

論 文 内 容 要 旨

題目 S100P Expression via DNA Hypomethylation Promotes Cell Growth in the Sessile Serrated Adenoma/Polyp-Cancer Sequence

(Sessile serrated adenoma/polyp-cancer sequence において S100P は遺伝子脱メチル化により発現し、細胞増殖を促進する)

著者 **Sayo Takahashi**, Koichi Okamoto, Toshihito Tanahashi, Shota Fujimoto, Tadahiko Nakagawa, Masahiro Bando, Beibei Ma, Tomoyuki Kawaguchi, Yasuteru Fujino, Yasuhiro Mitsui, Shinji Kitamura, Hiroshi Miyamoto, Yasushi Sato, Naoki Muguruma, Yoshimi Bando, Toshiro Sato, Takahiro Fujimori, Tetsuji Takayama

令和 3 年発行 Digestion 掲載予定

内容要旨

従来、大腸癌は adenoma-carcinoma sequence により発生すると考えられてきたが、最近、鋸歯状ポリープから発生する serrated-neoplasia pathway が注目されている。特に、右側大腸に好発する鋸歯状ポリープ sessile serrated adenoma/polyp (SSA/P) は BRAF 変異陽性、マイクロサテライト不安定性 (MSI-high) を有する癌の前病変と考えられ注目されている。SSA/P は高率に遺伝子メチル化が認められることが報告されているが、脱メチル化遺伝子の検討はされていない。そこで本研究では、SSA/P、cancer in SSA/P 組織を用いて Methylation array 解析を行い、SSA/P の発生、発癌に関わる脱メチル化遺伝子を網羅的に解析するとともに、大腸癌細胞株や SSA/P から樹立したオルガノイドを用いて脱メチル化遺伝子の機能解析を行った。

対象は SSA/P 7 例、cancer in SSA/P 2 例であり、Methylation array 解析は MIAMI 法により、mRNA 発現は RT-PCR により解析した。その結果、SSA/P と cancer in SSA/P の癌組織における脱メチル化遺伝子の平均数はそれぞれ 41.6 ± 21.5 個と 214 ± 19.8 個であった。SSA/P の 7 病変に共通する脱メチル化遺伝子は S100P、S100 α 2、PKP3、MUC2 の 4 遺伝子であった。SSA/P 10 例におけるこれらの遺伝子の mRNA 発現を RT-PCR により評価した

ところ、S100P、MUC2、S100 α 2の発現量が有意に亢進しており、免疫染色ではS100Pの発現が著明に亢進していた。

2種類の大腸癌細胞株を標的にsiRNAを用いて、S100P遺伝子をノックダウンし、BrdU assayにより細胞増殖能を評価したところ、いずれの細胞株においても対照群に比べて有意に抑制された。また、ヒトから樹立したSSA/Pオルガノイドを標的にshRNAを用いて、S100P遺伝子をノックダウンし、CellTiter-Glo(CTG) assayにより細胞増殖能を評価したところ、対照群に比べて有意に抑制された。S100P遺伝子における脱メチル化を調べるために、SSA/P組織よりDNAを抽出し、プロモーター領域、exon 1およびintron 1のCpGアイランドにおけるメチル化をMassARRAY解析により検討したところ、いずれの領域にも有意な脱メチル化を認めた。

以上より、前癌病変であるSSA/Pの発生においては、BRAF変異や遺伝子メチル化に加え、S100Pの脱メチル化が重要な役割を果たすことが示唆された。S100PはCpGアイランドの脱メチル化により転写促進、さらには蛋白質発現の増加をきたし、SSA/Pの細胞増殖を促進することによりSSA/P-cancer sequenceに寄与すると考えられた。

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲医第 1490 号	氏名	高橋 早代
審査委員	主査 島田 光生 副査 片桐 豊雅 副査 常山 幸一		

題目 S100P Expression via DNA Hypomethylation Promotes Cell Growth in the Sessile Serrated Adenoma/Polyp-Cancer Sequence

(Sessile serrated adenoma/polyp-cancer sequenceにおいてS100Pは遺伝子脱メチル化により発現し、細胞増殖を促進する)

著者 Sayo Takahashi, Koichi Okamoto, Toshihito Tanahashi, Shota Fujimoto, Tadahiko Nakagawa, Masahiro Bando, Beibei Ma, Tomoyuki Kawaguchi, Yasuteru Fujino, Yasuhiro Mitsui, Shinji Kitamura, Hiroshi Miyamoto, Yasushi Sato, Naoki Muguruma, Yoshimi Bando, Toshiro Sato, Takahiro Fujimori, Tetsuji Takayama
 令和3年発行 Digestion 掲載予定
 (主任教授 高山 哲治)

要旨 大腸癌はadenoma-carcinoma sequenceにより発生すると考えられてきたが、最近、鋸歯状ポリープから発生するserrated-neoplasia pathwayが注目されている。特に、右側大腸に好発する鋸歯状ポリープ (sessile serrated adenoma/polyp: SSA/P)は*BRAF*変異陽性、マイクロサテライト不安定性を有する前癌病変と考えられ注目されている。SSA/Pは高率に遺伝子メチル化が認められることが報告されているが脱メチル化遺伝子については不明である。

申請者らは、SSA/P、cancer in SSA/P組織を用いてmethylation array解析を行い、SSA/Pの発生、発癌に関わる脱メチル化遺伝子を網羅的に解析するとともに、大腸癌細胞株やSSA/Pから樹立したオルガノイドを用いて脱メチル化遺伝子の機能解析を行った。

得られた結果は以下の如くである。

1. SSA/P及びcancer in SSA/Pにおける脱メチル化遺伝子の数は、それぞれ 42 ± 28 と 214 ± 20 であり、発癌の過程で上昇した。
2. SSA/Pに最も高頻度に認められた脱メチル化遺伝子は*S100P*、*S100a2*、*PKP3*、*MUC2*であった。
3. これらの4遺伝子のうち、PCRでは*S100P*、*S100a2*、*MUC2*のmRNA発現レベルが有意に亢進し、免疫染色では*S100P*蛋白がもっとも著明な発現増加を認めた。
4. 樹立したオルガノイドにおいて *S100P*遺伝子をノックダウンしたところ、細胞増殖能は有意に低下した。同様に、2種類の大腸癌細胞株における*S100P*発現をノックダウンしたところ、いずれも細胞増殖能は有意に低下した。
5. SSA/P組織よりDNAを抽出してMassARRAY解析を行ったところ、*S100P*遺伝子のプロモーター領域、exon 1及びintron 1のCpGアイランドに有意な脱メチル化を認めた。

以上より、SSA/P-cancer sequenceにおいては、*BRAF*変異や遺伝子メチル化に加え、*S100P*の脱メチル化による蛋白発現の増加を介したSSA/Pの細胞増殖の促進が重要な役割を果たしていることが示唆された。

本研究は、新しく提唱された大腸発癌経路の一つであるSSA/P-cancer sequenceにおける脱メチル化の意義を明らかにしたものであり臨床的意義は大きく、学位授与に値すると判定した。