

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460687

研究課題名(和文) 便DNA検査による大腸腫瘍新規スクリーニング法の開発

研究課題名(英文) Stool DNA testing for detection of colorectal tumors

研究代表者

末広 寛 (SUEHIRO, Yutaka)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40290978

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究者は大腸がん及び大腸腺腫に極めて特異性の高いマーカーとしてTWIST1遺伝子のメチル化を報告している。便検体からこのTWIST1メチル化を検出することが大腸腫瘍の新たな検査法となる可能性がある。しかし、便から抽出したDNAに含まれるヒトDNAは微量であるため、従来のbisulfiteベースのメチル化測定技術では便中TWIST1メチル化の定量が困難であった。そこでbisulfite不要の新しい測定法を開発した。

研究成果の概要(英文)：As TWIST1 methylation is specific to colorectal tumors, detection of TWIST1 methylation from stool samples might be useful for colorectal tumor screening. However, because the content of human DNA in stool is very small, it is very difficult to detect TWIST1 methylation by conventional bisulfite-based methylation assays. Therefore, we developed a new methylation assay without bisulfite treatment.

研究分野：腫瘍学

キーワード：大腸癌 便DNA検査 メチル化

1. 研究開始当初の背景

本申請者らは、大腸がん及び大腸腺腫に極めて特異性の高いマーカーとして TWIST1 遺伝子のメチル化を報告している。以下にデータを示す。

【方法及び材料】 正常胃粘膜 26 例、胃がん 59 例、大腸正常粘膜 251 例、大腸腺腫 189 例、大腸がん 319 例の組織片より DNA を抽出し、TWIST1 遺伝子のメチル化レベルを COBRA 法にて測定した。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、CpG 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1)。

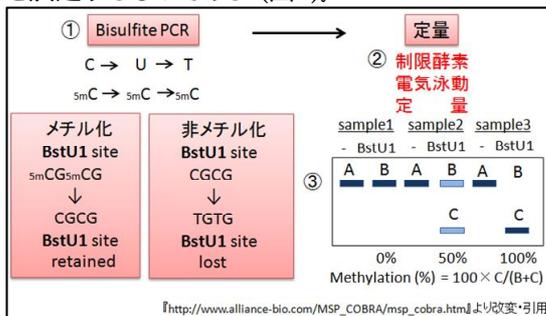


図1 DNA の bisulfite 処理および COBRA 法の例

メチル化感受性制限酵素はメチル基のある箇所に特異的に反応するため、電気泳動で下のほうにバンドが出た場合はメチル化 DNA、上のほうにバンドが出た場合は非メチル化 DNA と判定できる。これらのバンドの濃さによりメチル化、非メチル化の割合を測定する。

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 µl、10× Buffer (Applied Biosystems) 2 µl、25 mM MgCl<sub>2</sub> 1.6 µl、8 mM dNTPs 2µl、10 µM プライマーセット 1 µl、AmpliTaq Gold DNA ポリメラーゼ (Applied Biosystems) 0.1 µl に蒸留水 (大塚製薬) を加え全量を 20 µl とし、サーマルサイクラー i cycler (BIO RAD) を用いて PCR を行った。PCR 産物 8 µl に 10× NEBuffer 4 (New England BioLabs) 1 µl、BstU (New England BioLabs) 10 U を加えて全量を 10 µl とし、60 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 µl 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。

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

表1. COBRA法プライマーの配列

【結果】 図2に示すとおり、TWIST1 遺伝子メチル化は大腸腫瘍群 (大腸腺腫群及び大腸がん群) において高レベルであり、大腸腫瘍マーカーとして利用できることが明らかとなった (Y Suehiro, Genes, chromosomes & cancer, 2010; PCT/JP2010/002490 大腸腫瘍の検出方法)。

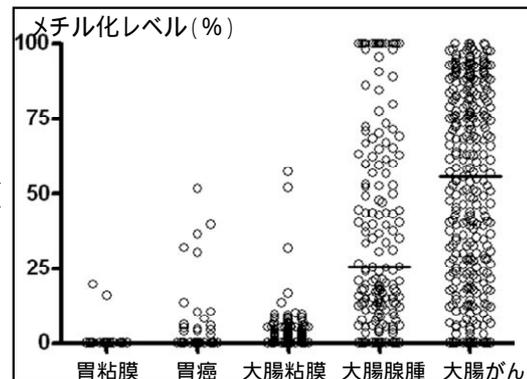


図2 TWIST1 メチル化レベル比較

TWIST1 メチル化レベルは大腸腫瘍群で高い。

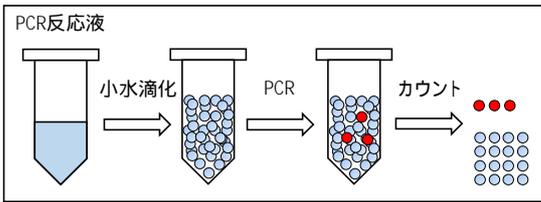
2. 研究の目的

大腸がんスクリーニングに用いられる便潜血検査は前がん病変の検出率が低いという問題があるため、検出率のより高い検査法の開発が必要である、この方法の一つが大腸がん特異的マーカー遺伝子便中から検出する「便 DNA 検査」である。しかし、「便 DNA 検査」には解決すべき課題がある。例えば、本研究者らは上述の技術による“便”DNA 検査を試みたが、20%弱の便サンプルしか解析できなかった。この理由として、(1)便中 DNA は 99%以上が細菌由来で、ヒト DNA は 0.1%以下と非常に微量のため検出が困難であり、(2)DNA の bisulfite 処理により 70%以上の DNA が断片化する上に、分解しやすい一本鎖 DNA の状態になるためである。便 DNA 検査を実用化するためには bisulfite 処理以外の手法によるメチル化解析技術の確立が必要であり、これを達成するために本研究を行った。

3. 研究の方法

(1) Bisulfite 処理を行わないメチル化解析法の確立  
TWIST1 がほぼ 100%メチル化していることが既知の DNA (大腸癌細胞株 HCT116) と、TWIST1 メチル化がほとんどないことが既知の DNA を種々の割合で混合した。この

DNA を薬剤処理後、プライマー及びプローブを用いてデジタル PCR による TWIST1 メチル化レベルを測定した ( 図 3 )。



### 図3 デジタル PCR

PCR 反応液を約 2 万個の小水滴に分け、サーマルサイクラーを用いて PCR を行う。小水滴内に対象遺伝子が含まれる場合は PCR 反応によりその小水滴は蛍光を発する。2 万個の小水滴を一つずつ蛍光量測定し、蛍光を発する小水滴の数をカウントすることで、遺伝子のコピー数の絶対値計測が可能となる。(本図ではコピー数=3)。

### ( 2 ) 便 DNA 検査(予備検査)

下部消化管内視鏡検査により「大腸病変なし」と診断された被験者(コントロール) 3 名および大腸癌患者 6 名より便検体を採取した。便検体より DNA を抽出し、上記方法によりメチル化 TWIST1 の検出を試みた。

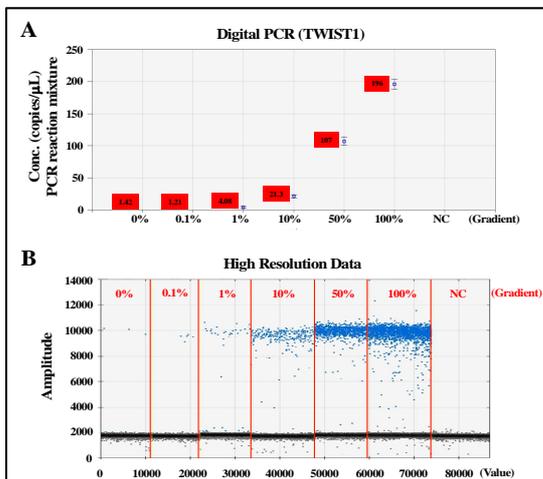
### ( 3 ) 便 DNA 検査

大腸がん患者便 124 検体 ( CRC )、健常者便 48 検体 ( Control ) を用い、便検体約 200mg から DNA を抽出し、上記の方法で TWIST1 メチル化レベルを検討した

