

令和 5 年 5 月 18 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09102

研究課題名（和文）潰瘍性大腸炎関連大腸癌と孤発性大腸癌を鑑別するDNAメチル化マーカーの開発

研究課題名（英文）Development of diagnostic marker for ulcerative colitis associated cancer

研究代表者

近藤 哲（Kondo, Satoru）

三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエイト

研究者番号：60763737

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：当科にて大腸全摘出術を施行した潰瘍性大腸炎患者と原発切除を施行した大腸癌患者から、dysplasia、癌部、悪性新生物を含まない潰瘍性大腸炎粘膜や正常大腸粘膜を採取し、多数のサンプルを用いて、発癌に関与する候補メチル化遺伝子の網羅的解析を行った。S-CRCおよびUC-CRC患者の癌組織において有意に高メチル化レベルを認める遺伝子Xを同定した。遺伝子Xが直腸粘膜組織で有意に高メチル化レベルであることを同定し、直腸粘膜組織における遺伝子Xのメチル化レベルが発癌予測マーカーとなりえ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

今回、同定した遺伝子XのDNAメチル化マーカーを用いたUC-CRCとS-CRCを鑑別可能とする診断マーカーを開発することで、これまでにない新しい診断治療アプローチとなる。この診断マーカーが直腸粘膜組織の発現を検討することで診断困難な潰瘍性大腸炎癌化患者を非侵襲的検査法で同定できることが期待され、さらに便中・血中の発現との関連を検討し、より少ないサーベイランス方法を確立することで、UCに合併したS-CRCに対する無用な大腸全摘術を回避し、患者の腫瘍学的予後のみならず術後QOLを担保することが可能となる。

研究成果の概要（英文）：We collected ulcerative colitis mucosa, normal colon mucosa, dysplasia, and cancerous tissue from patients with ulcerative colitis or colorectal cancer underwent surgery at our department. We performed a comprehensive analysis of candidate methylated genes involved in carcinogenesis using a large number of samples. Gene X methylation levels were significantly higher in cancer tissues of S-CRC and UC-CRC patients. In addition, gene X methylation levels significantly higher in rectal mucosal tissue than cecal tissue. The methylation level of gene X in rectal mucosal tissue may be a predictive marker for carcinogenesis.

研究分野：下部消化管悪性腫瘍

キーワード：潰瘍性大腸炎 大腸癌 メチル化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎(ulcerative colitis: UC)患者は本邦約10万人で、年間約4千人が発病し、患者数は増加の一途を辿っているが、ステロイド、5-ASAに加え、近年の免疫抑制剤、生物学的製剤を中心とした内科的治療の進歩により、劇症例、内科的治療抵抗例は減少傾向を示し、慢性長期経過例が増加している。一方、慢性経過例では炎症を母地とした Dysplasia-Carcinoma Sequence による大腸癌(UC-associated CRC:UC-CRC)を合併し、7-8年以上経過した全大腸炎型の累積癌化率は30年で30-40%と報告されている。特に隆起を望する UC-dysplasia は、浸潤癌を高率に伴うため、基本的に大腸全摘術が推奨されている。

一方、Adenoma-Carcinoma Sequence による散発性大腸癌(Sporadic CRC:S-CRC)は、通常の大腸粘膜と同様に UC 粘膜にも発生し、領域リンパ節郭清を含む手術術式で根治性を保つことが可能なことから、UC-CRC と S-CRC とでは、手術術式、そして術後の生活の質が著しく異なる(UC-CRC:大腸全摘術、S-CRC:大腸部分切除)ため、長期罹患 UC における UC-CRC と S-CRC の鑑別は重要となる。

潰瘍性大腸炎癌化の発現機序としては DNA 変異に伴う Genetic なものと遺伝子配列変異を伴わない遺伝子発現調節を来す Epigenetic 変化が大きく考慮されてきた。とくに Epigenetic 変化の中でも代表的な DNA メチル化は、炎症環境が DNA メチル化促進の有力な因子とされ、癌抑制遺伝子がメチル化されると当該遺伝子転写が抑制され発癌にいたることが見出されている。CpG island はヒト遺伝子のプロモータとしての役割があり、メチル化されると遺伝子発現が抑制される。これまでに、estrogen receptor, p16, CSPG, MYOD 遺伝子のメチル化は潰瘍性大腸炎に合併した癌部で有意に非癌部粘膜に比べ高く、更に癌合併潰瘍性大腸炎患者の非癌部粘膜においても、癌を合併していない患者粘膜に比べ有意に高く、DNA メチル化の "Field effect" の概念が報告されている。DNA メチル化の "Field effect" の概念を用いた癌化のハイリスク群選定によるあらたなサーベイランス法が期待されてきており、近年では、Aging に伴う長年にわたる時間経過とともに正常組織においておこる DNA メチル化を "Epigenetic drift" と呼ばれ、発癌リスクとの関連が報告されてきている。潰瘍性大腸炎は直腸から口側に炎症が広がる病態で、直腸の慢性炎症の蓄積は他の大腸部位に比べ高いことが推測される。また炎症と緩解による腸管粘膜細胞の再上皮化は、腸管の Aging を増長している可能性が考慮される。

