

174. 潰瘍性大腸炎の炎症粘膜における微小遺伝子変異の検出

田原 智満

藤田保健衛生大学 医学部 消化管内科学講座

Key words : 潰瘍性大腸炎 (UC), 遺伝子メチル化, 微小遺伝子変異

緒 言

潰瘍性大腸炎 (UC) は慢性の経過をたどり緩解・再燃を繰り返す大腸粘膜の潰瘍、びらんを生じる原因不明の非特異性の炎症性疾患である。UC 患者は大腸癌の合併頻度が高く、広範囲かつ高度な炎症が長期間持続する例、大腸癌家族歴を有する例、硬化性胆管炎の合併例は高リスクとされ intensive surveillance が推奨される¹⁻³⁾。しかし、癌合併、高度炎症持続例などの症例ごとの heterogeneity を予測しうる因子の詳細は不明であり、癌リスク群に対して Surveillance colonoscopy 以外に効率よく癌合併を診断する方法論、バイオマーカーは確立されていない。

DNA メチル化による遺伝子転写活性の抑制は重要な発癌メカニズムとして認識されているが、DNA メチル化の亢進は高齢者の消化管粘膜でも認められることにより発癌早期の遺伝子変化として重要であると考えられる⁴⁾。UC の炎症粘膜では、特に加齢により認められる DNA メチル化 (age-related methylation) の亢進が認められ、UC 患者の腫瘍合併例で特にその頻度、割合が高いことから、DNA メチル化が UC における炎症性発癌の早期の重要なメカニズムであることが示唆される⁵⁻⁷⁾。一方、UC 関連大腸癌では癌抑制遺伝子 *TP53* の不活化型変異を高頻度に認めるが、腫瘍特異的な遺伝子メチル化の蓄積を認める CpG island methylator phenotype (CIMP) 形質は稀であり、age-related methylation に関しても早期癌や dysplasia に比較し浸潤癌ではその頻度、割合が低下するという paradoxical な変化を示す⁸⁾。したがって、UC 関連大腸癌では炎症～腫瘍発生～浸潤の過程において、epigenetic な異常が genetic な異常に置き換わり、より高い生物学的悪性度を獲得していく可能性が考えられる。

本研究では UC における炎症性発癌の過程において、epigenetic な異常が genetic な異常に置き換わっていくという仮説にもとづき、1) UC 炎症大腸粘膜、非炎症部大腸粘膜および腫瘍組織の遺伝子メチル化を網羅的に解析した。2) さらに非腫瘍大腸粘膜における微小遺伝子変異を同定する目的で、次世代シーケンサーを用いた targeting ultra deep sequencing による遺伝子変異の定量的解析法の可能性を検討した。

方法および結果

1. UC 大腸粘膜における遺伝子メチル化解析

UC 患者腫瘍非合併 84 例、腫瘍合併 16 例の直腸炎症粘膜 (n = 84)、腫瘍近傍炎症粘膜 (n = 26)、腫瘍 (n = 33) および近位部非炎症大腸粘膜 (n = 10) より DNA を採取し解析に供した。癌・炎症関連候補 46 パネル遺伝子のメチル化を Bisulfite pyrosequencing により解析した。さらに Illumina Infinium HumanMethylation450 を用い、全ゲノム約 45 万箇所のメチル化サイトを解析した。癌・炎症関連候補 46 パネル遺伝子のメチル化解析では UC 炎症大腸粘膜では非炎症粘膜に対し、DNA メチル化が亢進しており、炎症の持続期間や癌合併例との関連が認められた (図 1)。また、網羅的遺伝子メチル化解析では、重症 UC では軽症例に比較し、特に CG 含有率の高い CpG islands とを中心に遺伝子メチル化が亢進しており、メチル化されている遺伝子群は biosynthetic process (P = 5.69E-05)、regulation of metabolic process (P = 0.009)、nitrogen compound metabolic process biosynthetic process (P = 0.015) に有意な enrichment を認めた (図 2)。

