

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03034

研究課題名(和文) マイクロビーズ技術を用いた肺がん検診ツールのイノベーションと臨床応用

研究課題名(英文) Innovation and clinical application of lung cancer screening modality using microbead-based technology

研究代表者

永坂 岳司 (NAGASAKA, TAKESHI)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30452569

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：本邦における肺がん検診は、胸部X線検査、喀痰細胞診が、また欧米では、低線量CTが行われているが、その検出精度はばらつきが多い。その理由として、それら検査には読影や細胞診という訓練された医師や技術者の介入が伴うためである。本研究は喀痰中の腫瘍由来Free核酸から腫瘍特異的变化であるメチル化DNAの検出を精確かつMechanicalに行う技術の開発を行い、現状の肺がん検診ツールのイノベーションを試み、喀痰から短時間に76CpGサイトのメチル化の有無を検出可能なシステムの構築を行い、2つの独立したコホートの解析を行い、その各々のROC曲線のAUCが0.93以上という極めて高い精度性と再現性を得た。

研究成果の概要(英文)：In Japan, chest X-ray and sputum cytology examination are recommended to lung cancer screening, and in western countries the low dose CT is recommended. However, the accuracy to screen lung cancer is varied widely for the reasons that skills of trained physicians and technicians for chest X-ray, low dose CT and sputum cytology examination are also varied. In this study, we developed a technique to accurately and mechanically detect the tumor-specific alteration, such as aberrant DNA methylation observed on tumor-derived free nucleic acid in sputum and tried to innovate the current lung cancer screening tool based on analyzing methylation status in 76 CpG. We analyzed two independent cohorts by our new developing assay and obtained extremely high precision and reproducibility with AUC of each ROC curve being 0.93 or more.

研究分野：複合領域

キーワード：医用システム 検査・診断システム 腫瘍診断学 腫瘍検査学 エピゲノム

## 1. 研究開始当初の背景

がん検診の有効性を評価するための指標は言うまでもなく死亡率減少効果である。大腸がん検診では、便潜血反応検査に死亡率減少効果を示す十分な証拠が認められる [Shaukat A et al, NEJM 2013]。もちろん、S 状結腸内視鏡検査や全大腸内視鏡検査、注腸 X 線検査も死亡率減少効果を示すが、検査に伴う不利益が無視できないため集団として実施するには勧められないとされている [有効性評価に基づく大腸がん検診ガイドライン]。

一方、肺がん検診であるが、非高危険群に対しては胸部 X 線検査、高危険群に対しては胸部 X 線検査と喀痰細胞診併用法が推奨されているが、これら検査が死亡率減少効果を十分示す証拠は認められていないのが現状である [有効性評価に基づく肺がん検診ガイドライン]。

米国では 55~74 歳の高危険群を対象としたランダム化比較試験 (NLST; National Lung Screening Trial) の結果、低線量 CT による肺がん検診により肺がん死亡を減少させることが示され 2013 年には The US Preventive Services Task Force (USPSTF) が、危険群に対する低線量 CT による肺がん検診を推奨した [Douglas E et al. JAMA Intern Med. 2014]。

本邦でも同様の対象者に同様の検診を提供することにより、受診者を肺がんから救命できる可能性が十分に期待されるが、偽陽性率が高いこと、過剰診断が生じること、精密検査の過程で死亡を含む重篤な合併症をきたすことなどの不利益に対し十分注意が必要である。

また、低線量 CT による肺がん検診では、通常線量と比較して病変の検出率の低下をきたさない画質を担保できる低線量での CT を撮影し、得られた画像を正しく判断するためには、一定以上の技能・実績・能力を備えた放射線技師、読影医、およびこれら検診システムを支える適切な施設が必要である。

