

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2017

課題番号：26710008

研究課題名(和文) 便潜血反応検査と便miRNA検査を組み合わせた新しい大腸がん検診法の開発研究

研究課題名(英文) Nobel method for colorectal cancer screening using fecal occult blood test and fecal miRNA test

研究代表者

古賀 宣勝 (KOGA, YOSHIKATSU)

国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・室長

研究者番号：70536086

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,400,000円

研究成果の概要(和文)：大腸がん検診として便潜血検査と便miRNA検査の併用法を検討した。便潜血検査を行った後の残液からmiRNAが抽出可能であり、miRNAの相対定量法および絶対定量法を確立した。進行新生物患者90例と健常者60例での便潜血検査と便miRNA検査の複合検査の評価を行い、便潜血検査の感度と特異度は74.4%と93.3%だったが、複合検査により感度93.3%と特異度91.7%と改善できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：A combination method of fecal occult blood test (FOBT) and fecal miRNA test (FmiRT) was examined for colorectal cancer screening. Fecal miRNA could be extracted from the FOBT residua, and both the relative quantification method and the absolute quantification method for miRNA expression could be established in this study. Among 90 patients with advanced neoplasia and 60 healthy subjects, the sensitivity and specificity of FOBT were 74.4% and 93.3%, and the sensitivity and specificity of the combination method of FOBT and FmiRT were 93.3% and 91.7%. The combination of FOBT and FmiRT might be useful for colorectal cancer screening.

研究分野：腫瘍診断学

キーワード：大腸がん がん診断 がん検診 miRNA 便検査 便潜血検査

## 1. 研究開始当初の背景

大腸がんは主要な悪性腫瘍のひとつであり、日本でも生活様式の欧米化に伴って増加傾向にあるが、一般的に早期発見し内視鏡的切除や外科的切除による治療ができれば生存率が極めて良好ながんである。現在、大腸がん検診法として便潜血反応検査が世界中で広く普及しており、便潜血反応検査化学法は大腸がんの死亡率を低下させることが大規模な無作為化比較対照試験にて報告された。しかし最近の大規模臨床研究において浸潤がん(粘膜下層以深のがん)における便潜血化学法の感度はせいぜい13~50%程度であることも事実である。一方、日本で使用されている抗ヒトヘモグロビン抗体を用いた便潜血免疫法の感度および特異度は便潜血化学法よりも高いと報告されているが、便中の微量なヘモグロビンを診断するものであり大腸がんを特異的には診断しておらず、その特異性と感度は不十分である。つまり、健常者における便潜血反応検査の陽性症例(偽陽性健常者症例)および大腸がん患者における便潜血反応検査の陰性症例(偽陰性大腸がん症例)が多いことが問題となっている。近年、大腸内視鏡検査やCTコロノグラフィーが大腸がん検診として考えられているが、侵襲的検査であり高コストのため実現は困難である。がん検診は、感度・特異度が高いことはもちろん、簡便・容易で被験者の精神的・肉体的な負担が少ない検査法であることが重要であり、最もエビデンスレベルの高い便潜血反応検査を軸に検査偽陽性健常者症例の除外と検査偽陰性大腸がん症例を拾い上げる検査を追加する新たな大腸がん検診法の開発は臨床的に大きな意義を持つ。

大腸がんは大腸粘膜から発生し常に便と接している。そのために自然排泄便を対象に大腸がんを診断しようという研究は昔から多くの研究者によって報告されている。これまでに研究代表者らは、新しい大腸がんスクリーニング法の実現を目指して、自然排泄便から大腸がん細胞を分離、検出する検査手法の研究開発を進めてきた。排便から剥離細胞を回収するまでの最適保存時間と最適保存温度を決定し、便中の剥離細胞を効率よく回収するのに適した磁性ビーズの特徴も明らかにした。便から分離した大腸がん細胞を診断する方法はmRNAを用いたがん特異遺伝子の発現解析とmicroRNA(miRNA)発現解析を報告した。また、miRNAは便中에서도比較的安定しており、便miRNA検査が大腸がん検診法となり得る可能性を示してきた。

miRNAは、17から25塩基程度のタンパクをコードしない小さなRNA分子であり、がんの発生・分化・増殖などに関与している。miRNAは対象となるmRNAの3'非翻訳領域に相補的な配列を有し結合することでタンパクの翻訳を妨げたり、RNA干渉を通して

mRNA自体を分解したりすることで遺伝子発現を負に調節している。miRNAはその機能が解析されている一方で血液や便、体液中のmiRNAを用いたがん診断も検討されている。血液や体液中でも安定してmiRNAを検出できるのはexosomeという50から90nmサイズの粒子に包まれているからと報告されており、我々もexosomeに包まれたmiRNAが便中でも安定していることを報告した。

以上の背景を踏まえて、最もエビデンスレベルの高い便潜血反応検査の問題点である偽陽性健常者の除外と偽陰性大腸がん症例の拾い上げを便miRNAが可能ではないかとの考えに至った。

## 2. 研究の目的

研究代表者らが今まで報告してきた手技のうちでRNAを用いたがん特異遺伝子発現解析やがん特異的miRNA発現解析が最も簡便で低コストであった。これらは便の中から磁性ビーズを用いて回収したがん細胞を対象としていた。本研究では便潜血反応検査の追加検査として便miRNA検査が利用可能かを検討するものであるが、今までの研究を基盤として便潜血反応検査の反応液からmiRNAの抽出法およびそれに引き続くmiRNAの解析法はすでに確立していた。さらに、117名の大腸がん患者における便潜血反応検査残液中のmiR-106aが107名の健常者のそれよりも高値であり、便潜血反応検査と独立した因子であるため、便miR-106aによって便潜血陰性大腸がん患者46名のうち4分の1の12名を拾い上げることができることも報告していた。

本研究の目的である「自然排泄便を用いた新しい大腸がん検診法の確立」の実現のために、研究期間の前半は研究開始時点で有望と考えていたmiR-106aとそれ以外にも大腸がん患者と健常者を明確に区別できるmiRNAを検討することとした。その実現のためにそれまで検討してきた症例と別の症例対象研究を用いて、便miRNA検査が便潜血反応検査の追加検査として実用可能かどうかの確認を行った。本研究期間の後半では、大腸がん患者と健常者を区別することのできる新たな便miRNAの候補を探索すると同時に、大腸がん検診(大腸内視鏡検査)受診者を対象に、便潜血反応検査と便miRNA検査の複合検診の評価を行うこととした。

## 3. 研究の方法

### (1)2014年度の研究方法

便潜血検査残液からのmiRNA抽出法とmiRNA絶対定量法の確立:既取得便検体(大腸がん患者117例、健常者107例)を使用した。便潜血検査用の採便容器に約10mgの便を採取し、型通り便潜血検査を実施した。検査残液を2mL遠心管に移し、4、20,000g、30分間の条件で遠心した後上清を除去し、便ペレットを取得した。miRNeasy Mini Kit

にて便 miRNA を抽出し、NanoDrop にて濃度を計測した。Real-time PCR 法による miRNA の発現解析に用いる miRNA は 5ng とした。各 miRNA に対する合成 RNA を段階希釈することで絶対定量法に必要な標準曲線を作製し、1ng-RNA あたりのコピー数を算出した。

#### (2)2015 年度の研究方法

新たな検体の回収および便潜血検査と便 miRNA 検査:大腸がん検診における便潜血検査は 2 日法が行われている。既取得検体では 1 日分の便のみ採取しており、2 日間の便検体を採取する症例が必要となった。新たに同意を得られた 150 症例の便検体 (2 日法) を採取し、便潜血検査を行うと同時に残液から抽出した miRNA を用いて便 miRNA 検査を実施した。

#### (3)2016 年度の研究方法

便潜血検査と便 miRNA 検査の複合検査法の検討および平均的がんリスク被験者の症例集積:2015 年度までに得られた FOBT および FmiRT の解析を、統計解析ソフト SPSS を用いて実施した。最終的には決定木解析法にて複合検査の可能性を算出した。また、大腸内視鏡検査を施行された 40 歳以上 80 歳以下の平均的がんリスク被験者において便検体の回収を開始した。

#### (4)2017 年度の研究方法

大腸がんを効率よく診断する便 miRNA の網羅的解析と平均的がんリスク被験者の症例集積:大腸がん患者と健常者を明確に区別できる新たな miRNA を見出すために、Chip 解析による miRNA アレイ解析を実施した。有望な miRNA については、上記 150 例の便 miRNA を用いて、real-time PCR 法による再現性の確認を行った。また、2016 年度から継続して症例集積を行っていた平均的がんリスク被験者の便検体の回収を完了した。

