

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 9 月 30 日現在

機関番号：32622  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2011～2014  
課題番号：23591971  
研究課題名(和文) 消化器癌の血清による分子生物学的診断

研究課題名(英文) Serum biomarker for digestive cancer

## 研究代表者

白畑 敦 (shirahata, atsushi)

昭和大学・医学部・兼任講師

研究者番号：60384541

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：低侵襲で簡便な癌の血清診断を目的として研究を継続した。以前に大腸癌組織中のメチル化ビメンチン遺伝子と血清中のメチル化ビメンチン遺伝子が相関することを報告し、今回血清診断の有用性を検討した。242人の大腸癌患者の血清でquantitative methylation-specific polymerase chain reactionの手法を用いた。CEAとCA19-9とのcombinationにて検討しstage 0で57.1%、Iで36.1%、IIで45.2%、IIIで55.4%、IVでは85.7%の感度であった。メチル化ビメンチンは大腸癌の血清診断に有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The present study aimed to examine the feasibility of detecting vimentin (VIM) methylation in the serum of patients with colorectal cancer (CRC) and to determine the effectiveness of a relatively simple, inexpensive, and noninvasive test performed in combination with the conventional carcinoembryonic antigen analysis. Patients and Methods：VIM methylation in the serum DNA of 242 patients with CRC was measured by a quantitative methylation-specific polymerase chain reaction. Results：A significantly higher positive rate was obtained for VIM methylation than for carcinoembryonic antigen or carbohydrate antigen 19-9 in stage 0, I, and II patients. The combination of all three markers yielded similar sensitivity for patients with disease of stage 0: 57.1%, I: 36.1%, II: 45.2%, and III: 55.4%, whereas the sensitivity reached 85.7% for patients with stage IV disease. Conclusion: VIM methylation of serum DNA may be a useful marker for early detection of CRC.

研究分野：消化器外科(大腸肛門病)

キーワード：Vimentin Methylation

1. 研究開始当初の背景

近年の分子生物学の進歩により癌関連遺伝子の研究は飛躍的に進歩した。消化器癌を扱う臨床において、今後、診断・治療への応用の面から癌の生態の解明、生物学的悪性度の判定を行う研究が望まれている。今日、癌のバイオマーカー（癌診断マーカー・癌予後マーカー）の検索が急務であり低侵襲で簡便・安価な日常臨床で使用できる血清マーカーの研究が注目されていた。

2. 研究の目的

消化器癌の分子生物学的手法を用いた血清診断の確立を目的としている。有用なバイオマーカーとなり得る遺伝子の検索や手法の工夫により高感度の癌のスクリーニング法の発見を目指した。

3. 研究の方法

癌患者の血清・癌組織（付随する正常粘膜）を収集し、様々な遺伝子マーカーを検索した。メチル化遺伝子に関しては Quantitative methylation-specific polymerase chain reaction (qMSP) の手法で定量し検討した。バイオマーカーとしての有用性を臨床病理学的所見と検討し診断マーカーとしての有用性、予後マーカーとしての有用性を研究した。

4. 研究成果

今まで我々は様々な癌種における遺伝子マーカーの検索を行い発表してきた。まず研究目的である血清診断のために癌組織における遺伝子マーカーの検索をした。MACC1 遺伝子の発現を胃癌 (Anticancer Res30(9):3441-4, 2010)、大腸癌 (Anticancer Res30:2689-2692, 2010)、肝細胞癌 (Anticancer Res31: 777-780, 2011) にて報告した。またメチル化ビメンチン遺伝子の発現を大腸癌 (Anticancer Res29:279-282, 2009)、胃癌 (Anticancer Res29:2227-2229, 2009)、肝細胞癌 (Anticancer Res31:1289-91, 2011) にて発見し有用性や悪性度との関係をそれぞれ報告した。それらの結果を検討しメチル化ビメンチン遺伝子が血清診断のターゲット遺伝子になる可能性が高いと判断し、さらには検体採取数が多く遺伝子研究が進んでいる大腸癌について中心に研究を進めることとした。