したがって、本邦で CT による肺がん検診を行なった場合にも NLST と同様の結果を得ることができるかどうかは必ずしも明らかではないことを理解する必要がある。

胸部 X 線検査、喀痰細胞診、そして低線量 CT による肺がん検診すべてに共通する解決すべき問題点は、得られた画像の読影、細胞診をある一定以上のクオリティーを持って行うことのできる技能・実績・能力を備えた放射線技師、読影医、臨床検査技師、病理医およびこれら検診システムを支える適切な施設が必要となることである。また、例えば、それら設備を整えたとしても、判断を人が行う以上、結果にばらつきが生じることは否めない。

便潜血反応検査は、非侵襲的であり、出血の有無を機械的に感知する。このため、その判定にばらつきは少なく、早期癌や前癌病変

への感度が低くてもその低侵襲性・利便性・再現性から、大腸がん検診において、十分な死亡率減少効果を示してきた。便潜血反応検査の弱点を解決する方法として、癌細胞に特異的に認められる遺伝子変異を便から検出する方法の開発が行われており、コストや検出手技の煩雑さはあるが、便潜血反応検査よりも高感度に大腸がんや大腸腺腫を検出可能であることが米国の多施設共同大規模試験にて示されている [Imperiale TF et al. NEJM. 2014]。

研究代表者らは、高精度非侵襲的がんスクリーニング法のバイオマーカーとして、癌に特異的に認められる変化の一つである DNA (CpG のシトシン) のメチル化に注目し、このメチル化 DNA を便から簡易に検出する技術 (High-Sensitive Assay for Bisulfite DNA; Hi-SA) の開発を行ってきた。その結果、便から癌細胞由来のメチル化 DNA を検出することによって、大腸癌だけでなく胃癌も検出可能であることを世界で初めて示した [Nagasaka T et al, JNCI 2009]。研究代表者らは現在までに、多施設の各消化器癌手術予定患者及び消化管内視鏡施行された健康人の便検体/肺切除予定患者から得られた喀痰検体の解析を行い (基盤研究 B: 課題番号 23390323) 、

**A) 便検体および喀痰検体に対する保存液の開発** (現在、2 年以上保存した検体からも解析可能)

**B) 便潜血反応と同等量の微量の便検体および喀痰から癌細胞由来メチル化 DNA を精製することなく直接 Bisulfite 変性を行いメチル化 DNA の検出を可能とする技術の開発**

**C) 消化器癌だけでなく肺癌においても高頻度にメチル化される 4 遺伝子プロモーター 8 領域の同定**

を行い、その技術を便・喀痰検体の解析に応用し、良好な結果を得てきた。

## 2. 研究の目的

本研究では、多施設の肺切除予定患者および 55~74 歳の高危険群から得られた喀痰検体を用い、NGS (Next Generation Sequencer) や蛍光・磁気マイクロビーズを用いた検出技術 (xMAP/MAGPIX) を取り入れた Automatic 新期肺がん検診ツールのイノベーションを行い、その検診ツールとしての精确性の検証も併せて行う。

