

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15325

研究課題名（和文）腸管洗浄液DNAメチル化を応用した大腸がんリスク予測・超早期診断法の開発

研究課題名（英文）Risk prediction and early detection of colorectal cancer by aberrant DNA methylation in bowel lavage fluid

研究代表者

久保 俊之（Kubo, Toshiyuki）

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：80784313

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では経口腸管洗浄液から腫瘍特異的なDNAメチル化を検出することで大腸がんのリスク予測・超早期診断法を開発することを目的とする。洗浄液は糞便を含まないため、便中DNAよりも腫瘍細胞由来のDNAの割合はるかに多く、がん特異的なDNA化の検出が容易となる。またCTコロノグラフィーによる大腸がんスクリーニング方法の有用性が多数報告されている。しかしながら小さな大腸がんや平坦な病変は同定困難である。CTコロノグラフィーは経口腸管洗浄を必要とすることから、腸管洗浄液メチル化解析が補完的な検査として併用することで両者の欠点を補い、高精度で非侵襲的な大腸がんスクリーニング方法となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸がんは早期発見により内視鏡で治癒可能である。また前癌病変の内視鏡切除により大腸がん発生を予防することも可能である。以上より高リスクや早期大腸がんの患者さんを容易に見つける方法の開発は極めて重要である。便鮮血反応が健康診断で用いられており、早期発見に有用であるが、その後の精密検査である大腸内視鏡検査の受診率が低いことが問題である。本研究での腸管の洗浄液のメチル化検査、そしてCTコロノグラフィーで大腸内視鏡検査の受診率を上げ、大腸がんの早期発見、予防に有用であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Molecular stool analysis is considered to be a promising approach to noninvasive colorectal cancer (CRC) screening, although it requires further improvement. Aberrant DNA methylation is a common event in CRC, and methylation of many genes is a potentially useful marker for stool-based CRC screening. We show that aberrant DNA methylation is detectable in bowel lavage fluid (BLF) obtained through oral bowel preparation. Sufficient bowel preparation enables sensitive detection of tumor-derived DNA methylation in BLF specimens. Combination with other CRC screening methods that require bowel preparation, such as sigmoidoscopy and computed tomographic colonoscopy, would be the best clinical application of the BLF methylation test.

研究分野：消化器病

キーワード：大腸がん スクリーニング

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

大腸がんによる死亡を減らすためには早期発見が重要である。本邦では免疫学的便鮮血反応検査(FIT)が大腸がんスクリーニング検査として普及しているが、偽陰性や、2次スクリーニング(全大腸内視鏡検査)の低受診率が問題となる。従って高精度かつ非侵襲的な大腸がんスクリーニング方法の確立は重要な課題である。

便中 DNA から大腸がん細胞由来の遺伝子異常を検出することで大腸がんスクリーニングに応用する試みは国内外で盛んに研究が行われてきた。便中 DNA のメチル化の有用性を示す研究結果も数多く報告されている。米国では遺伝子変異と DNA メチル化マーカーを組み合わせた検査(Cologuard)が実用化され FDA に認可されたが、649 ドルという高額な検査となっている。

また全大腸内視鏡検査で大腸腫瘍を認めた際には、大腸がんを予防するために内視鏡的に切除することが有用であることが明らかとなっているが、「どのような大腸腫瘍が癌化のポテンシャルの高い病変であり、内視鏡的に切除すべきか?」という問いに対して、未だ明確な答えはない。

### 2. 研究の目的

本研究は大腸がんのリスク予測・超早期診断を可能とする腸管洗浄液検査法と、CT コロノグラフィーを組み合わせた新規大腸がんスクリーニング戦略の構築を目的とする。

### 3. 研究の方法

網羅的 DNA メチル化解析から大腸がんリスクマーカーとなりうる DNA メチル化異常を抽出する。上記で抽出した DNA メチル化について、パイロシークエンス法または MethyLight 法を用いて多数検体で検証する。同定したマーカー候補の DNA メチル化を大腸腫瘍組織で解析することで、発がん過程における生物学的・臨床病理学的意義を検証する。

