

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月2日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590626

研究課題名（和文） 便潜血検査用検体を用いた大腸癌新規スクリーニング法の開発

研究課題名（英文） Fecal-based long DNA assay for colorectal cancer detection

研究代表者

末広 寛 (SUEHIRO YUTAKA)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：40290978

研究成果の概要（和文）：

目的：大腸癌の主要なスクリーニング法に便中の血液を検出する便潜血検査があるが、早期癌での感度が低い、偽陽性を生じるなどの問題があり、感度、特異度ともにより優れた検査法の確立が望まれる。そこで便検体を用いた DNA テスト（TWIST1 メチル化検出）による大腸癌スクリーニング法の確立を試みた。大腸癌患者の便より DNA を抽出し TWIST1 メチル化レベルを測定したところ TWIST1 メチル化陽性であったのは 9/49 例（18%）であった。この結果から便 DNA 検査による大腸癌スクリーニングの有用性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Purpose: Although the fecal occult blood test is performed daily as a primary screening test, sensitivity is low, and false positive reactions may occur when hemorrhoids are present.

Fecal DNA analysis appears to be a valid alternative method providing more advanced and reliable detection of CRC. Thus, we evaluated whether the DNA test could improve diagnostic performance for CRC detection.

Methods: DNA was isolated from stools of patients with CRC and Twist1 methylation level was evaluated using pyrosequencing.

Results: We found TWIST1 methylation occurred in feces with a sensitivity of 18% for detection of CRC.

Conclusions: TWIS1 methylation assay may be useful for the detection of CRC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
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：便 DNA 検査

1. 研究開始当初の背景

大腸癌は、2008年に世界中で新たに発生した全癌患者数の約9.8%を占め、癌による部位別死亡者数でも第4位となっており、予後不良な癌のひとつである。大腸癌の主要なスクリーニング法に便中の血液を検出する便潜血検査があるが、早期癌での感度が低い、偽陽性を生じるなどの問題があり、感度、特異度ともにより優れた検査法の確立が望まれる。便潜血検査に比べ高感度であるとして便中DNAの異常を検出する方法が開発されているがコストが高く、検査に適した検体の前処理や解析法が検討段階でありほとんど実用化には至っていない。

2. 研究の目的

我々は大腸非腫瘍部に比べて大腸腫瘍でTWIST1のメチル化レベルが有意に高いことを発見し、TWIST1メチル化は大腸腫瘍のスクリーニングにおける有用なマーカーである可能性があることを報告している。しかしながら我々がこれまでにメチル化検出法として用いてきた Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) 法は操作が煩雑で時間がかかる、発癌物質であるエチジウムブロマイドの廃液処理、低レベルメチル化の際の測定値が不安定などの問題があり、検出法の改良が必要である。そこで、COBRA法よりも優れ、臨床検査法としての実用化が可能な新規メチル化検出法の開発を目指し本研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 研究材料

① 細胞株

ヒト大腸癌より樹立された細胞株 RKO、HCT-116、HT-29、DLD-1 (the American Type Culture Collection (Manassas, VA)) を用いた。RKOは10%ウシ胎児血清 (FBS)、0.1 mM MEM nonessential amino acids solution (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA)、1 mM ビルビン酸溶液 (Gibco/Invitrogen)、ペニシリン 100 U/ml、ストレプトマイシン 100 µg/ml を加えた Eagle's minimum essential medium (SIGMA, St. Louis, MO) で培養された。HCT116 と HT-29 は 10%FBS、ペニシリン 100 U/ml、ストレプトマイシン 100 µg/ml を加えた McCoy's 5A medium (Gibco/Invitrogen) で培養された。DLD-1 は 10%FBS、ペニシリン 100 U/ml、ストレプトマイシン 100 µg/ml を加えた RPMI 1640 medium (Gibco/Invitrogen) で培養された。これらの細胞株については以下の条件で DNA 脱メチル化剤 5-aza-2'-deoxycytidine (DAC) (Sigma-Aldrich) を添加し低メチル化状態にした。細胞株に 1 µmol/l の DAC を添加し、72 時間培養し、培養中は 24 時間ごとに DAC を含むメディアム

