

論 文 内 容 要 旨

題目 *B-RAF* mutation and accumulated gene methylation in aberrant crypt foci (ACF), sessile serrated adenoma/polyp (SSA/P) and cancer in SSA/P
(Aberrant crypt foci (ACF)、sessile serrated adenoma/polyp (SSA/P)、cancer in SSA/P における *B-RAF* 変異及びメチル化遺伝子の網羅的解析)

著者 A Inoue, K Okamoto, Y Fujino, T Nakagawa, N Muguruma,
K Sannomiya, Y Mitsui, T Takaoka, S Kitamura, H Miyamoto,
T Okahisa, T Fujimori, I Imoto and T Takayama
平成 27 年発行 British Journal of Cancer に掲載予定

内容要旨

近年、大腸癌の発生経路として大腸鋸歯状病変から発癌する serrated pathway が注目されている。大腸鋸歯状病変の一つである Sessile serrated adenoma/polyp (SSA/P) は右側結腸に好発し、*p16* などの遺伝子のメチル化を認めることから microsatellite instability (MSI) 陽性癌の前病変と考えられている。しかし、SSA/P の発生機序の詳細は不明である。一方、aberrant crypt foci (ACF) は、メチレンブルーに濃染する大腸微小病変として報告され、動物の大腸発癌モデルにおいて前癌病変と考えられている。われわれはこれまで、拡大内視鏡を用いてヒトの主に直腸及び左側結腸の ACF を観察し、ACF の前癌病変としての意義を報告した。本研究では、SSA/P 患者における右側大腸(上行結腸及び盲腸)の ACF を観察し、ACF、SSA/P 及び cancer in SSA/P 組織を用いて各種遺伝子解析を行うとともに、メチレーションアレイによりメチル化遺伝子の網羅的解析を行った。また、SSA/P 患者を対象に右側大腸における ACF の陽性率や数を調べ、ACF の SSA/P-cancer sequence の前病変としての意義を検討した。

まず ACF、SSA/P 及び cancer in SSA/P 組織における *B-RAF* 遺伝子変異を 2-step-PCR-RFLP 法により調べたところ、いずれも 66.7%(10/15)、80%(16/20)、100%(2/2) と高率に陽性であった。一方、*K-RAS* 遺伝子変異はいずれも低率であった。PCR-SSCP 法により MSI 解析を行ったところ、cancer in SSA/P では MSI-high (MSI-H) を 50% (1/2) に認めしたが、ACF 及び SSA/P に MSI-H は認められなかった。MSI-H を認めない癌には *p53* 変異を認めた。次いで MIAMI 法

様式 (8)

によりメチレーションアレイ解析を行ったところ、ACF、SSA/P、cancer in SSA/P それぞれ 11.3 ± 7.7 個、 37.0 ± 17.3 個、 193 ± 39 個のメチル化遺伝子を認め、この順に有意に増加した ($p < 0.05$)。SSA/P 組織では、*PQLC1*、*HDHD3*、*RASL10B*、*FLI1*、*GJA3*、*SLC26A2* の 6 遺伝子にもっとも高率にメチル化を認めた。ACF 組織では、これらの 6 遺伝子のうちの一部にメチル化を認め、cancer in SSA/P では 6 遺伝子全てにメチル化を認めた。これらのメチル化は MSP 法によっても確認された。また、免疫染色により、これらの遺伝子発現が消失または減弱していることが確かめられた。

次いで、SSA/P 症例 38 例及び健常人 20 例を対象に、右側大腸における ACF の陽性率及び数を検討した。その結果、SSA/P 症例における ACF の陽性率及び数は健常人に比べて有意に高かった ($97.4\% \text{ vs } 10.0\%$ 、 $p < 0.01$ 、 3.79 ± 2.11 個 $\text{vs } 0.10 \pm 0.33$ 個、 $p < 0.01$)。また、SSA/P 症例では SSA/P の数と ACF の数に有意な相関を認めた ($p < 0.05$)。

以上の結果より、SSA/P 症例においては右側大腸の ACF は、SSA/P の前病変であることが示唆された。また、*B-RAF* 変異と 6 遺伝子 (*PQLC1*、*HDHD3*、*RASL10B*、*FLI1*、*GJA3*、*SLC26A2*) の一部のメチル化により ACF が発生し、これらを含む遺伝子のメチル化が蓄積することにより SSA/P に進展し、MSI を来す *MLH1* のメチル化や *p53* 変異により発癌することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲医第1228号	氏名	井上 篤
審査委員	主査 島田 光生 副査 片桐 豊雅 副査 坂下 直実		

題目 *B-RAF* mutation and accumulated gene methylation in aberrant crypt foci (ACF), sessile serrated adenoma/polyp (SSA/P) and cancer in SSA/P

(Aberrant crypt foci (ACF)、sessile serrated adenoma/polyp (SSA/P)、cancer in SSA/Pにおける *B-RAF* 変異及びメチル化遺伝子の網羅的解析)

著者 A Inoue, K Okamoto, Y Fujino, T Nakagawa, N Muguruma, K Sannomiya, Y Mitsui, T Takaoka, S Kitamura, H Miyamoto, T Okahisa, T Fujimori, I Imoto and T Takayama

平成 27 年発行 British Journal of Cancer に掲載予定
(主任教授 高山哲治)

要旨 近年、大腸癌の発生経路として大腸鋸歯状ポリープから発癌する serrated pathway が注目されている。鋸歯状ポリープのうち sessile serrated adenoma/polyp (SSA/P) は、右側大腸に好発し、マイクロサテライト不安定性 (microsatellite instability; MSI) を呈する癌の前病変と考えられているが、その発生機序の詳細は不明である。一方、aberrant crypt foci (ACF) は、メチレンブルーに濃染する大腸微小病変であり、腺腫や癌の前病変として報告されている。

申請者らは、SSA/P 患者における右側大腸の ACF、SSA/P 及び

cancer in SSA/P 組織を用いて各種遺伝子解析ならびにメチル化遺伝子の網羅的な解析を行い、ACF の SSA/P-cancer sequence の前病変としての意義を明らかにするとともに、ACF-SSA/P-cancer sequence の分子機序を検討した。

得られた結果は以下の如くである。

- 1) ACF、SSA/P 及び cancer in SSA/P のいずれにおいても *B-RAF* 変異を高率に認めた。
- 2) ACF 及び SSA/P では MSI を認めなかったが、cancer in SSA/P では 2 例中 1 例に MSI を認め、残りの 1 例には *p53* 変異を認めた。
- 3) メチレーションアレイ解析では、ACF、SSA/P、cancer in SSA/P の順にメチル化遺伝子の数が有意に増加した。SSA/P では、とくに *PQLC1*、*HDHD3*、*RASL10B*、*FLI1*、*GJA3*、*SLC26A2* の 6 遺伝子に高頻度のメチル化を認めた。ACF ではこれらの 6 遺伝子の一部に、cancer in SSA/P では 6 遺伝子全てにメチル化を認めた。
- 4) SSA/P 組織を用いた免疫染色では、これらの 6 遺伝子関連タンパクの発現はいずれも消失または減弱していた。
- 5) SSA/P 症例の右側大腸における ACF の陽性率及び数は健常人に比べて有意に高かった。また、SSA/P 症例における SSA/P の数と ACF の数には有意な相関を認めた。

以上の結果より、右側大腸の ACF は SSA/P の前病変であることが示唆された。また、*B-RAF* 変異と 6 遺伝子の一部のメチル化により ACF が発生し、これらの遺伝子のメチル化が蓄積することにより SSA/P に進展し、癌化につながることを示唆された。

本研究は、大腸癌の発癌機構解明における学術的意義は大きく、学位授与に値すると判定した。