

分離腺管/間質を用いたオミックス解析に基づいた大腸腫瘍の発生進展過程の解明



岩手医科大学病理診断学講座

菅井 有

これまでのヒトサンプルの解析は組織サンプルを丸ごと解析することが一般的でした。しかし、癌の分子解析には、調べたいターゲット細胞のみを解析することが重要になります。私たちはターゲット細胞のみを採取する方法を開発しヒトサンプルの分子解析を行ってきました。一方で分子解析を行う場合、解析対象の分子を網羅的に解析する方法が必要になります（オミックス解析と言います）。私たちの研究はこれらの2つの方法を用いて大腸癌の分子機序の解明を試みたものです。大腸癌の発生に関わる分子メカニズムなどをご紹介します。

●はじめに

癌組織は癌腺管と周囲の非癌組織（間質と言います）で構成されていますが、腺管分離法（CIM: crypt isolation method）は腺管を間質から分離し正常及び腫瘍腺管のみを採取する方法です。癌細胞の分子解析では非癌細胞の混入が解析の信頼性に支障を来すことが問題視されていますので、採取サンプルからいかに非腫瘍性組織を除外するかが解析の正否を決定することになります。CIMはこの問題の解決に極めて有用な方法です。分子解析を行う場合、生体内分子を網羅的に調べることが必要になります。このような解析方法をオミックス解析と言いますが、医学の領域でも最先端の研究分野の1つです。本稿ではCIMとオミックス解析を組み合わせることで明らかにし得た“大腸癌の分子腫瘍発生理論（癌発生の仕組みという意味）”について概説します。

●前癌病変からみた大腸癌の発癌経路

前癌病変から大腸癌に至る経路は大きく分けて腺腫を経由する経路と鋸歯状経路とされている経路があります。また両者に対応する分子異常として microsatellites stable (MSS) 型と microsatellite instability (MSI) 型があります。MSI 型はミスマッチ修復 (mismatch repair: MMR) 遺伝子の機能異常により、くり返し配列であるマイクロサテライト領域に異常な反復をきたす現象を指します。代表的な関連遺伝子として MLH1 が知られています。MSI 型は大腸癌の 10% 程度とされており、鋸歯状経路と関係しています。MSS 型は MSI ではない状態を指しますが、腺腫を経由するタイプに相当します。MSS 型は大腸癌全体の 90% を占めます。

●大腸癌の浸潤、転移にはコピー数異常が重要である

大腸癌の発生と関係する分子異常はいくつか知られていますが、最近注目を集めている分子異常の一つにコピー数多型があります（体細胞の場合は somatic copy number alteration, SCNA と言います）。この異常はゲノムの不安定性を増加させることが知られており、重要な分子異常の一つです。SCNA では遺伝子全体のコピー数の変化を伴うことから、発癌への影響は大きいことが予想されます。SCNA の増加は良性腫瘍より悪性腫瘍で、粘膜内癌より浸潤癌でそれぞれ高いことが明らかにされています。

●コピー数変化と mRNA の発現異常

細胞の機能の異常はタンパク質の変化を伴うことが通常です。ところが SCNA にタンパク質の変化を伴っているかはよく分かっていません。しかし SCNA とタンパク質の変化を同一サンプルで比較することは容易ではありません。そこで我々はタンパク質の前段階である mRNA（メッセンジャーRNA）と SCNA の関係性を調べることにしました。SCNA と mRNA の発現異常が同時にみられる場合、発現異常を伴う mRNA は強力な発癌効果を有することになります。粘膜内癌と進行癌では関与する SCNA/mRNA パターンが異なります。粘膜内癌では OLFM4 が、進行癌では DDX27 などが重要な役割を担うことが示されました（図 1）。

●miRNA と mRNA の発現異常

エピゲノムとは、DNA の塩基配列は変化せず、DNA やヒストンへの化学修飾（たんぱく質や DNA などの生体高分子に含まれる特定の官能基を化学的に変化させて、活性や反応性などの機能を変化させること）によって遺伝情報を制御する機構のことを言います。すなわち“どの遺伝子を使い、どの遺伝子を使わないかを決めるスイッチ”のことです。その代表として DNA メチル化と microRNA の異常があります。microRNA (miRNA) は 21-25 塩基長の 1 本鎖 RNA 分子であり遺伝子の転写後の発現調節に関与します。microRNA は機能的には mRNA の転写を促進する (miRNA の発現は減少する) タイプと抑制するタイプ (mRNA の発現は増加する) があります (従って両者は逆相関の関係にあります)。腺腫を介する経路と鋸歯状病変を介する経路について、それぞれ異なった miRNA/mRNA パターンが関与していることが明らかにされました。図 2、3 をご参照ください。

●組織型と分子異常—篩状型癌は特殊な癌かも知れない

私たちは CIM を用いてふるいのように複数の小さな穴が開いている篩状構造を示す癌腺管のみを採取して、篩状型癌の分子異常の解析を行いました。その結果、非篩状型癌と比較して篩状型癌の SCNA の頻度と KRAS 変異の頻度が高いことがわかりました。SCNA は予後と関係する因子とも言われていますし、KRAS 変異はある薬剤の効果との関係（ソトラシブは KRAS 変異を持つ大腸癌に有効）で篩状型癌の重要な特徴になります。更に

mRNA の発現異常を調べましたが、PARP4 と GNAQ の発現が篩状癌で高いことがわかりました。また篩状型癌が全体の80%以上ある場合は予後が不良であることも示されました。

