

13 - 12 表面型大腸がんの悪性度解析及び発育進展に関する研究

主任研究者 国立がんセンター中央病院 下 田 忠 和

研究成果の要旨

大腸癌の発生には高異型度癌として発生する de novo type と3低異型度癌として発生する腺腫内癌がある。de novo type の癌ではp 21.3 の RASSF1A のメチル化が関連し、その頻度が腺腫由来の癌に比して高く、かつ周囲の非腫瘍性粘膜にも高発現していた。さらに高異型度癌では早期に多数の遺伝子異常が見られる。すなわち表面型大腸癌の多くは腺腫由来の癌とは明らかに異なることを解明した。この高異型度癌は早期に浸潤し、進行がんでは肝転移を来す可能性が示唆される。大腸癌の肝転移はリンパ節転移、静脈侵襲、がん細胞の脱分化、CD10 発現が独立した因子で、さらにその組み合わせにより、従来よりは精度の高い肝転移予測が可能で、肝転移低危険度群、中間群、高危険度群に分けることが可能となった。

研究者名および所属施設

分担研究課題

下田 忠和 国立がんセンター中央病院 医長
味岡 洋一 新潟大学大学院 医歯学総合研究科
助教授
藤井 博昭 順天堂大学医学部 講師
渡邊 聡明 東京大学医学部 助教授
八尾 隆史 九州大学大学院医学研究院 助教授
菅井 有 岩手医科大学 助教授

表面型大腸腫瘍の悪性度とその増殖形態の関連
表面型大腸腫瘍悪性度解析
表面型大腸腫瘍の LOH 解析及び遺伝子メチル化の解析
表面型大腸腫瘍の遺伝子解析
形質発現からみた大腸癌の悪性度
DNA 量と遺伝子変異から見た大腸癌の悪性度

総括研究報告

1 研究目的

本研究の目的は表面型大腸腫瘍の悪性度解析及び、大腸癌の初期病変から進行癌にいたる発育進展を解明することである。早期大腸癌には隆起(ポリープ)型癌とは異なり、10mm 以下の極めて小さい粘膜内癌から悪性度を増し、粘膜下層に浸潤する表面型大腸癌がある。これは従来考えられてきた大腸癌の組織発生、形態発生経路ならびに遺伝子異常の経路とは異なることが明らかになってきた。

また大腸癌には組織学的に低と高異型度癌があり、低異型度癌から高異型度癌へ、あるいは初期から高異型度癌として発生するものまで多彩な組織異型を示す。この違いが大腸癌の発育進展に反映され、また遺伝子異常にも関連してことが予測される。癌の異型度別の観点から遺伝子異常の蓄積経路についての研究は少ない。従来、腺腫由来の癌の遺伝子異常の経路は追及されてきたが、de novo type の

癌、すなわち 10mm 以下で発見される高異型度癌の特性ならびにその発生機序は殆ど解析されてこなかった。これまでに本研究では高異型度癌は初期から 17p, 3p など多くの染色体領域で多彩な遺伝子異常が来され、腫瘍の増大とともに 5p, 18q, 22q 等の異常を来すこと、さらに 3p ではそのメチル化が大腸癌発生に重要な因子であることを報告してきた。高異型度癌の発生母地、あるいは前癌病変は未だ不明であるが、これは早期に粘膜下層に浸潤し、通常型の 2 型進行癌に進展し、その中にはリンパ節、さらには肝転移をきたすものが多く含まれている。大腸癌のリンパ節、肝転移を来す因子に関しては腫瘍細胞の脱分化などが報告されているが、まだその詳細は不明である。本研究班では高異型度癌の特性について転移の予測因子も含めて検討した。

2 研究成果

1) 表面型大腸癌の LOH 解析と遺伝子メチル化の解析

RASSF1A 遺伝子(3p21.3)のメチル化: RASSF1A は 3p21.3 に位置するがん抑制遺伝子であり多くの腫瘍において promoter 領域のメチル化による不活化が知られている。しかし、通常の進行大腸癌ではそのメチル化は低頻度 ($45/222=20\%$) で、さらに K-ras 変異とは相反する関係にあると報告されている。K-ras 変異が表面型大腸腫瘍では低頻度、また 3p LOH が比較的頻度が高いとのこれまでの報告に基づき、RASSF1A メチル化および 3p 領域の詳細な LOH を 48 症例につき検討した。3p マイクロサテライト・マーカーのうち一つでも LOH を認めた症例は 52%(24/46)、そのうち Homogeneous な LOH が 39.1% (18/46) と 3pLOH は比較的早期に高頻度に生じていた。領域別に見ると 3p21.3 領域の LOH は 47.6% (20/42) であった。RASSF1A のメチル化は腫瘍部分において 81.3% (39/48) と高頻度に認められた。また、腫瘍においてメチル化のあった症例では腫瘍周囲の正常粘膜部分においても 49%(19/39) すでにメチル化が認められた。K-ras 変異は従来の報告同様に低頻度 (14.6%) であり、特に RASSF1A のメチル化を認める症例では少ない傾向があった。すなわち、RASSF1A のメチル化状態と K-ras 変異は有意に相反する関係にあった ($p=0.017$)。一方、RASSF1A のメチル化は 3p21.3LOH の有無に関わらず

認められた。以上より RASSF1A は表面型大腸腫瘍の発育進展において K-ras 変異を介さずに、ras シグナル系の機能異常に關与する重要な遺伝子であると考えられた (Oncogene, 2004, 23:8900-8907)。