## 4. 研究結果

( 1 ) Bisulfite 処理を行わないメチル化解析法の確立

種々の TWIST1 遺伝子メチル化レベルの DNA を用いて、デジタル PCR によりメチル化レベルを測定したところ、少なくとも 0.14% のメチル化レベルを定量的に測定可能であり ( 図 4 )、理論上は 0.01% まで定量可能であった。我々は本法を「超高感度メチル化解析法」と名付けた。

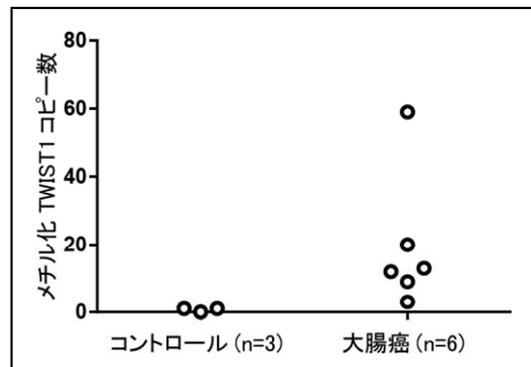


### 図4 超高感度メチル解析法

(A) テンプレート DNA のメチル化 DNA 混合率と、測定値としてのメチル化レベルの間には直線的な相関が認められた。(B) デジタル PCR 生データ。一つのドットが1つのドロップレットの蛍光量を示す。NTC, no template control.

### ( 2 ) 便 DNA 検査(予備試験)

便 DNA 検査予備試験結果 ( 図 5 ) に示す通り、bisulfite 不要の超高感度メチル化解析法により便 DNA 検査の成功率が格段に上がった。また、コントロール群に比べて大腸癌患者群で TWIST1 メチル化レベルが高いことが明らかとなった。なお、これらのサンプルは従来技術 ( bisulfite ベースのメチル化解析 ) では PCR がかからず解析ができなかったものであるが、超高感度メチル化解析法では問題なく測定可能であった。

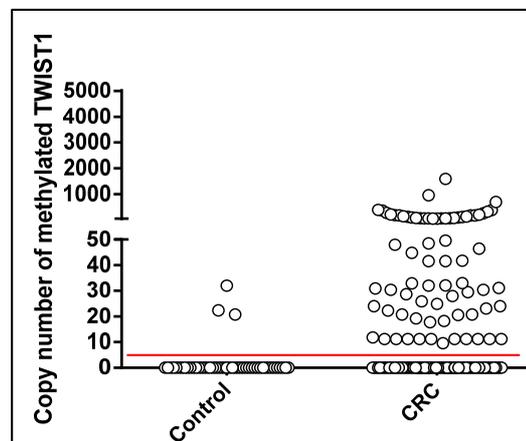


### 図5 便 DNA 検査予備試験結果(超高感度メチル化解析法)

被験者の便検体より DNA を抽出し、超高感度メチル化解析法にて TWIST1 メチル化レベルを比較したところ、コントロール群に比べて大腸癌患者群でメチル化レベルが高値であった。

### ( 3 ) 便 DNA 検査

便 DNA 検査結果を図 6 に示す。本法は便検体からの大腸腫瘍スクリーニングに利用できる可能性が高いため、今後さらに症例数を増やして検討を行う予定である。



## 図6 便 DNA 検査結果(超高感度メチル化解析法)

TWSIT1 メチル化レベルのカットオフ値を 5 コピーとすると、大腸がんの検出感度は 47%、特異度は 94%であった。

### 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 7 件)

Suehiro Y, Sakai K, Nishioka M, Hashimoto S, Takami T, Higaki S, Shindo Y, Hazama S, Oka M, Nagano H, Sakaida I, Yamasaki T. Highly sensitive stool DNA testing of *Fusobacterium nucleatum* as a marker for detection of colorectal tumours in a Japanese population. *Ann Clin Biochem*. 2016. [Epub ahead of print], 査読有.

