

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03563

研究課題名(和文) 便潜血検査と便DNA検査併用による大腸腫瘍スクリーニング精度の検証

研究課題名(英文) Stool DNA testing in combination with fecal immunochemical test for hemoglobin for detection of colorectal neoplasia

研究代表者

末廣 寛 (Suehiro, Yutaka)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：40290978

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：メチル化TWIST1遺伝子(mTWIST1)が大腸腫瘍のバイオマーカーであることを我々は世界で初めて報告している。この知見から、便中のmTWIST1を検出できれば大腸癌診断ができると考え便DNA検査を試みたものの、便中のヒトDNAは極めて微量のために従来技術(bisulfite処理ベース解析技術)ではmTWIST1の検出がほとんどできなかった。そこで、新規メチル化解析技術のCORD assay (combined restriction enzymes and digital PCR)を開発し、本研究により早期癌スクリーニング法としての有用性を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回開発した高感度メチル化解析法CORD assayは、酵素を加えるのみでよく、その後のDNA精製が不要で、酵素反応液をそのままPCR反応液に添加できるため、非常に単純な作業工程である。この技術を用いれば、便、血清、血漿など、種々の検体から、様々な癌のスクリーニング検査に応用できると思われる。CORD assayは臨床検査のツールとして大きな潜在力を秘めている。

研究成果の概要(英文)：As hypermethylation of TWIST1 is specific to colorectal neoplasia, detection of the methylated TWIST1 from feces might be useful for colorectal neoplasia screening. However, because the content of human DNA in feces is very small, it is very difficult to detect methylated TWIST1 by conventional bisulfite-based methylation assays. Therefore, we developed a new methylation assay without bisulfite treatment, the combined restriction digital PCR assay (CORD assay). Combination of the fecal CORD assay of methylated TWIST1 with fecal immunochemical test (FIT) for hemoglobin improved a sensitivity for colorectal tumors, especially for flat-type advanced adenoma that are difficult to detect by FIT alone.

研究分野：臨床検査学

キーワード：早期がん診断

1. 研究開始当初の背景

我々の研究グループはメチル化 TWIST1 が大腸腫瘍のバイオマーカーであることを世界で初めて報告している。この知見から、便中のメチル化 TWIST1 の有無を調べれば大腸腫瘍のスクリーニングに応用できると考え、便 DNA 検査を試みたが、従来のメチル化解析方法、すなわち、DNA を Bisulfite 処理して PCR でメチル化解析を行う方法では、メチル化 TWIST1 を検出することがほとんどできなかった。Bisulfite ベースの DNA メチル化解析の問題点を説明する DNA を Bisulfite 処理をすると激しい化学反応のため最大 9 割の DNA が変性喪失してしまう。また、Bisulfite 処理後の DNA は 1 本鎖になるため、分解しやすく保存性が悪いという問題もある。さらには、定量 PCR での検出限界は約 10 コピー程度であることから、インプット DNA (Bisulfite 処理前の DNA 検体) 中にターゲットのメチル化遺伝子が 100 コピー存在する必要がある。なお、便は 99% 以上が細菌成分であり、ヒトの成分が極めて少ないため、便 DNA から遺伝子検査を行うために多量の便検体から DNA を抽出する必要がある。例えば、大腸癌スクリーニングをするための便 DNA 検査 Cologuard® (米国 FDA 承認の診断薬) では、便全量 (~200-300g) が必要とされる。本邦でこのような多量の便検体を検査材料とするのは現実的ではない。そうすると、微量な便検体からでもメチル化解析が可能となるよう、測定系の高感度化が必要になる。なお、メチル化解析法には bisulfite ベースの解析法以外に、「メチル化感受性制限酵素 - PCR」という方法がある。これはメチル化された CG 部位はメチル化感受性制限酵素では切れず、メチル化のない CG 部位は切れるという性質を利用し、当該切断点をはさんだ PCR でメチル化レベルを確認する方法である。この方法は定量性が極端に悪いという問題があった[1]。

2. 研究の目的

微量な便検体からでもメチル化解析を可能とする「メチル化感受性制限酵素 - PCR」法を確立し、本技術による便中のメチル化 TWIST1 検査が大腸腫瘍診断に有用かを検証するために本研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 新規メチル化解析法の開発 (図 1)

