

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460937

研究課題名(和文) エピゲノム解析を応用した超早期胃癌検出法の開発と実用化

研究課題名(英文) Detection of Early Gastric Cancer with DNA Methylation Analysis of Gastric Washes

研究代表者

渡邊 嘉行 (Watanabe, Yoshiyuki)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：90329243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：通常内視鏡検査時に廃棄される胃洗浄廃液から回収・解析したDNA異常を胃癌の分子マーカーとして臨床応用する本研究の目的は、最終的に前向き臨床試験として行われ、解析の結果、Sox17, miR34, MINT25の3遺伝子メチル化異常が超早期胃癌を捉えることの出来る候補遺伝子として選定され、それぞれの感度・特異度・AUC (Area Under the Curve)は、Sox17(70.0%, 48.1%, 0.646)、MINT25(70.0%, 35.2%, 0.555)、miR34(65.0%, 49.4%, 0.578)という結果を得ることが出来たため、米国がん学会、米国消化器病週間に発表を行った。

研究成果の概要(英文)：Although minimal invasive treatment is widely accepted for early stage of gastric cancer (EGC), we still do not have any appropriate risk markers to detect residual neoplasia and some potential of recurrence. Our goal is to verify the potency of our three selected candidate genes (Sox17, MINT25, miR34) as a treatment marker for EGC. 352 EGC cases were registered and endoscopically removed. 182 cases could followed endoscopically for 2 years (51.7%). Sensitivity, specificity and AUC were as follows. Sox17 (70.0%, 48.1%, 0.646), MINT25 (70.0%, 35.2%, 0.555), miR34 (65.0%, 49.4%, 0.578). We have developed a new methodology for gastric cancer detection by DNA methylation in gastric washes. It is easy and useful for early detection of recurrence after endoscopic treatment in GcA patients.

研究分野：胃癌メチル化異常

キーワード：胃癌 胃洗浄廃液 分子マーカー DNAメチル化 ピロリ菌

### 1. 研究開始当初の背景

胃がん内視鏡検診の導入にも関わらず癌部位別死因2位、見逃し率約25%である。我々は、通常内視鏡検査時に廃棄される胃洗浄廃液から回収・解析したDNA異常を胃がんの分子マーカーとすることで、従来法の弱みである「見逃し」の解消につなげることができるほか、存在・予測診断にも応用可能であることを米国 *Gastroenterology* 誌に報告した。

### 2. 研究の目的

「解析時間短縮」、「効率的なDNA抽出」、「コスト削減」の課題すべてを解決する新たな手法を考案した。つまり、胃洗浄廃液から直接目的遺伝子を増幅する手法である。本法は、胃全体の情報を網羅した「廃液を用いた超早期胃がん遺伝子診断」として画期的な唯一の方法であり、本技術の優位性・応用展開の可能性は高く、先進医療の制度を活用した早期の多施設での臨床展開を行う予定で、薬事申請へとつなげていく。

### 3. 研究の方法

胃洗浄廃液を我々の開発した特殊法により短時間に処理、ペレット化させた処理済洗浄廃液を用い、迅速 Bisulfite 処理法による変換処理を行った後、直接反応液、Taq ポリメラーゼ、メチル化判定プライマーを用いて遺伝子増幅、リアルタイム PCR 法によりメチル化判定が効率かつ安定した定量解析となる系を樹立する。さらに、従来の胃洗浄廃液DNA抽出法と新法とのDNAメチル化解析結果に差がないことを検証する。既に本大学生命倫理委員会において、本臨床自主試験研究の承認を得ており(第1494号)症例の登録が行われる状況にある。臨床応用へ向けた従来法と新法との解析結果を比較検証するとともに、先進医療の制度を活用した臨床応用を具体的に構築する。

### 4. 研究成果

検討の結果、回収した胃洗浄廃液をリアルタイムPCR法にて行うよりも Pyrosequencing 法にて解析するほうが回収したサンプルの質に影響されないメチル化解析結果をあることが出来た。さらに、通常内視鏡検査時に廃棄される胃洗浄廃液から回収・解析したDNA異常を胃がんの分子マーカーとして臨床応用する本研究の目的は、最終的に前向き臨床試験として行われ、解析の結果、Sox17, miR34, MINT25 の3遺伝子メチル化異常が超早期胃がんを捉えることの出来る候補遺伝子として選定され、それぞれの感度・特異度・AUC (Area Under the Curve) は、Sox17 (70.0%, 48.1%, 0.646)、MINT25 (70.0%, 35.2%, 0.555)、miR34 (65.0%, 49.4%, 0.578) という結果を得ることが出来たため、米国がん学会、米国消化器病週間にて発表を行った。

### 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2件)

1. Miyamoto S, Watanabe Y, Oikawa R, Ono S, Mabe K, Kudo T, Yamamoto H, Itoh F, Kato M, Sakamoto N. Analysis of *Helicobacter pylori* genotypes in clinical gastric wash samples. *Tumour Biol.* 2016 Jan 29. (査読有)
2. Watanabe Y, Yamamoto H, Oikawa R, Toyota M, Yamamoto M, Kokudo N, Tanaka S, Arii S, Yotsuyanagi H, Koike K, Itoh F. DNA methylation at hepatitis B viral integrants is associated with methylation at flanking human genomic sequences. *Genome Res.* 2015 Mar;25(3):328-37. doi: 10.1101/gr.175240.114. (査読有)

[学会発表](計3件)

1. Yoshiyuki Watanabe, Ritsuko Oikawa, Hiroyuki Yamamoto, Fumio Itoh.

Hypermethylation of BARHL2 gene is useful as a molecular marker in early stage of gastric cancer. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2015. April 18 2015, Pennsylvania Convention Center Philadelphia, Pennsylvania. United States

2. Yoshiyuki Watanabe, Ritsuko Oikawa, Hiroyuki Yamamoto, Fumio Itoh. The BARHL2 Gene Is Silenced by Promoter Hypermethylation in Early Stage of Gastric Cancer. Digestive Disease Week (DDW) 2015. May 18 2015, Walter E. Washington Convention Center 801 Mt Vernon PI NW, Washington, DC, USA.

〔図書〕(計0件)

## 6 . 研究組織

- (1) 研究代表者  
渡邊 嘉行(Watanabe, Yoshiyuki)  
聖マリアンナ医科大学・医学部・講師  
研究者番号：90329243
- (2) 研究分担者  
前畑 忠輝 (Maehata, Tadateru)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：90534199

