

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15088

研究課題名(和文)大腸腫瘍における体細胞染色体コピー数変化の網羅的解析

研究課題名(英文)Comprehensive molecular analysis based on somatic copy number alterations in colorectal tumors

研究代表者

永塚 真(Eizuka, Makoto)

岩手医科大学・医学部・任期付助教

研究者番号：90815937

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：大腸腫瘍におけるゲノム、エピゲノム変化を解析し、体細胞コピー数変化(somatic copy number alteration, SCNA)との関連について検討した。大腸腺腫、粘膜内癌、固有筋層浸潤癌について腺管分離法により腫瘍腺管を採取しそのSCNA解析結果について階層的クラスター解析を行った。CNAの頻度から3つのsubgroupに分類された。subgroup1 (SB1)は多くのCNAに特徴付けられSB3ではCNAは少なく、SB2は中間的であった。CNA異常領域ではSB1は2,3に比してSB2は3に比してgain, overallで有意に長かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸腫瘍(腺腫、粘膜内癌、固有筋層浸潤癌)における体細胞コピー数変化(somatic copy number alteration, SCNA)を解析し、その結果を階層的クラスター解析を行うことで恣意性なくSCNAの発現パターンを比較検討し、癌の浸潤の際には多くのSCNAの蓄積が重要な役割を担うことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We aimed to identify the molecular profiles of early colorectal carcinogenesis based on SCNAs. A single nucleotide polymorphism array was used to examine 100 colorectal IMNs (low-grade adenoma [LGA], 40; high-grade adenoma [HGA], 25; intramucosal adenocarcinoma [IMA], 35) and early invasive CRC (20 tumors). Hierarchical clustering analysis based on the SCNA pattern was carried out to identify molecular profiles in IMNs and early invasive CRC. Colorectal tumors were classified into three subgroups based on SCNA patterns. Subgroup 1 was characterized by multiple SCNAs, subgroup 3 was closely associated with infrequent SCNAs, and subgroup 2 was an intermediate subgroup in SCNA pattern between subgroups 1 and 3. Considerable SCNAs may be required for acquisition of invasive ability in CRC.

研究分野：腫瘍発生

キーワード：大腸腫瘍 体細胞コピー数変化

1. 研究開始当初の背景

大腸癌の発癌経路として、1) adenoma-carcinoma sequence, 2) serrated pathway, 3) de novo pathway が主に知られている。1)は腺腫を介して癌が発生する際に *APC*, *KRAS*, *TP53* 変異が発生し、種々の程度に染色体異常 (コピー数変化, copy number alteration, CNA) を蓄積することにより進行癌へとプロGRESSIONする。3) の分子異常は十分に明らかにされていないが、正常粘膜から直接癌が発生するもので、*TP53* 変異と染色体異常が腫瘍発生に中心的な役割を担うことが指摘されている。一方、2)は正常粘膜から *BRAF* 変異によって過形成性ポリープが発生し、ゲノムワイドのメチル化の蓄積により sessile serrated adenoma/ polyp (SSA/P) が引き起こされる。最終的には *MLH1* のメチル化により microsatellite instability (MSI) が出現し、マイクロサテライト領域の変異の蓄積により MSI 陽性の癌が発生する。1)と 3)から発生する癌は染色体異常を共通として、chromosomal instability (CIN) 型大腸癌に分類され、2)は microsatellite instability (MIN) 型大腸癌に分類される。このように大腸癌は分子病型としては CIN 型と MIN 型に分類されるが、大腸癌の多くは CIN 型である。大腸癌の 80~90%は腺腫を介して発生することが知られており、上述のように *APC*, *KRAS*, *TP53* 変異が重要な役割を担っていることが指摘されてきた。一方で次世代シーケンサーの普及により癌細胞の変異について新しい知見が明らかにされ、それによると大腸癌においては発生初期にドライバー遺伝子の変異が起こり (*APC*, *KRAS*, *TP53*, *PIK3CA*, *BRAF* 変異), その後に爆発的な頻度で発生する rare variant 変異の蓄積により癌の浸潤・転移が引き起こされるとされる。このように変異の無秩序な蓄積が進行癌の特徴であるが、変異の異常な蓄積を引き起こす機序については明らかにされていない。我々は総量的なコピー数 (copy number alteration, CNA) の変化が高グレード腺腫の状態ですでに起きているが (図 1) (Eizuka M, Sugai T, et al. J Gastroenterol. 2017; 52: 1158-1168), 一方で進行癌の状態ではそれとは比較にならない量のコピー数の異常蓄積が起きていることも明らかにした (図 2) (Takahashi Y, Sugai T, et al. Int J Cancer. 2016; 139: 2493-2501). このことはコピー数異常の観点からは高グレード腺腫から粘膜内癌の段階と粘膜下層に深に浸潤する段階の 2 段階変化が起きていることを示唆している。さらにこのことは進行癌において無数に発生する遺伝子変異を規定する因子としてコピー数変化が重要であることを示している。