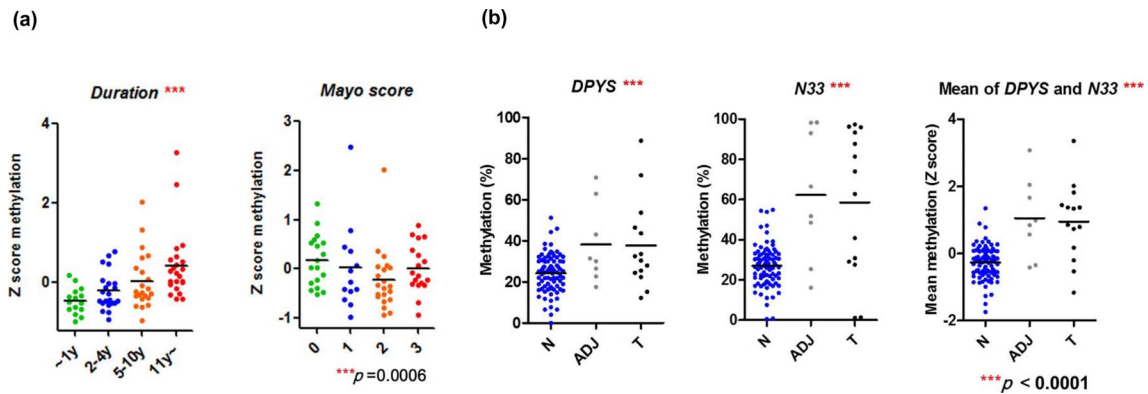


図1. US大腸細胞における Bisulfite pyrosequencing による網羅的メチル化解析

(a) 16箇所の遺伝子メチル化の平均 Z score は炎症の持続期間に有意な関連を示すが (左)、現時点での炎症の程度の指標となる内視鏡像 (Mayo score) とは関連は認められない。

(b) *DPYS*, *N33* 遺伝子のメチル化、その平均 Z score は UC 非担癌例の直腸粘膜 (N) に対し、担癌症例の非腫瘍大腸粘膜 (ADJ)、腫瘍部 (T) において有意に高メチル化を認めた (one-way ANOVA)。

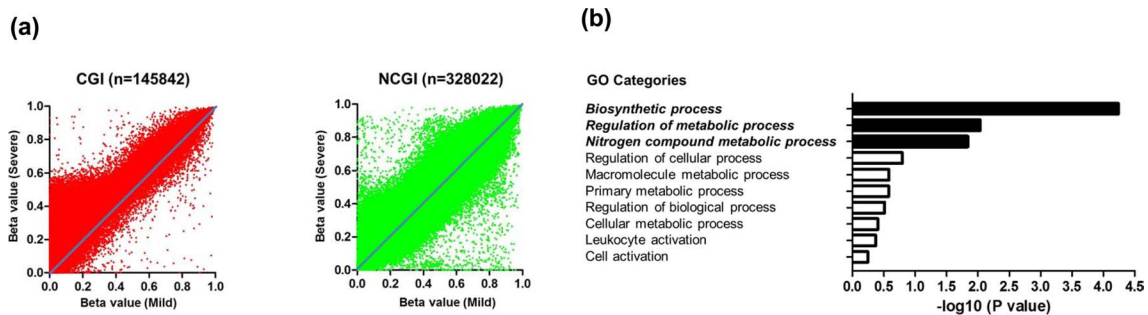


図2. Illumina Infinium HumanMethylation450 による網羅的メチル化解析

(a) 重症 UC (縦軸)、軽症 UC (横軸) の比較。重症 UC では軽症例に比較し、特に CG 含有率の高い CpG islands (CGI) を中心に遺伝子メチル化が亢進している。

(b) 重症 UC においてメチル化されている CGI をコードする遺伝子群の Gene Ontology (GO) 解析。メチル化されている遺伝子群は biosynthetic process ($P = 5.69E-05$)、regulation of metabolic process ($P = 0.009$)、nitrogen compound metabolic process biosynthetic process ($P = 0.015$) に有意な enrichment を認めた。

2. UC 大腸粘膜における微小遺伝子変異の同定に関する検討

大腸癌で高頻度に遺伝子変異が生じているとされる TP53、APC、KRAS、SMAD4 などの翻訳領域を 200 bp 程度に区切り PCR で増幅、PCR 産物を混合し次世代シーケンサー HiSeq 2000 によりシーケンスを行った。健常者大腸粘膜 ($n = 5$)、大腸癌患者の腫瘍近傍の大腸粘膜 ($n = 5$)、癌部 ($n = 3$) を用いた検討では、各サンプル 260 万~450 万リードの解析深度が得られ、微小変異のみを対象とした mismatch rate は、健常者大腸粘膜に対して大腸癌患者の腫瘍近傍の大腸粘膜、癌部において有意に高いという結果が得られた (図3)。