## 3. 研究の方法

**喀痰から DNA 精製を経ることなく Direct に Bisulfite 変性し、Multiplex PCR にて増幅を行う One Tube Method の確立 (Mechanization)**

図 1 に One Tube Method を示す。

**Methylation Score の連続数化による検出手法の開発 (Continuous Valuation)**

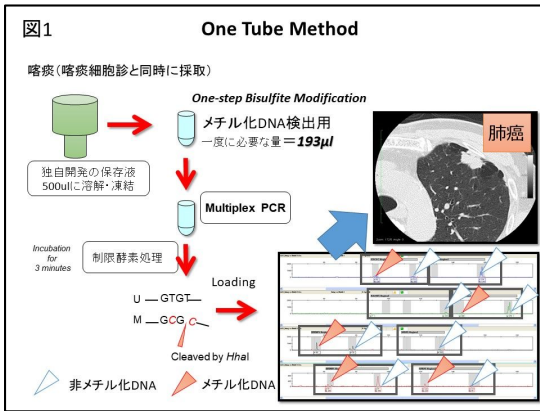
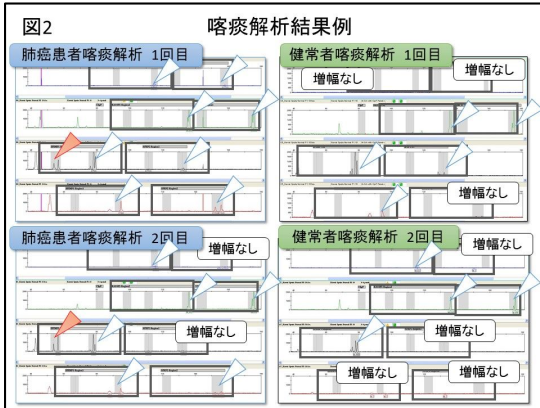
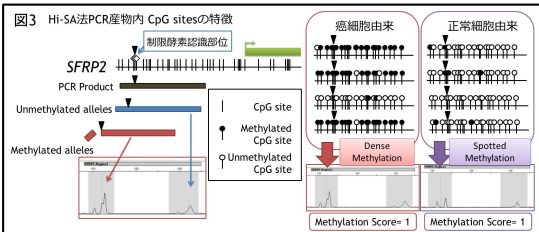


図2はHi-SA法による実際の解析例を示す。喀痰内に含まれる微量な Free 核酸を増幅するため、増幅にばらつきが認められるが、解析回数を増やすことにより、増幅やメチル化の有無の再現性は向上する。特に、興味深い傾向としては、メチル化が実際に強く認められ、何度解析してもメチル化が認められる場



合と、メチル化の出現が不安定な場合が認められることである。このばらつきに対しては、解析数を増していくと、MSのばらつきは安定する。このような現象は図3に示すようにDenseまたはSpotted Methylationの状態を表しているのではないかと我々は考察している。Spotted Methylationの状態なら、数回に1度、メチル化が検出されるのに対し、Dense Methylationの状態では常にメチル化が検出されることが推定される。このような場合、



NGSで用いられる Depths の概念を導入することにより、Dense Methylation と Spotted Methylation の差を検出することが可能なシステムの開発することができると考えられる。また、PCR産物内のCpGすべてのメチル化statusを検出することによっても、DenseとSpottedの差を検出することが可能である。本研究では、この2つの方向性を検出できるシステム(xMAP/MAGPIX-Hi-SA)の開発を行う。xMAP/MAGPIX-Hi-SAの開発を行った後に、

One Tube Methodを用い、喀痰検体の解析を2つの方法で引き続き行う(今まで通りのキャピラリーシーケンサーで判定する方法[Hi-SA]とxMAP/MAGPIX-Hi-SA法)

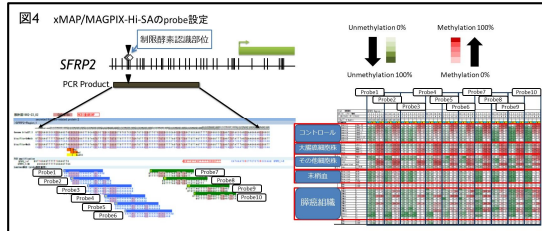
#### 4. 研究成果

##### One Tube Methodの確立 (Mechanization)

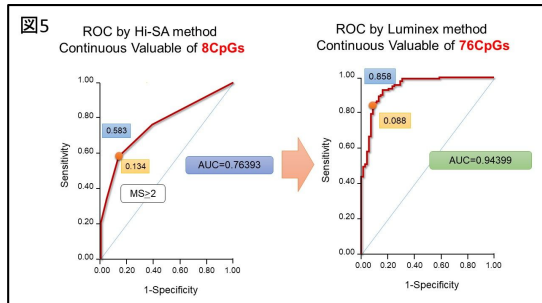
Methylation Scoreの連続変数化(Continuous Valuation)と臨床検体を用いた検出力の検討現行の8マーカーPCR産物内には、計76 CpG sitesが存在する。その76 CpG sitesのメチル化statusの検出をxMAP/MAGPIXで行えるように合計52プローブを用い検出可能となるように開発を行った。図4はSFRP2遺伝子プロモーター領域のCpG siteのメチル化検出プローブの設定を提示する。同様の設定を8つの増幅領域に含まれるCpGサイトすべてに行い、Multiplex PCRの設定を行った。