## 2. 研究の目的

UC-CRC 発癌 (Dysplasia-Carcinoma Sequence) と S-CRC 発癌(Adenoma-Carcinoma Sequence) はこれまでの研究により、発癌過程におけるゲノム異常発症時期の違いが報告されており、エピゲノム異常である DNA メチル化も同様の変化を起こる可能性が考慮される。また先行研究において直腸粘膜が潰瘍性大腸炎長期罹患に伴う炎症蓄積・発癌リスクを反映することから、直腸粘膜と腫瘍のメチル化程度の差を評価することにより、S-CRC と UC-CRC を鑑別可能となることを明らかにした。以上の背景から、今回、潰瘍性大腸炎や孤発性大腸癌症例における癌組織と直腸粘膜における DNA メチル化そのものや、その差を利用することにより、UC-CRC と S-CRC を鑑別可能とする DNA メチル化マーカーの開発をすることはこれまでにない新しいアプローチとなる。またそれが便中、血清に反映されることが確認できれば診断困難な潰瘍性大腸炎癌化患者を非侵襲的検査法で同定できることが期待され、これにより UC に合併した S-CRC に対する無用な大腸全摘術を回避し、患者の腫瘍学的予後のみならず術後 QOL を担保することが可能となる。

## 3. 研究の方法

当科にて大腸全摘出術を施行した潰瘍性大腸炎患者および原発切除術を施行した大腸癌患者から dysplasia、癌部、悪性新生物を含まない潰瘍性大腸炎粘膜や正常大腸粘膜、マッチした術前血清ならびに術前腸管洗浄液を採取している。これらの多数のサンプルを用いて、候補メチル化遺伝子の網羅的解析を行った。

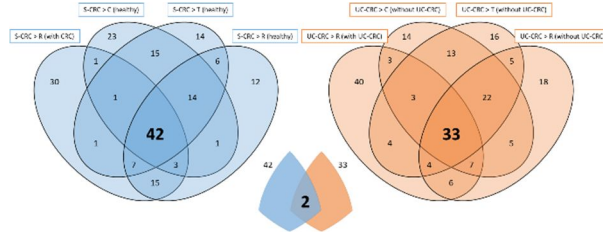
S-CRC 患者 378 例から 736 個、UC 患者 155 例から 285 個、UC-CRC 患者 100 例から 147 個、健常者 36 例から 52 個の大腸粘膜を採取した。QIAmp DNA Mini kit, QIAmp DNA FFPE tissue kit を用いて DNA を抽出し、EZ DNA methylation Gold Kit を用いて DNA パイサルファイト化を行った。

Discovery phase として、S-CRC 患者 6 例から癌組織、正常大腸粘膜組織、健常者 8 例から盲腸組織、横行結腸組織、直腸組織を用いて包括的 DNA メチル化アレイを行った。同様に、UC-CRC 患者 8 例から癌組織、正常大腸粘膜組織、UC 患者 8 例から盲腸組織、横行結腸組織、直腸組織を用いて包括的 DNA メチル化アレイを行った。