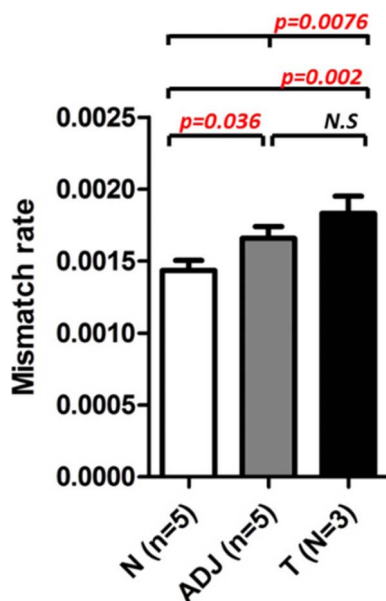


図3. targeting ultra deep sequencing による微小遺伝子変異の検出

健常者大腸粘膜 (N)、大腸癌患者の腫瘍近傍の大腸粘膜 (ADJ)、癌部 (T) を用いた targeting ultra deep sequencing 結果。微小変異のみを対象とした mismatch rate は、健常者大腸粘膜に対して大腸癌患者の腫瘍近傍の大腸粘膜、癌部において有意に高くなった (one-way ANOVA)。

考 察

DNA メチル化解析の一連の結果により、UC において重症経過をたどる例、癌合併例など UC の heterogeneity に関わる因子の同定に有効であることを確認した。さらに、UC 炎症粘膜における特有の DNA メチル化異常、pathway の同定は UC においても癌の化学予防や分子標的治療につながる知見であると考えられた。

一方、次世代シーケンサーによる targeting ultra deep sequencing では関心領域を 200 万リード以上に増幅できることを確認した。微小変異のみを対象とした mismatch rate は、健常者大腸粘膜に対し大腸癌患者の腫瘍近傍の大腸粘膜、癌部において有意に高いという結果が得られ、UC 患者の前癌粘膜における微小遺伝子変異の同定に有用性が期待できる。今後解析アルゴリズムについて更なる検討を行い UC 患者サンプルでの解析を行いたいと考える。UC における炎症性発癌の過程における epigenetic・genetic な異常の相互作用を検討し、UC 発症の分子メカニズムの解明やオーダーメイド医療につながる知見を得たいと考える。

共同研究者

本研究の共同研究者は藤田保健衛生大学消化管内科の医局員、米国テンプル大学附属 fels 研究所の Jean-Pierre Issa 教授、および研究員である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Ekblom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med.* 1990;323(18):1228-33. DOI: 10.1056/NEJM199011013231802 PMID: 2215606
- 2) Askling J, Dickman PW, Karlén P, Broström O, Lapidus A, Löfberg R, Ekblom A. Family history as a risk factor for colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2001;120(6):1356-62. PMID: 11313305
- 3) Nuako KW, Ahlquist DA, Mahoney DW, Schaid DJ, Siems DM, Lindor NM. Familial predisposition for colorectal cancer in chronic ulcerative colitis: a case-control study. *Gastroenterology.* 1998;115(5):1079-83. PMID: 9797361

- 4) Issa JP, Ottaviano YL, Celano P, Hamilton SR, Davidson NE, Baylin SB. Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. *Nat Genet.* 1994;7(4):536-40. DOI: 10.1038/ng0894-536 PMID: 7951326
- 5) Issa JP, Ahuja N, Toyota M, Bronner MP, Brentnall TA. Accelerated age-related CpG island methylation in ulcerative colitis. *Cancer Res.* 2001;61(9):3573-7. PMID: 11325821
- 6) Tominaga K, Fujii S, Mukawa K, Fujita M, Ichikawa K, Tomita S, Imai Y, Kanke K, Ono Y, Terano A, Hiraishi H, Fujimori T. Prediction of colorectal neoplasia by quantitative methylation analysis of estrogen receptor gene in nonneoplastic epithelium from patients with ulcerative colitis. *Clin Cancer Res.* 2005;11(24 Pt 1):8880-5. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1309 PMID: 16361578
- 7) Fujii S, Tominaga K, Kitajima K, Takeda J, Kusaka T, Fujita M, Ichikawa K, Tomita S, Ohkura Y, Ono Y, Imura J, Chiba T, Fujimori T. Methylation of the oestrogen receptor gene in non-neoplastic epithelium as a marker of colorectal neoplasia risk in longstanding and extensive ulcerative colitis. *Gut.* 2005;54(9):1287-92. DOI: 10.1136/gut.2004.062059 PMID: 15870230
- 8) Konishi K, Shen L, Wang S, Meltzer SJ, Harpaz N, Issa JP. Rare CpG island methylator phenotype in ulcerative colitis-associated neoplasias. *Gastroenterology.* 2007;132(4):1254-60. DOI: 10.1053/j.gastro.2007.01.035 PMID: 17408633