申請者はこれまでに早期病変から進行大腸癌まで含めた多数検体で、*KRAS*、*BRAF*、*PIK3CA*、*TP53* 変異や DNA メチル化(CIMP)など代表的な分子異常を解析済みである。生検は拡大内視鏡観察下に、表面構造別にピンポイントで採取されており、内視鏡像、病理組織像、分子情報の比較検討が可能である。正常 前がん病変 大腸がんにおけるマーカー候補の DNA メチル化の変化を明らかにし、上記のデータと統合解析する。腸管洗浄液メチル化検査と CT コロノグラフィー併用による大腸がんスクリーニングの有用性を検証する。

どのような大腸腫瘍が癌化のポテンシャルの高い病変であり、内視鏡的に切除すべきかを検討するためにインターバル大腸がんについて検討する。

マーカー候補が遺伝子プロモーターやエンハンサーに存在する場合、その DNA メチル化が遺伝子の発現制御に関わっているか検証する。大腸がん細胞株を用いて、DNA メチル化酵素阻害剤処理が遺伝子発現に与える影響を解析する。またプロモーター領域やエンハンサー領域をクロニングし、DNA メチル化が転写活性に与える影響をレポーターアッセイで解析する。がんとの相関が知られていない遺伝子であった場合、大腸がん細胞株を用いて過剰発現あるいはノックダウンを行い、増殖、遊走、浸潤、アポトーシス、細胞周期、in vivo 腫瘍形成能などに与える影響を解析する。

### 4. 研究成果

便中 DNA の大半は、腸内細菌に由来するものである。大腸内視鏡検査の際に前処置薬として服用・排泄される経口腸管洗浄液に着目した。洗浄液は糞便を含まないため、便中 DNA よりも腫瘍細胞由来の DNA の割合はるかに多く、がん特異的な DNA 化の検出が容易となることを見いだした。さらに腸管洗浄液のメチル化スコアで大腸がんリスクを層別化することが可能であった。(メチル化スコア 1, 感度 92%、特異度 53%、メチル化スコア 3, 感度 51%、特異度 89%)

CT コロノグラフィーと腸管洗浄液メチル化解析併用について、検討した。進行大腸がんは全て、CT コロノグラフィーまたは腸管洗浄液 DNA メチル化で診断可能であった。CT コロノグラフィーによる大腸がんスクリーニング方法の有用性が多数報告されている。しかしながら小さな大腸がんや平坦な病変は同定困難とされており、我々の検討でも CT コロノグラフィーで同定困難であった、平坦病変、CT コロノグラフィーで小ポリープと診断された小型大腸がんは、腸管洗浄液メチル化解析から大腸がん判定でき、CT コロノグラフィーは経口腸管洗浄を必要とすることから、腸管洗浄液メチル化解析が補完的な検査として併用することで両者の欠点を補い、高精度で非侵襲的な大腸がんスクリーニング方法となることが示唆された。

さらに洗浄液でメチル化が検出されたが、大腸がんが存在しない症例について検討したところ、胃がんが存在する症例が複数あった。胃癌においては内視鏡下で胃内を洗浄し洗浄液よりメチル化を検出することで胃癌の存在を診断することが可能であることが報告されている。しかし内視鏡検査を併い、本研究のような非侵襲的な方法での報告例はない。経口腸管洗浄液を用いる場合、胃がんから遊離した胃がん細胞も含まれており、検出できたと考えられた。以上より、経口腸管洗浄液を用いることで、全消化管癌をスクリーニング対象とできる可能性が示唆された。

インターバル大腸がん、前回検査から 5 年以内に浸潤がんが発見された症例について検討したところ、*BRAF* 変異症例が多く、鋸歯状病変由来が多いことが明らかとなった。鋸歯状病変にがんを伴った症例、鋸歯状病変の網羅的メチル化解析により、鋸歯状病変の癌化と関連する遺伝