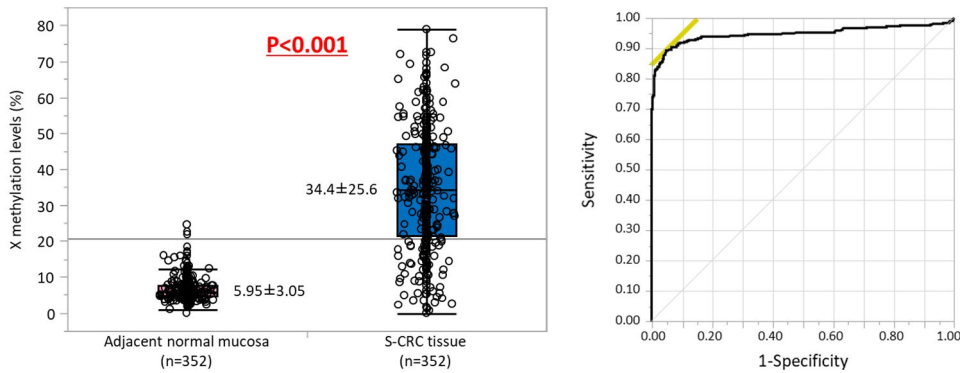
S-CRC 患者の癌組織、正常大腸粘膜組織、UC 患者の盲腸組織、横行結腸組織、直腸組織、UC-CRC 患者の癌組織、盲腸組織、横行結腸組織、直腸組織を用いて、Discovery phase で抽出した遺伝子 'X' の DNA メチル化の部位・癌発現に伴う発現を検証し、発癌予測マーカーとしての可能性を検討した。

## 4. 研究成果

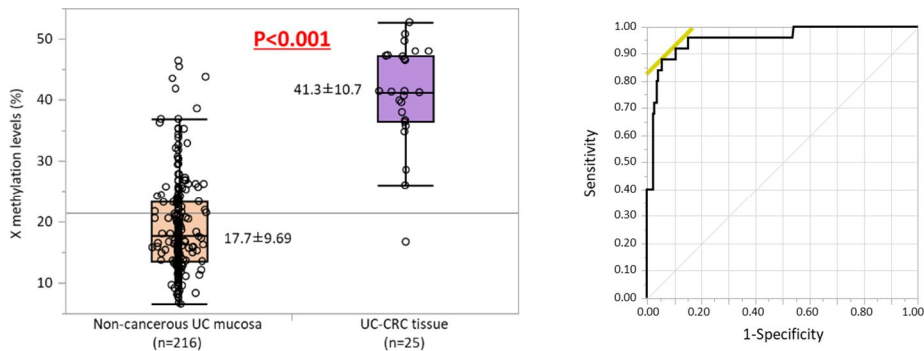
(1) 癌組織で高メチル化の CpG サイト上位 100 個を選定し、正常粘膜組織と比較して、S-CRC 患者の癌組織で高メチル化の CpG サイト 42 個を同定した。同様に UC-CRC において癌組織と正常粘膜組織(盲腸組織、横行結腸組織、直腸組織)と比較して、高メチル化の CpG サイトを 33 個同定した(下図)。以上の解析から重複する CpG サイトが 2 個抽出され、同部位を含む遺伝子 X について検討を行うこととした。



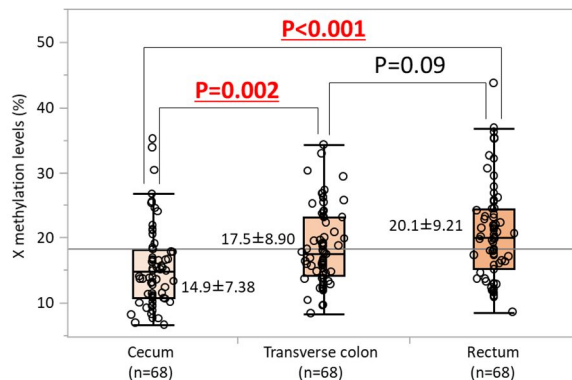
(2) S-CRC 患者の癌組織では遺伝子 X のメチル化レベルは正常粘膜組織に比べて有意に高値であった。ROC 曲線を用いた S-CRC の癌組織と正常粘膜組織の遺伝子 X のメチル化レベルの診断能は感度・特異度ともに非常に優れていた(AUC:0.95, 感度 89%、特異度 95%) (下図)。



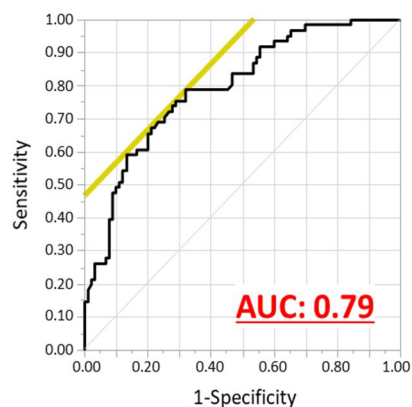
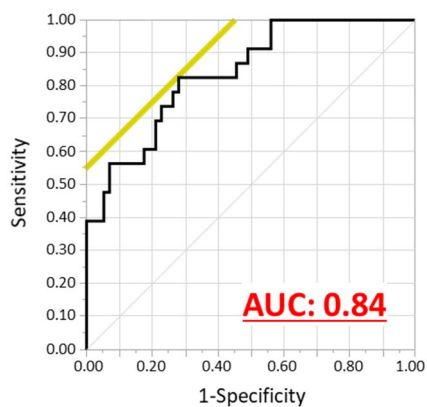
(3) UC-CRC 患者においても、癌組織における遺伝子 X のメチル化レベルは正常粘膜組織に比べて有意に高値であった。ROC 曲線を用いた UC-CRC の癌組織と正常粘膜組織の遺伝子 X のメチル化レベルの診断能は感度・特異度ともに非常に優れていた(AUC:0.95, 感度 88%、特異度 94%) (下図)。