##### Methylation Scoreの連続数化による検出手法の開発 (Continuous Valuation)

##### a) Validation setを用いた解析



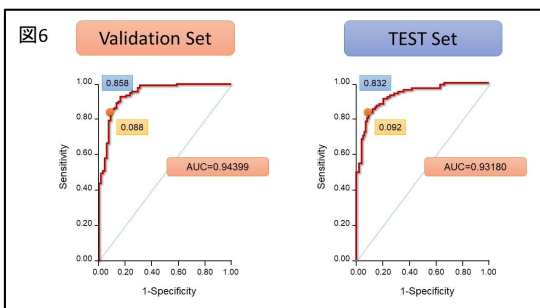
合計209例の喀痰(141例が肺がん患者、68例が肺がん非担癌者)をValidationグループとして解析を行った。このValidationグループから得られた喀痰を用い、One Tube Methodにて喀痰からBisulfite DNAを抽出した。このDNAを鋳型にPCRを施行。まず、我々が以前から行っていた制限酵素を用いメチル化を検出するHi-SA法にて喀痰中のメチル化DNAの解析を行った(Methylation Scoreは0-8となる。2回解析を行ったため、Methylation Scoreは $[0-8] \times 2 = [0-16]$ の値を得ることになる)。冷凍保存されているこれらValidationグループの喀痰を、One Tube Method Multiplex PCR xMAP/MAGPIX-Hi-SAにて解析した。xMAP/MAGPIXを用いた喀痰中メチル化DNAの詳細な検出による肺がん患者の検出精度を、ROC曲線にて検討を行った結果を示す(図5)。図4にて示したように、合計8個のCpGサイトのメチル化の有無の検出に比し、合計76個のCpGサイトのメチル化の



有無の検出(すなわちDense methylationの検討)を行うことにより,同一の喀痰を用いた場合,AUC=0.76393から0.94399と著しく肺がんに対するスクリーニングの精確性の改善が認められた。

#### b) TEST set を用いた解析

呼吸器内科にて気管支内視鏡予定患者の検査施行前の喀痰の採取を開始。岡山大学学内IRBにて承認を受け,呼吸器内科の協力の元,平成29年2月までに144例の気管支内視鏡患者の検査施行前の喀痰を採取。また,胸部CTにて異常所見を認めない肺がん非担癌者58例の喀痰も採取。合計202例をTESTグループと定義し,にて最適化されたxMAP/MAGPIX-Hi-SAをTESTグループに用い検討を行った。厳密な再現性および研究の独立性を担保するために,喀痰検体をそのまま,研究協力機関であるG&Gサイエンス社に輸送し,One Tube Method Multiplex PCR xMAP/MAGPIX-Hi-SAの工程をG&Gサイエンス社研究員にて行っていただき,その結果を解析したところ,驚くべき検出能力の再現性が認められた(図6)。



