

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23650615

研究課題名（和文） 便中マイクロRNA検出による膵癌スクリーニング技術の開発

研究課題名（英文） Development of non-invasive pancreatic cancer screening by detection of fecal miRNA

研究代表者

永坂 岳司（NAGASAKA TAKESHI）

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：30452569

研究成果の概要（和文）：

我々は便中から組織特異的に発現している miRNA を検出することによって、便中メチル化 CpG 検出法で検査陽性となった被験者に対し、その腫瘍局在の推測を可能とすることによる、新規膵癌スクリーニング技術の開発を行った。

研究成果の概要（英文）：

We developed a new non-invasive screening strategy for pancreatic cancers by detection of fecal miRNA which might be expressed in organ-specific spectrum combined with our robust fecal DNA methylation analysis strategy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：腫瘍学

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：膵癌、スクリーニング、miRNA、DNA メチル化、検診

1. 研究開始当初の背景

厚生労働省による人口動態調査によると、日本における 2004 年の膵癌による死亡数は 22,260 人、2008 年には 25,976 人と増加傾向にある。膵癌は他の消化器癌とは異なり、発見されたときは外科的切除不可能な進行末期状態のことが多い。近年では、PET-CT 等により膵癌を診断することはある程度可能であるが、それら CT や MRI を検診手段として用いることは、その検出感度やコストの面から考えても現実的ではない。このような背景から、膵液を用いて膵癌に認められる遺伝子変異を検出する

ことによる膵癌の早期診断方法へ向けての開発等が行われているが未だ臨床応用に至っていない。

「膵癌を非侵襲的かつ高感度にスクリーニングすることができないか？」

我々はこの可能性を追い求め、癌に特異的に認められるメチル化 DNA を便から簡易に検出する技術を開発し、大腸癌だけでなく、胃癌も同時に検出可能であることを示し、大腸よりも口側に発生した腫瘍の DNA ならば便から検出できることを世界で初

めて示した。

2. 研究の目的

現在までに、便保存液の開発・精製方法の改良を行い、メチル化DNA検出に必要な便検体量は便潜血反応と同等量にて行えるように開発済みである。加えて、本技術のさらなる高精度化に取り組み、検出手技を複雑にすることなくマーカー数を倍増させることに成功している。本研究は、miRNAを新規バイオマーカーに用い、まったく新しい原理による便からのmiRNA検出技術の確立を行い、便中ヒトメチル化DNA/miRNAの双方を検出し組み合わせることによる非侵襲的痔瘻スクリーニング技術の開発を図る。

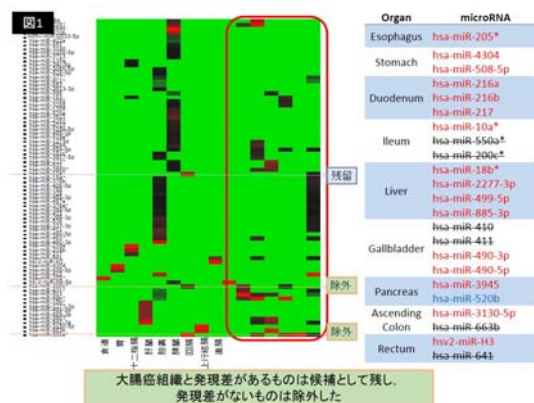
3. 研究の方法

我々は、miRCURY LNA microRNA Array (ヒトmiRNAの100%を網羅)を用いて各組織間・各腫瘍間のmiRNA発現の検討を行う。miRNA発現の組織特異的発現様式はすでに報告されている(Landgraf P et al., Cell. 2007)。本研究は消化器組織にターゲットを絞り、より詳細な検討を行う予定である。具体的には各消化器疾患の手術時に得ることができる凍結消化器組織(正常胃粘膜、正常大腸粘膜、正常肝臓組織、正常膵組織、正常小腸粘膜、大腸癌)を用いてmiRNA profilingを行う。この解析結果にて各組織(可能なら各腫瘍)特異的発現を示すmiRNAの選定を行い、各臓器に特異的に発現しているmiRNAの選出を行う。miRNAにおいても、遺伝子突然変異やDNAメチル化異常と同様に、例えば、大腸癌すべてに共通に認められる変化は存在しないと我々は考えている。また、各subtypeに分類可能な腫瘍すべてにmiRNA profilingを行うことはコストの面からも不可能である。したがって、本研究は組織特異的発現を示すmiRNAを同定することを第一の目標に掲げる。便中のmiRNAの検出には、①Total RNAの抽

出、精製②リアルタイムPCRによる検出という手順を踏む。我々は、現在、便検体量は便潜血反応の際に収集する量にて検出可能にしているが、①の手順はまだまだ煩雑である。我々は①の手順をスキップ(簡略化)して②のステップに移行する方法を現在、開発し検討中であるこの方法により、便検体から②までの移行時間は理論上1時間以内に終了する。

4. 研究成果

(1)各消化器疾患の手術時に得ることができる凍結消化器組織(正常胃粘膜、正常大腸粘膜、正常肝臓組織、正常膵組織、正常小腸粘膜、大腸癌)を用いてmiRNA profilingを行った。この解析結果にて各組織(可能なら各腫瘍)特異的発現を示すmiRNAの選定を行ったところ、各臓器に特異的に発現しているmiRNAが確認された(図1)。



(2) これらmiRNA群が組織特異的に発現していることを、個々のmiRNAについてreal-timePCRにて各臓器組織から増幅を行い確認を行い、組織特異的発現しているmiRNAをマーカー候補とした。

(3) 便中のmiRNAの検出には、①Total RNAの抽出、精製、②リアルタイムPCRによる検出という手順を踏む。我々は、現在、便検体量は便潜血反応の際に収集する量にて検出可能にしているが、①の手順はまだまだ煩雑である。我々は①の手順をスキップ(簡略化)

して②のステップに移行する方法を現在、開発し検討中である。この技術は現在も開発途上であり、現在、鋭意に開発を継続している。

(4) 次に、便中メチル化 CpG 検出による膵癌を含めた上部消化器腫瘍に対する非侵襲的スクリーニングの効果と未来に向けての可能性を提示する。図2は我々が行っている便中メチル化 CpG 検出による大腸癌を含めた次世代スクリーニング方法の試験参加者 (H24年8月まで) の内訳と結果を示す。

図2

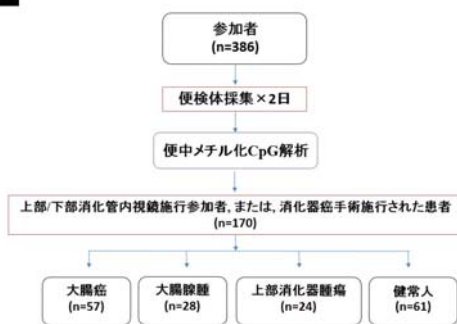
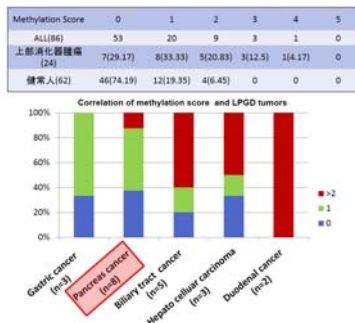


図3

上部消化器腫瘍患者の便中CpG検出



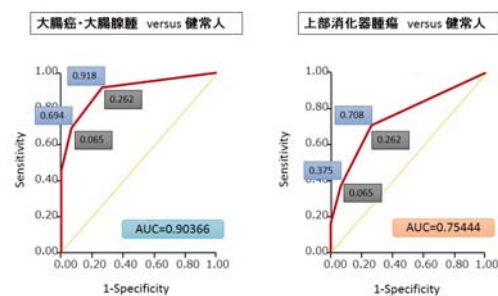
現在、8種類のマーカーを用いて便中メチル化 CpG 検出によるスクリーニング法を開発しその能力の検討を行っている。試験参加者には便を2日分採取(便潜血反応と同等量)していただき、その2日分を解析し、methylation score (メチル化スコア)はその2日分の便検体解析により得られた値を加算したもので評価を行っている(図3、すなわち、メチル化スコアは0-16の値をとることになる)。この方法によると、メチル化スコア1以上を検査陽性とする、上部消化管腫瘍に対する感度

は71%、特異度75%となる。メチル化スコア2以上を検査陽性とする、上部消化管腫瘍に対する感度は38%、特異度93%となる(図4)。

(5) 便中メチル化 CpG 検出によるスクリーニング法による大腸癌、大腸腺腫に対する感度は、ともにメチル化スコア1以上を検査陽性とする、感度は90%。メチル化スコア2以上を検査陽性すると感度は69%であり、非侵襲的スクリーニングツールとして能力はそうとう高いものと考えられる。問題点は、メチル化スコア1、2が得られた場合の

図4

ROC



その腫瘍の局在を指摘できないことである

(まずは下部消化管内視鏡による精査を行うことになるが)。本研究によるmiRNAを便から検出し、そのmiRNA発現分布の組織特異性を抽出することによってメチル化スコア1、2が得られた場合のその腫瘍の局在推測することが可能となる。本スクリーニング方法の開発により、世界で初めて、膵癌を非侵襲的かつ簡易にスクリーニングすることが可能となる。また、本研究の遂行により、①膵癌のみでなく、大腸癌、胃癌も検出可能、②医療機関を経ることなく定期的なスクリーニングを受けることが可能 という、現行の癌検診にはない2つの利点を得ることになる。これら利便性の向上は、本スクリーニング法を癌検診に用いた場合において検診受診率の飛躍的上昇が期待される。この受診率の上昇は進行早期癌の発見率の増加を伴うことによる進行末期患者の絶対的減少と根治手術件数の増加に伴う

再発または切除不能による化学療法移行患者数の減少を期待することができる。加えて、本スクリーニングは医療機関を経ることなく行うことが可能である。そのため、地域差による診断技術の不均衡も生じなくなり、日本のみならず、他の先進国・非先進国においても安価で高品質な消化器癌のスクリーニングを提供することが可能となる

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 6 件)

- ① 問山祐二、永坂岳司、Serum mir-21 as a Diagnostic and Prognostic Biomarker in colorectal cancer、JNCI、査読有、2013 May 23、[Epub ahead of print]
- ② 永坂岳司、藤原俊義、便中メチル化CpG検出による大腸がんスクリーニング、大腸癌フロンティア、査読無、5巻、2012、50-57
- ③ 西田直生志、永坂岳司、Characteristic patterns of altered DNA methylation predict emergence of human hepatocellular carcinoma、Hepatology、査読有、Vol. 56、2012、994-1003
- ④ Keun Hur、永坂岳司、MicroRNA-200c modulates epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in human colorectal cancer metastasis、Gut、査読有、June、2012、online
- ⑤ 竹田正範、永坂岳司、Expansion of CpG methylation in the SFRP2 promoter region during colorectal tumorigenesis、Acta Medica Okayama、査読有、Vol. 65、2011、169-177
- ⑥ Ajay Goel、永坂岳司、De novo constitutional MLH1 epimutations confer early-onset colorectal cancer

in two new sporadic Lynch syndrome cases, with derivation of the epimutation on the paternal allele in one、International of cancer、査読有、Vol. 128、2011、869-978

[学会発表] (計 6 件)

- ① 永坂岳司、便中メチル化検出による消化器癌スクリーニング、第 7 回エビジェネティク研究会総会、2013 年 5 月 31 日、奈良市
- ② 森川達也、Analysis of DNA methylation from exfoliated cancer cells in feces could screen colorectal tumors as well as other gastrointestinal cancers including pancreatic cancers、DDW2013、2013 年 5 月 20 日、USA、オランダ
- ③ 永坂岳司、便中メチル化CpG検出による消化器癌スクリーニング、第 84 回日本消化器内視鏡学会総会、2012 年 10 月 11 日、神戸市
- ④ 永坂岳司、Fecal DNA Methylation Analysis to Detect Gastrointestinal Neoplasia、World Cancer Congress、2012 年 8 月 28 日、カナダ、トロント
- ⑤ 永坂岳司、BRAF変異癌-根治切除後の分子生物学的/臨床的特徴、第 49 回日本癌治療学会総会、2011 年 10 月 27 日、名古屋市
- ⑥ 谷口信将、膵がんをターゲットにした非侵襲的スクリーニング技術の開発、第 111 回日本外科学会総会、2011 年 5 月 26-28 日、紙上開催

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永坂 岳司 (NAGASAKA TAKESHI)

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：30452569