Zhang Y, Suehiro Y (Corresponding author), Shindo Y, Sakai K, Hazama S, Higaki S, Sakaida I, Oka M, Yamasaki T. Long-fragment DNA as a potential marker for stool-based detection of colorectal cancer. *Oncol Lett*. 2015 Jan;9(1):454-458, 査読有.

Nishikawa J, Yoshiyama H, Iizasa H, Kanehiro Y, Nakamura M, Nishimura J, Saito M, Okamoto T, Sakai K, Suehiro Y, Yamasaki T, Oga A, Yanai H, Sakaida I. Epstein-barr virus in gastric carcinoma. *Cancers (Basel)*. 2014 Nov 7;6(4):2259-74, 査読有.

Tsunedomi R, Hazama S, Fujita Y, Okayama N, Kanekiyo S, Inoue Y, Yoshino S, Yamasaki T, Suehiro Y, Oba K, Mishima H, Sakamoto J, Hamamoto Y, Oka M. A novel system for predicting the toxicity of irinotecan based on statistical pattern recognition with UGT1A genotypes. *Int J Oncol*. 2014 Oct;45(4):1381-90, 査読有.

Inoue Y, Hazama S, Iwamoto S, Miyake Y, Matsuda C, Tsunedomi R, Okayama N, Hinoda Y, Yamasaki T, Suehiro Y, Yoshino S, Sakamoto J, Mishima H, Oka M. FcyRand EGFR polymorphisms as predictive markers of cetuximab efficacy in metastatic colorectal cancer. *Mol Diagn Ther*. 2014 Oct;18(5):541-8, 査読有.

Okada T, Nakamura M, Nishikawa J, Sakai K, Zhang Y, Saito M, Morishige A, Oga A, Sasaki K, Suehiro Y, Hinoda Y, Sakaida I. Identification of genes specifically methylated in

Epstein-Barr virus-associated gastric carcinomas. *Cancer Sci*. 2013

Oct;104(10):1309-14, 査読有.

Suehiro Y, Okada T, Shikamoto N, Zhan Y, Sakai K, Okayama N, Nishioka M, Furuya T, Oga A, Kawauchi S, Maeda N, Tamesa M, Nagashima Y, Yamamoto S, Oka M, Hinoda Y, Sasaki K. Germline copy number variations associated with breast cancer susceptibility in a Japanese population. *Tumour Biol*. 2013 Apr;34(2):947-52, 査読有.

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]  
出願状況(計 2 件)

名称: 大腸腫瘍の有無を検査する方法

発明者: 末廣 寛

権利者: 山口大学

種類: 特許

番号: 特許願 2015-177040

出願年月日: 平成 27 年 9 月 8 日

国内外の別: 国内

名称: 大腸腫瘍の有無の予測を補助する方法

発明者: 末廣 寛、山崎隆弘

権利者: 山口大学

種類: 特許

番号: 特許願 2016-024772

出願年月日: 平成 28 年 2 月 12 日

国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

### 6 . 研究組織

(1)研究代表者

末廣 寛 (SUEHIRO, Yutaka)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 4 0 2 9 0 9 7 8

(2)研究分担者

岡山 直子 (OKAYAMA, Naoko)

山口大学・医学部附属病院・副臨床・衛生  
検査技師長

研究者番号: 4 0 4 2 0 5 4 1