### 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15件)

1. Koi M, Garcia M, Choi C, Kim HR, Koike J, Hemmi H, Nagasaka T, Okugawa Y, Toiyama Y, Kitajima T, Imaoka H, Kusunoki M, Chen YH, Mukherjee B, Boland CR, Carethers JM: Microsatellite alterations with allelic loss at 9p24.2 signify less-aggressive colorectal cancer metastasis. *Gastroenterology* 2016;150:944-955.
2. Nagasaka T, Mishima H, Sawaki A, Shimokawa M, Inukai M, Shinozaki K, Tanioka H, Nasu J, Nishina T, Hazama S, Okajima M, Yamaguchi Y: Protocol of a randomised phase iii clinical trial of sequential capecitabine or 5-fluorouracil plus bevacizumab (cape/5-fu-bmab) to capecitabine or 5-fluorouracil plus oxaliplatin plus bevacizumab (capeox/mfolfox6-bmab) versus combination capeox/mfolfox6-bmab in advanced colorectal cancer: The c-cubed (c3) study. *BMJ open* 2016;6:e011454.
3. Okugawa Y, Toiyama Y, Toden S, Mitoma H, Nagasaka T, Tanaka K, Inoue Y, Kusunoki M, Boland CR, Goel A: Clinical significance of snora42 as an oncogene and a prognostic biomarker in colorectal cancer. *Gut* 2017;66:107-117.
4. Shigeyasu K, Nagasaka T, Mori Y, Yokomichi N, Kawai T, Fuji T, Kimura K, Umeda Y, Kagawa S, Goel A, Fujiwara T: Clinical significance of mlh1 methylation and cpg island methylator phenotype as prognostic markers in patients with gastric cancer. *PLoS one* 2015a;10:e0130409.
5. Shigeyasu K, Tazawa H, Hashimoto Y, Mori Y, Nishizaki M, Kishimoto H, Nagasaka T, Kuroda S, Urata Y, Goel A, Kagawa S, Fujiwara T: Fluorescence virus-guided capturing system of human colorectal circulating tumour cells for non-invasive companion diagnostics. *Gut* 2015b;64:627-635.
6. Takehara Y, Nagasaka T, Nyuya A, Haruma T, Haraga J, Mori Y, Nakamura K, Fujiwara T, Boland CR, Goel A: Accuracy of four mononucleotide-repeat markers for the identification of DNA mismatch-repair deficiency in solid tumors. *Journal of translational medicine* 2018;16:5.
7. Morikawa T, Inada R, Nagasaka T, Mori Y, Kishimoto H, Kawai T, Umeda Y, Mishima M, Goel A, Fujiwara T: Braf v600e mutation is a predictive indicator of upfront chemotherapy for stage iv colorectal cancer. *Oncology letters* 2018;15:2195-2201.
8. Toda K, Nagasaka T, Umeda Y, Tanaka T, Kawai T, Fuji T, Taniguchi F, Yasui K, Kubota N, Takehara Y, Tazawa H, Kagawa S, Sun DS, Nishida N, Goel A, Fujiwara T: Genetic and epigenetic alterations of netrin-1 receptors in gastric cancer with chromosomal instability. *Clinical epigenetics* 2015;7:73.
9. Haruma T, Nagasaka T, Nakamura K, Haraga J, Nyuya A, Goel A, Masuyama H, Hiramatsu Y: Clinical impact of endometrial cancer stratified by genetic mutational profiles, pole mutation, and microsatellite instability. *PLoS one* 2018.
10. Weng W, Liu N, Toiyama Y, Kusunoki M, Nagasaka T, Fujiwara T, Wei Q, Qin H, Lin H, Ma Y, Goel A: Novel evidence for a piwi-interacting rna (pirna) as an oncogenic mediator of disease