ステップ 1 ではメチル化感受性制限酵素の HhaI と HpaII、および、エクソヌクレアーゼ ExoI を添加し 16 時間インキュベーションした。検体から抽出した DNA には非メチル化 DNA とメチル化 DNA が混在している。メチル化感受性制限酵素認識部位の CG にメチル化がない場合に DNA は切断される。一方で、この部位の CG にメチル化がある場合は切断されずにそのまま残る。ステップ 2 では追加のメチル化感受性制限酵素として BstUI を添加し 16 時間インキュベーションする。先ほどと同様、メチル化感受性制限酵素認識部位中の CG にメチル化がない場合に DNA は切断され、制限酵素認識部位の CG にメチル化がある場合は切断されずにそのまま残る。ステップ 3 では、デジタル PCR により、制限酵素での切断を免れたターゲット遺伝子のコピー数を測定した。なお、本技術を CORD assay (combined restriction enzymes and digital PCR) と名付けた[2]。

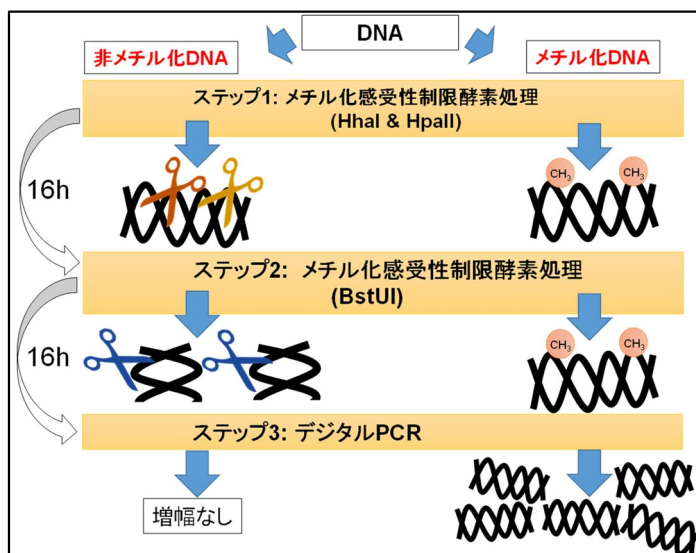


図 1 新規メチル化解析法 CORD assay (combined restriction enzymes and digital PCR)の原理

(2) 便 DNA 検査による大腸腫瘍スクリーニングへの応用

480 人からインフォームドコンセントを取得し、便潜血検査、便 DNA 検査 (CORD assay によるメチル化 TWIST1 検査) を実施した。その後、下部消化管内視鏡検査や外科手術などにより最終診断が下され、443 人が研究対象となった。内訳はコントロール 71 人、非進行腺腫 40 人、進行腺腫 127 人、大腸癌 205 人である。ここでいう進行腺腫とは、径 1cm 以上の腺腫、病理組織学的に絨毛成分を有するもの、

本邦の粘膜内癌(ステージ0大腸癌)にほぼ相当する高度異形成を指す。

4. 研究成果

(1) 新規メチル化解析法

従来技術(bisulfite 処理 - 定量 PCR)ではインプット DNA(Bisulfite 処理前の DNA 検体)中にターゲットのメチル化遺伝子が 100 コピー以上ないとメチル化遺伝子の検出ができないが、CORD assay ではインプット DNA(制限酵素処理前の DNA 検体)中にターゲットのメチル化遺伝子が 1 コピーでもあれば検出可能である。この方法によりバイサルファイトベースのメチル化解析法の約 100 倍の高感度化を達成した。

(2) 便 DNA 検査による大腸腫瘍スクリーニングへの応用

CORD assay により便検体中のメチル化 TWIST1 遺伝子を検出できるかを予備的に検討した。図 2 に示す通り、従来の bisulfite ベースのメチル化解析ではデータ取得ができなかった便検体でも、この CORD assay によりデータを得ることができた[2]。