●大腸癌の近傍正常粘膜における miRNA と mRNA 発現異常との関係性

癌ができる粘膜では正常粘膜の段階で何らかの分子レベルの蓄積がある可能性を示唆されています。私たちは癌組織と癌の近傍粘膜から CIM を用いて癌腺管、正常腺管のみを採取して、それぞれ RNA を抽出しました。結果のみを述べますと CEACAM1 の発現減少/miR-7114-5p 発現増加と AK1 の発現減少/miR-6780b-5p 発現増加のパターンが癌組織と近傍の正常粘膜で共通にみられました。この関係は癌の近傍正常粘膜に起きている異常を具体的に明らかにした点で意義深いと考えます。

●大腸癌と微小環境

さらに間質細胞も同時に採取すれば両者の関係も解析できますが、これは最近注目されている癌微小環境（癌細胞とその周囲の間質のユニット）の解析にも有用です。癌微小環境は癌の浸潤、転移に関係していると考えられています。私たちは分離癌腺管と分離間質を別々に採取して mRNA の発現異常を調べました。その結果、非転移例と比較して転移例において癌細胞では Tenascin-C の発現増加が、間質細胞においては OR11H4 の発現増加がみられました。即ち Tenascin-C と OR11H4 の発現増加が転移に密接に関係していることが示唆されました。更に両者の過剰発現は大腸癌の予後とも関連していました。

●最後に

CIM を用いたオミックス解析に基づいた大腸癌の分子異常について述べました。大腸癌は全てのがんの中で最も解明が進んでいるの1つですが、まだまだ“群盲象を撫でる”感があります。一般の方々には難しい内容もありますが、本邦で発信した癌研究について理解を深めていただければ幸いです。

図 1. 大腸癌の発癌過程にみられる SCNA とそれに相当する mRNA の発現の関係性

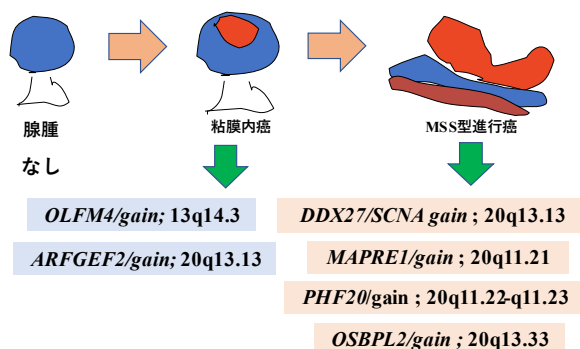


図 2. 腺腫癌関連経路における miRNA/mRNA の発現異常の関係

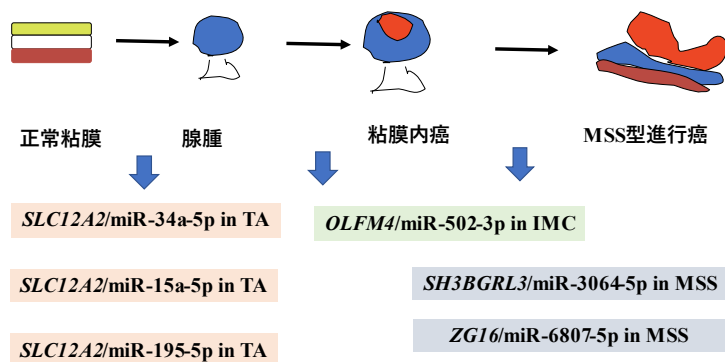
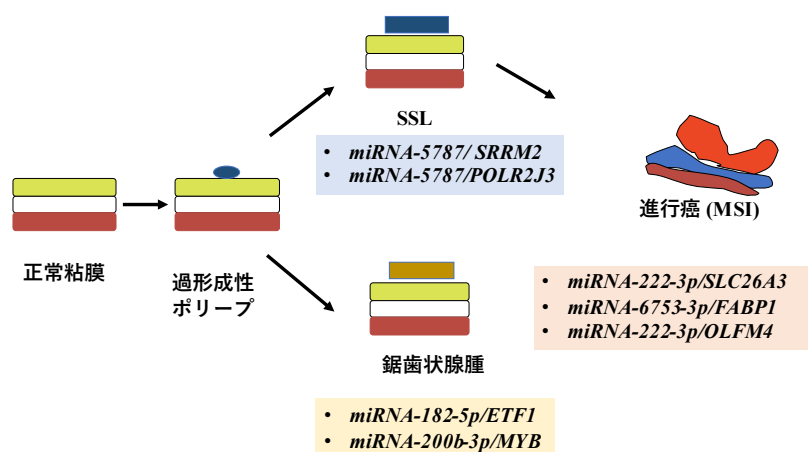


図 3. 鋸歯状経路における miRNA/mRNA の発現異常の関係



第 111 回日本病理学会 宿題報告 (令和 4 年度日本病理学賞)

「Isolated gland/stroma-based multi omics 解析に基づいた大腸腫瘍の発生進展過程の解明」