

平成23年5月31日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590572

研究課題名（和文）大腸腫瘍に対する非侵襲的診断方法による総合的診断の確立

研究課題名（英文） Development of Non-invasive Screening Tool to Detect Colorectal Neoplasia.

研究代表者

永坂 岳司（NAGASAKA TAKESHI）

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：30452569

研究成果の概要（和文）：

大腸癌死亡を下げる最も効果的な方法は的確な非侵襲的スクリーニング法の開発である。我々は、便中の剥離された癌細胞からのDNAメチル化を検出する技術を開発し、その効果の検討を行った。まず、便中ヒト由来DNAの異常メチル化を測定するために新規スクリーニングツールの開発を行い、その手法を用いて、胃癌、結腸直腸の腫瘍を伴う患者および健常者から得られた合計、296の便サンプルの解析を行った。その結果、胃癌を持った患者の57.1%、結腸直腸癌を持った患者の75.0%、および結腸直腸のハイリスクアデノーマを持った患者の44.4%を我々の開発したスクリーニング法にて検出可能であった。私たちの開発した非侵襲的便中DNAメチル化分析法は、結腸直腸の腫瘍だけでなく胃癌も高感度にスクリーニングすることが可能であり、次世代スクリーニングツールとして期待される。

研究成果の概要（英文）：

The development of noninvasive screening tests is important to reduce mortality from gastrointestinal neoplasia. We sought to develop such a test by analysis of DNA methylation from exfoliated cancer cells in feces. We developed a novel strategy that uses single-step modification of DNA with sodium bisulfite and fluorescence polymerase chain reaction methodology to measure aberrant methylation in fecal DNA. Methylation was analyzed in 296 fecal samples obtained from a variety of patients, including 21 with gastric tumors, 152 with colorectal tumors, and 10 with non-neoplastic or inflammatory lesions in the gastrointestinal lumen. The assay successfully identified one or more methylated markers in fecal DNA from 57.1% of patients with gastric cancer, 75.0% of patients with colorectal cancer, and 44.4% of patients with advanced colorectal adenomas, but only 10.6% of subjects without neoplastic or active diseases. Methylation in fecal DNA is associated with the presence of gastrointestinal tumors relative to non-neoplastic conditions. Our novel fecal DNA methylation assay provides a possible means to noninvasively screen not only for colorectal tumors but also for gastric tumors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000

2010年度	400,000	120,000	520,000
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：腫瘍検査学、大腸癌、メチル化、スクリーニング、便潜血反応

1. 研究開始当初の背景

我が国では大腸癌患者は増加傾向（年間死亡は約4万人）にあり、数年内にがん死亡の1位になることが予想されている。がんの罹患率と死亡率の激減を目指した「第3次対がん10か年総合戦略」が策定されたが、大腸癌死亡を下げる最も効果的な方法は確かなスクリーニング法の開発による早期（手術可能な状態での）発見に他ならない。大腸癌に対する非侵襲的診断アプローチには、現在、便潜血反応（FOBT）と米国のEXACT SCIENCE社による便中の癌由来のDNAに認められる遺伝子変異を検出する方法（PreGen-Plus）が行われている。これら方法はある程度の成功を収めているが、(1)前がん病変に対する感度が低いこと、(2)右側大腸癌に対する感度が低いこと、の2点を共通の弱点に持つ。従って、これら弱点を克服することが可能な新規方法論の確立が望まれている。我々は以前より蓄積してきた癌のエピジェネティック（DNAのメチル化）研究での成果を応用し、便中の癌由来DNAのメチル化の検出による大腸癌のスクリーニング法に取り組みを行ってきた。その結果、現在行われている非侵襲的診断アプローチの2つの弱点を克服することが可能であり、かつ従来の便DNAを用いた検査の煩雑な手技を大幅に削減したスクリーニング方法を確

立した（非侵襲的便中DNAメチル化分析法）。

2. 研究の目的

本研究は、(1)非侵襲的便中DNAメチル化分析法の有益性を大規模研究によって検証し、(2)同じ検体を用いて、非侵襲的便中DNAメチル化分析法とFOBTを組み合わせた結果を検討し、大腸腫瘍に対する非侵襲的診断方法による総合的診断の確立およびその効果を検討することを目標とする。

