

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590935

研究課題名(和文) 糞便RNA検査は潰瘍性大腸炎の診療に役立つことができるのか？

研究課題名(英文) Are fecal mRNA assay useful for ulcerative colitis ?

研究代表者

金岡 繁 (KANAOKA, SHIGERU)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：00252172

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：糞便中のCD45などのmRNA発現(糞便RNA検査)が、潰瘍性大腸炎(以下UC)の疾患活動性や粘膜炎症の非侵襲的バイオマーカーになるか検討を行った。対象は73例、延べ86例のUC患者。大腸内視鏡検査(CS)当日または前日に臨床検査(CRP, ESR, Hb, Plt, Alb), CS前日までにCAIスコア、糞便を採便し、CSによる粘膜評価はMayo内視鏡スコア(0-3)を用いた。糞便mRNA検査と臨床検査はMayo内視鏡スコア4群間で有意差を認め、また臨床検査より内視鏡スコアによく相関していた。糞便RNA検査疾患活動性や粘膜炎症の非侵襲的バイオマーカーになりえると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Fecal CD45 or proinflammatory cytokines mRNA were evaluated as a noninvasive biomarker of disease activity or mucosal inflammation for ulcerative colitis (UC). Total 86 colonoscopies were performed in 73 UC patients. Samples from feces and blood were analyzed for fecal mRNA assay and laboratory findings (CRP, ESR, Hb, Plt, Alb), and the results were compared with colonoscopic findings. Mucosal status was assessed using the Mayo endoscopic score (0-3). There was significant differences in all non-invasive markers and CAI among the Mayo endoscopic score ($p < 0.01$). Endoscopic disease activity correlated closest with CAI, followed by fecal mRNA assay, Alb, CRP, ESR, Hb, and Plt. In addition, nineteen of 42 patients with Mayo 2 or 3 had CAI less than 5, however, more than half of 19 patients had positive result of fecal mRNA assay when proper cutoff was set. These results suggested that fecal mRNA assay is useful as a noninvasive biomarker of mucosal inflammation for UC.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：潰瘍性大腸炎 糞便 糞便RNA発現

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎 (以下 UC) は本邦において生活習慣の欧米化に伴い罹患患者数が増加の一途をたどっている。この疾患は原因が不明であり、治療にもかかわらず再燃と寛解を繰り返すことが多い。重症の治療として、ステロイド、免疫調節剤や生物学的製剤などにより寛解導入の向上がみられてきたが、単独の治療では抵抗性を示す症例も多く、適切な治療効果予測による機動的な治療戦略が必要である。また、寛解導入後の維持療法中に前触れもなく再燃する例も多く、治療薬の減量は主治医の経験によるところも多いのが現状である。

従来、治療効果判定を臨床症状や臨床検査値を組み合わせて評価する clinical activity index (CAI) などの疾患活動性 index を用いて行ってきた。ところが、index 上寛解と評価されても粘膜治癒がみられていないことや、粘膜治癒を伴った寛解では再燃率が低いことなど、粘膜の状態を評価する内視鏡 index の重要性が認識されている。しかし、侵襲性、患者認容性や簡便さの点で、大腸内視鏡検査が頻回に行えないのが現状である。鋭敏な炎症反応物質である CRP が陰性にもかかわらず血便が見られ、内視鏡では比較的広い範囲に炎症が見られる患者も少なくない。ここに腸管の炎症を良く反映する非侵襲的検査法が待望されている。

近年、糞便中の好中球蛋白である calprotectin, M2-pyruvate kinase や S100A12 が、UC 患者の治療抵抗性および再燃予測に有用であり、疾患活動性と大腸内視鏡所見を反映することが報告された (Turner et al. Gut 2010)。しかしながら、これらは CRP 検査より優れているが、疾患活動性 index や内視鏡 index

には及ばないのが現状である。

申請者らは、糞便から抽出した RNA を用い COX-2, MMP-7 mRNA 発現を解析する大腸がん診断法を開発し、その有用性を報告してきた (Kanaoka et al. Gastroenterology 2004, Adv Clin Chem 2007, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2009)。この方法は、細胞成分を分離せずに RNA を抽出し RT-PCR を行う (以下糞便 RNA 検査) というユニークなものである。これまでに大腸がん 111 例、コントロール 113 例での検討で感度 82%、特異度 98% という良好な成績を得ている。最近、申請者らは糞便中の COX-2 mRNA 発現は、癌部における COX-2 mRNA 発現とその表面積に影響を受けることを報告した (Hamaya, Kanaoka et al. Br J Cancer 2010)。一方で好中球だけでなくリンパ球など様々な白血球が UC の発症・進展に重要な役割を担っていることが知られている。従って好中球蛋白である calprotectin などよりも、白血球系全般を反映する CD45 やリンパ球で産生される炎症性サイトカインを用いることにより、糞便中の mRNA 発現が粘膜での炎症の程度とその広がりをより鋭敏に反映することが予測される。そこで申請者らは、糞便 RNA 検査が UC の疾患活動性や大腸内視鏡所見を反映する検査になる可能性を充分もつと考え、予備実験を行い糞便中の CD45 mRNA 発現が UC の重症度を反映するという preliminary な結果を得ている。

2. 研究の目的

上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに、まず糞便 RNA 検査が UC 患者の疾患活動性および大腸内視鏡所見を反映する検査になるか検討した。

具体的には UC 患者の活動期から寛解、そして再燃時の経時的に行う大腸内視鏡検査時に、疾患活動性 index である CAI と、内視鏡 index である Mayo endoscopic score と CD45 や炎症性サイトカインなどの糞便中の mRNA 発現との関連性を検討し、この検査が各 CAI や Mayo endoscopic score を反映するかを明らかにする。

なお、糞便中の calprotectin と採血検査 (CRP, ESR, Hb, Plt, Albumin) も同時に測定し、糞便 RNA 検査と比較検討を行い、この検査の優位性の有無も明らかにする。

3. 研究の方法

対象は前向きに集められた 73 例、延べ 86 例の UC 患者。年齢中央値 55 歳 (16-81 歳) 男女比 48 : 25 であった。

a. 検討するバイオマーカーの選択

ヒト細胞由来マーカーとして β 2-microglobulin (B2M)、白血球細胞由来マーカーとして CD45、上皮細胞由来マーカーとして carcinoembryonic antigen (CEA)、炎症性サイトカインの代表である TNF- α を選択した。

b. qRT-PCR 測定系の確立

選択したバイオマーカーの定量的 real-time RT-PCR (qRT-PCR) の最適化を行った。我々の抽出法による糞便 RNA には腸内細菌由来の RNA も含まれるため、Taqman primer & probe の特異性 (ヒト RNA 由来 cDNA にのみ反応する) のチェックを行った。また、スタンダードプラスミド DNA を作成し、各マーカーの mRNA 発現に定量性をも確認した。

c. 糞便中 calprotectin の測定

calprotectin をサンドイッチ ELISA 法によるもので、市販のキットを使用して測定した。

糞便中の mRNA 発現と疾患活動性、大腸内視鏡所見、組織所見との関連性の検討

経過観察中の UC 患者で、大腸内視鏡検査 5-1 日前に糞便と採血採取を行い、内視鏡にて全大腸を観察し得た症例を対象とした。

- ・ 疾患活動性 index として CAI を用いる
- ・ 内視鏡 index として Mayo endoscopic score (0-3)
- ・ a で示したバイオマーカーによる糞便 RNA 検査
- ・ 糞便中 calprotectin
- ・ 採血検査 (CRP, ESR, Hb, Plt, Albumin)