(4) 正常大腸粘膜組織における遺伝子 X のメチル化レベルは、肛門側腸管ほど高値であり、直腸粘膜組織では盲腸粘膜組織と比較して有意に高値であった( $P < 0.001$ 、下図)。



(5) 直腸粘膜組織における遺伝子 X のメチル化レベルの診断能は UC-CRC、S-CRC とともに感度・特異度ともに優れており、発癌予測マーカーになる可能性が示唆された (UC-CRC; AUC:0.84, 感度 83%、特異度 72%、S-CRC; AUC:0.79, 感度 75%、特異度 71%、下図)。



### 成果のまとめ

S-CRC および UC-CRC 患者の癌組織において有意に高メチル化レベルを認める遺伝子 X を同定した。遺伝子 X が直腸粘膜組織で有意に高メチル化レベルであることを同定し、直腸粘膜組織における遺伝子 X のメチル化レベルが発癌予測マーカーとなりえる可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Okugawa Yoshinaga, Toiyama Yuji, Fujikawa Hiroyuki, Kawamura Mikio, Yasuda Hiromi, Yokoe Takeshi, Mochiki Ikuyo, Okita Yoshiki, Ohi Masaki, Nakatani Kaname	4. 巻 51
2. 論文標題 Cumulative perioperative lymphocyte/C-reactive protein ratio as a predictor of the long-term outcomes of patients with colorectal cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Surgery Today	6. 最初と最後の頁 1906 ~ 1917
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00595-021-02291-9	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 Fujikawa Hiroyuki, Okugawa Yoshinaga, Yamamoto Akira, Imaoka Hiroki, Shimura Tadanobu, Kitajima Takahito, Kawamura Mikio, Yasuda Hiromi, Okita Yoshiki, Yokoe Takeshi, Ohi Masaki, Toiyama Yuji	4. 巻 5
2. 論文標題 Cumulative C-reactive Protein in the Perioperative Period as a Novel Marker for Oncological Outcome in Patients with Colorectal Cancer Undergoing Curative Resection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the Anus, Rectum and Colon	6. 最初と最後の頁 281 ~ 290
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.23922/jarc.2021-013	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 Kitajima Takahito, Okita Yoshiki, Kawamura Mikio, Kondo Satoru, Toiyama Yuji, Uchida Keiichi, Kusunoki Masato	4. 巻 20
2. 論文標題 The relationship between preoperative T helper cytokines in the ileal mucosa and the pathogenesis of pouchitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12876-020-01421-w	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 Kusunoki K., Toiyama Y., Okugawa Y., Yamamoto A., Omura Y., Kusunoki Y., Yin C., Kondo S., Okita Y., Ohi M., Sasaki H., Bando T., Uchino M., Ikeuchi H., Kusunoki M.	4. 巻 23
2. 論文標題 The advanced lung cancer inflammation index predicts outcomes in patients with Crohn's disease after surgical resection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Colorectal Disease	6. 最初と最後の頁 84 ~ 93
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/codi.15248	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 -

〔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
研究分担者	問山 裕二  (Toiyama Yuji)  (00422824)	三重大学・医学部附属病院・准教授   (14101)	
研究分担者	大北 喜基  (Okita Yoshiki)  (20378342)	三重大学・医学部附属病院・講師   (14101)	
研究分担者	奥川 喜永  (Okugawa Yoshinaga)  (30555545)	三重大学・医学部・助教   (14101)	
研究分担者	北嶋 貴仁  (Kitajima Takahito)  (30586772)	三重大学・医学部附属病院・助教   (14101)	
研究分担者	楠 正人  (Kusunoki Masato)  (50192026)	三重大学・医学系研究科・寄附講座大学教員   (14101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------