

103. 癌遺伝子変異陽性大腸癌の発癌機構の解明

金田 篤志

Key words : 大腸癌, 癌遺伝子, DNA メチル化

千葉大学 大学院医学研究院
分子腫瘍学

緒 言

大腸癌はゲノム異常とエピゲノム異常の蓄積により発症するが、その蓄積のされ方によって癌はサブタイプに層別化される。網羅的 DNA メチル化情報を用いると大腸癌は高・中・低メチル化群の 3 群に層別化される¹⁾。低メチル化群は癌遺伝子変異も非常に少ないサブグループであるのに対し、高メチル化群は右側結腸から発症し癌遺伝子 *BRAF* 変異と強く相関する。中メチル化群は癌遺伝子 *KRAS* 変異と非常に強く相関する。中メチル化 *KRAS* 変異(+)群は最も予後が悪く、また *KRAS* 変異(+)群は Cetuximab による標的治療にも応答しないなど、臨床的にも異なる癌症例サブグループである¹⁾。

大腸癌にはいくつかの発癌経路が知られる。腺腫-癌連関と呼ばれる隆起性腺腫からの発癌経路について²⁾、隆起性腺腫を層別化すると、*KRAS* 変異と強く相関する中メチル化群と、癌遺伝子変異のない低メチル化群の 2 群に大きく分けられる³⁾。それに対し鋸歯状腺腫と呼ばれる腺腫の一部は高メチル化や *BRAF* 変異を伴うことが知られ、鋸歯状経路が高メチル化大腸癌の発癌経路ではないかとも考えられている。平坦な早期病変から発症する *de novo* 経路では側方進展型腫瘍 (LST) が、*KRAS* 変異と相関する中メチル化群と、癌遺伝子変異のない低メチル化群の 2 群に大きく層別化される。前者は顆粒型 LST、後者は無顆粒型 LST、と肉眼的にも異なる早期病変の特徴であることも分かり、これら各サブタイプは全く異なる発癌経路の分子学的特徴と言えた⁴⁾。

一方で正常細胞に癌遺伝子の活性化が起きると、正常細胞は異常な細胞増殖に対する防御機構として不可逆な増殖停止に至ることが知られ、これを早期細胞老化という。早期細胞老化におけるエピゲノム変化の網羅的解析により、ダイナミックかつ協調的なヒストン修飾変化により重要なシグナルを制御していることを解明した。例えば *Bmp2-Smad1* シグナルの活性化はその一つであり、このシグナルの破綻は細胞老化による細胞増殖停止を回避させた⁵⁾。

本研究は、*BRAF* 変異(+)大腸癌、*KRAS* 変異(+)大腸癌の分子異常の網羅的解析、各癌遺伝子変異が誘導する早期細胞老化の必須因子の網羅的解析により、癌遺伝子変異(+)大腸癌の発癌分子機構を解明することを目的とした。ここでは *BRAF* 変異(+)大腸癌の分子異常の網羅的解析を中心に報告する。

方 法

大腸鋸歯状病変として 45 例の SSA/P (無茎性鋸歯状腺腫/ポリープ, sessile serrated adenoma/polyp), 14 例の TSA (鋸歯状腺腫, traditional serrated adenoma), および中・低メチル化早期病変の比較標本として 108 例の LST, さらに高メチル化大腸癌 17 例を解析した。

大腸癌層別化メチル化マーカー 20 個 (Group1 マーカー 6 個, Group2 マーカー 14 個) に対し、パイロシーケンス法により定量的メチル化解析を行った。

癌遺伝子 *KRAS*・*BRAF* の変異を質量分析器 MassARRAY (Sequenom) を用いて解析した。

さらにがんドライバー変異遺伝子⁶⁾、大腸がん重要シグナル関連遺伝子群を含む 126 個の遺伝子のエクソン全領域について HaloPlex (Agilent Technologies) を用いたキャプチャ・シーケンス法により、網羅的エクソン変異解析を行った。配列の解析は SureCall software (Agilent Technologies) を用いて行った。

結 果

高メチル化大腸癌と同様に SSA/P は右側結腸に有意に認められ ($P < 0.0001$), TSA は主に左側結腸に認められた. 癌遺伝子変異も高メチル化大腸癌と同様に SSA/P は *BRAF* 変異が高頻度, *KRAS* 変異が低頻度であり, TSA は有意に *BRAF* 変異が少なく ($P = 0.02$) *KRAS* 変異が多かった ($P = 0.003$) (図 1).

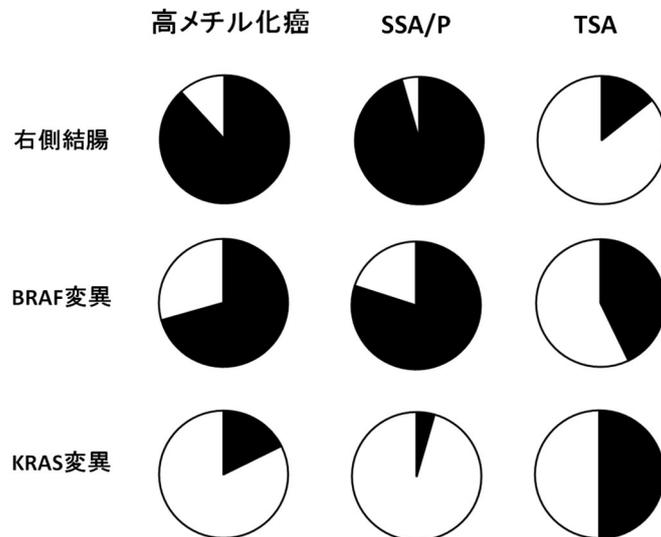


図 1. 高メチル化大腸癌, SSA/P, TSA の部位および癌遺伝子変異.

SSA/P では高メチル化大腸癌と同様に右側結腸に高頻度に認め, *BRAF* 変異を高頻度に認めた. それに対し TSA は左側結腸に認め, *BRAF* 変異は有意に低頻度であり *KRAS* 変異を有意に高頻度に認めた.

DNA メチル化解析の結果からも TSA は Group1 マーカーメチル化が見られず, Group2 マーカーメチル化が強く認められ, *KRAS* 変異が多いことも含めて顆粒型 LST と同様の特徴を示し, 中メチル化群を示すと考えられた. それに対し SSA/P は Group2 マーカーだけでなく Group1 も比較的高いメチル化レベルを示し, 高頻度の *BRAF* 変異も含めて高メチル化群を示した (図 2). 右側結腸の発症と合わせ, TSA ではなく, SSA/P が高メチル化大腸癌の前癌病変と考えられた.

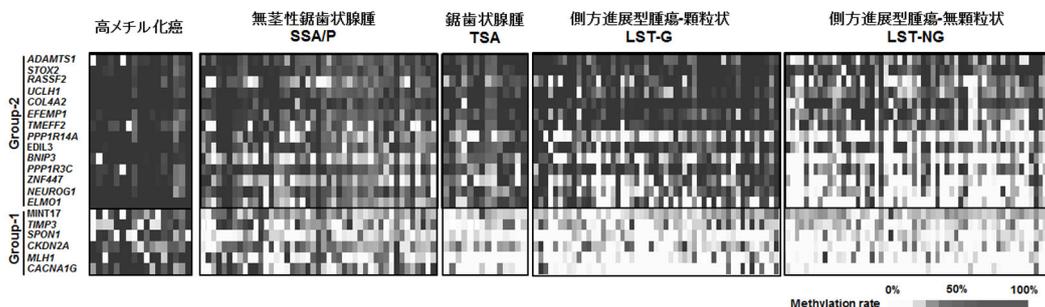


図 2. 大腸癌鋸歯状経路および *de novo* 経路の早期病変の DNA メチル化異常.

大腸癌鋸歯状経路の早期病変のうち SSA/P (無茎性鋸歯状腺腫/ポリープ) は高メチル化癌と同様の高メチル化を示した. TSA (鋸歯状腺腫) は LST-G と同様の中メチル化を示した. 高メチル化大腸癌は SSA/P と比較して *MLH1* などさらに異常メチル化蓄積が進行していた.

SSA/Pと比較し、高メチル化大腸癌は異常メチル化蓄積が進行していた。MLHIメチル化は高メチル化大腸癌のほとんどが陽性であったが、SSA/Pは36%にとどまった ($P < 0.0001$) (図2)。高メチル化大腸癌では免疫染色にてMLHI蛋白消失を認めたが、SSA/PではMLHIメチル化(+)症例であってもそのメチル化レベルは癌よりも低く、免疫染色でもMLHI蛋白消失は認めないか、ごく一部の腺管に認めるのみであった。

エクソン変異を高メチル化癌、MLHIメチル化(+) SSA/P、MLHIメチル化(-) SSA/P、TSAと比較した。高メチル化癌は、一塩基変異の頻度 ($P < 0.0001$) もindel (挿入・欠失) の頻度 ($P=0.002$) も、SSA/PやTSAと比較して有意に多かった。しかしMLHIメチル化(+) SSA/PとMLHIメチル化(-) SSA/P間では差がなかった ($P = 0.9$)。

個々の遺伝子で比較すると、126遺伝子のうち32遺伝子で、SSA/Pと比較して高メチル化大腸癌が有意に多い変異を示した。APC, ACVR2A, MSH3, MSH6など報告されている遺伝子も多く含んだ。BRAF変異は腺腫の段階ですでに生じており、癌と腺腫の間で陽性頻度に差はなかった。ミスマッチ修復遺伝子の変異は高メチル化大腸癌で有意に認められた。これまで報告されていたPI3K, WNT, TGF- β などのシグナルに加え、BMPシグナルの変異を高頻度に認めた (図3)。

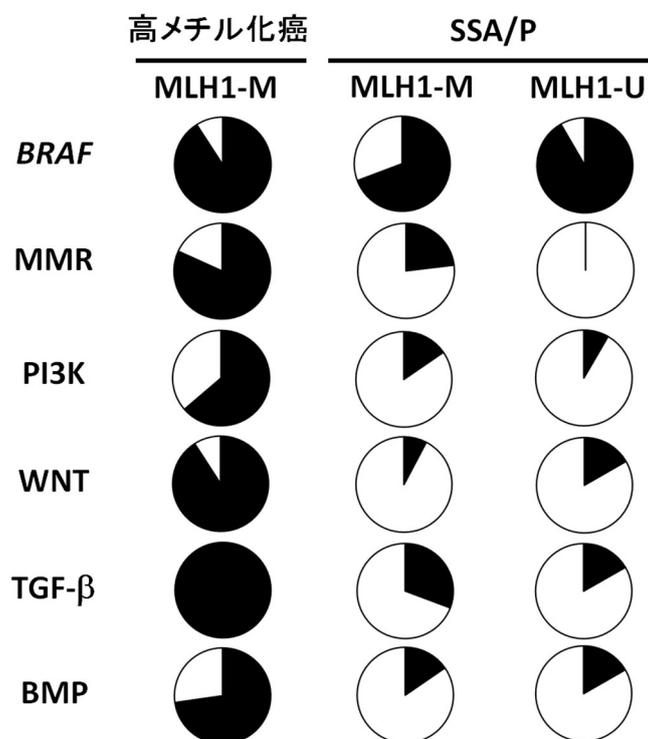


図3. エクソン変異解析.

癌関連遺伝子126個のエクソン変異をキャプチャーシーケンス法により解析した。高メチル化癌はSSA/Pは有意に変異が多く、ミスマッチ修復遺伝子(MMR)の高頻度な変異がその原因と考えられた。報告されているPI3K, WNT, TGF- β などのシグナルに加え、BMPシグナルの変異を高頻度に認めた。SSA/Pのうち、MLHIメチル化の有無では変異頻度に差はなく、またMLHIメチル化(+)症例であってもそのメチル化レベルは癌と比較して低いため、SSA/Pの段階で高変異形質の獲得に不十分と考えられた。

考 察

DNAメチル化および癌遺伝子変異の解析から、SSA/Pは高メチル化大腸癌と同様にGroup1マーカーおよびGroup2マーカーの高いメチル化レベルを認め、BRAF変異と強く相関した。両者とも右側結腸で有意に発症し、SSA/Pが高メチル化大腸癌の前癌病変と考えられた。それに対しTSAは明瞭に中メチル化プロファイルを示し、BRAF変異よりもむしろKRAS変異を高頻度に示し、左側結腸から発症した。

高メチル化大腸癌は SSA/P と比較して非常に高頻度の遺伝子変異を認めた。 *MLH1* メチル化だけでなく、 *MSH3*, *MSH6* などミスマッチ修復遺伝子群の高頻度の変異を認め、これらの異常がその原因と考えられた。 SSA/P は *MLH1* メチル化 (+) SSA/P, *MLH1* メチル化 (-) SSA/P ともに遺伝子変異は低く、その両者に差はなかった。 MLH1 メチル化 (+) 症例もそのメチル化レベルは低く、高遺伝子変異形質の獲得および発癌には不十分と思われた。

遺伝子変異は、報告されている PI3K, WNT, TGF- β シグナル関連遺伝子の変異を有意に高頻度に認める一方⁷⁾、大腸癌で高頻度に認める TP53 変異は高メチル化大腸癌では低頻度にとどまった。特筆すべきことに、 *BMP2*, *BMP2*, *SMAD4* など BMP シグナル関連遺伝子の変異を有意に高頻度に認めた。我々は以前線維芽細胞を用い、 *Bmp2* 発現上昇・ *Smad6* 不活化・ *Nog* 不活化など、 BMP シグナルの活性化が癌遺伝子変異誘導性細胞老化に必須であり、このシグナルの破綻が細胞老化回避・細胞増殖に至ることを報告している⁵⁾。大腸癌鋸歯状経路において、 *BRAF* 変異および BMP シグナル破綻が、発癌に寄与していると考えられた。本研究は、 *Int. J. Cancer* 誌に報告した⁸⁾。

共同研究者

本研究の共同研究者は横浜市立大学医学部肝胆膵消化器病学の酒井英嗣、中島 淳、NTT 東日本関東病院消化器内科の大圃 研、松橋信行、NTT 東日本関東病院病理診断部の土井紀輝、福島純一、埼玉県立がんセンター腫瘍診断・予防科の赤木 究、東京大学先端科学技術研究センターの八木浩一、油谷浩幸、東京大学大学院医学研究科人体病理学の阿部浩幸、深山正久、千葉大学大学院医学研究院分子腫瘍学の福世真樹、松坂恵介、眞野恭伸、高根希世子である。

文 献

- 1) Yagi, K., Akagi, K., Hayashi, H., Nagae, G., Tsuji, S., Isagawa, T., Midorikawa, Y., Nishimura, Y., Sakamoto, H., Seto, Y., Aburatani, H. & Kaneda, A. : Three DNA methylation epigenotypes in human colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.*, **16** : 21-33, 2010.
- 2) Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A. M. & Bos, J. L. : Genetic alterations during colorectal-tumor development. *New Engl. J. Med.*, **319** : 525-532, 1988.
- 3) Yagi, K., Takahashi, H., Akagi, K., Matsusaka, K., Seto, Y., Aburatani, H., Nakajima, A. & Kaneda, A. : Intermediate methylation epigenotype and its correlation to KRAS mutation in conventional colorectal adenoma. *Am. J. Pathol.*, **180** : 616-625, 2012.
- 4) Sakai, E., Ohata, K., Chiba, H., Matsushashi, N., Doi, N., Fukushima, J., Endo, H., Takahashi, H., Tsuji, S., Yagi, K., Matsusaka, K., Aburatani, H., Nakajima, A. & Kaneda, A. : Methylation epigenotypes and genetic features in colorectal laterally spreading tumors. *Int. J. Cancer*, **135** : 1586-1595, 2014.
- 5) Kaneda, A., Fujita, T., Anai, M., Yamamoto, S., Nagae, G., Morikawa, M., Tsuji, S., Oshima, M., Miyazono, K. & Aburatani, H. : Activation of Bmp2-Smad1 signal and its regulation by coordinated alteration of H3K27 trimethylation in Ras-induced senescence. *PLoS Genet.*, **7** : e1002359, 2011.
- 6) Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V. E., Zhou, S., Diaz, L. A. Jr. & Kinzler, K. W. : Cancer genome landscapes. *Science*, **339** : 1546-1558, 2013.
- 7) Cancer Genome Atlas Network : Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*, **487** : 330-337, 2012.
- 8) Sakai, E., Fukuyo, M., Ohata, K., Matsuoka, K., Doi, N., Mano, Y., Takane, K., Abe, H., Yagi, K., Matsushashi, N., Fukushima, J., Fukayama, M., Akagi, K., Aburatani, H., Nakajima, A. & Kaneda, A. : Genetic and epigenetic aberrations occurring in colorectal tumors associated with serrated pathway. *Int. J. Cancer*, DOI: 10.1002/ijc.29903, 2015.