

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08774

研究課題名（和文）大腸癌合併潰瘍性大腸炎の治療方針を規定するマーカーの開発

研究課題名（英文）A Molecular Biological Approach to the Diagnosis and Treatment Planning for Ulcerative Colitis-associated Cancer

研究代表者

山本 晃（YAMAMOTO, Akira）

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：10889322

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：潰瘍性大腸炎症例ならびに孤発性大腸炎症例の組織サンプルを用いた網羅的DNAメチル化解析より、標的となるメチル化CpGサイトcg17698295（gene symbol：OPLAH）を決定した。同CpGサイトは癌特異的（cancer-specific）でかつ時間依存、空間依存的であり、発癌素地としての変異とされるepigenetic driftやfield effectの概念を反映していた。当科集積サンプルから、潰瘍性大腸炎症例の非癌部直腸粘膜を用いて同メチル化レベルを評価したところ、癌合併症例とそうでない症例の鑑別に有用であることが確認でき、多施設共同前向き研究でも、再現性をもって確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

時間依存的ならびに空間依存的なエピゲノム変異としてのfield effect、epigenetic driftといった現象を掛け合わせ、かつ癌特異的な変化を評価できる方法を開発することが、UC-CRCの診断およびサーベイランスに有益な新たな診断マーカーの開発につながる可能性がある。直腸のみの検体で癌サーベイランスを行うことができるなら、定期的な大腸内視鏡検査によるサーベイランス法に比べて医療経済的にも、精神的なものを含めた患者負担の軽減にもつながる可能性があり、有益な研究であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We determined the target methylated CpG site cg17698295 (gene symbol: OPLAH) by comprehensive DNA methylation analysis using tissue samples from patients with ulcerative colitis and sporadic colorectal cancer. The CpG site is cancer-specific, time- and location-dependent, and reflects the concept of epigenetic drift and field effect, which are considered to be genetic or epigenetic mutations that predispose to carcinogenesis. The evaluation of the methylation level in the noncancerous rectal mucosa of patients with ulcerative colitis from our collection of samples clarified the usefulness of the methylation level in differentiating between cases with and without cancer, and was validated reproducibly in a multicenter preclinical study.

研究分野：消化管外科

キーワード：潰瘍性大腸炎 孤発性大腸癌 バイオマーカー エピゲノム メチル化

## 1. 研究開始当初の背景

Epigenetic 変化、とりわけ DNA メチル化の関与がとりあげられてきた。癌抑制遺伝子のプロモーター領域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。DNA メチル化の " Feld effect " の概念は、癌特異的に高メチル化を示す特定の遺伝子について、癌合併症例の背景粘膜が非癌合併症例の粘膜よりも高メチル化を示すというものである。"Epigenetic drift " の概念は、時間経過とともに生じる、aging に関わる DNA メチル化を指し、発癌リスクとの関連が報告されている。UC 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部位に比べ高いことが推測される上に、再燃と寛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。一方で、昨今の腸内細菌叢との新知見を考慮すると、UC-CRC のみならず、S-CRC においても慢性炎症が局所における aging を促進し、発癌過程に關与する可能性が示唆される。過去に我々は UC 患者の大腸粘膜を使用し、大腸のどの部位に比べても直腸で高く、病恹期間に有意に相関し、癌部で有意に高い、いわば部位、年齢、癌特異的な DNA メチル化マーカーを複数個同定し、直腸生検組織における新たな癌ハイリスク群を選定するサーベイランス法を報告した(Gastroenterology 2017:Toiyama Y, Okugawa Y, Kusunoki M)。

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 genetic/epigenetic 変化に関する時相の違いが示唆されている。メチル化の起こる時相の差異に注目し、S-CRC と UC-CRC に共通するメチル化に主眼を置いた先行研究では、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、直腸粘膜のメチル化レベルそのものが癌化ハイリスク症例の鑑別に有用である可能性に加えて、癌組織と隣接する直腸粘膜のメチル化レベルの差を評価することにより、S-CRC と UC-CRC を鑑別可能となる可能性を示した。以上の背景から、部位、時間、癌特異的という概念に基づく DNA メチル化マーカーによって UC-CRC、S-CRC を鑑別し、治療方針を決定することは新しいアプローチ法である。UC に合併した S-CRC に対し、大腸全摘を施行しない場合の周術期合併症や腫瘍学的予後の検討は十分とはいえず、これらの評価を併せて行う必要があるものの、不要な大腸全摘術を回避し、術後 QOL を担保することは、高齢化が進む昨今において医療者、患者双方にとって有益であり得る。

## 2. 研究の目的

UC に対する生物学的製剤の飛躍的普及による慢性症例の増加を背景に、今後癌合併 UC 症例は増加することが予想される。合併した癌が S-CRC か UC-CRC かによって、手術術式を含む治療方針が変わる可能性があり、術後の QOL に深く影響する。これらの鑑別法として p53 変異検査や ki-67 免疫染色などの方法がこれまで試されてきたが、いまだ臨床的に確立したものは無い。部位、年齢、癌特異的な Epigenome 変化をバイオマーカーとして選定し、臨床応用まで想定するというのが本研究計画の独創的な点であり、さらに、鑑別バイオマーカーによってもたらされる治療方針変更の妥当性を評価することで、新規バイオマーカーが鑑別としての役割のみならず、治療方針決定のためのバイオマーカーになり得ると考えている。

## 3. 研究の方法

当科ではこれまで 2000 年 10 月から 2016 年 8 月までの期間に潰瘍性大腸炎患者約 400 症例に対して大腸全摘出術・回腸囊肛門吻合術を施行してきている。そのうち最終病理結果で dysplasia 合併症例 20 例、大腸癌合併症例 30 例を経験している。また孤発性大腸癌もまた 500 例の手術標本をそれぞれの切除標本より、dysplasia、癌部のみならず、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も含めて、それぞれ採取し-80 で保管している。これらの多数のサンプルを用いて、以下のように候補メチル化遺伝子の網羅的解析ならびに再現性試験を行う。

**(1) DNA メチル化網羅的解析による、潰瘍性大腸炎(UC)関連癌発癌に關与する候補 site の同定**  
UC-CRC 組織(5 例) vs UC-CRC 健常直腸粘膜(5 例)を EZ RNA methylation kit (Zymo research) を用いて DNA を Bisulfite 処理し、Bisulfite DNA を用いて whole genome 網羅的解析 (Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS)) を施行。

**(2) 上記網羅的解析の中から、癌特異的な標的メチル化 site の絞り込み:**  
UC-CRC 組織>> UC-CRC 非癌部直腸粘膜 (UC-CRC に特異的な高メチル化)  
S-CRC 組織>> S-CRC 健常直腸粘膜 (S-CRC に特異的な高メチル化)

**(3) UC Evaluation set を用いた Epigenetic drift を反映するメチル化 site の絞り込み**  
UC 上行結腸粘膜(70 例) vs UC 横行結腸粘膜(70 例) vs UC 直腸粘膜(70 例) (Patients matched sample)より採取した DNA サンプルを使用し、Bisulfite 処理を施行。それぞれの候補サイトに対する DNA メチル化レベルを Pyrosequencer、qMSP を用いて解析する。  
同一患者における全大腸内の解剖学的 localization に伴うメチル化レベルの変化を評価す

る。

部位別メチル化レベルと、発症年齢、手術時年齢、病悩期間などの時間軸に関連する臨床因子との相関解析を行う。

#### (4) S-CRC Evaluation set を用いた Epigenetic drift を反映するメチル化 site の絞り込み

S-CRC 健常大腸粘膜(400 例)より採取した DNA サンプルを使用し、Bisulfite 処理を施行。それぞれの候補サイトに対する DNA メチル化レベルを Pyrosequencer、qMSP を用いて解析する。それぞれの DNA メチル化レベルと手術時年齢をはじめとする臨床因子との相関解析を行う。

#### (5) 候補メチル化 site を用いた診断能評価

UC-CRC 診断能評価

UC 患者大腸粘膜(210 例) vs UC-CRC(25 例)

上記部位より採取した DNA サンプルを使用し、Bisulfite 処理を施行。DNA メチル化レベルを Pyrosequencer、もしくは qMSP を用いて解析を行い、潰瘍性大腸炎関連癌病理組織診断における補助診断マーカーとしての有用性を検討する。

S-CRC 診断能評価

S-CRC 組織(400 例) vs S-CRC 健常大腸粘膜(adjacent normal mucosa, 400 例、Patients matched sample)

上記より採取した DNA サンプルを使用し、Bisulfite 処理を施行。DNA メチル化レベルを Pyrosequencer、もしくは qMSP を用いて解析を行い、S-CRC>>健常粘膜となることを確認し、補助診断マーカーとしての有用性を検討する。

直腸粘膜のみを用いた癌ハイリスク診断能の評価

UC-CRC 非癌部直腸粘膜(25 例) vs UC 直腸粘膜(70 例)

S-CRC 正常直腸粘膜(20 例) vs Healthy control 直腸粘膜(20 例)

上記部位より採取した DNA を Bisulfite 処理し、Pyrosequencer や qMSP を用いて解析を行い、field effect の概念から、直腸健常粘膜のみを用いた癌鑑別可能マーカーとしての有用性を検討する。

UC-CRC と S-CRC の鑑別能の評価

Epigenetic drift、field effect の概念を反映し、腫瘍自体とその近接する非癌部組織中メチル化レベルの差として「UC-CRC 組織と UC 非癌部粘膜の差」と「S-CRC 組織と健常粘膜の差」を比較することにより、UC-CRC と S-CRC の鑑別可能性を検討する。

#### (6) Internal and External Validation: DNA メチル化定量解析による UC 関連癌診断能の有用性検討

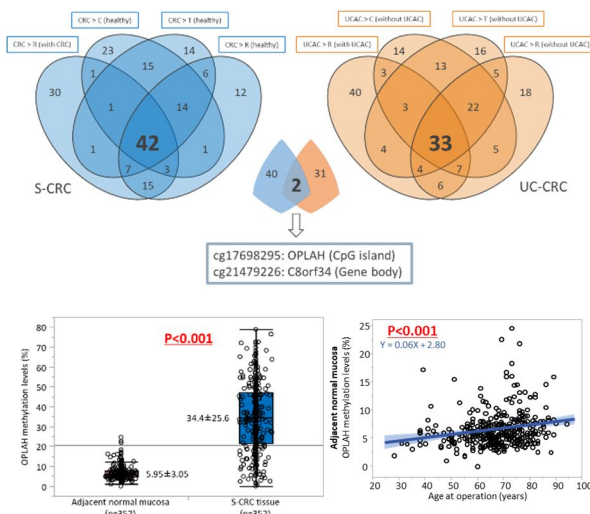
Internal validation: UC 合併 S-CRC 症例(10 例)を対象としたメチル化解析

当施設において、これまでの既往歴、現病歴、病理組織検査、免疫染色(p53, Ki-67)、p53 変異解析で UC に合併した S-CRC と考えられる症例を対象に同様のメチル化解析を施行。上記で確認された至適鑑別 Cut-off value での鑑別能を確認する。

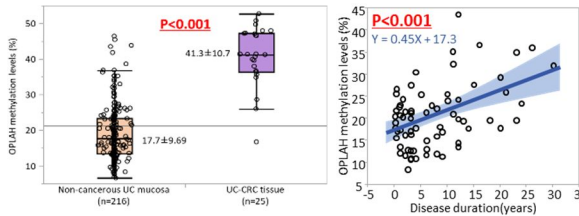
External validation: 他施設にて上記部位より採取した DNA サンプルを使用し、Bisulfite 処理を施行。DNA メチル化レベルを Pyrosequencer、もしくは qMSP を用いて解析を行い、潰瘍性大腸炎関連癌者の鑑別マーカーとしての有用性を検討し、6-4)の結果の再現性を検証する

## 4. 研究成果

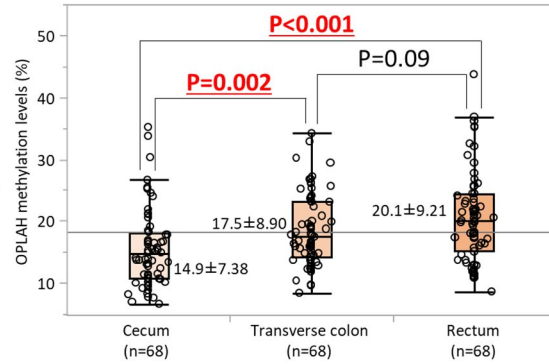
潰瘍性大腸炎症例ならびに孤発性大腸炎症例の組織サンプルを用いた網羅的 DNA メチル化解析より、標的となるメチル化 CpG サイト cg17698295 (gene symbol: OPLAH) を決定した。



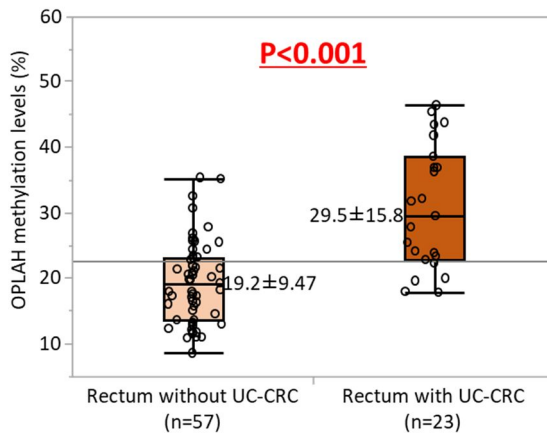
S-CRC の検討では、OPLAH メチル化レベルは正常大腸粘膜に比べ CRC で高メチル化を呈したほか(P < 0.001, AUC:0.92)、正常大腸粘膜のメチル化レベルは年齢と正の相関を示した。また UC の検討では、OPLAH メチル化レベルは盲腸粘膜と比較し、直腸粘膜で有意に高値を示し、直腸粘膜の OPLAH メチル化は病悩期間と正の相関を示した。UC-CRC の OPLAH メチル化レベルは非癌部 UC 粘膜に比べ有意に高値であり(P < 0.001, AUC:0.99)、同 CpG サイトは癌特異的(cancer-specific)でかつ時間依存、空間依存적であり、発癌素地としての変異とされる epigenetic drift や field effect の概念を反映していた。



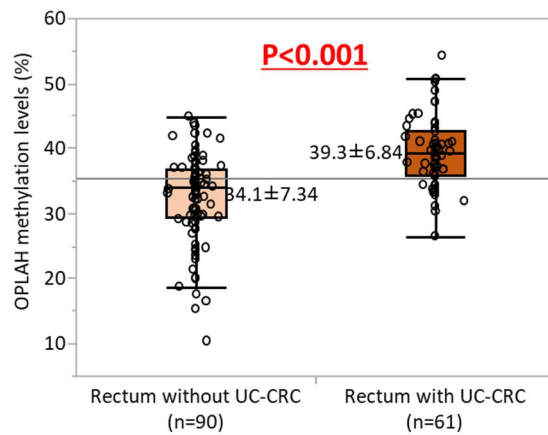
UC-CRC 合併患者の直腸粘膜は、癌非合併 UC 患者の直腸粘膜と比較し、有意に OPLAH の高メチル化を示した ( $P < 0.0001$ , AUC:0.83) .直腸粘膜における OPLAH メチル化レベルは他施設症例を用いた Validation Cohort においても UC-CRC 合併患者を同定可能であった ( $P < 0.0001$ , AUC:0.79) .



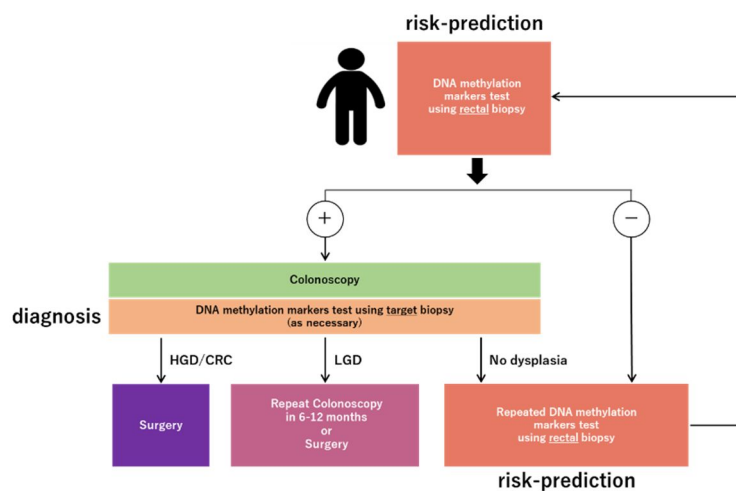
### Internal cohort (evaluation cohort)



### External cohort (validation cohort)



上記を踏まえ、当科では、従来の UC-CRC サーベイランス法である定期的な大腸内視鏡検査の問題点である、診断困難性や患者負担への解決法として、直腸粘膜のみを用いた、より客観的かつ簡便なサーベイランス法を提案する。具体的には、直腸粘膜のみの生検検体を用いて特定の DNA の CpG サイトのメチル化レベルを評価することで、Cancer high risk 群を割り出し、この群には大腸内視鏡検査を施行するという形をとれば、内視鏡施行件数を抑えることができ、患者負担が減ることにつながる。

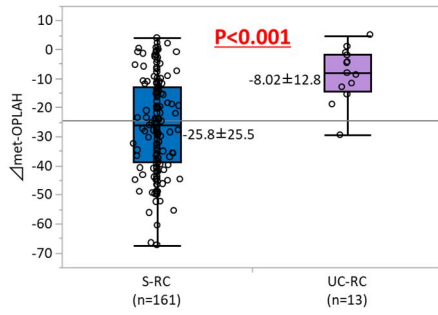


risk と評価された群については、多段階発癌のいずれかのステップにある病変が存在している可能性が高いという前提のもと内視鏡を施行することで、前癌病変の検出率も高まる可能性がある。さらには、target biopsy として採取した生検検体について、病理組織学的に dysplasia をはじめとする前癌病変としての評価が難しい場合にも、採取した検体における標的 CpG サイトのメチル化レベルを測定することで、診断の一助になる可能性がある。すなわち、我々が提唱する

Time-dependent かつ Location-dependent かつ Cancer-specific なバイオマーカーは、risk predictive biomarker として、さらには diagnostic biomarker として機能することが見込まれ、UC 症例の decision-making に役立つことが期待される。

さらに、UC-CRC と S-CRC の鑑別に役立つことも想定し、評価を行った。UC 症例に癌を合併した場合、dysplasia-carcinoma sequence によって生じた UC-CRC であるなら、Etiologic field effect の概念をふまえても、大腸全摘が適応になることに矛盾はない。ただし、UC 症例の手術では、排便状況の変化など、QOL の低下が問題になる。昨今の UC に対する内科的治療の多様化は、手術加療を経ずに大腸が残存している UC 長期罹患症例の増加につながり、高齢 UC 症例に癌を合併するケースが増えることが予想される。この場合、UC 症例に合併した癌が dysplasia-





carcinoma sequence を介した UC-CRC ではない可能性があり、内科的治療により長期に寛解維持可能であった症例などには、UC 症例でありながら S-CRC を生じることもあり得る。UC 症例であっても、生じた癌が S-CRC であった場合には、支配血流に応じたリンパ節郭清を伴う部分切除が許容されると考えられ、大腸全摘による QOL 低下を防ぐことにつながる可能性がある。したがって、UC 症例に生じた癌が UC-CRC なのか、S-CRC なのかを鑑別するバイオマーカーの開発は重要な意味合いをもつ。S-CRC もおそらくは慢性炎症が発癌に関わるが、UC の ” 直腸から連続する炎症 ” という特異性に注目した。

S-CRC 発癌に係る炎症は局所に生じたもの、UC-CRC 発癌に係る炎症は広範囲に存在するものという仮説を立て、Etiologic field effect の概念に基づき、広範囲に発癌素地としての分子学的変化を生じている場合は UC-CRC、局所だけに発癌素地としての分子学的評価を生じている場合は S-CRC と予想する。実際に、癌組織の DNA メチル化レベルと近接する非癌組織の DNA メチル化レベルの差をとることで、UC-CRC と S-CRC の鑑別が可能となることが示されつつある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 山本晃、大北喜基、今岡裕基、志村匡信、川村幹雄、問山裕二	4. 巻 75
2. 論文標題 潰瘍性大腸炎関連癌の分子生物学的アプローチを用いた診断法	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本大腸肛門病学会雑誌	6. 最初と最後の頁 478-486
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 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・医学系研究科・教授  (14101)	
研究分担者	川村 幹雄 (KAWAMURA Mikio) (00722589)	三重大学・医学系研究科・助教  (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・医学部附属病院・教授  (14101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	今岡 裕基  (IMAOKA Hiroki)  (70762938)	三重大学・医学系研究科・寄附講座助教     (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