子 S の異常メチル化を同定した。

大腸発がんにおける遺伝子 S の機能を明らかにするため、まず大腸がん細胞株に遺伝子 S 発現ベクターを導入し、細胞増殖に与える影響を解析した。cell viability アッセイおよびコロニー形成アッセイの結果、遺伝子 S の過剰発現は大腸がん細胞の増殖とコロニー形成を抑制した。一方、遺伝子 S は大腸がん細胞の浸潤能、遊走能、アポトーシスには影響を与えなかった。また in vivo での腫瘍形成に与える影響を検証するため、遺伝子 S を導入した大腸がん細胞をヌードマウスに移植した結果、遺伝子 S が xenograft の形成を軽度抑制することを明らかにした。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 久保俊之、山野泰穂、山本英一郎、三橋慧、鈴木拓、長谷川匡、永塚真、菅井有、仲瀬裕志	4. 巻 22
2. 論文標題 拡大内視鏡診断と分子生物学的解析が可能であったTSA の癌化症例	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 INTESTINE	6. 最初と最後の頁 485,492
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ohwada Sae, Iida Tomoya, Hirayama Daisuke, Sudo Gota, Kubo Toshiyuki, Nojima Masanori, Yamashita Kentaro, Yamano Hiroo, Nakase Hiroshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Clinicopathological comparison between acute gastrointestinal-graft-versus-host disease and infectious colitis in patients after hematopoietic stem cell transplantation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1371/journal.pone.0200627	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miyake Takakazu, Iida Tomoya, Masaki Yoshiharu, Onodera Kei, Kubo Toshiyuki, Yamashita Kentaro, Yamano Hiroo, Nakase Hiroshi	4. 巻 11
2. 論文標題 A case of nodal malignant lymphoma presenting with arterial bleeding related to its duodenal penetration	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 229 ~ 234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1007/s12328-018-0827-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamashita Kentaro, Suzuki Ryo, Kubo Toshiyuki, Onodera Kei, Iida Tomoya, Saito Mayuko, Arimura Yoshiaki, Endo Takao, Nojima Masanori, Nakase Hiroshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Gastric Xanthomas and Fundic Gland Polyps as Endoscopic Risk Indicators of Gastric Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gut and Liver	6. 最初と最後の頁 409 ~ 414
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.5009/gnl17136	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kubo Toshiyuki, Yamashita Kentaro, Yokoyama Yoshihiro, Hirayama Daisuke, Shirata Tomohiro, Mitsuhashi Kei, Onodera Kei, Yamamoto Eiichiro, Noshō Katsuhiko, Yamano Hiroo, Kubo Terufumi, Sugita Shintaro, Hasegawa Tadashi, Nakase Hiroshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Hepatic portal venous gas due to polystyrene sulfonate-induced enteritis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 220 ~ 223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1007/s12328-018-0818-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iida Tomoya, Ohkubo Yosuke, Kubo Toshiyuki, Yamashita Kentaro, Onodera Kei, Yamamoto Eiichiro, Noshō Katsuhiko, Ito Toshiro, Yamano Hiroo, Nakase Hiroshi	4. 巻 6
2. 論文標題 A case of a rectal stricture related to ischemic proctitis following rupture of an aortic aneurysm	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Endoscopy International Open	6. 最初と最後の頁 E186 ~ E189
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1055/s-0043-117946	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iida Tomoya, Yamashita Kentaro, Ohwada Sae, Ohkubo Yosuke, Hirano Takehiro, Miyake Takakazu, Onodera Kei, Kubo Toshiyuki, Yamano Hiroo, Nakase Hiroshi	4. 巻 18
2. 論文標題 Natural history of gastric cancer from a retrospective review of endoscopic images of older patients with interval gastric cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Geriatrics & Gerontology International	6. 最初と最後の頁 997 ~ 1002
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1111/ggi.13289	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yorozu Akira, Yamamoto Eiichiro, Niinuma Takeshi, Tsuyada Akihiro, Maruyama Reo, Kitajima Hiroshi, Numata Yuto, Kai Masahiro, Sudo Gota, Kubo Toshiyuki, Nishidate Toshihiko, Okita Kenji, Takemasa Ichiro, Nakase Hiroshi, Sugai Tamotsu, Takano Kenichi, Suzuki Hiromu	4. 巻 111
2. 論文標題 Upregulation of adipocyte enhancer binding protein 1 in endothelial cells promotes tumor angiogenesis in colorectal cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1631 ~ 1644
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1111/cas.14360	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----