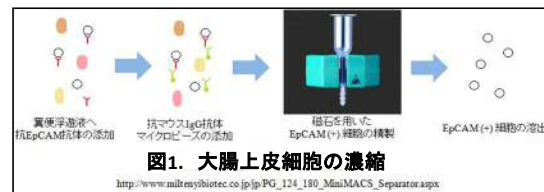
の交換を行った。一方でこの対照として同量のリン酸緩衝食塩水 (PBS) を加えたものも同様に培養した (Mock)。Allprep DNA/RNA Minikit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出した。

② 便検体

大腸腫瘍患者 49 例から採取した便検体を用いた。これらはすべてインフォームドコンセントを得た。

a. DNA 抽出

偽陽性を防ぎ、阻害物質になりうる夾雑物を取り除くために以下の方法で便中の大腸上皮細胞を分離・濃縮し DNA を抽出した (図 1)。



便 1 g を PBS 10 ml に浸し、塊がほぐれるまで 4°C でインキュベーションした後、メッシュ (アイセン工業株式会社) を張った容器に移した。ろ液に Anti-Human CD326 (EpCAM) Purified (eBioscience) 1 µl を加え 4°C で攪拌しながら 12 時間インキュベーションした。遠心して上清を除き、PBS 10 ml と Goat Anti-Mouse IgG MicroBeads (Miltenyi Biotec) 10 µl を加えた後 4°C で攪拌しながら 12 時間インキュベーションした。遠心して上清を除き PBS 10 ml に再懸濁した後、MiniMACS™ Separator にセットしたナイロンメッシュ (508 µm, 山縣屋金網工場) と MACS™ Separation Columns Large Columns (Miltenyi Biotec) に通した。磁石スタンドから取り外したカラムに PBS 1 ml を通し、ろ液を遠心した。上清 800 µl を除去した後、QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出した。

③ Bisulfite 処理

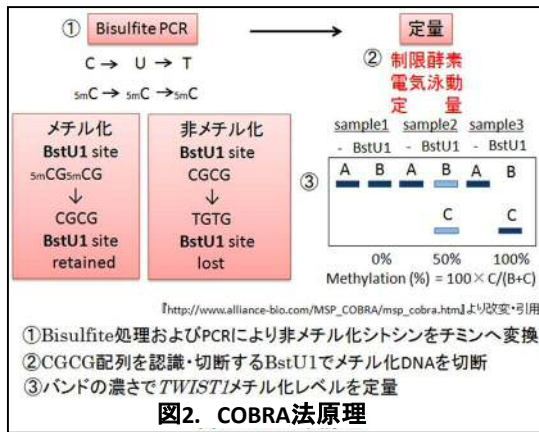
細胞株および便検体から抽出した DNA 400 ng を EpiTect Bisulfite Kit (QIAGEN) を用いて Bisulfite 処理した。

(2) TWIST1 メチル化解析

① COBRA 法

a. COBRA 法概説

COBRA 法は DNA メチル化の定量解析法である。Bisulfite 処理により非メチル化シトシンがウラシルに変換されることを利用し、CpG8, 9) を含む領域に特異的な制限酵素による切断の程度により、DNA のメチル化レベルを決定するものである (図 2)。



b. 方法

解析に用いたプライマーを表1に示す。非メチル化アレルのコントロールとしては、正常ヒト末梢血から抽出したDNAをBisulfite処理したものを用いた。メチル化アレルのコントロールとしては、メチルトランスフェラーゼ処理後Bisulfite処理した末梢血DNAを用いた。テンプレートDNA (Bisulfite処理を行ったDNA) 2 μ l、10 \times Buffer II (Applied Biosystems) 2 μ l、25 mM MgCl₂ 1.6 μ l、8 mM dNTPs 2 μ l、10 μ M プライマーセット 1 μ l、AmpliAq Gold DNA ポリメラーゼ (Applied Biosystems) 0.1 μ l に蒸留水 (大塚製薬) を加え全量を20 μ l とし、サーマルサイクラー i cycler (BioRad) を用いてPCRを行った。