- progression, and a potential prognostic biomarker in colorectal cancer. *Molecular cancer* 2018;17:16.
11. Weng W, Wei Q, Toden S, Yoshida K, Nagasaka T, Fujiwara T, Cai S, Qin H, Ma Y, Goel A: Circular rna circs-7-a promising prognostic biomarker and a potential therapeutic target in colorectal cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2017;23:3918-3928.
  12. Yoshida K, Nagasaka T, Umeda Y, Tanaka T, Kimura K, Taniguchi F, Fuji T, Shigeyasu K, Mori Y, Yanai H, Yagi T, Goel A, Fujiwara T: Expansion of epigenetic alterations in efemp1 promoter predicts malignant formation in pancreatobiliary intraductal papillary mucinous neoplasms. *Journal of cancer research and clinical oncology* 2016;142:1557-1569.
  13. Yoshida K, Toden S, Weng W, Shigeyasu K, Miyoshi J, Turner J, Nagasaka T, Ma Y, Takayama T, Fujiwara T, Goel A: Snora21 - an oncogenic small nucleolar rna, with a prognostic biomarker potential in human colorectal cancer. *EBioMedicine* 2017a;22:68-77.
  14. Mori Y, Nyuya A, Yasui K, Toshima T, Kawai T, Taniguchi F, Kimura K, Inada R, Nishizaki M, Haraga J, Nakamura K, Umeda Y, Kishimoto H, Fujiwara T, Katata Y, Yamaguchi Y, Nagasaka T: Clinical outcomes of women with ovarian metastases of colorectal cancer treated with oophorectomy with respect to their somatic mutation profiles. *Oncotarget* 2018;9:11.
  15. Yoshioka T, Shien K, Namba K, Torigoe H, Sato H, Tomida S, Yamamoto H, Asano H, Soh J, Tsukuda K, Nagasaka T, Fujiwara T, Toyooka S: Antitumor activity of pan-her inhibitors in her2-positive gastric cancer. *Cancer science* 2018.
- [学会発表](計 16 件)
1. Kawai T, Nagasaka T, Takehara Y, Umeda Y, Fuji T, Taniguchi F, Kimura K, Toshima T, Yasui K, Mori Y, Kishimoto H, Toyooka S, Goel A, Fujiwara T: Non-invasive detection of methylated CpGs from sputum can predict patients with lung cancer: The European Cancer Congress 2015: 2015/9/26: Vienna, Austria
  2. Nagasaka T, Nyuya A, Toshima T, Kawai T, Yasui K, Kimura K, Mori Y, Kishimoto H, Fujiwara T: Novel assay for the detection of methylated CpGs from sputum to screen patients with lung cancer: ESMO Asia 2016: Singapore
  3. Mori Y, Nagasaka T, Tazawa H, Umeda Y, Shigeyasu K, Yoshida K, Goel A, Fujiwara T: MGMT Inactivation Arrest Tumor Growth and Serves As a Promising Predictive Biomarker for Treatment Response in Colorectal Cancer: Digestive Disease Week (DDW) 2016: San Diego
  4. Toshima T, Nagasaka T, Mori Y, Kawai T, Fuji T, Taniguchi F, Kimura K, Yasui K, Kishimoto H, Umeda Y, Tazawa H, Goel A, Fujiwara T: A novel circulating cell free DNA-based assay in colorectal cancer patients during treatment with systematic chemotherapy: AACR Annual Meeting 2016: New Orleans
  5. Kimura K, Nagasaka T, Mori Y, Kawai T, Fuji T, Taniguchi F, Yasui K, Toshima T, Umeda Y, Tazawa H, Goel A, Fujiwara T: PD-1 and PD-L1 expression patterns and DNA mismatch repair status for precision management of patients with gastric cancer: AACR Annual Meeting 2016: New Orleans
  6. Kawai T, Nagasaka T, Mori Y, Fuji T, Taniguchi F, Kimura K, Toshima T, Yasui K, Umeda Y, Tazawa H, Goel A, Fujiwara T: Micro RNAs as promising therapeutic targets for anti-metastatic therapy in colorectal cancer : AACR Annual Meeting 2016: New Orleans
  7. Shigeyasu K, Toden S, Nagasaka T, Fujiwara T, Boland CR, Goel A: Genome-wide enhancer analysis identifies PVT1 as an oncogenic enhancer of MYC: AACR Annual Meeting 2016: New Orleans
  8. Yasui K, Nagasaka T, Umeda Y, Fuji T, Taniguchi F, Toshima T, Kimura K, Kawai T, Mori Y, Tazawa H, Yagi T, Goel A, Fujiwara T: Comprehensive analysis of intrahepatic cholangiocarcinoma based on viral infections and mutational status in the IDH1/2 and KRAS genes: AACR Annual Meeting 2016: New Orleans
  9. Toshima T, Nagasaka T, Mori Y, Kawai T, Yasui K, Fuji T, Taniguchi F, Kimura K, Kishimoto H, Umeda Y, Goel A, Fujiwara T: A Novel Circulating Cell Free DNA-Based Assay Can Predict Tumor Response to S

- ystematic Chemotherapy: ESMO 2017 Congress: Madrid, Spain
10. Nagasaka T, Okada T, Yokomichi N, Taniguchi F, Toshima T, Yasui K, Fuji T, Mori Y, Kawai T, Umeda Y, Yagi T, Fujiwara T, Goel A: Heterogeneity of epigenetic and EMT marks observed in hepatocellular carcinoma with keratin 19 proficiency: ESMO 2017 Congress: Madrid, Spain
  11. Yasui K, Nagasaka T, Nyuya A, Toshima T, Kawai T, Shigeyasu K, Yano S, Mori Y, Haraga J, Nakamura K, Umeda Y, Goel A, Fujiwara T: Gene expression signatures in BRAF V600E mutant colorectal cancer in relation to WNT signaling cascade: ESMO 2017 Congress: Madrid, Spain
  12. Nyuya A, Haraga J, Nagasaka T, Nakamura K, Haruma T, Nishida T, Yasui K, Fujiwara T, Goel A, Masuyama H: POLE mutations and MSI were positive predictive factors for progression free survival in endometrial cancer patients at the risk of recurrence: ESMO 2017 Congress: Madrid, Spain
  13. J. Haraga, Takeshi Nagasaka, K. Nakamura, A. Nyuya, T. Haruma, T. Nishida, K. Yasui, T. Fujiwara, Ajay Goel, H. Masuyama: Significance of MSH2 promoter methylation in endometrial cancer with MSH2 deficiency: ESMO 2017 Congress: Madrid, Spain
  14. Yoshiko Mori, Takeshi Nagasaka, Hiroaki Tanioka, Akihiro Nyuya, Takashi Kawai, Toshiaki Toshima, Kazuya Yasui, Kunitoshi Shigeyasu, Hiroyuki Kishimoto, Yuzo Umeda, Toshiyoshi Fujiwara: Ovarian metastasectomy in colorectal cancer may improve the clinical outcomes of patients with metastatic colorectal cancer regardless of BRAF or KRAS mutational profiles: ESMO-GI 2017
  15. Kazuya Yasui, Takeshi Nagasaka, Toshiaki Toshima, Takashi Kawai, Kunitoshi Shigeyasu, Yoshiko Mori, Junko Haraga, Keiichiro Nakamura, Yuzo Umeda, Hiroshi Tazawa, Ajay Goel, Toshiyoshi Fujiwara: Gene expression profiles in BRAF V600E mutant colorectal cancer and association with SFRP2 methylation status: AACR2017
  16. Junko Haraga, Takeshi Nagasaka, Keiichiro Nakamura, Tomoko Haruma, Takeshi Nishida, Akihiro Nyuya, Kazuya Yasui, Hisashi Masuyama, Toshiyos

hi Fujiwara, Yuji Hiramatsu: Clinicopathological significance of endometrial cancer with MSH2 deficiency: AACR2017

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

永坂 岳司(NAGASAKA TAKESHI)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 30452569

(2)研究分担者

豊岡 伸一(TOYOOKA SHINICHI)

岡山大学・大学院医歯薬総合研究科・教授

研究者番号: 30397880

香川 俊輔(KAGAWA SYUNSUKE)

岡山大学病院・消化管外科・准教授

研究者番号: 00362971

榎田 祐三(UMEDA YUZO)

岡山大学病院・消化管外科・助教

研究者番号: 10573735

母里 淑子(MORI YOSHIKO)

岡山大学大学院・医歯薬総合研究科・助教

研究者番号: 70708081