることであった。

加えて、大腸鋸歯状病変の進展への関与が予測されている経路の遺伝子変異、遺伝子メチル化の検討を行い、TSA の癌化に重要な遺伝子変化を明らかにし、変異遺伝子、メチル化遺伝子のプロファイルを比較、さらに内視鏡所見・病理学的所見と対比することにより、TSA の段階で高悪性度大腸癌（MSS 癌）への進展予測が可能かどうかを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

当初、遺伝子発現の網羅的解析を行うため、病変と病変周囲からの生検検体を使用する予定であったが、検体の集積が不十分であったため、実行が困難となった。そのため、金沢大学と研究協力施設の倫理審査委員会の承認を得て既に採取され、保有している大腸鋸歯状病変のパラフィン包埋ホルマリン固定（FFPE）標本、計 78 検体（TSA 37 病変、SSA 18 病変、microvesicular hyperplastic polyp; MVHP 23 病変）を対象とし、遺伝子変異、メチル化の解析を行うこととした。

DNA を抽出した後、鋸歯状病変で従来変異が報告されている *APC*, *TP53*, *KRAS*, *BRAF*, *RNF43* 遺伝子に加えて、大腸進行癌で変異が報告されている Wnt シグナル経路関連遺伝子である *CTNBN1*, *AXIN2*, *DKK1-4*, *FAM123B*, *ARID1A*, *TCF7L2*, *SOX9* など、39 遺伝子を含む変異解析パネルを作成し、次世代シーケンサーを用いて変異解析を行った。同遺伝子群周囲のコピー数変化に関しても、Ion Reporter Software を用いて解析を行った。

また、CIMP マーカー（*MINT1*, *MINT2*, *MINT12*, *MINT31*, *MLH1*, *CDKN2A*）や他の癌関連遺伝子（*SFRP1*, *SFRP2*, *IGFBP7*, *SOX5*, *GALNT14*）のメチル化の定量的解析をパイロシーケンス法によって行った。各遺伝子で 15%以上のメチル化で、メチル化陽性とし、CIMP マーカーのうち、3 遺伝子以上のメチル化陽性で CIMP 陽性、4 遺伝子以上のメチル化陽性で高度 CIMP 陽性とした。さらに、39 検体において、Wnt シグナル経路の亢進を反映するとされる β カテニンの免疫組織化学による検討を行った。

4. 研究成果

大腸鋸歯状病変 78 病変において、39 遺伝子について全エクソンの変異解析を行った。1 サンプルあたり平均 2.4 の変異が認められた。*BRAF* 遺伝子変異がもっとも多く (78 例中 53 例、67.9%)、次いで *RNF43* (25.6%)、*KRAS* (20.5%)、*APC* (16.3%) の順に変異頻度が高かった (図 1)。

