

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16422

研究課題名（和文）胃癌腹水洗浄液におけるDNAメチル化バイオマーカーを用いた新規診断法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel diagnostic method using DNA methylation biomarker in peritoneal lavage fluid of gastric cancer

研究代表者

原田 宏輝（Harada, Hiroki）

北里大学・医学部・助教

研究者番号：10623192

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、400例の胃癌患者における腹水洗浄細胞液中の微量癌細胞を当教室で独自に開発した癌特異的DNA marker (CD01) を用いたメチル化特異的droplet digital PCR (dd-MSP) 法にて検出し、その感度・特異度を算出することを目的とした。さらには、検出された微量癌細胞と予後との関係を明らかにした。dd-MSP法での胃癌腹水洗浄液中の微量癌細胞の検出率は感度83.9%、特異度90.9%、AUC=0.93という結果であった。予後についての検討では、dd-MSP法によって検出された微量癌細胞陽性が予後因子となることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

体液からの微量癌細胞の検出についての研究は国内外問わず、多くの研究報告がなされており、癌診療におけるトピックのひとつと言える。本研究で得られた、dd-MSP法での胃癌腹水洗浄液中の微量癌細胞の高い検出率や予後との密接な関係には非常に高い波及効果があると考えられる。DNA異常は安定した変化であるため、RNAやタンパクと比較して検体の取り扱いに際して厳格な注意を必要としない。したがって、臨床診断には特に適したバイオマーカーであるといえる。よって、小規模な病院においても実施可能な検査であり、全国への均霑化という点では非常に有用な研究結果であり、学術的にも社会的にも意義のある成果であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：In this study, methylation-specific droplet digital PCR (dd-MSP) using a cancer-specific DNA marker (CD01) originally developed by our laboratory was carried out on a microscopic cancer cell in peritoneal lavage fluid from 400 gastric cancers. The purpose of this study was to calculate the sensitivity and specificity of the dd-MSP method. Additionally, we clarified the relationship between the detected microscopic cancer cells and prognosis. Results from the dd-MSP method exhibited a sensitivity of 83.9%, a specificity of 90.9%, and an AUC of 0.93 for the detection of microscopic cancer cells within peritoneal lavage fluid of gastric cancer. In terms of prognostic evaluation, it was revealed that a detection of a microscopic cancer cells by means of the dd-MSP method serves as a prognostic factor.

研究分野：外科学

キーワード：胃癌 腹水洗浄細胞診 CD01遺伝子 Droplet Digital PCR DNAメチル化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

進行胃癌の中で、腹水洗浄細胞診陽性 (CY1) 胃癌は予後不良である (Hosoda K. Ann Gastroenterol Surg 2019; Yamashita K. Eur J Surg Oncol 2015)。しかし、根治的手術の際の病理学的腹水洗浄細胞診陰性 (CY0) を確認したにもかかわらず、ある一定数は腹膜再発を経験する。これは、病理学的 CY0 は胃癌診療において顕微鏡的腫瘍のない状態を保証するのに十分ではないことを示唆している。実際、病理学的 CY0 が確認されているにもかかわらず、上皮由来細胞の特異的マーカーである *CEA* mRNA を使用した高感度 PCR によって検出され、予後不良である (Kodera Y. Ann Surg 2002)。しかし、RNA は脆弱であり、RNA を使用した臨床検査は日常的な臨床検査として不安定な可能性があり、検査普及の障壁となる。一方で、DNA は非常に安定した特徴を有しているため、がん検出のための DNA マーカーが強く望まれている。我々は、胃癌検出を表す理想的な DNA マーカーとして Cysteine dioxygenase type 1 (*CDO1*) 遺伝子、Homeobox only protein homeobox (*HOPX*) 遺伝子に到達した (Harada H. PLoS One 2019; Ooki A. Oncogene 2010)。さらに、胃癌の微小腹膜転移を検出する *CDO1* DNA メチル化の臨床的可能性を早期に示した先行研究では、従来 of CY と比べて DNA CY は 2 倍の腹膜播種再発を予測することが可能であると報告した (Ushiku H. Gastric Cancer 2017)。他にも、腓液 (Harada H. Cancer Sci 2019) などの微小癌細胞の検出法として非常に有望であることが示された。その後、十分な数 (400 検体) の胃癌患者における腹腔内洗浄液を用いて、前向き症例集積研究を行った。DNA CY1 と従来 of CY1 との一致率において診断的感度 74.2%、診断的特異度は 96.5% との結果を得た (Harada H. Cancer Sci 2021)。この結果は、既報にある *CEA* mRNA を用いた腹水洗浄細胞診の結果 (Kodera Y. Ann Surg 2002) などと比較し、同等の結果であった。しかし、これを実臨床に導入し全国へ均霑化するうえで、感度をさらに上げる必要があると考えられた。そこで我々は、Droplet Digital メチル化特異的 PCR (ddMSP) 法を用い、*CDO1* と *HOPX* のメチル化を絶対的に定量化することで、これが成し得ると考えた。腹水洗浄細胞診における DNA 診断法としての有効性が示されれば、現在の胃癌診療をさらに改善する可能性が高いと考えている。