### 4. 研究成果

#### (1)2014 年度の研究成果

便潜血反応検査の採便キットを用い、定量的便潜血反応検査免疫法を行った後の残液から抽出した miRNA をサンプルとした。約 10mg の便ペレットから抽出できた RNA は約 1 $\mu$ g であったが、miRNA の発現解析に使用する 1 アッセイあたりの RNA は約 5ng であるため、十分な量が確保できた。

既報告では miRNA の解析は相対発現量を用いたが、各症例のサンプルを正確に比較するには一定量の RNA 中に含まれるターゲット miRNA の絶対量を比較することが必要である。そのため絶対定量法の確立を研究初年度に行った。各種 miRNA を合成し、希釈系列を real-time PCR 法にて解析することで RNA 1ng あたりのコピー数を算出可能

であった (図 1)。がん患者 117 例と健常者 107 例における 6 種類の便 miRNA のコピー数を解析すると、健常者検体と比較してがん患者検体ではすべての miRNA が有意に高値だった。感度と特異度を元に ROC 曲線を作図し AUC を計算すると、miR-106a が 0.793、miR-223 が 0.730 と高値を示し、有望な miRNA であった (図 2)。

以上より便潜血反応検査残液の miRNA 抽出法と miRNA の絶対定量法の確立ができた。

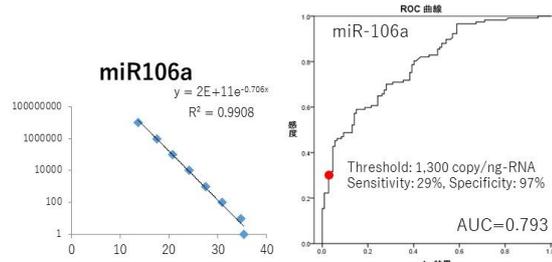


図1 標準曲線

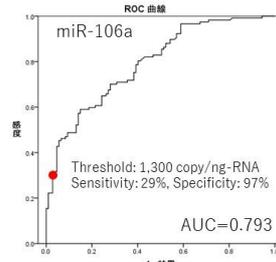


図2 絶対定量法 (AUC)

#### (2)2015 年度の研究成果

新たに同意を得られた症例の内訳は、大腸がん患者 75 例 (外科的切除 58 例、内視鏡的切除 17 例)、進行腺腫患者 15 例、非進行腺腫患者や所見なしの健常者 60 例の合計 150 例だった。便潜血検査の採便キットを用い、2 日間の便検体は 150 症例中 143 症例 (95.3%) から提出された。便潜血検査の陽性率は、大腸がん患者 85.3%、進行腺腫患者 20.0%、健常者 8.0%であった。便 miRNA 検査の ROC 曲線を作図し AUC を計算すると、miR-106a が 0.687、miR-223 が 0.603、miR-92a が 0.754 であった (図 3)。

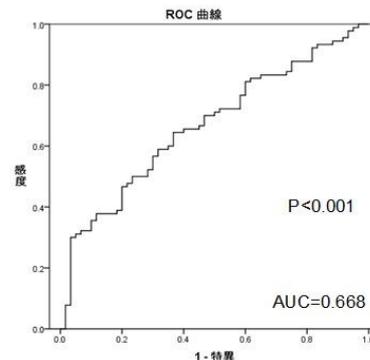


図3 便miR-106a検査 (AUC)

#### (3)2016 年度の研究成果

進行新生物患者 (大腸がん患者と進行腺腫患者を合わせたもの) 90 例と非進行大腸腺腫患者と健常者を合わせた 60 例での便潜血検査と便 miRNA 検査の複合検査の評価を行った。便潜血検査の感度と特異度は 74.4% と 93.3%だったが、複合検査により感度 93.3%と特異度 91.7%と改善できる可能性が示唆された (表 1)。

	感度	
	FOBT	FOBT+miRNA
大腸がん+進行腺腫	74.4% (67/90)	93.3% (83/90)
大腸がん	94.7% (54/57)	98.2% (56/57)
粘膜内がん	55.6% (10/18)	83.3% (15/18)
進行腺腫	20.0% (3/15)	80.0% (12/15)