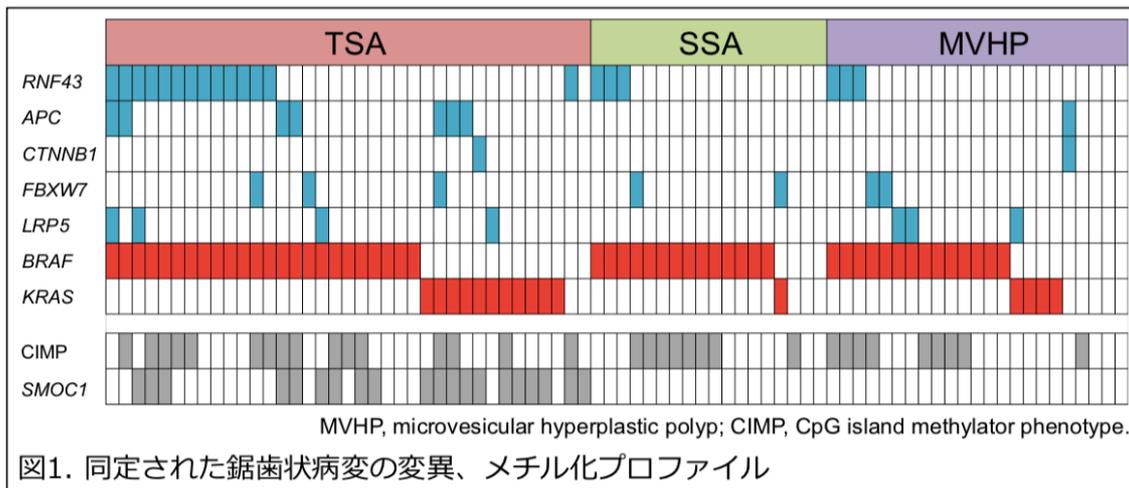


図1. 同定された鋸歯状病変の変異、メチル化プロファイル

RNF43 遺伝子変異は TSA の 38% に、SSA の 17% に認められた。*APC* 遺伝子変異は TSA の 19% に認められた一方、SSA では認められなかった。(図 2 の青色で示された) Wnt シグナル関連分子の変異を 1 遺伝子以上認めた検体の頻度は、SSA と比較して、TSA で有意に高かった (62% 対 28%、 $P = 0.02$)。

免疫組織化学による解析は 39 病変 (TSA 14 病変、SSA 13 病変、MVHP 12 病変) において行い得たが、SSA と比較して、TSA において有意に β カテニンの核内集積が高頻度であった。また、全 39 病変で、*RNF43*、*APC*、*CTNNB1* 遺伝子のいずれか 1 遺伝子以上の変異を伴う病変は、伴わない病変に比較して、より β カテニンの核内集積が高頻度であった。このことは、TSA において、Wnt シグナル関連分子の遺伝子変異が実際に経路の亢進に関連し、発癌に寄与している可能性が示された。

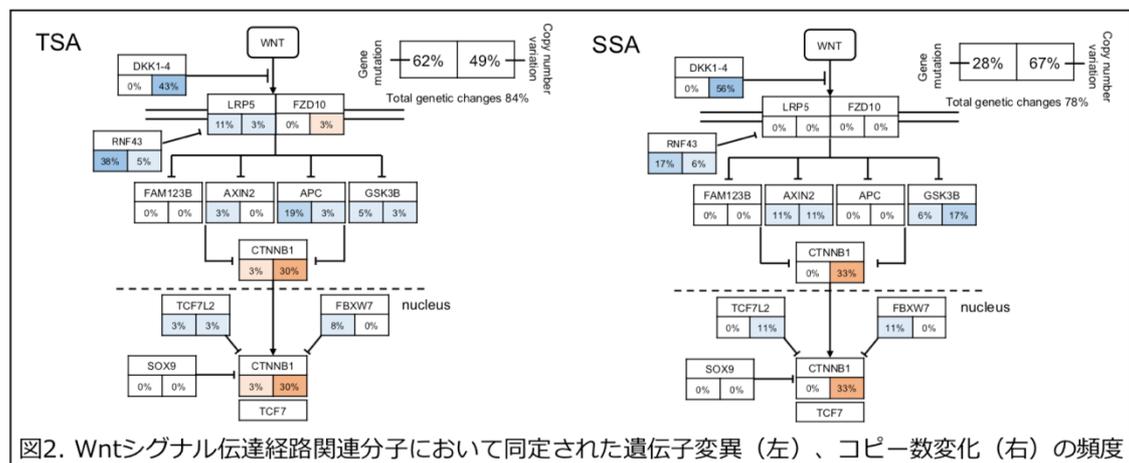


図2. Wntシグナル伝達経路関連分子において同定された遺伝子変異 (左)、コピー数変化 (右) の頻度

一方、遺伝子メチル化に関しては、CIMP 陽性病変の頻度は、TSA と SSA で差がなかった。しかし、*SMOC1* 遺伝子メチル化に関しては、TSA の 37 病変中 20 病変 (54.1%) でメチル化陽性であったが、SSA の 18 病変には認められなかった ($P < 0.01$ 、図 1)。この結果は、従来報告された Aoki らの結果 (引用文献①) を裏付けるものであった。さらに、*SMOC1*、*SFRP1*、*SFRP2* のメチル化レベルは SSA や MVHP と比較して、TSA で有意に高かった。上記の結果により、SSA と比較し、TSA では Wnt シグナル関連分子の遺伝子変異と蛋白発現の亢進、*SMOC1* 遺伝子メチル化が高頻度にみられ、SSA とは異なる TSA 独自の発癌経路の存在が示された。