3. 研究の方法

- (1) 新規検出法の開発
- (2) 便検体を用いての解析
- (3) 大腸腫瘍に対する感度・特異度の検討

4. 研究成果

- (1) 新規検出法の開発

便検体からヒト由来DNAを増幅し、且、その増幅産物内に認められる腫瘍特異的DNAメチル化を検出する方法は当初はアガロースゲルにて電気泳動を行うことにより結果を得ていたが、その工程は煩雑であり、非効率であったため、その最終確認工程をキャピラリーシーケンサーにて行うことができるよ

うに開発を行った。

(2) 便検体を用いての解析

関連病院を中心に得られた上部消化管内視鏡と下部消化管内視鏡を施行された 303 例の便検体を収集し、便保存状態が良好であった 296 検体の解析を行い、その臨床データと比較検討を行った。

(3) 大腸腫瘍に対する感度・特異度の検討

この 296 の便検体は、84 例の大腸癌患者、56 例の大腸腺腫患者、12 例の大腸過形成ポリープ患者、4 例の虚血性大腸炎患者、2 例の潰瘍性大腸炎、21 例の胃癌患者、4 例の胃十二指腸潰瘍患者、そして 113 例の内視鏡上なんらかの新生物または活動性病変を認めなかった患者から構成された。今回我々は 4 つの DNA メチル化領域を便中ヒト DNA メチル化解析のバイオマーカーとした。そのうち 1 つでもメチル化を認めた場合を検査陽性とする、大腸癌の 75.0%、そして、進行大腸腺腫の 44.4% が検査陽性となり、FOBT の大腸癌 50.0%、進行大腸腺腫の 11.1% よりも明らかに高感度であった。また本検出法の偽陽性であるが、内視鏡上なんらかの新生物または活動性病変を認めなかった患者からの便では 10.6% 認めるのみであった。驚くべきことに、胃癌患者の 57.1% も便中 DNA メチル化検出によりスクリーニングすることが可能であった。以上、私たちの開発した非侵襲的便中 DNA メチル化分析法は、結腸直腸の腫瘍だけでなく胃癌も高感度にスクリーニングすることが可能であり、次世代スクリーニングツールとして期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 16 件)

1. Somatic hypermethylation of MSH2 is a frequent event in Lynch Syndrome colorectal cancers.

Nagasaka T, Rhee J, Kloor M, Gebert J, Naomoto Y, Boland CR, Goel A. *Cancer Res.* 2010;70(8):3098-108. 査読有

2. An optimized pentaplex PCR for detecting DNA mismatch repair-deficient colorectal cancers.

Goel A, **Nagasaka T**, Hamelin R, Boland CR. *PLoS One.* 2010;5(2):e9393. 査読有

3. Epigenetic silencing of miR-137 is an early event in colorectal carcinogenesis.

Balaguer F, Link A, Lozano JJ, Cuatrecasas M, **Nagasaka T**, Boland CR, Goel A. *Cancer Res.* 2010;70(16):6609-18. 査読有

4. Fecal MicroRNAs as novel biomarkers for colon cancer screening.

Link A, Balaguer F, Shen Y, **Nagasaka T**, Lozano JJ, Boland CR, Goel A. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010;19(7):1766-74. 査読有

5. 便中メチル化 DNA 検出による消化器がんスクリーニング: 消化器がんを非侵襲的にスクリーニングすることは可能か?

永坂岳司, **田中紀章**, 孫冬生, 猶本良夫, **松原長秀**, 八木孝仁, 藤原俊義. *岡山医学雑誌* 2010 第 122 巻: 107-112. 査読有

6. Analysis of fecal DNA methylation to detect gastrointestinal neoplasia.

Nagasaka T, **Tanaka N**, Cullings HM, Sun DS, Sasamoto H, Uchida T, Koi M, Nishida N, Naomoto Y, Boland CR, **Matsubara N**, Goel A. *J Natl Cancer Inst.* 2009 Sep 16;101(18):1244-58. 査読有

7. Mutations in both KRAS and BRAF may contribute to the methylator phenotype in colon cancer.

Nagasaka T, Koi M, Kloor M, Gebert J, Vilkin A, Nishida N, Shin SK, Sasamoto H, **Tanaka N**, **Matsubara N**, Boland CR, Goel A. *Gastroenterology.* 2008 Jun;134(7):1950-60. 査読有

8. Methylation pattern of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene in colon during progressive colorectal tumorigenesis.

