

令和元年5月27日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10549

研究課題名(和文) 大腸癌臨床でのメチル化DNAマーカーを用いたLiquid Biopsyの開発

研究課題名(英文) Development of Liquid Biopsy System using cancer specific DNA methylation in colorectal cancer.

研究代表者

渡辺 昌彦 (Watanabe, Masahiko)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：80146604

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：便検体を用いて大腸癌の検出能について解析をおこなった。便検体には人由来DNAが少ないことが予想され、Nested outer PCR amplificationで人由来DNAを増幅後 inner Q-MSP/Q-ddCPRを行い特許申請を行った(NOPIQ/NOPID; 特願2018-146195)。FIT (fecal immunological test)と合わせると100%の検出を達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、独自に同定した癌特異的メチル化遺伝子 CD01の高感度検出法として NOPIDを開発した。本法は、新しい技術なので特許に申請した。便検体における癌診断が既存の80%を大きく上回り100%に達した。以上から、大腸癌の便検査で見逃し症例が可及的に減少する可能性が示唆された。検診に応用することで大腸癌のスクリーニング検査として普及するポテンシャルがあると考えられる。今後は、前向き検証試験を行い実用性について再検討していく予定である。

研究成果の概要(英文)：Cancer detection rate was explored for stool samples of colorectal cancer (CRC). The detection was performed with PCR detection system using cancer-specific methylation of CD01 gene for CRC patients. Our methods were divided with nested outer PCR prior to inner Q-MSP/ddMSP, thus designated as NOPIQ/NOPID. In combination with fecal immunological test (FIT), NOPID can reach 100% of sensitivity of CRC detection.

研究分野：癌研究

キーワード：stool colorectal cancer FIT diagnosis

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

大腸癌のスクリーニング検査として便潜血反応 (Fecal immunological test)が有用であることが知られ、この方法を用いると大腸癌患者の 80%を検出できることが知られている。一方、FIT に DNA 検査を組み合わせることにより感度が上昇することが欧米から報告され注目されている (Multitarget stool DNA testing, NEJM 2014)。この方法は、感度が有意に上昇するもののコストが高く (10 万円以上) 普及していない。コストが高い理由は複数個の DNA 検査を組み合わせることで検査費用がかさむことがあげられる。今後、コストを下げることでその普及を広げ大腸癌の screening の効率を上げることが強く望まれていた。現在、multitarget stool DNA test は FIT に加えて、K-ras 変異・DNA メチル化 (2 個) の検出を加えている。われわれは、メチル化遺伝子としてより癌特異性が高い遺伝子を用いることでより効率の良い大腸癌スクリーニングシステムを開発することを目指していた。

独自の方法で癌特異的メチル化遺伝子を同定し、大腸癌組織で短特異的にメチル化をきたす遺伝子を選別した。その結果、CDO1 遺伝子の癌メチル化が非癌部メチル化と大きな差を示し ( $p < 0.0001$ )、その ROC カーブが 0.96 を示すことを同定した (Brait M, et al. PLoS One 2012)。さらに大腸癌・小腸癌のメチル化プロファイルを詳細に検討し adenoma-carcinoma sequence に伴いメチル化が増大することを明らかにした (Kojima K et al, PLoS One 2018; Kojima K et al, PLoS One 2019)。CDO1 遺伝子のメチル化は非癌部では著しく低く癌特異的ということができた。よって、便検体から CDO1 遺伝子メチル化が検出された場合、その検出をもって大腸癌の診断ができないかという仮説を立てた。

### 2. 研究の目的

便検体を用いて CDO1 メチル化検出を行い、大腸癌診断に有用かどうかを検討する。

### 3. 研究の方法

(1) 大腸癌患者 48 例と非癌患者 8 例の便検体を収集し CDO1 遺伝子メチル化を用いた癌検出能について検討を行う。最初に 12 例の大腸癌由来の便検体を用いて Q-MSP を行う。それにより生体内での癌由来 DNA の状況を把握し戦略を立てる。

(2) 感度のよいメチル化検出法として第 3 世代 PCR 機械である droplet digital PCR (Rosch Inc)を大学で購入してもらった。

(3) 感度を上昇させる手段として nested PCR を用いることにした。

### 4. 研究成果

(1) 大腸癌患者由来の便 12 検体から DNA を抽出し、CDO1 メチル化と beta-actin の増幅を確認した。Beta-actin の量は通常の Ct 値より 5 程度異なったが、全例で確認できた。このことは、ヒト由来の DNA が全例で抽出されていたことを示す。しかし、Ct 値が高いことは人由来の DNA が通常の検体の 30 分の 1 程度しか含まれていないことを示すものであった。便は食物および大腸菌などの菌由来の DNA を大量に含むと想定されるため人由来の DNA (剥離した粘膜細胞など)の量は著しく低いと考えられた。CDO1 メチル化測定に当たっては、positive control である DLA の 100 倍希釈までは明白に検出できたが、1000 倍希釈になるとその定性は不安定になった。このことは、低い量の PCR 解析は不安定になることを示唆している。10 例の大腸癌患者由来の便検体から通常の Q-MSP を用いて癌を検出することはできなかった。

(2) Q-MSP の感度を上げるため target sequence の外側で Nested outer PCR を加えて解析することとした。Inner PCR としては、Q-MSP と droplet digital MSP (dd-MSP)を行い、それぞれを NOPIQ, NOPID と呼んだ。結果を図に示す。癌特異的メチル化遺伝子としてわれわれ独自の CDO1 遺伝子に加えて、これまでによく知られておりすでに血液中のメチル化マーカーとしての実用性がいわれている SEPT9 の結果も同時に比較した。



Ni shizawa N, Katoh H, Kosaka Y, Sato T, Watanabe M, Yamashita K. Clinical significance of cancer specific methylation of the CD01 gene in small bowel cancer. PLoS One. 2019 Jan 24; 14(1):e0211108. doi: 10.1371/journal.pone.0211108. eCollection 2019. PubMed PMID: 30677088; PubMed Central PMCID: PMC6345476.

Kojima K, Nakamura T, Ohbu M, Katoh H, Ooizumi Y, Igarashi K, Ishii S, Tanaka T, Yokoi K, Ni shizawa N, Yokota K, Kosaka Y, Sato T, Watanabe M, Yamashita K. Cysteine dioxygenase type 1 (CD01) gene promoter methylation during the adenoma -carcinoma sequence in colorectal cancer. PLoS One. 2018 May 10; 13(5):e0194785. doi: 10.1371/journal.pone.0194785. eCollection 2018. PubMed PMID: 29746493; PubMed Central PMCID: PMC5944981.

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：癌の検出方法及びキット

発明者：渡邊昌彦

権利者：渡邊昌彦

種類：特許

番号：特願 2018-146195

出願年：2018

国内外の別： 国内

取得状況(計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。