また、前述のごとく、TSA には *BRAF* 変異陽性の病変と *KRAS* 変異陽性の病変とが存在するが、両病変の発癌メカニズムが同一か異なるかは明らかではなかった。そのため、本研究では、*BRAF* 遺伝子変異陽性病変と *KRAS* 遺伝子変異陽性病変に亜分類し、比較を行った。*BRAF* 遺伝子変異陽性病変は、*KRAS* 遺伝子変異陽性病変と比較して、より近位大腸に発生する傾向にあった。*RNF43* 遺伝子変異陽性病変、高度 CIMP 陽性病変は、*BRAF* 遺伝子変異を伴う病変のみにみられ、*KRAS* 遺伝子変異陽性病変にはみられなかった。反対に、*SMOC1* メチル化陽性病変は *BRAF*

遺伝子変異と比較して、*KRAS* 遺伝子変異陽性病変に高頻度にみられた (81.8% 対 37.5%、 $P = 0.03$ 、図 1)。上記の結果から、TSA は独自の発癌経路をもつことが示唆されたが、その経路も一つではなく、複数の発癌経路が存在する可能性が示唆された。

まとめると、本研究の結果から、従来提唱されてきた、管状腺腫を前癌病変とする adenoma-carcinoma sequence、SSA を前癌病変とする serrated-neoplasia pathway とは異なる、TSA を前癌病変とする第 3 の大腸発癌経路の存在が示された。また、第 3 の発癌経路においても、複数の発癌経路が存在する可能性も示唆された。近年、遺伝子発現の網羅的解析から、化学療法に抵抗性を示す高悪性度大腸癌が鋸歯状病変由来であることが示唆されている(引用文献②)。今後、高悪性度大腸癌と分子プロファイルを比較することにより、TSA が高悪性度大腸癌の前癌病変であることが確立されれば、本研究の結果は、Wnt シグナル経路を標的とした新たな分子標的治療や化学予防の開発に資することができると考えられる。

<引用文献>

- ① Aoki H, Yamamoto E, Takasawa A, et al. Epigenetic silencing of *SMO1* in traditional serrated adenoma and colorectal cancer. *Oncotarget* 2018; 9: 4707-4721.
- ② De Sousa E Melo F, Wang X, Jansen M, et al. Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions. *Nat Med* 2013; 19: 614-618.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

- ① Sawada T, Nakanishi H, Kaizaki Y, Sasaki Y, Yamamoto E, Aoki H, Eizuka M, Takahashi N, Hasatani K, Kubota E, Kataoka H, Ota R, Yanase Y, Inagaki S, Yamada S, Minamoto T, Suzuki H, Sugai T. Integrative analysis of gene mutations and DNA methylation in colorectal serrated lesions. United European Gastroenterology Week 2018 2018 年
- ② 澤田 武、中西宏佳、佐々木泰史、山本英一郎、青木敬則、永塚 真、高橋直樹、太田亮介、久保田英嗣、片岡洋望、源 利成、菅井 有、鈴木 拓. 大腸鋸歯状病変における遺伝子変異、コピー数変化、DNA メチル化の統合解析. 第 77 回日本癌学会学術総会 2018 年
- ③ 中西宏佳、澤田 武、海崎泰治、佐々木泰史、山本英一郎、青木敬則、永塚 真、高橋直樹、波佐谷兼慶、久保田英嗣、片岡洋望、太田亮介、稲垣聡子、山田真也、源 利成、鈴木 拓、菅井 有. 大腸鋸歯状病変における遺伝子変異、メチル化の統合解析. 第 60 回日本消化器病学会総会 2018 年

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：山本 英一郎

ローマ字氏名：Eiichiro Yamamoto

所属研究機関名：札幌医科大学

部局名：分子生物学講座

職名：講師

研究者番号 (8 桁)：60567915

(2)研究協力者

研究協力者氏名：鈴木 拓

ローマ字氏名：Suzuki Hiromu

所属研究機関名：札幌医科大学

部局名：分子生物学講座

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：20381254

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。