

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462011

研究課題名(和文) エピゲノムから考案した潰瘍性大腸炎癌化ハイリスク症例の診断方法の確立

研究課題名(英文) DNA methylation biomarkers predict development of UC-associated colorectal neoplasia

研究代表者

問山 裕二 (Toiyama, Yuji)

三重大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00422824

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：腸管の慢性炎症ならびに加齢による頻回の粘膜再上皮化は、腸管上皮細胞のDNAメチル化を異常誘発する因子であり、潰瘍性大腸炎(UC)合併大腸癌(CAC)に深く関与している。このように形成されるDNAメチル化異常は癌組織に加え、非癌部にも存在することが知られ(Field defect)、この現象は大腸腫瘍を合併する高危険群の絞り込みを可能にする新たな危険因子として期待される。

今回の研究では、複数のDNAメチル化マーカーはField effectの特性を持ち、それらのマーカーパネルを用いたUC患者の直腸生検は、CAC合併患者の絞り込みに有用な検査方法として期待される結果であった。

研究成果の概要(英文)：Colitis-associated cancer (CAC) is higher among long-standing ulcerative colitis (UC) patients, such as that for whom surveillance colonoscopy is widely recommended. However, CAC is often difficult to detect endoscopically and histologically because of mucosal structure modifications by inflammation. Therefore, several molecular alterations may be promising as markers for identifying patients at high risk of developing CAC. First, we investigated the feasibility of using the methylation status of several microRNAs, which have characteristic of both type C (methylated during carcinogenesis) and type A (methylated during aging) simultaneously as a promising biomarker in CAC. We next performed the analysis of these biomarkers from rectal biopsy specimen has robust predictive potential in identifying UC patients with CAC elsewhere in the colorectum. In addition, we confirmed the reproducibility by using a large cohort.

研究分野：消化器癌

キーワード：DNAメチル化 マイクロRNA 潰瘍性大腸炎 癌化

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎は、大腸の粘膜に糜爛や潰瘍ができる原因不明の大腸瀰漫性非特異性炎症疾患である。食生活の欧米化に伴い潰瘍性大腸炎の患者数は増加の一途を辿っている。ステロイド、5ASA、免疫調節薬、生物学的製剤を中心とした内科的治療の進歩により従来は外科治療を考慮してきた UC の重症例でも、手術を回避できる症例も見られるようになってきている。その一方で、潰瘍性大腸炎は大腸癌のハイリスク群とされ、我が国の長期成績の検討では、罹患期間ならびに罹患範囲が独立した大腸癌発生リスクファクターとされている。UC 合併癌は患者の予後を左右する腸管合併症であるために、早期発見し外科的治療へのスムーズな移行が極めて重要である。

潰瘍性大腸炎は長期経過に伴い癌化の危険性が高くなることが知られており、腫瘍発見のスクリーニングとして定期的に surveillance colonoscopy (SC) を行うことが推奨されている。現在、わが国では7年以上罹患する全大腸炎型、左側結腸炎型患者に年1回以上の全大腸内視鏡検査下の random-step biopsy あるいは拡大内視鏡を併用した有所見部位の biopsy (target biopsy) によるサーベイランスが推奨されている。しかしながら、潰瘍性大腸炎に合併する癌の特徴として、多発癌の頻度が高く、低分化型腺癌、印環細胞頻度が高く、背景粘膜に炎症を伴うことが多く、色調での判別も極めて困難で、これらの要因が潰瘍性大腸炎合併大腸癌の発見を困難にしている。またやみくもに生検をする方法 (random-step biopsy) は患者の侵襲性から好ましくないと考えられている。

2. 研究の目的

潰瘍性大腸炎における炎症性発癌のメカニズムをエピゲノムの観点から解明し、有用なマーカーを見出すことにより、現在行われている癌化サーベイランスプログラムより、さらに安全で確実な検出方法を確立することを目的としている。これに伴って不必要なサーベイランス検査を省略することが可能となり、患者への負担だけでなく医療費の削減にも寄与することが期待される。

3. 研究の方法

腸管の慢性炎症ならびに加齢による頻回の粘膜再上皮化は、腸管上皮細胞の DNA メチル化を異常誘発する因子であり、細胞分裂が進むほど DNA メチル化エラーが蓄積し、潰瘍性大腸炎 (UC) 合併大腸癌 (CAC) に深く関与している。このように形成される DNA メチル化異常は癌組織に加え、非癌部にも存在することが知られ (Field defect)、この現象は大腸腫瘍を合併する高危険群の絞り込みを可能にする新たな危険因子として期待される。

検証方法

散発性大腸癌組織で高度にメチル化されている5つの miRNAs (-1, -9, -124, -137, -34b/c) に着目し、UC 非癌部粘膜 (盲腸: n=62, 横行結腸: n=62, 直腸: n=87)、Dysplasia (n=12) ならびに CAC (n=13) から DNA を抽出、Bisulfite 処理後パイロシーケンス法で miRNAs のメチル化レベルを定量し、臨床病理学的因子ならびに発癌との関連を検討した。

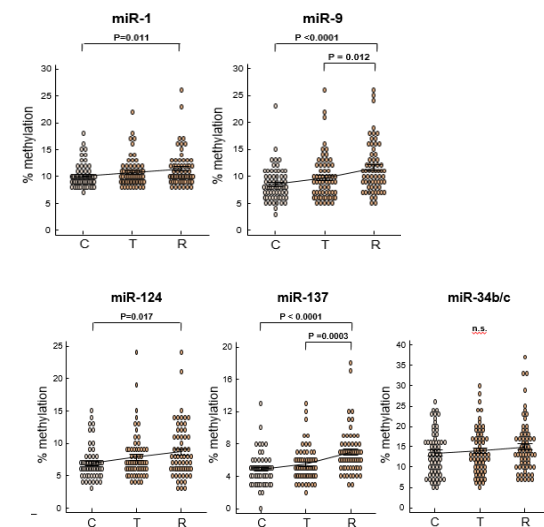
検証方法

CAC 非合併 UC 患者の直腸粘膜 (n=90) ならびに CAC 合併 UC 患者の直腸粘膜 (n=61) から DNA を抽出、Bisulfite 処理後パイロシーケンス法で miRNAs のメチル化レベルを定量し initial cohort の再現性を確認した。

4. 研究成果

結果 1.

潰瘍性大腸炎非癌部粘膜の5つの miRNAs メチル化レベルは遠位大腸で高く、直腸で有意に高値を示した。

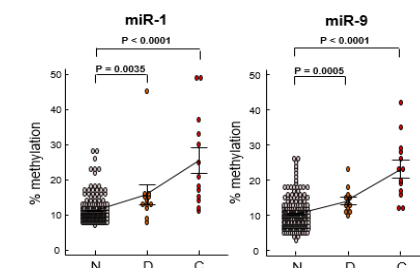


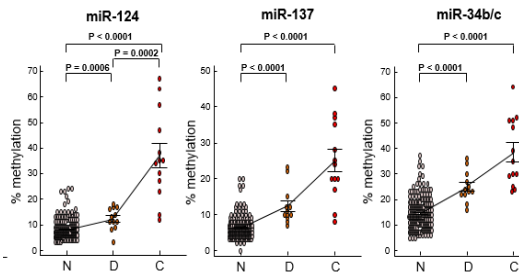
結果 2.

直腸粘膜の5つのメチル化レベルは診断時年齢、手術時年齢、病脳期間と有意に相関した。Dysplasia、CAC のこれらの miRNAs メチル化レベルは非癌部粘膜に比し有意に高値であった。

結果 3.

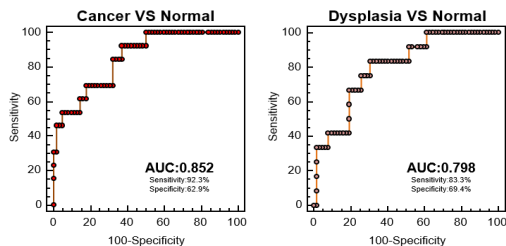
CAC 合併 UC 患者の直腸粘膜の5つのメチル化レベルは、非合併 UC 患者の直腸粘膜に比し有意に高値であった。





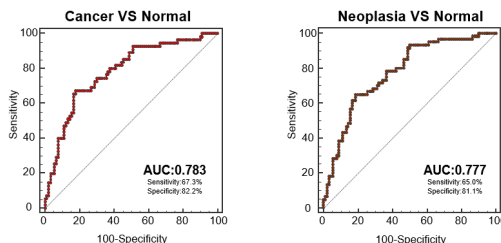
結果 4.

5つのmicroRNAメチル化パネルはCACを合併するUC患者を高率に同定できた。



結果 5.

CAC合併UC患者の直腸粘膜の5つのメチル化レベルは、非合併UC患者の直腸粘膜に比べ有意に高値で、5つのmicroRNAメチル化パネルはUC患者を高率に同定でき、再現性が確認された。



結果のまとめ

UC粘膜においては、複数のDNAメチル化マーカーは部位、粘膜年齢及び腫瘍依存的であり、時に"Field effect"を認める。Field effectの特性を持つDNAメチル化マーカーパネルを用いた直腸生検は、CAC合併UC患者の絞り込みに有用な検査方法として期待される。

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 3件)

Araki T, Toiyama Y, Tanaka K, Uchida K, Kusunoki M. Advances in research on ulcerative colitis. Nihon Geka Gakkai Zasshi. 2015 Mar;116(2):104-8. 査読あり

Toiyama Y, Okugawa Y, Goel A. DNA methylation and microRNA biomarkers for noninvasive detection of gastric and colorectal cancer. Biochem Biophys Res Commun. 2014 Dec 5;455(1-2):43-57. 査読あり