ビメンチンは中間径フィラメントのサブユニット蛋白質で非上皮性腫瘍のマーカーとして日常診療で使われている。2005年 Wei-Dong Chen らが大腸癌の腫瘍組織中のビメンチン遺伝子がメチル化していることを発見し診断への有用性が報告された。そこで我々もまずメチル化ビメンチン遺伝子が大腸癌の腫瘍組織内での発現を研究した。大腸癌組織の 65% にメチル化ビメンチン遺伝子の発現を確認でき、さらに

は DUKE 分類の悪性度と相関することを発見した (Vimentin Methylation as a Marker for Advanced Colorectal Carcinoma. Anticancer Res29:279-282, 2009)。次に大腸癌組織中と患者血清中でのメチル化ビメンチン遺伝子の相関を研究した。大腸癌腫瘍組織中にメチル化ビメンチン遺伝子が発現していれば血清中にも遺伝子が発現し、癌組織中に発現していなければ血清中にも発現していなかった。また腹膜播種や肝転移などの遠隔転移を有する高度進行癌患者の血清中には有意にメチル化ビメンチン遺伝子の発現が高いことを確認した (Detection of vimentin methylation in the serum of colorectal cancer patients. Anticancer Res30:5015-5018, 2010)。それらの研究結果より最終的には『大腸癌におけるメチル化ビメンチン遺伝子による血清スクリーニング診断の可能性』を最終目標としてとして研究を進めた。

今回の検討では 242 人の大腸癌患者の血清診断を行った (健康人ボランティア 25 人)。血清中のメチル化ビメンチン遺伝子はリンパ節転移の有無と相関し悪性度の指標になる可能性が示唆された。またメチル化ビメンチン遺伝子による大腸癌の血清診断の感度は 32.6% で (ステージ II で 28.8%、ステージ III で 35.1%、ステージ IV で 32.7%)、CEA, CA19-9 との combination での診断感度はステージ I で 36.1%、ステージ II で 45.2%、ステージ III で 55.4%、ステージ IV で 85.7% であった (図 1、表 1)。メチル化ビメンチン遺伝子は大腸癌の血清診断に有用である可能性が示唆された。

この研究での問題点はメチル化ビメンチン遺伝子のカットオフ値に関してと考えられた。当初、ROC 解析 (AUC = 0.579 (95% CI: 0.50-0.659)) によりカットオフ値を設定し感度 32.2%、特異度 100% の癌のスクリーニング法として学会発表を行った (図 2) (8th International Symposium on Minimal Residual Cancer. Detection of vimentin methylation in the serum of patients with colorectal cancer.)。しかしボランティア数が 25 人と疾患群と比較し少なく、また疾患群に比べて年齢が若く ROC 解析の信頼性が保証できなかった。そのため論文発表では任意にカットオフ値を設定し検討を行った。ROC 解析はスクリーニング検査のカットオフ値の設定には有用な方法である事は間違いなく、今後、健康人ボランティア群を整える事で正確な ROC 解析によるカットオフ値の設定が可能になればさらに信頼性のあるバイオマーカーとしての可能性が高まる。

また他の癌腫でのメチル化ビメンチン遺伝子の血清マーカーとしての有用性も研究してきた。我々は胃癌での血清メチル化ビメンチン遺伝子の診断マーカー、予後マーカーとしての有用性を報告した

(Detection of vimentin methylation in the serum of patients with gastric cancer. *Anticancer Res* 32:791-794, 2012). 71人の胃癌患者(健常人ボランティア21人)で検討した。胃癌患者の血清メチル化ビメンチン遺伝子は健常人と比較し高く、特に遠隔転移を有する患者で高かった。メチル化ビメンチン遺伝子による胃癌の血清診断の感度は33.8%で(ステージIIで18.8%、ステージIIIで24%、ステージIVで61.5%) CEAやCA19-9とのcombinationでは59.2%の感度であった(ステージIIで43.8%、ステージIIIで60%、ステージIVで76.9%)。胃癌においても症例数を増やす事により大腸癌と同様に癌の有用な血清バイオマーカーとして可能性が期待された。

表 1)