4. 研究成果

86 回の TCS の Mayo 内視鏡スコアは 0:20, 1:24, 2:27, 3:15 であった。

Mayo 内視鏡スコア 4 群間で CAI スコア、糞便 RNA 検査 4 マーカーと 5 つの採血項目いずれも有意差 ($P < 0.01$) を認めた。

Mayo 内視鏡スコア 4 群間で CAI スコア、糞便 RNA 検査 4 マーカーと 5 つの採血項目いずれも有意差 ($P < 0.001$) を認め、中でも CAI スコアと糞便 RNA 検査の P 値が低かった。次に Mayo 内視鏡スコアと評価項目との相関はすべて有意に相関したが、CAI スコアと糞便 TNF- α mRNA 検査は採血検査より高い相関を示した。

Mayo 内視鏡スコアが 2、3 の活動期症例で、CAI にて寛解期 (4 点以下) と判定された症例 19 例は、糞便 RNA 検査でカットオフ値を適切に設定すると半数以上の症例で活動期と判定することができた。

なお、糞便中の calprotectin については現在測定中である。

以上より糞便 RNA 検査は採血検査より大腸粘膜の炎症を鋭敏に反映し、内視鏡的項目を含まない CAI と組み合わせることにより UC 診療に有用であることが判明した。

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)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Tomohiro Terai, Satoshi Osawa, Shinya Tani, Shinzi Oishi, Yoshifumi Arai, Takanori Yamada, Mitsushige Sugimoto, Takahisa Furuta, Shigeru Kanaoka, Hiroaki Miyajima, Ken Sugimoto: Induction of murine TNBS-induced colitis is strictly controlled by a modified method using continuous inhalation anesthesia with sevoflurane. Dig Dis Sci 2014 Jan 23. [Epub ahead of print].
2. Yasushi Hamaya, Shigeru Kuriyama, Tetsunari Takai, Ken-ichi Yoshida, Takanori Yamada, Mitsushige Sugimoto, Satoshi Osawa, Ken Sugimoto, Hiroaki Miyajima, Shigeru Kanaoka: A Distinct Expression Pattern of the Long 3'-Untranslated Region Dicer mRNA and its Implications for Posttranscriptional Regulation in Colorectal Cancer. Clin Transl Gastroenterol 3: e17, 2012
3. 金岡 繁, 濱屋 寧, 栗山 茂: 糞便 RNA を用いた大腸癌の検査法 大腸癌 FRONTIER 5 (1) : 58-61, 2012
4. Tomohiro Terai, Mitsushige Sugimoto, Satoshi Osawa, Ken Sugimoto, Takahisa Furuta, Shigeru Kanaoka, Mutsuhiro Ikuma: Successful treatment of ulcerative colitis complicated by Sweet's syndrome by corticosteroid therapy and leukocytapheresis. Clin J Gastroenterol 4: 151-156, 2011

〔学会発表〕(計 12 件)

1. Shigeru Kanaoka, Shigeru Kuriyama, Moriya Iwaizumi, Takanori Yamada, Mitsushige Sugimoto, Satoshi Osawa, Ken Sugimoto, Yoshisuke Hosoda, Yoshihiko Sato, Masami Yamada, Shigeto Yoshii, Kazuhiko Kawakami, Katsuhiko Nakai,

Hiroaki Miyajima: Fecal Hemoglobin as a Marker for Mucosal inflammation of Ulcerative Colitis: Usefulness of Combination with Rachmilewitz's Clinical Activity Index. 2014 年 5 月 3 日 (2014DDW in Chicago)

2. 金岡 繁, 栗山 茂, 杉本光繁, 大澤 恵, 山田貴教, 細田佳佐, 佐藤嘉彦, 山田正美, 吉井重人, 杉本 健: UC における粘膜治癒バイオマーカーとしての定量的便ヘモグロビン検査の有用性: CAI スコアや臨床検査値と比較して 第 10 回日本消化管学会総会(口演) 2014 年 2 月 14 日
3. 金岡 繁, 栗山 茂, 岩泉守哉, 鈴木 聡, 山田貴教, 杉本光繁, 大澤 恵, 杉本 健: UC における粘膜治癒バイオマーカーとしての定量的便ヘモグロビン検査の有用性: CAI スコアや臨床検査値と比較して 第 55 回日本消化器病学会大会 (JDDW2013 東京) 2013 年 10 月 10 日
4. 杉本 健, 岩泉守哉, 山田貴教, 杉本光繁, 金岡 繁, 古田隆久, 大澤 恵: クロウン病の臨床経過における喫煙の影響についての検討 第 55 回日本消化器病学会大会 (JDDW2013 東京) 2013 年 10 月 9 日
5. Shigeru Kanaoka, Shigeru Kuriyama, Moriya Iwaizumi, Takanori Yamada, Mitsushige Sugimoto, Satoshi Osawa, Ken Sugimoto, Hiroaki Miyajima: Potential Usefulness of Fecal Immunochemical Test plus Fecal microRNA Assay as a Marker for Colorectal Cancer Screening. 2013 年 5 月 20 日 (2013DDW in Orlando)
6. Shigeru Kuriyama, Moriya Iwaizumi, Takanori Yamada, Mitsushige Sugimoto, Satoshi Osawa, Ken Sugimoto, Hiroaki Miyajima, Shigeru Kanaoka: Fecal

- microRNA plus COX-2 mRNA Assays as a Marker for Colorectal Cancer Screening. 2013年5月18日 (2013DDW in Orlando)
7. Shigeru Kuriyama, Yasushi Hamaya, Takanori Yamada, Mitsushige Sugimoto, Satoshi Osawa, Ken Sugimoto, Hiroaki Miyajima, Shigeru Kanaoka: Fecal microRNA Assays as a Marker for Colorectal Cancer Screening. 2012年5月22日 (2012DDW in San Diego)
8. 杉本 健、大澤 恵、杉本光繁、山田貴教、古田隆久、金岡 繁: 難治性潰瘍性大腸炎における手術回避に關与する因子の検討と外科的治療を考慮するタイミングについて 第9回日本消化管学会総会 (コアシンポジウム2) 2013年1月25日
9. 栗山 茂、金岡 繁、杉本 健: 糞便中のCOX-2 mRNAとmicroRNAの発現を組み合わせたFecal RNAs testの大腸がんスクリーニングの現状と展開に向けて 第54回日本消化器病学会大会 (JDDW2012 神戸 シンポジウム) 2012年10月11日
10. 金岡 繁、濱屋 寧、栗山 茂: 糞便中の遺伝子発現を指標にしたFecal RNA testの大腸がんスクリーニングの実用性 第53回日本消化器病学会大会 (JDDW2011 福岡 シンポジウム) 2011年10月20日
11. 金岡 繁、濱屋 寧、栗山 茂: 4マーカーを用いたFecal RNA testの大腸がんスクリーニングの有用性と問題点 第50回日本消化器がん検診学会総会 (パネルディスカッション) 2011年5月20日
12. Shigeru Kanaoka, Yasushi Hamaya, Shigeru Kuriyama, Mutsuhiro Ikuma, Hiroyuki Miyajima: Alteration in Fecal COX-2 mRNA Expressions before and

after Surgical or Endoscopic Resection of Colorectal Cancer and Adenoma 2011年5月7日 (2011DDW in Chicago)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
○出願状況 (計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
金岡 繁 (KANAOKA, Shigeru)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号: 00252172

(2)研究分担者
栗山 茂 (KURIYAMA, Shigeru)
浜松医科大学・医学部・助教
研究者番号: 90596446

杉本 健 (SUGIMOTO, Ken)
浜松医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 20529507

岩泉守哉 (IWAIZUMI, Moriya)
浜松医科大学・医学部・助教
研究者番号: 60444361

(3)連携研究者
()

研究者番号: