

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670598

研究課題名(和文)炎症性腸疾患における癌化マーカーの遺伝子学的検討—血液・糞便の臨床応用

研究課題名(英文)Biomarker of the colorectal cancer in inflammatory bowel disease patients.

研究代表者

須並 英二 (SUNAMI, EIJI)

東京大学・医学部附属病院・登録研究員

研究者番号：70345205

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性腸疾患(IBC)長期経過例では大腸癌リスクが増加する。本研究では、患者血液、糞便あるいは生検組織といった新たな材料を対象とし大腸癌検出の可能性に関する検討を行った。対象遺伝子変化として、LINE1 global hypomethylationの程度(LHI)に注目した。大腸癌患者の血漿LHIは健常人より有意な上昇を示し、癌患者スクリーニング検査としての有用性が示唆された。生検組織では、大腸組織においては、前癌状態で既にLHIの有意な上昇を認めた。糞便での遺伝子検出の可能性の検討ではLHIの検討は可能であったが、その臨床応用の可能性に関しては対象遺伝子により詳細な検討が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Inflammatory Bowel disease (IBD) may cause colorectal cancer after long disease duration. In this study, the possibility of early detection of the colorectal cancer by means of the blood, feces and biopsy is investigated. In this study, we quantified the global methylation status of cfDNA in plasma extracted from colorectal cancer (CRC) patients, and investigated its clinical usefulness as a biomarker. LINE-1 hypomethylation index (LHI) in plasma may have a potential to serve as a biomarker enabling us to detect CRC patient at early stage. By means of the biopsy specimen, early onset of LINE-1 demethylation during adenomatous change of colorectal epithelial cells and LINE-1 demethylation progression is linear to TNM stage progression are demonstrated. LINE-1 hypomethylation is also detected from the material of the feces and regarding the utilization of this specimen, further analyses of the data are necessary.

研究分野：大腸がん

キーワード：炎症性腸疾患 大腸がん バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

大腸癌の発生は炎症性腸疾患長期経過症例における重大な問題となっている。そのサーベイランスは、現状では大腸内視鏡でのみ可能であるが、通常の大腸癌と異なり慢性炎症を背景としているため境界不明瞭、平坦病変などの特徴から識別困難なケースも多い。そのため前癌病変である Dysplasia の指摘がサーベイランスの目標とされているが、その方法は現状では内視鏡に限られている。また大腸癌腫瘍マーカーの CEA, CA19-9 は、サーベイランスには適しておらず、**IBD サーベイランスには分子生物学的アプローチを背景とする新たな展開が必須**である。サーベイランスとしての臨床応用において重要なことは、**低侵襲、繰り返し採取可能**であることであるが、候補は、**生検材料、新規材料として糞便、血液であり、その際特に微量 DNA であることを意識した検討が重要である。**

2. 研究の目的

炎症性腸疾患 (IBD) 長期経過症例では大腸癌リスクの増加することが課題であり、そのサーベイランスの重要性が強調されている。近年 IBD 関連大腸癌やその前癌病変、背景粘膜における遺伝子学的特徴が明らかにされつつあるが、サーベイランスの補助的役割を果たすには至っていない。**本研究では、糞便、患者血液といった現実的にサーベイランスに際し使用可能な新たな材料を対象にすること、微量材料検討に適した方法・対象遺伝子変化を考慮することで炎症性腸疾患関連大腸癌に対する分子生物学的アプローチの臨床応用を推進することを目的とする。**

3. 研究の方法

健常人、IBD 非癌化患者、IBD 癌化患者血液、生検組織、糞便より遊離 DNA を分離精製する。糞便の遊離 DNA における **LINE1 のメチル化定量**を行い癌化症例での変化を経時的

にあるいは非癌化患者との比較で検討。血液に関しては遊離 DNA の定量を行った後、LINE1 定量を行う。更に DNA を SBM 処理後 AQAMA 等 quantitative real-time methylation specific PCR の手法を用いて上記標的遺伝子メチル化の程度を定量化する。

以上の検討より、**IBD 癌化時に認められる (経時的あるいは非癌化患者との比較検討により) 糞便中に検出される遊離 DNA における遺伝子メチル化の変化や血液中遊離 DNA の量的変化とメチル化の変化**を検出し、サーベイランスへの応用を実現する。

4. 研究成果

まず血液中の遊離 DNA を使用した大腸癌検出の可能性に関する検討を行った。対象遺伝子変化としては、血液中に大量に存在し、遺伝子変化定量に際し有利と考えられる LINE1 global hypomethylation に注目した。大腸癌患者と健常人とにおける血漿中遊離 LINE1 DNA のメチル化レベルを定量し、癌患者識別の可能性を検討した。大腸癌患者 112 人、対照群として健常人 30 人より血漿を採取した。遊離 DNA はフェノール・クロロホルム法で抽出し、濃度を PicoGreen assay で定量した。メチル化レベルは LINE-1 遺伝子の promotor 領域(148bp)を対象に、パイサルファイト処理後、absolute quantitative analysis of methylated alleles realtime PCR (AQAMA) によって定量した。LINE-1 hypomethylation index (LHI) を $\text{unmethylation copy number} / \text{methylation} + \text{unmethylation copy number}$ と定義した。大腸癌患者の血漿遊離 DNA 量および血漿 LHI は健常人より有意な上昇を示した(遊離 DNA : $16.1 \pm 9.72 \text{ ng/ml}$ vs $11.3 \pm 3.41 \text{ ng/ml}$, $P = 0.0014$ 、血漿 LHI : 0.33 ± 0.029 vs 0.37 ± 0.042 , $P < 0.0001$)。臨床病理学的因子

の検討では腫瘍長径と血漿 LHI の間に弱い有意な相関を認めた($r = 0.19$, $P = 0.039$)。一方、遠隔転移例で血漿 LHI が高い傾向があったが($P = 0.096$)、Stage I-IV 間で有意差は無かった。健常人と癌患者を識別するスクリーニング検査としての有用性は ROC 曲線で評価し、血漿遊離 DNA 量は至適カットオフ値 12.1ng/ml、感度 67.0%、特異度 66.7%、AUC 0.69、血漿 LHI は至適カットオフ値 0.36、感度 67.0%、特異度 86.7%、AUC 0.82 と計算され、AUC の比較では血漿 LHI が有意に優れた($P = 0.048$)。

生検組織における大腸癌検出の可能性に関しては、Laser Capture Microdissection の手技を用いて、正常組織、前癌病変、癌間質組織、癌組織の極小の標本より正確でコンタミの少ない精度の高い抽出を実行し、前述の LINE-1 hypomethylation index (LHI) を検討した。その際バイサルファイト処理は in situ で実行し効率の改善を工夫した。大腸組織においては、前癌状態で LHI の有意な上昇を認め、間質の組織においては LHI の有意な亢進は認めなかった(正常組織: LHI 0.38, 前癌病変: LHI 0.49, $p < 0.05$)(正常組織: LHI 0.38, 間質組織: LHI 0.37, n.s.)。組織中の Line1 hypomethylation は腫瘍発生のきわめて早期より生じることが示された。同様の傾向を血漿遊離 DNA が反映する可能性を示唆した。

その他の対象となる材料として糞便における遺伝子検出の可能性の検討を行った。糞便を用いた LHI の検討は可能であったが、その臨床応用の可能性に関してはさらなる症例の集積や対象遺伝子のより広範囲な検討が必要と考えられた。Line1 hypomethylation の検討は組織や血液におけるスクリーニングでの有用性が期待される。

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 2 件)

1. Ishii H, Hata K, Kishikawa J, Anzai H, Otani K, Yasuda K, Nishikawa T, Tanaka T, Tanaka J, Kiyomatsu T, Kawai K, Nozawa H, Kazama S, Yamaguchi H, Ishihara S, Sunami E, Kitayama J, Watanabe T. Incidence of neoplasias and effectiveness of post operative surveillance endoscopy for patients with ulcerative colitis: comparison of ileorectal anastomosis and ileal pouch-anal anastomosis. World Journal of Surgical Oncology. 査読あり. Vol.14 2016 833-835. DOI: 10.1186/s12957-016-0833-5
2. Hata K, Kishikawa J, Anzai H, Shinagawa T, Kazama S, Ishii H, Nozawa h, Kawai K, Kiyomatsu T, Tnaka J, Tanaka T, Nishikawa T, Otani K, Yasuda K, Yamaguchi H, Ishihara S, Sunami E, Kitayama J, Watanabe T. Surveillanace colonoscopy for colitis associated dysplasia and cancer in ulcerative colitis patients. Digestive Endoscopy. 査読あり vol. 28 2016 260-265. DOI: 10.1111/den.12505

[学会発表](計 1 件)

1. Yuzo Nagai, Eiji Sunami, Yoko Yamamoto, Koji Yasuda, Kensuke Otani, Takeshi Nishikawa, Toshiaki Tanaka, Junichiro Tanaka, Tomomichi Kiyomatsu, Keisuke Hata, Kazushige Kawai, Hiroaki Nozawa, Hironori Yamaguchi, Soichiro Ishihara, Joji Kitayama, Toshiaki Watanabe. LINE-1 hypomethylation of circulating cell-free DNA in plasma has a potential to serve as a biomarker for detecting colorectal cancer patient. 第70回日本消化器外科学会総会. 2015年07月15日~2015年07月17日. アクトシティ浜松(静岡県・浜松市)

[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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

須並 英二 (SUNAMI, EIJI)
東京大学・医学部付属病院・登録研究員
研究者番号：70345205

(2) 研究分担者

石原 聡一郎 (ISHIHARA, SOICHIRO)
東京大学・医学部付属病院・講師
研究者番号：00376443

山口 博紀 (YAMAGUCHI, HIRONORI)
東京大学・医学部付属病院・登録研究員
研究者番号：20376445

渡邊 聡明 (WATANABE, TOSHIAKI)
東京大学・医学部付属病院・教授
研究者番号：80210920

(3) 連携研究者

()

研究者番号：