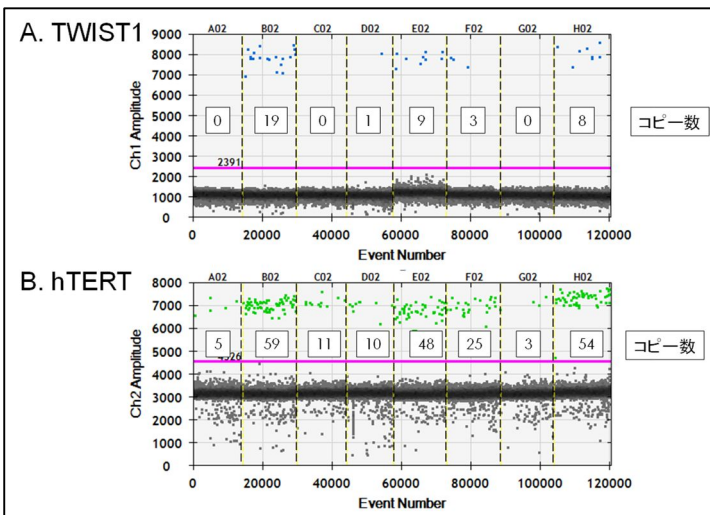


図 2 便検体での CORD assay 結果
ターゲットのメチル化 TWSIT1 については、全くコピー数が観察されないものから、19 コピーまで観察されるものまでであった(A)。
内部コントロールの hTERT については 3 コピーから 59 コピーが観察され、全例 PCR 増幅が認められたことから、便検体が適切に採取されていることが確認できた(B)。

被験者 443 人の解析結果については、図 3 で示すように、メチル化 TWIST1 コピー数やメチル化 TWIST1 / hTERT コピー数比が腫瘍の悪性度と共に増加することが分かった。便潜血検査と便 DNA 検査の組み合わせ結果を図 4 に示す。進行腺腫群について、便潜血検査単独での検査感度は 32%、便 DNA 検査単独での検査感度は 47%に過ぎなかったが、両者の組み合わせにより検査感度は 69%まで上昇した[3]。さらに進行腺腫の発育形態別にみると(図 5)、隆起型については便潜血検査単独では検査感度 28%しかなかったが、組み合わせ検査により検査感度 65%にまで向上した。平坦型については、便潜血検査単独での検査感度はわずか 16%だったが、組み合わせ検査により 71%まで向上した[3]。

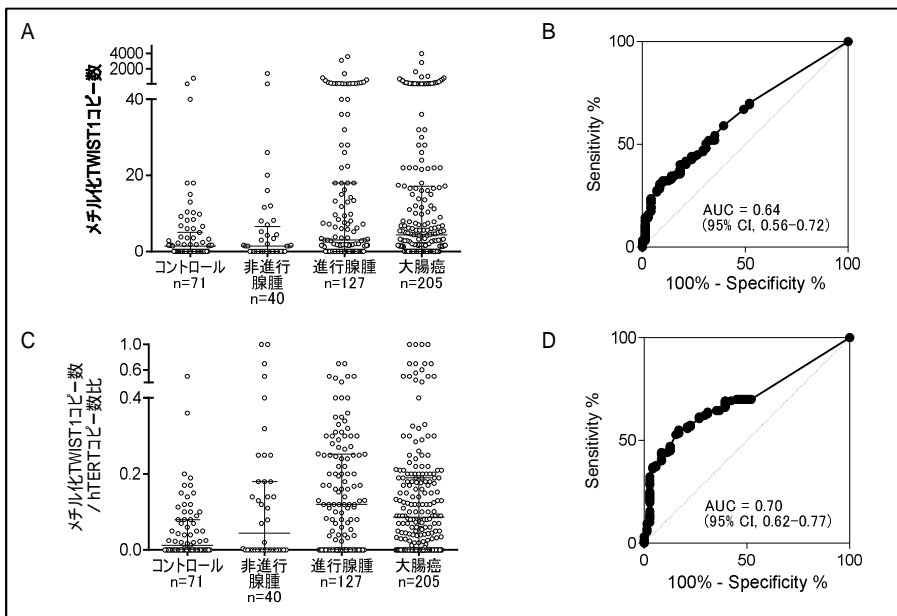


図 3 TWIST1 メチル化レベル分布比較
メチル化 TWIST1 コピー数の絶対値の分布(A)、コントロール群と進行腺腫(群)における receiver operating characteristic (ROC)カーブを示す(B)。また、メチル化 TWIST1/hTERT コピー数比の分布(C)、および、コントロール群と進行腺腫群における ROC カーブを示す(D)。メチル化 TWIST1 コピー数については 20、メチル化 TWIST1/hTERT の比については 0.19 をカットオフとして設定した。