	特異度	
	FOBT	FOBT+miRNA
非進行腺腫+正常所見	93.3% (56/60)	91.7% (55/60)
非進行腺腫	77.8% (7/9)	77.8% (7/9)
正常所見	96.1% (49/51)	94.1% (48/51)

表1 FOBT+FmiRTの感度・特異度

大腸内視鏡検査を施行された平均的がんリスクのがん検診年齢である被験者 646 例の症例集積を行った。便潜血検査の陽性率は 8.8%であり、抽出した便 miRNA の中央値は 1.99 µg との結果を得た。

#### (4)2017 年度の研究成果

12 例の進行新生物患者検体および 8 例の健常者検体を用いて、2000 種類を超える miRNA を網羅的に検出できる高感度 miRNA アレイ解析を実施した。健常者と比べて進行新生物患者で有意に高値である miRNA を 21 種類選択することができた。そこで再現性の確認のため、2015 年度に新たに取得した 150 例の便 miRNA における上記 21 種類の miRNA 発現解析を相対定量法および絶対定量法で行った。しかしながらいずれの miRNA も大腸がん患者の便 miRNA で有意に高値とはならず、再現が得られなかった。理由として便潜血検査残液中の miRNA は微量であり、PCR 法と比べてアレイ解析法では十分な感度が得られておらず、適切な miRNA を選択できていなかった可能性が示唆された。

一方で大腸内視鏡検査を施行された平均的がんリスクのがん検診適応年齢である被験者は 1366 例が集積された。そのうち 1 例は採便が不十分であると判断し、最終的に 1365 例が登録された。便潜血検査の陽性率は 8.4%であった。便 miRNA の抽出は 646 例においてのみ実施済みであり、残りの 719 例の便 miRNA の抽出と便 miRNA 発現解析は継続して実施することとした。

#### 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 9 件)

Nobuyoshi Yamazaki, Yoshikatsu Koga, Yasuhiro Matsumura. MicroRNA analysis of colorectal cancer using fecal and tissue samples. RNA & Disease 4(3):e1592, 2017. 査読有、DOI: 10.14800/rd.1592.

Yoshikatsu Koga. miRNAs are stable in several severe storage conditions and useful for molecular diagnostics. Journal of Tumor Medicine & Prevention

1(4): 555568, 2017. 査読有、DOI: 10.19080/JTMP.2017.01.555568.

古賀宣勝、劣悪な検体でも解析可能な miRNA の利用法、Pharm Stage、査読無、16(7)、2017、pp.42-47

Nobuyoshi Yamazaki, Yoshikatsu Koga, Hirokazu Taniguchi, Motohiro Kojima, Yukihide Kanemitsu, Norio Saito, Yasuhiro Matsumura. High expression of miR-181c as a predictive marker of recurrence in stage II colorectal cancer. Oncotarget 8(4):6970-6983, 2017. 査読有、DOI: 10.18632/oncotarget.14344.

古賀宣勝、糞便中の DNA 検査、検査と技術、査読無、44(4)、2016、pp.290-292、DOI: 10.11477/mf.1543206395.

山崎信義、古賀宣勝、松村保広、血漿中遊離アミノ酸濃度や microRNA を用いた大腸がん検診への期待、消化器内視鏡、査読無、27(4)、2015、pp.715-716

古賀宣勝、山崎信義、松村保広、大腸癌診断のための便中バイオマーカー、臨床病理、査読無、63(3)、2015、pp.361-368、[http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=co3labor/2015/06303/009&name=0361-0368j&UserID=160.190.244.6&base=jamas\\_pdf](http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=co3labor/2015/06303/009&name=0361-0368j&UserID=160.190.244.6&base=jamas_pdf)

Yuki Fujiwara, Yoshikatsu Koga, Kimiko Hasegawa, Hiroya Fujii, Tetsuji Yamaguchi, Ryou Tsumura, Masahiro Yasunaga, Yasuhiro Matsumura. A new chemiluminescent enzyme immunoassay for plasma tissue factor detection. Biosensors Journal 3(1):111, 2014. 査読有、DOI: 10.4172/2090-4967.1000111.