Nagasaka T, Goel A, Notohara K, Takahata T, Sasamoto H, Uchida T, Nishida N,

Tanaka N, Boland CR, Matsubara N. *Int J Cancer*. 2008;122(11):2429-36. 査読有

9. Aberrant methylation of multiple tumor suppressor genes in aging liver, chronic hepatitis, and hepatocellular carcinoma.

Nishida N, Nagasaka T, Nishimura T, Ikai I, Boland CR, Goel A. *Hepatology*. 2008;47(3):908-18. 査読有

(その他 7編)

[学会発表] (計 20件)

1. 永坂 岳司、An Optimized Pentaplex PCR for Detecting DNA Mismatch Repair-Deficient Colorectal Cancers、日本人類遺伝学会 第 55 回大会、2010/10/27、埼玉
2. 永坂 岳司、Somatic hypermethylation of MSH2 is a frequent event in lynch syndrome colorectal cancers (Lynch 症候群大腸癌と MSH2 メチル化)、第 69 回日本癌学会学術総会、2010/9/23、大阪
3. 永坂 岳司、大腸癌化学療法における個別化医療のための KRAS/BRAF/MSI マトリックスの提案、第 65 回日本消化器外科学会総会、2010/7/14、山口
4. 永坂 岳司、KRAS/BRAF/MSI 分類による術前からの大腸癌治療戦略構築の提案、第 73 回大腸癌研究会、2010/7/2、奄美
5. 永坂 岳司、大腸癌バイオマーカーの未来、Chugai Colorectal Cancer Conference、2010/5/20、大阪
6. 永坂 岳司、Analysis of fecal DNA methylation for detecting gastrointestinal neoplasia、第 64 回日本消化器外科学会総会、2009/7/16、大阪
7. 谷口信将、Differential mutation of BRAF/KRAS in primary and liver metastasis of colon cancer、第 64 回日本消化器外科学会総会、2009/7/16、大阪
8. 岡 哲弘、Genetic and epigenetic alterations of netrin receptors in gastric cancer、第 64 回日本消化器外科学会総会、2009/7/16、大阪
9. 永坂 岳司、初発大腸癌と肝転移巣における KRAS/BRAF 突然変異の検出および解析〜

必要な感度は？一致率は？、第 91 回日本消化器病学会中国支部例会、2009/6/13、岡山

10. Ajay Goel、Gene Expression Profiling Identifies Loss of Fhit Expression Due to Epigenetic Silencing As a Frequent Event in African American (AA) Patients with Colorectal Cancer (CRC)、Digestive Disease Week 2009、2009/5/30~6/4、Chicago

11. Keisuke Toda、Genetic and Epigenetic Alterations of Netrin Receptors in Gastric Cancer、Digestive Disease Week 2009、2009/5/30~6/4、Chicago

12. 永坂 岳司、Analysis of fecal DNA methylation for detecting gastrointestinal neoplasia、第 67 回日本癌学会学術総会、2008/10/29、名古屋

(その他、8編)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永坂 岳司 (NAGASAKA TAKESHI)
岡山大学・岡山大学病院・助教
研究者番号：30452569

(2) 研究分担者

近藤 喜太 (KONDOU YOSHITAKA)
岡山大学・岡山大学病院・医員
研究者番号：50534765 (H21~H22)

田中 紀章 (TANAKA NORIAKI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：10127566 (H20)

小林 直哉 (KOBAYASHI NAOYA)
岡山大学・岡山大学病院・講師
研究者番号：10325102 (H20~H21)

松原 長秀 (MATSUBARA NAGAHIDE)
岡山大学・医学部・歯学部附属病院・講師
研究者番号：70314672 (H20)

Hiromi Sasamoto (HIROMI SASAMOTO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・外国人客員研究員
研究者番号：10452567 (H20)

(3) 連携研究者

なし