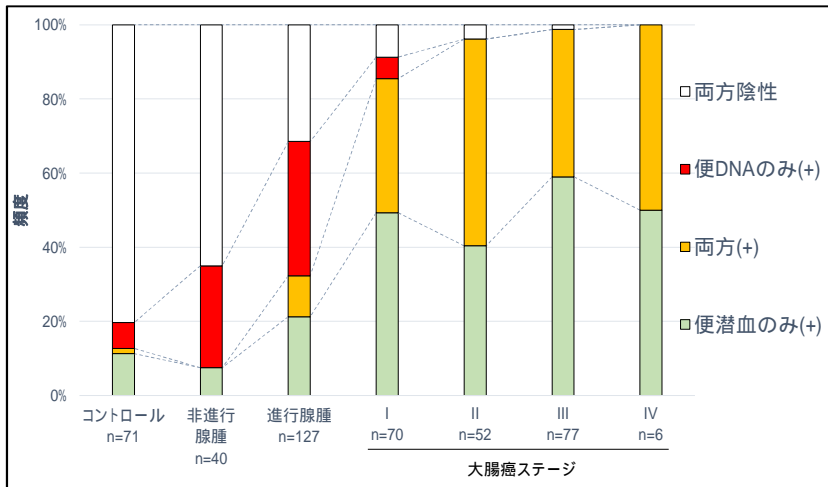


図4 便潜血検査と便DNA検査の組み合わせ結果

メチル化 TWIST1 コピー数およびメチル化 TWIST1/hTERT 比について、どちらか一方、あるいは、どちらもカットオフ以上の場合を便DNA検査陽性と判定した。進行腺腫については、便潜血検査単独での検査感度は32%、便DNA検査単独での検査感度は47%であった。両者の組み合わせにより検査感度は69%まで上昇した。

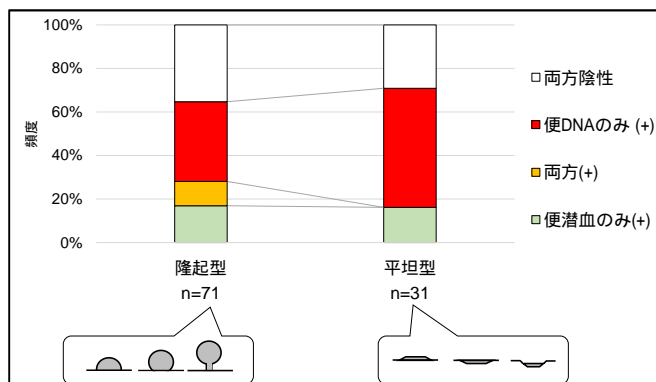


図5 進行腺腫における発育形態別の便潜血検査と便DNA検査の組み合わせ結果

隆起型については、便潜血検査単独では検査感度28%であったが、組み合わせ検査により65%にまで向上した。平坦型については、便潜血検査単独での検査感度はわずか16%であったが、組み合わせ検査により71%まで向上した。

<引用文献>

1. 蔡立義, 阿部雅修, 和泉俊一郎, 牛島俊和, DNAメチル化の解析法. 日本比較内分泌学会ニューズ. 119: 17-22, 2005.
2. Suehiro Y, Zhang Y, Hashimoto S, Takami T, Higaki S, Shindo Y, et al., Highly sensitive faecal DNA testing of TWIST1 methylation in combination with faecal immunochemical test for haemoglobin is a promising marker for detection of colorectal neoplasia. Ann Clin Biochem. 55: 59-68, 2018.
3. Suehiro Y, Hashimoto S, Goto A, Yamaoka Y, Yamamoto N, Suzuki N, et al., Fecal DNA Testing of TWIST1 Methylation Identifies Patients With Advanced Colorectal Adenoma Missed by Fecal Immunochemical Test for Hemoglobin. Clin Transl Gastroenterol. 11: e00176, 2020.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Suehiro Yutaka, et al.	4. 巻 11
2. 論文標題 Fecal DNA Testing of TWIST1 Methylation Identifies Patients With Advanced Colorectal Adenoma Missed by Fecal Immunochemical Test for Hemoglobin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical and Translational Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 e00176 ~ e00176
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14309/ctg.0000000000000176	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 末廣 寛、橋本 真一、山崎 隆弘
2. 発表標題 便潜血検査と便DNA検査の併用による non-polypoid type大腸進行腺腫検出率向上の可能性
3. 学会等名 第106回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 末廣 寛
2. 発表標題 便DNA検査の併用により、便潜血検査のみでは見逃されてしまう大腸進行腺腫を検出できる
3. 学会等名 第60回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yutaka Suehiro, Takahiro Yamasaki
2. 発表標題 Faecal DNA test in combination with faecal immunochemical test for haemoglobin is useful for detection of colorectal advanced adenoma
3. 学会等名 UEG 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	山崎 隆弘 (Yamasaki Takahiro) (00304478)	山口大学・大学院医学系研究科・教授 (15501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------