Okugawa Y, Toiyama Y, Goel A. An update on microRNAs as colorectal cancer biomarkers: where are we and what's next? Expert Rev Mol Diagn. 2014 Nov;14(8):999-1021 査読あり

[学会発表](計 8件)

問山 裕二, 奥川 喜永, 今岡 裕貴, 沖上 正人, 藤川 裕之, 三枝 晋, 廣 純一郎, 小林 美奈子, 大井 正貴, 荒木 俊光, 井上 靖浩, 毛利 靖彦, 楠 正人. 潰瘍性大腸炎患者の大腸粘膜における miR-137 メチル化の臨床病理学的意義 第 71 回日本大腸肛門病学会 学術集会 2016 11月18日 三重サンアリーナ (三重県・伊勢市)

荒木 俊光, 問山 裕二, 楠 正人. エピゲノムから考案した colitis associated cancer 診断方法の確立を目指して JDDW 2016 2016年11月3日~6日 神戸コンベンションセンター (兵庫県・神戸市)

問山 裕二, 廣 純一郎, 小林 美奈子, 荒木 俊光, 大北 喜基, 井上 靖浩, 毛利 靖彦, 楠 正人. 潰瘍性大腸炎粘膜における LINE-1 ならびに ESR1 メチル化レベルの臨床的意義. 第 54 回日本癌治療学会学術集会 2016年10月20日~22日 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

長野 由佳, 問山 裕二, 内田 恵一, 近藤 哲, 川村 幹雄, 松下 航平, 大北 喜基, 大竹 耕平, 井上 幹大, 荒木 俊光, 楠 正人. 小児(20歳以下発症)潰瘍性大腸炎患者の直腸粘膜における microRNA-124,-137 メチル化の意義. 日本小児栄養消化器肝臓学会. 2016年9月16日~18日 つくば国際会議場 (茨城県・つくば市)

荒木 俊光, 問山 裕二, 楠 正人. エピゲノムから考案した colitis associated cancer 診断方法の確立を目指して JDDW 2016 2016年11月3日~6日 神戸コンベンションセンター (兵庫県・神戸市)

問山 裕二, 川村 幹雄, 大北 喜基, 廣 純一郎, 小林 美奈子, 大井 正貴, 荒木 俊光, 田中 光司, 井上 靖浩, 毛利 靖彦, 楠 正人. 潰瘍性大腸炎関連癌におけるエピゲノム異常から見た発癌に対するリスク診断法 日本癌学会総会 2015年10月8日~10日名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)

問山 裕二, 奥川 喜永, 廣 純一郎, 小林 美奈子, 大井 正貴, 荒木 俊光, 田中 光司, 井上 靖浩, 毛利 靖彦, 楠 正人. 散発性ならびに潰瘍性大腸炎関連癌におけるエピゲノム異常から見た発癌、予後に対するリスク診断法. 第 70 回日本消化器外科学会総会. 2015年7月15日~17日 アクトシテ

イ浜松 (静岡県・浜松市)
荒木 俊光, 問山 裕二, 楠 正人
Neoplasia 合併潰瘍性大腸炎の臨床的特徴と
危険群に対するサーベイランスアプローチ
日本消化器病学会総会 2015年4月23日~
25日 仙台国際センター (宮城県・仙台市)
問山 裕二, 奥川 喜永, 荒木 俊光, 田
中 光司, 井上 靖浩, 内田 恵一, 毛利 靖
彦, Boland C. Richard, Goel Ajay, 楠 正
人. パイロシーケンス法を用いた定量的メ
チル化解析による潰瘍性大腸炎患者の癌化
リスク診断. 第69回日本消化器外科学会総
会. 2014年7月16日~18日. ホテルハマツ
(福島県・郡山市)

〔図書〕(計 1件)
Yuji Toiyama, 他 Colitis Associated Cancer
2016 150 (pp85-105) Springer

〔産業財産権〕

取得状況 (計 1件)

名称 : ULCERATIVE COLITIS
(UC)-ASSOCIATED COLORECTAL
NEOPLASIA MARKERS
発明者: Ajay Goel, Yuji Toiyama, C. Richard
Boland, Yoshinaga Okugawa
権利者: Baylor Research Institute
種類: Application
番号: 20160115548
取得年月日: April 28, 2016
国内外の別: 国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

問山 裕二 (TOIYAMA YUJI)
三重大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 00422824

(2) 研究分担者

川村 幹雄 (KAWAMURA MIKIO)
三重大学・医学系研究科
研究分担者
研究者番号: 00722589

井上 靖浩 (INOUE YASUHIRO)
三重大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 20324535

楠 正人 (KUSUNOKI MASATO)
三重大学・医学系研究科・教授
研究者番号: 50192026

(3) 研究協力者

藤川 裕之 (FUJIKAWA HIROYUKI)
三重大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 40616091

近藤 哲 (KONDO SATORU)
三重大学・医学部附属病院・医員
研究者番号: 60763737

廣 純一郎 (HIRO JYUNICHIRO)
三重大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 70444437