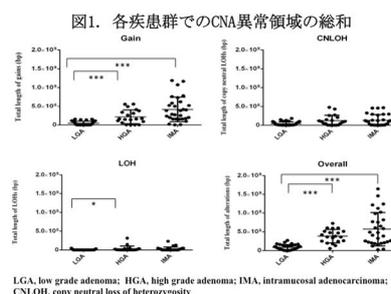


図1. 各疾患群でのCNA異常領域の総和

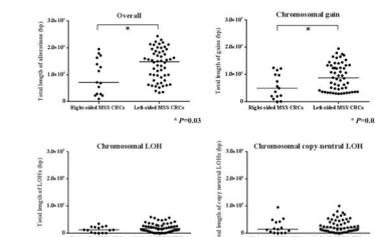
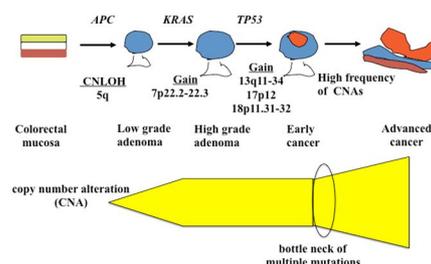


図2. MSS型進行大腸癌のCNAにおける左右差の比較

2. 研究の目的

本研究では CNA の大腸癌におけるプロGRESSION過程の役割を明らかにすることを目的に同一腫瘍において粘膜内癌と浸潤癌におけるコピー数変化の違いを検討することを目的とした。その学術的独自性として大腸進行癌についてのコピー数変化の報告はみられるがその前駆

図3. Adenoma-carcinoma sequenceとCNAの関わり



病変である大腸腺腫や粘膜内癌における報告，そしてその結果と進行癌におけるコピー数変化の頻度，異常領域の総和の比較を行った研究はみられない。したがって大腸腺腫，粘膜内癌におけるコピー数変化の解析は本邦から独自に発信される研究成果となり得，大腸腫瘍の初期の腫瘍発生，プログレッションの理解に有用な情報を提供できる研究と考えられる。またその結果と進行癌におけるコピー数変化の比較は癌が浸潤する際に律速段階となりうる変化がどの染色体領域で起きているのかを明らかにし，癌が粘膜下層浸潤し進行癌へ変化するメカニズムの解明に貢献すると考えられる（図 3）。本研究は腺管分離法を施行し間質の混在のない純粋な腫瘍腺管を用いることで，より精度の高い解析が行える。

3．研究の方法

初期の大腸腫瘍のプログレッションに重要な遺伝子の同定，癌の浸潤の際に要となる遺伝子の同定を目標に以下の様に研究を進める。

内視鏡的粘膜切除術，内視鏡的粘膜下層剥離術検体，外科手術検体を用い 120 例の症例（低グレード腺腫 40 例，高グレード腺腫 25 例，粘膜内癌 35 例，進行癌 20 例）の集積を目標とする。

1. 検体を収集し既報に基づき腺管分離法を施行する
2. DNAを抽出し，HumanCytoSNP-12v2.1 BeadChip を用いてコピー数変化解析を行う。判定についてはillumina社のアルゴリズムに則り判定を行う。
3. 検体の病理標本から大腸癌取扱い規約第9版に則り大腸腫瘍の組織学的診断を行う。
4. 各疾患群ごとにコピー数変化の頻度，染色体異常領域の総和を算出する。
5. 各疾患群でコピー数変化の差異を認めた遺伝子座から候補遺伝子を抽出する。

4．研究成果

Somatic Copy number alteration (SCNA)は大腸癌で浸潤の際に多数みられることが明らかにされているが、大腸腺腫、粘膜内癌、浸潤癌における頻度、さらに癌関連遺伝子変異、DNAメチル化状態、microsatellite instability (MSI)との関連は明らかでない。今回我々は大腸腫瘍におけるゲノム、エピゲノム変化を解析し、SCNAとの関連について検討した。大腸腺腫65例 [low grade adenoma (LGA) 40例, high grade adenoma (HGA) 25例]、粘膜内癌 (intramucosal cancer: IMC) 35例、固有筋層浸潤癌20例について腺管分離法により腫瘍腺管を採取後、DNAを抽出し、HumanCytoSNP-12v2.1 BeadChip を用いてSCNA解析を行った。Gain, loss of heterozygosity (LOH), copy neutral LOHに分類し、その頻度、染色体異常領域から階層的クラスター解析を行い各subgroup間のCNA頻度、異常領域と*BRAF*, *KRAS*, *TP53*遺伝子変異、DNAメチル化状態、MSIとの関連を調べた。CNAの頻度から3つのsubgroupに分類された。subgroup1は多くのCNAに特徴付けられsubgroup3ではCNAは少なく、subgroup2は中間的であった。CNA異常領域ではsubgroup1は2,3に比してsubgroup2は3に比してgain, overallで有意に長かった。組織像ではsubgroup1は固有筋層浸潤癌がsubgroup3ではLGAが多かった。IMC, HGAでは有意差はみなかった。Subgroup1,2は3に比して*TP53*変異が多かった。*KRAS*, *BRAF*変異、DNAメチル化状態についてはsubgroup間で有意差はみなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sugai T, Eizuka M, Habano W, et al.	4. 巻 9
2. 論文標題 Comprehensive molecular analysis based on somatic copy number alterations in intramucosal colorectal neoplasias and early invasive colorectal cancers	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 22895-22906
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.25112	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 永塚真
2. 発表標題 Comprehensive molecular analysis based on somatic copy number alterations in intramucosal colorectal neoplasias and early invasive colorectal cancers.
3. 学会等名 日本消化器癌発生学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------