遺伝子	Forward primer Sequence (5'-3')	Reverse primer Sequence (5'-3')
TWIST1	TGTGTAGAAGTTGTTGTTATTG	CRAAAAAAACTATCCTAACC

表1. COBRA法プライマーの配列

PCR産物 8 μ l に10 \times NEBuffer 4 (New England BioLabs) 1 μ l、BstU I (New England BioLabs) 10 Uを加えて全量を10 μ l とし、60 $^{\circ}$ C 2時間インキュベートを行った。制限酵素処理後にLoading buffer (No BPB) を2 μ l 加え、エチジウムブロマイドを含む4%アガロースゲルに全量アプライした。100 bp DNA Ladderをサイズマーカーとして100 Vで電気泳動40分間した後ゲルの撮影を行い、ImageJ (NIH) にてメチル化レベルを調べた。

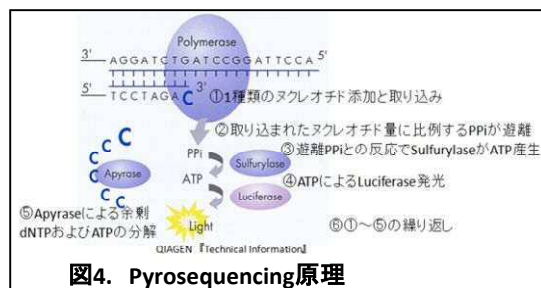
② Pyrosequencing™解析

a. Pyrosequencing™概説

Pyrosequencing™はDNA合成による配列解読原理に基づき、COBRA法に比べて短時間で、かつ簡便な操作で塩基配列データが定量的に得られる方法である (図3)。

すなわちPCR産物を鋳型としたDNA合成反応の際に、dNTPを1種類ずつ添加し、取り込まれたヌクレオチドの量に比例して生じるルシフェラーゼの発光量を記録することで迅速かつ容易に配列解読および定量解析を行

うものである (図4)。



b. 方法

非メチル化コントロールとして正常ヒト末梢血由来DNAに加えてヒト胎盤由来DNAをBisulfite処理したものを用いた。テンプレートDNA (Bisulfite処理を行ったDNA) 1 μ l、10 \times CoralLoad 2.5 μ l、25 mM MgCl₂ 0.5 μ l、10 μ M Primer セット 0.5 μ l、2 \times PyroMark PCR Master Mix 12.5 μ l にRNase-free water 7.5 μ lを加えて全量を25 μ l とし、サーマルサイクラーを用いてPCRを行った。PCR産物 4 μ l を、エチジウムブロマイドを含む3%アガロースゲルにて電気泳動を行い、UV照射下で写真を撮影した。50bp DNA Ladder (Invitrogen) をサイズマーカーとして用いた。PyroMark Q24 システムを用いて、増幅がみられたサンプルにおけるTWIST1メチル化解析を行った。

4. 研究成果

(1) TWIST1メチル化解析 (細胞株を用いたPyrosequencing™およびCOBRA法の比較)

細胞株由来DNAを用いてPyrosequencing™によるTWIST1メチル化解析を行った。図5に示すように2箇所のCpGにおけるメチル化レベルは、HT-29 (Mock) で81-92%、HT-29 (DAC) で21-25%、メチル化の陽性コントロールで92-100%、非メチル化の陽性コントロールで10-12%であった。