2. 研究の目的

根治的手術の際の病理学的腹水洗浄細胞診陰性 (CY0) を確認したにもかかわらず、III 型および IV 型の肉眼的特徴を有する腫瘍では腹膜再発を経験する。これは、病理学的 CY0 は胃癌診療において顕微鏡的腫瘍のない状態を保証するのに十分ではないことを示唆している。癌診療における 微小癌細胞の検出は近年注目されており、体液中に混ざる癌細胞由来分子産物を最先端医療技術を用いて高感度に検出することにより、より正確な診断が行える

ことにその最大の利点がある。われわれは独自に同定した DNA マーカー (*CDO1*, *HOPX*) を用いたメチル化特異的 PCR 法による腹水洗浄細胞診 (DNA CY) の確立を目指した臨床システムの構築を行ってきた。今回、更なる診断精度向上のため、より進化した診断法として、ddMSP 法による DNA CY 診断法を提案する。本研究における有効性が示されれば、現在の胃癌腹膜播種診療をさらに改善する可能性が高いと考えている。

3. 研究の方法

3-1. DNA 抽出

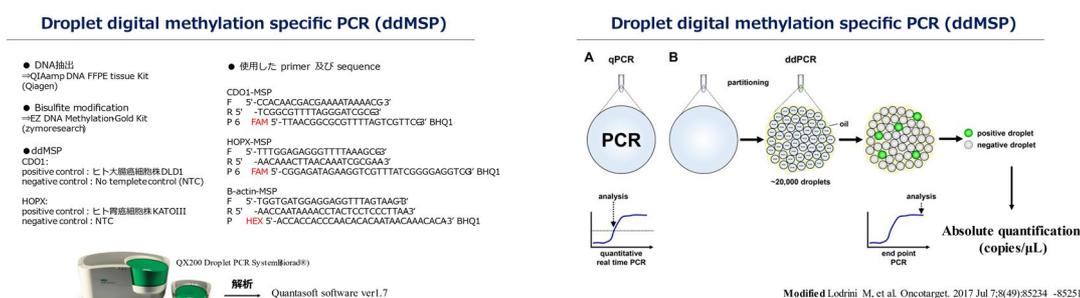
腹水洗浄細胞診液はすでに得られており、本研究室の-80℃の冷凍庫に保管されている。50ml 遠沈管の検体は 3500rpm で 30 分間遠心分離し、細胞成分を 1ml マイクロチューブに移してさらに 14000rpm で 15 分間遠心を加え上澄みを破棄した後に DNA mini kit (QIAGEN Sciences, Hilden, Germany) を用いて DNA を抽出した。

3-2. Bisulfite 処理

Bisulfite 処理は EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research, Orange, CA) を使用して行った。処理後 DNA は-80℃で使用するまで保管。

3-3. Droplet Digital PCR

Bisulfite 処理された 1 μ L の genome DNA は Droplet Digital PCR Supermix Probes (Bio-Rad) を用いた QX200TM Droplet Digital TM PCR system (Bio-Rad) にて ddMSP を施行する。目的遺伝子である *CDO1* や *HOPX*、内在性コントロール遺伝子である *Beta-actin* の primer や probe は以下のものを使用した。



3-4. 通常 CY 検査との結果の比較

すでに検討を行った腹水洗浄液 400 検体中 (2016/9/9-2019/1/18 までに収集) の TaqMan probe を用いたメチル化特異的 PCR 法 (DNA CY) での結果は、DNA CY1 と従来の CY1 との一致率において診断的感度は 74.2%、肉眼的腹膜播種がないとされる pStage IA 症例における DNA CY0 の割合 (診断的特異度) は 96.5% との結果を得ている。ddMSP 法を行う

ことで、さらに診断精度が上昇するかを検討する目的で DNA CY と同様に従来の CY との比較を行い診断的感度・特異性を算出した。

3-5. ddMSP 法における陽性検体と陰性検体における予後の検討

全生存率において陽性検体 vs 陰性検体について追跡調査を行って明らかにした。腹膜再発は術後 2 年以内に発症することが多く、初回登録例が 2016/9/9 であることから本研究期間中に十分検討が可能であると考ええる。