古賀宣勝、便中タンパク、DNA、RNA で大腸癌はどこまで解るか、日本大腸検査学会雑誌、査読無、31(1)、2014、pp.28-36

##### [学会発表](計 16 件)

Yoshikatsu Koga, Nobuyoshi Yamazaki, Yasuo Kakugawa, Takahisa Matsuda, Masaaki Ito, Yutaka Saito, Hiroshi Saito, Yasuhiro Matsumura, Multitarget fecal miRNA test combined with fecal immunochemical test and fecal miRNA test for colorectal cancer screening. 2017 AACR Annual Meeting, Apr/5th/2017, Washington DC.

古賀宣勝、山崎信義、金光幸秀、斎藤典男、組織 miRNA を用いた stage II 大腸癌の再発予測、JDDW 2016、2016 年 11 月 4 日、神戸。

古賀宣勝、ユニークな消化器癌研究 - 便の分子診断から抗体デリバリーまで -、第75回 日本癌学会学術総会、2016年10月6日、横浜。

古賀宣勝、劣悪な検体でも解析可能なmiRNAの利用法、技術情報協会セミナー、2016年8月19日、東京。

Yoshikatsu Koga, Nobuyoshi Yamazaki, Hirokazu Taniguchi, Motohiro Kojima, Yukihide Kanemitsu, Norio Saito, Yasuhiro Matsumura, Highly expression of miR-181c in tumor tissue as a recurrence marker of Dukes B colorectal cancer. 2016 AACR Annual Meeting, Apr/20th/2016, New Orleans.

古賀宣勝、便中miRNAによる大腸がん診断法の開発研究、平成27年度文部科学省新学術領域研究公開シンポジウム、2016年2月8日、東京。

古賀宣勝、便やFFPE組織など劣悪な検体でのmiRNA発現解析、Applied Biosystems/Ion Torrent ユーザーグループミーティング2015、2015年12月11日、東京。

山崎信義、古賀宣勝、齋藤典男、松村保広、MiR-151-5p, -181cはDukes B大腸癌再発の予測因子である、第74回 日本癌学会学術総会、2015年10月10日、名古屋。

古賀宣勝、山崎信義、松村保広、大腸がん検診のための便潜血検査と便miRNA検査、第35回 日本分子腫瘍マーカー研究会、2015年10月7日、名古屋。

山崎信義、古賀宣勝、齋藤典男、松村保広、MiRNA発現解析によるStage II大腸癌再発予測因子の検討、第70回 日本消化器外科学会総会、2015年7月17日、浜松。

山崎信義、古賀宣勝、松本美野里、大竹陽介、角川康夫、便潜血検査補助診断としての便中miR-106aの有効性、JDDW 2014、2014年10月24日、神戸。

Yoshikatsu Koga, Nobuyoshi Yamazaki, Masahiro Yasunaga, Yasuhiro Matsumura, Development of novel cancer diagnostic methods using exfoliated cancer cells. 第73回 日本癌学会学術総会、2014年9月27日、横浜。

Atsurou Niizeki, Yuki Fujiwara, Sachiko Kitajima, Kimiko Hasegawa, Yoshikatsu Koga, Masahiro Yasunaga, Yasuhiro

Matsumura, The novel diagnosis of colorectal cancer targeting a colorectal cancer-specific antigen. 第73回 日本癌学会学術総会、2014年9月26日、横浜。

Nobuyoshi Yamazaki, Yoshikatsu Koga, Norio Saito, Yasuhiro Matsumura, MiR-23c, 148b, 151-5p, and -181c as predictive marker of the recurrence in Dukes B colorectal cancer. 第73回 日本癌学会学術総会、2014年9月26日、横浜。

Nobuyoshi Yamazaki, Yoshikatsu Koga, Norio Saito, Yasuhiro Matsumura, Tissue miRNA as a predictive marker for recurrence of Dukes B colorectal cancer, 2014 AACR Annual Meeting, Apr/7th/2014, San Diego.

Yuki Fujiwara, Yohei Hisada, Ryuta Sato, Ryo Tsumura, Yoshikatsu Koga, Masahiro Yasunaga, Yasuhiro Matsumura, Association between plasma tissue factor and tumor volume: A novel sensitive method for detecting plasma tissue factor. 2014 AACR Annual Meeting, Apr/7th/2014, San Diego.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

古賀 宣勝 (KOGA, Yoshikatsu)  
国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・室長  
研究者番号：70536086