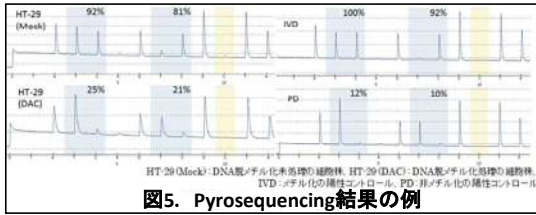


図5. Pyrosequencing結果の例

COBRA 法と Pyrosequencing™の解析結果を比較したところ、有意な相関が認められた (図6)。

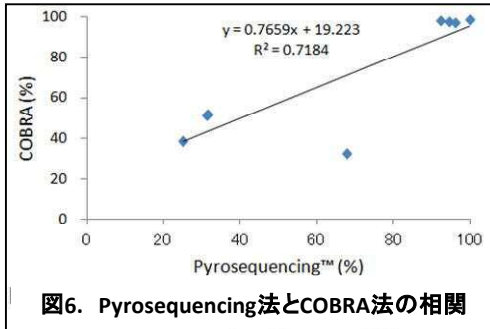


図6. Pyrosequencing法とCOBRA法の相関

(2) TWIST1 メチル化解析 (便検体を用いた Pyrosequencing™および COBRA 法の比較)
便検体より抽出した DNA を用いて Pyrosequencing™および COBRA 法による TWIST1 メチル化解析を行った (図7)。

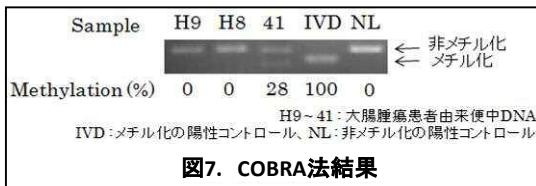


図7. COBRA法結果

各症例の Pyrosequencing™および COBRA 法による TWIST1 メチル化レベルは Case H9 で1%、0%、Case H8 で0-1%、0%、Case 41 で23-25%、28%であり、それぞれ同等のメチル化レベルが認められた (図8)。

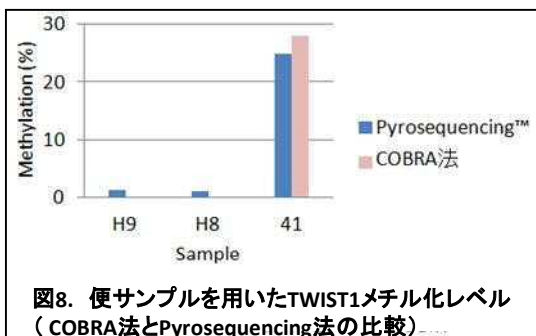


図8. 便サンプルを用いたTWIST1メチル化レベル (COBRA法とPyrosequencing法の比較)

(3) 多数の便検体を用いた Pyrosequencing™による TWIST1 メチル化解析

症例数を用いて TWIST1 メチル化解析を行った (図9)。解析に用いた大腸腫瘍患者 49 例のうち PCR による増幅がみられたのは大腸

腫瘍患者 9 例であった。TWIST1 メチル化レベルはほとんどの症例が非メチル化の陽性コントロールと同程度であった。Case 41 のみが TWIST1 メチル化レベルは 24.9%と高値を示した。

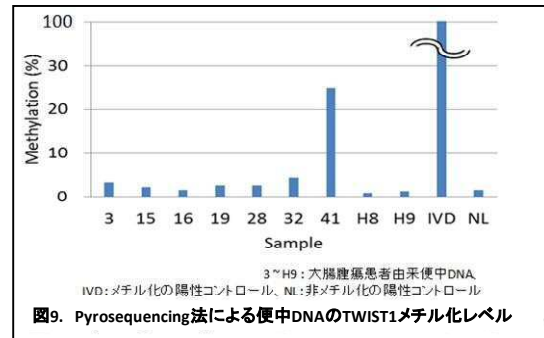


図9. Pyrosequencing法による便中DNAのTWIST1メチル化レベル

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計1件)

① 末広 寛、大腸がん genomics および epigenomics の臨床検査への応用、第61回日本電気泳動学会 (JES) シンポジウム (2011年5月9日) 山口大学 (宇部市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

末広 寛 (SUEHIRO YUTAKA)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 40290978