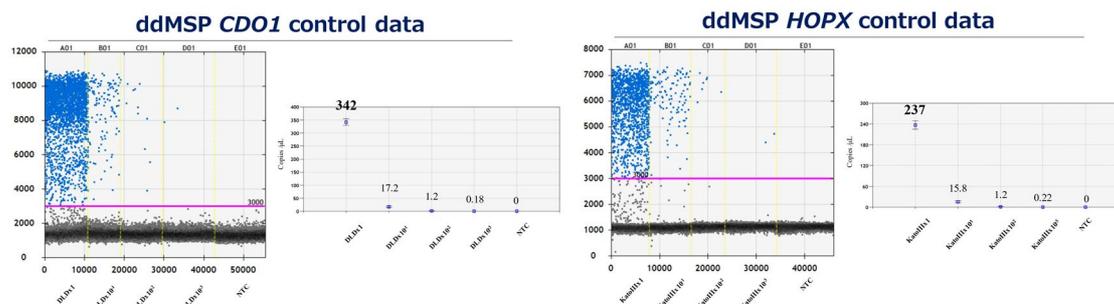
4. 研究成果

4-1. ddMSP *CDO1* control data

下図の左側が droplets の状態を示しており、positive droplets が青丸で表されている。左から順に 10 倍希釈されており、希釈系列となっている。蛍光強度が 3000 以上を Positive と定義し、NTC では全く positive droplet がないことを確認した。右側は左の droplets に対応した絶対定量を示しており、本研究はこの定量値を用いて検討した。

4-2. ddMSP *HOPX* control data

上記 (4-1) の ddMSP *CDO1* control data と同様、下図の左側が droplets の状態を示しており、positive droplets が青丸で表されている。蛍光強度が 3000 以上を Positive と定義し、NTC では全く positive droplet がないことを確認した。



4-3. ddMSP *CDO1* と ddMSP *HOPX* と Stage の関係

両遺伝子共に、CY1 は明らかに positive droplets が多いことが判明した。CY0 ではほぼ positive droplets がなく、Stage IV の中には CY0 でも一定数の positive droplets がある症例が存在した。

4-4. ddMSP *CDO1* と ddMSP *HOPX* における CY 陽性率

ddMSP で定量化された両遺伝子の値は有意に CY1 で高値であった。ROC 曲線では ddMSP *CDO1* は Cut off 値 0.55, AUC 0.93, 感度 83.9%, 特異度 90.9% となった。ddMSP *HOPX*

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Harada Hiroki, Soeno Takafumi, Nishizawa Nobuyuki, Washio Marie, Sakuraya Mikiko, Ushiku Hideki, Niihara Masahiro, Hosoda Kei, Kumamoto Yusuke, Naitoh Takeshi, Sangai Takafumi, Hiki Naoki, Yamashita Keishi	4. 巻 112
2. 論文標題 Prospective study to validate the clinical utility of DNA diagnosis of peritoneal fluid cytology test in gastric cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1644 ~ 1654
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14850	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 該当する

1. 著者名 Harada Hiroki, Nie Yusuke, Araki Ippeita, Soeno Takafumi, Chuman Motohiro, Washio Marie, Sakuraya Mikiko, Ushiku Hideki, Niihara Masahiro, Hosoda Kei, Kumamoto Yusuke, Naitoh Takeshi, Sangai Takafumi, Hiki Naoki, Yamashita Keishi	4. 巻 16
2. 論文標題 Haploinsufficiency by minute MutL homolog 1 promoter DNA methylation may represent unique phenotypes of microsatellite instability-gastric carcinogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0260303
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0260303	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Keishi Yamashita, Takafumi Soeno, Hiroki Harada, Hideki Ushiku, Marie Washio, Mikiko Sakuraya, Masao Niihara, Kei Hosoda, Takeshi Naitoh, Naoki Hiki
2. 発表標題 Treatment strategies for peritoneal dissemination of gastric cancer and DNA detection
3. 学会等名 第76回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原田宏輝
2. 発表標題 CD01遺伝子DNAメチル化を用いた新規胃癌DNA腹水洗浄細胞診の確立
3. 学会等名 第82回日本臨床外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原田宏輝
2. 発表標題 新規胃癌DNA腹水洗浄細胞診の確立 CD01遺伝子メチル化を用いて
3. 学会等名 第92回日本胃癌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 添野孝文
2. 発表標題 Novel molecular diagnosis for peritoneal dissemination of gastric cancer by droplet digital PCR
3. 学会等名 第93回日本胃癌学会総会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------