2) 表面型大腸腫瘍の LOH 解析

表面型大腸腫瘍ではこれまでに 5q, 17p, 18q LOH は隆起型由来(腺腫内癌、低異型度癌)の大腸癌と同様の頻度で認められているとの報告がある。特に 17p は腫瘍発生早期から關与している。また、3p LOH は上記のごとく 17p LOH 程高頻度ではないが比較的早期から認められる症例が存在する。その他の染色体領域に関しても LOH 頻度を表面型大腸腫瘍で検索した。Genome wide screening の後、2q, 4q, 5q, 12q, 14q, 15q, 17p, 18p, 18q, 22q に絞り 43 症例の解析を行った。多数部位より microdissection を行うことによりその獲得時期についての情報が得られる。homogeneous LOH (すべての腫瘍部位において LOH が共通してみられる。すなわち腫瘍の発生初期に獲得された変化と考えられる)および heterogeneous LOH (LOH が腫瘍の一部のみみられるか、部位により LOH の allele が異なる。腫瘍の早期発育進展途上、粘膜内ないしは浸潤部で獲得される変化である)に分類して検索をした。また、これを元に heterogeneity index (HI) を染色体腕毎に、heterogeneous LOH 症例数 / (homogeneous + heterogeneous) LOH の症例数として表示する。HI が低い腫瘍ほど発生初期から關与する。

17p, 18q LOH が高頻度に早期から起こる傾向がある。さらに 18p LOH, 22q LOH の頻度も高く、特に 18p, 18q LOH は共通している症例が多い。22q LOH は通常の進行大腸癌でも高頻度に認められ特に 22q13 が重要欠失領域とされている。表面型大腸腫瘍ではこれらの LOH が早期から關与しており、異型度、悪性度の高さを反映すると考えられる。10 染色体での fractional allelic loss (FAL) は heterogeneous LOH / homogeneous LOH で、0.57、homogeneous LOH のみで 0.37 であった。これをこれまでの通常型進行大腸癌に関する報告論文と比較すると、明らかに表面型大腸腫瘍では FAL の高い腫瘍に属することが明らかである。17p, 18p, 18q LOH すべてのみられる症例は heterogeneous / homogeneous LOH で、72%(21/29) すべて

13 - 12 表面型大腸がんの悪性度解析及び発育進展に関する研究

homogeneous LOH は38%(11/29)となる。また、17p, 18p, 18q, 22LOH は同様順に37%(10/27), 15%(4/27)であった。以上より、これらの染色体領域のLOHが早期から、共通にみられる症例の多いことがわかった。

以上、LOH パターンからみた表面型大腸腫瘍の特徴は
1)多くの症例ではFALが高い腫瘍であり、通常では進行癌、予後不良癌、悪性度の高い大腸癌でみられるLOH が多数、早期から関与している。悪性度の高い腫瘍であることはFALが高いことが一因と考えられる。2)17p, 3p に加え、18p, 18q, 22q LOH の頻度が高く、しかも早期から関与する傾向がある。3)その他のLOH (5q, 14q, 15q, 2q, 1q, 4q)も比較的頻度が高く、腫瘍早期進展途上に獲得されうる。4)多数 LOH が腫瘍発生当初から認められる現象はde novo 発癌を強く示唆する。5) LOH の頻度、獲得時期が隆起型腫瘍におけるVogelstein の多段階発癌機構とは異なる。

3)大腸癌の肝転移予測因子の解析

大腸癌の肝転移因子として従来、がん細胞の静脈侵襲、さらには癌浸潤先進ぶでのがん細胞脱分化、さらにはCD10 の発現が独立した因子として報告してきた。しかしこれらの因子をもってしても、実際に肝転移を来たすのは20-30%である。そこで手術後の肝転移をより高率に予測する因子について T2-4 の進行大腸癌 505 例の検討を行った。その結果、癌浸潤度 ($p = 0.006$, OR1.96)、静脈侵襲 ($P < 0.001$, OR3.17)、脱分化現象 ($P = 0.036$, OR1.71)、リンパ節転移 ($p < 0.001$, OR2.55) CD10 発現 ($P < 0.006$, OR2.23) が独立した肝転移を来たす因子であった。これらの因子に対して各 1 点のスコアをつけ、認めた因子の合計のスコアと肝転移の関係を検討した。その結果、肝転移 low risk(スコア 0-2, 9/186, 4.8%), 中間群(スコア 3-5, 93/288, 32.3%), high risk (スコア 6, 20/29, 69%)に分けることが可能であった。さらに浸潤度を除いた5つの因子の、組み合わせではリンパ節転移とほかの因子のうち少なくとも2つを認める例ではそれ以外の例に比較して 6-8 倍の頻度で肝転移を来たすことが判明した($P < 0.001$)、以上から今後、術後の肝転移予測が従来よりはより高精度に行える可能性が示された。

3.倫理面への配慮

本件旧では一部過去の症例解析であるが、そのほかはすべてICの得られた材料である。また患者の個人情報は各施設で完全に保管され、班員間での患者情報は一切守秘されている。

〔班長協力者〕

石黒 信吾	大阪府立成人病センター
岩下 明德	福岡大学医学部筑紫病院
落合 淳志	国立がんセンター東病院
加藤 洋	癌研究会癌研究所
佐野 寧	国立がんセンター東病院
渡辺 英伸	新潟大学医学部

