

大腸腫瘍におけるジェネティック・エピジェネティックな異常と臨床応用

山本英一郎¹⁾²⁾ 鈴木拓¹⁾²⁾ 山野泰穂³⁾ 菅井有⁴⁾ 篠村恭久²⁾ 今井浩三⁵⁾ 豊田実¹⁾

1 札幌医科大学分子生物学講座 2 札幌医科大学第一内科 3 秋田赤十字病院

4 岩手医科大学分子診断病理 5 東京大学医科学研究所

背景と目的：一部の大腸癌で CpG アイランドの同時多発的なメチル化を来す CpG アイランドメチル化形質 (CIMP: CpG island methylator phenotype) を示す。遺伝子変異と異常メチル化のプロファイルより、BRAF 変異、MSI 陽性、高度の CIMP を認める CIMP-1 (High)、KRAS 変異と軽度の CIMP を認める CIMP-2 (Low)、メチル化異常が少なく、p53 変異が高率な CIMP-Negative の 3 群に分類されることが示されている。しかし発癌過程における遺伝子異常が生じるタイミング、オリジンとなる前癌病変についてはいまだ不明な点が多い。

近年、一部の鋸歯状病変 (Sessile serrated adenoma: SSA) が CIMP 大腸癌の前癌病変であることが報告されたが、SSA の臨床病理学的特徴は不明瞭である。SSA の臨床的特徴を明らかにすることは CIMP 大腸癌予防において極めて重要な課題である。

今回我々は CIMP 大腸癌発生過程における分子機序を解明すること、ゲノムエピゲノム解析から CIMP 大腸癌の前癌病変における臨床病理学的特徴を明らかとすることを目的とした。

方法：前癌病変 192 検体、早期癌 38 検体、進行癌 100 検体を対象とした。検体は拡大内視鏡、病理組織像、ゲノム情報の 1 対 1 対応が可能である。Methylated CpG island Amplification (MCA)-microarray、アレイ CGH (array based comparative genomic hybridization) を用いたゲノムワイドなメチル化、コピー数解析を行った。MSI、遺伝子変異 (BRAF、KRAS、p53、PIK3CA、AKT1、AKT2、PDK1)、パイロシークエンス法を用いたメチル化解析を行った。

結果：MCA-microarray による網羅的なメチル化解析を行った (n=86; 前癌病変 28 検体、早期癌 14 検体、進行癌 28 検体、正常大腸粘膜 16 検体)。Unsupervised クラスタ解析、K-means 法により高度にメチル化を認める群、中等度にメチル化を認める群、メチル化異常が少ない群の 3 群に分類した。その結果、進行癌だけでなく早期癌や前癌病変も進行癌と同様の 3 群に分類されることが明らかとなった。

其々のクラスターを特徴づける 14 遺伝子を抽出、既知の 11 遺伝子を加えた 25 遺伝子を選択した。パイロシークエンス法を用いて全検体で定量的メチル化解析を行った。その結果、MCA-microarray と同様の 3 群; 高度にメチル化を認める M-cluster1 (CIMP-H)、中等度のメチル化を認める M-cluster2 (CIMP-L)、メチル化の少ない M-cluster3 (CIMP-N) に分類できることが確認された。さ

らに主成分分析により前癌病変と大腸癌では同様の分布を示すことが明らかとなり、進行癌で見られるメチル化異常は前癌病変の段階で生じていることが示唆された。

次にアレイ CGH (n=84; 前癌病変 40 検体、早期癌 25 検体、進行癌 19 検体) を用いて全ゲノム領域のコピー数変化の解析を行った。Unsupervised クラスタ解析により、コピー数変化の少ない C-cluster1、7 番染色体、19 番染色体の増幅を高頻度に認め、欠失の少ない C-cluster2、18 番染色体の欠失、20 番染色体の増幅を高頻度に認める C-cluster3 に分類された。コピー数異常を認める C-cluster2、3 の大多数は癌であり、前癌病変は C-cluster1 に分類された。コピー数異常は癌化の段階で生じていることが示唆された。

次に CIMP-H 大腸癌の前癌病変の臨床的特徴について検討した。CIMP-H に分類される前癌病変は病理組織学的に SSA であった。また BRAF 変異を高頻度に認め、コピー数異常は少ない (C-cluster1) 特徴的な遺伝子プロファイルを示した。BRAF 変異は過形成ポリープの一部で認めるがメチル化異常は少ない。一部癌化を伴った SSA 症例における SSA 部と癌部で比較したところ BRAF 変異は両部位で認め、網羅的解析でも異常メチル化、コピー数異常とも同様のプロファイルを示す。しかし MLH1 メチル化及び MSI は癌部においてのみ認めた。以上の結果より初期に BRAF 変異は生じ、発育進展に CIMP の獲得が必要であると考えられた。さらに癌化においては MLH1 メチルに伴う MSI が重要な役割を担っていることが示唆された。

次に SSA/BRAF/CIMP を認める病変の臨床的特徴について検討した。拡大内視鏡所見との対比により病変内に腺管開口部の開いた II 型様ピットパターン (Type II-Open) を呈する病変で病理組織学的には全例病変内に SSA を認め、さらに BRAF/CIMP を高率に認めた。Type II-Open の有用性を独立したセットで前向きに検証した。BRAF/CIMP の感度/特異度は BRAF 62.1%/96%、CIMP 71.4%/92.8% であり、極めて特異度が高い結果が得られた。

結語：大腸癌で認めるジェネティックエピジェネティックな異常は発癌過程の早期で確立されることが示唆された。CIMP 大腸癌の前癌病変を示唆する内視鏡所見 Type II-Open を同定した。このような臨床と基礎の橋渡し研究により病態が明確となり大腸癌の予防に重要な知見を得ることができた。