	Stage 0 (n=7)	Stage I (n=36)	Stage II (n=73)	Stage III (n=74)	Stage IV (n=49)	total (n=239)
CEA	14.3%	5.6%	17.8%	36.5%	73.5%	33.1%
CA19-9	0.0%	0.0%	11.0%	12.2%	40.8%	15.5%
VIM methylation	57.1%	30.6%	28.8%	35.1%	32.7%	32.6%

図 1)

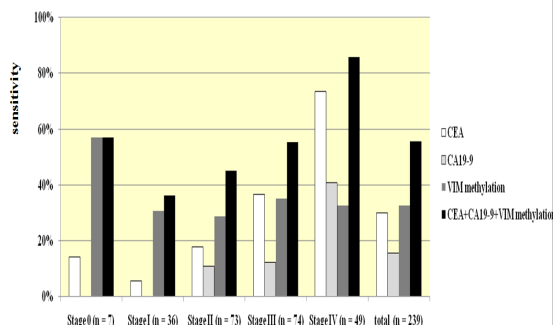
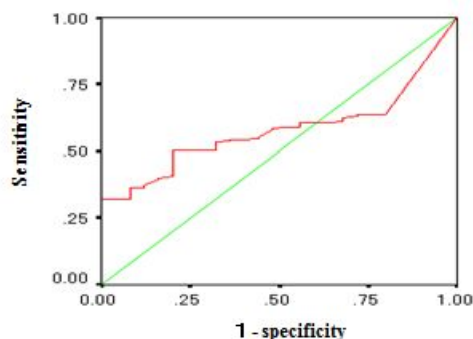


図 2)



## 5. 主な発表論文等

以下すべて代表者が筆頭著者

〔雑誌論文〕(計4件)

1. Detection of vimentin methylation in the serum of patients with gastric cancer. *Anticancer Res.* 2012 Mar;32(3):791-4.
2. 最新胃癌学 基礎と臨床の最新研究動向 V 胃癌の予後因子 MACC1 遺伝子. *日本臨床* 72 巻 増刊号 1, 2014
3. 切除不能進行・再発大腸癌に対する生存期間の決定因子の検討. *日本大腸肛門病会誌* 67:423-427, 2014
4. Serum vimentin methylation as a potential marker for colorectal cancer. *Anticancer Res.* 2014 Aug;34(8):4121-5

〔学会発表〕(計11件)

1. 8th International Symposium on Minimal Residual Cancer. Detection of vimentin methylation in the serum of patients with colorectal cancer (2011.9.22 Osaka)
2. 第66回日本消化器外科学会総会 肝細胞癌におけるMACC1遺伝子の検討(2011年7月15日、名古屋)
3. 第70回日本癌学会学術総会 Detection of vimentin methylation in the serum of patients with colorectal cancer (2011年10月3日、名古屋)
4. 第49回日本癌治療学会学術集会 大腸癌におけるメチル化 Vimentin 遺伝子による血清診断(2011年10月27日、名古屋)
5. 第19回JDDW2011 大腸癌の Vimentin 遺伝子による血清診断(2011年10月20日福岡)
6. 第111回日本外科学会定期学術集会 大腸癌におけるメチル化 Vimentin 遺伝子による血清診断(2012年5月 東京)
7. 第45回制癌剤適応研究会 切除不能進行・再発大腸癌に対する生存期間の決定因子(2012年3月2日、東京)
8. 第84回日本胃癌学会総会 胃癌におけるメチル化 Vimentin 遺伝子の検討(2012年2月8日、大阪)
9. 第112回日本外科学会定期学術集会(千葉) 胃癌におけるメチル化 Vimentin 遺伝子による血清診断(2012年4月12日千葉)
10. 第71回日本癌学会総会 胃癌におけるメチル化 Vimentin 遺伝子による血清診断(2012年8月19日、札幌)
11. 第67回日本消化器外科学会 胃癌におけるメチル化 Vimentin 遺伝子による血清診断(2012年7月18日、富山)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等 なし

6．研究組織

(1)研究代表者

白畑敦(Shirahata Atsushi)  
昭和大学・医学部・兼任講師  
研究者番号：60384541

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし