

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24300337

研究課題名(和文)血液中遊離DNAの腫瘍マーカーとしての実用化—LINE1を中心として

研究課題名(英文)Clinical utilization of teh cell free DNA as tumor biomarker.

研究代表者

須並 英二(EIJI, SUNAMI)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70345205

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円

研究成果の概要(和文)：担癌患者の末梢血遊離DNAは癌組織に由来して健常人より高濃度に存在し、様々な遺伝子解析に応用されている。癌のepigeneticな変化として重要なglobal hypomethylationに注目し、大腸癌患者の血漿中遊離DNAのメチル化レベルを定量することで、血液中の遊離DNAがバイオマーカーとして有用であるか、臨床応用可能であるか検討した。結論としては、血漿中遊離DNAにおけるLINE1非メチル化の割合(LHI)は大腸癌を早期発見可能な腫瘍マーカーとして有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Circulating Cell-free DNA (cfDNA) is known to be increased in multiple cancers reflecting necrosis and apoptosis of tumor tissue and is target for various genetic analysis. The global hypomethylation is thought to correlate with genomic instability and tumor progression. In this study, we quantified the global methylation status of cfDNA in plasma extracted from colorectal cancer (CRC) patients, and investigated its clinical usefulness as a biomarker. LINE-1 hypomethylation index (LHI) in plasma may have a potential to serve as a biomarker enabling us to detect CRC patient at early stage.

研究分野：大腸がん

キーワード：大腸がん バイオマーカー 血中遊離DNA LINE1

1. 研究開始当初の背景

癌の診断、治療に際し腫瘍マーカーの果たす役割は非常に大きい。腫瘍マーカーは主として、スクリーニング、確定診断の補助そして癌治療経過中の評価等に使用される。特に予防的医学の側面からはより良いスクリーニングのための腫瘍マーカーの開発が必要とされている。腫瘍マーカーとして現在実用化されているものは、ほとんど全てが血液中の癌関連たんぱく質、糖鎖その他の抗原、特定のホルモンの定量であり、**遺伝子学的な腫瘍マーカーは mCEA 等数えるほどしか存在しない。**

血液中には、細胞中ではなく遊離した状態で DNA が微量ながら存在する事が知られている。癌患者の血液中には特に癌細胞由来の遊離 DNA が健常人より多く(高濃度で)存在することが知られている。癌患者における血液中遊離 DNA は癌細胞から分泌されることや、癌細胞が壊死すること等、正常細胞と異なるメカニズムで産生されと考えられている。そのため癌患者血清中の遊離 DNA には癌特有の DNA が様々な特徴を持って検出される。主な特徴としては、

定量すると、血清中遊離 DNA の濃度は癌患者では、健常人に比べて高いこと。

健常人遊離 DNA は比較的小さなサイズで一定である(正常細胞では DNA はアポトーシスにより血液中に散布されるからとされている。)のに対し、癌患者のそれは様々なサイズで存在し大きなものの割合が多く認められること。

癌に特異的な DNA 変化(point mutation, methylation, Allelic imbalance 等)が検出されること。

等が指摘されている。これらの事実は血液中

遊離 DNA が腫瘍マーカーの役割を果たす可能性を示唆している。[Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. Schwarzenbach H. et al. Nat Rev Cancer. 2011 June; 11(6):426-37.]

LINE1 は non-coding genomic DNA に属し、LINEs という autonomous transposon のメンバーのひとつである。特徴的なことはあらゆる genome のなかで最もその数量が多く存在することで、LINE1 を対象に選ぶことにより、その他の遺伝子を対象にすることに比べて、 **$10^4 - 10^6$ 倍の濃度の遺伝子数の検討が可能となり、少量の DNA を対象とした検討に付随する測定誤差を縮小することが可能となる。**

2. 研究の目的

癌における遺伝子的変化としては、mutation や AI 等の genetic な変化と methylation に代表される epigenetic な変化が重要な意味を持つ。methylation に着目すると、癌では tumor related genes の hypermethylation 及び global hypomethylation が高頻度に認められることが報告されている。正常細胞では LINE1 は大部分がメチル化されているが、LINE1 hypomethylation は大腸癌、前立腺癌、肝臓癌、乳癌、白血病等多岐にわたる癌種の癌細胞内の DNA で確認されている。**我々は LINE1 hypomethylation が大腸癌では前癌状態で発生し更に stage と共に進行することを報告している。** [LINE1 hypomethylation during colon cancer progression. Sunami E et al. PLoS One. 2011 Apr 14;6(4): 18884.]

更に、我々はこれまでに血清中の遊離 DNA を対象にした検討を行ってきている。前立腺癌では癌組織で認められる癌関連遺伝子の

methylation や **AI** が血清遊離 DNA でも認められ、組み合わせることによって精度の高いマーカーとなりうることを示した (Multimarker circulating DNA assay for assessing blood of prostate cancer patients. Sunami E et al. Clin Chem. 2009 Mar;55(3):559-67.)。また血清遊離 LINE1 DNA は乳癌患者で増加し、この定量化もバイオマーカーとなりうることを示してきた (Quantification of LINE1 in circulating DNA as a molecular biomarker of breast cancer. Sunami E et al. Ann N Y Acad Sci. 2008 Aug;1137:171-4.)。今後遊離 DNA は腫瘍マーカーとして実用化に向けて発展が、更には特に LINE1 は汎用マーカーとしての発展も期待される。

3 . 研究の方法

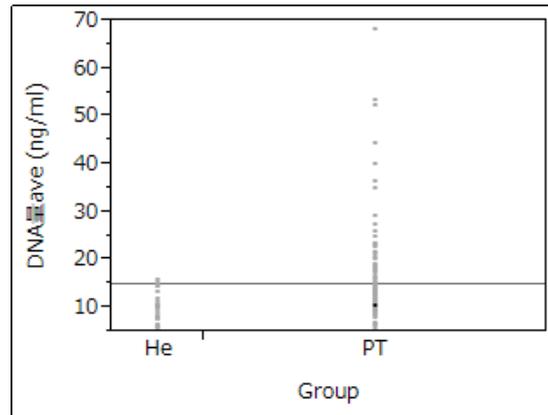
2012年4月から2014年7月に切除術を施行した大腸癌患者112人、対照群として健康人30人より血漿を採取した。遊離DNAはフェノール・クロロホルム法で抽出し、濃度をPicoGreen assayで定量した。メチル化レベルはLINE-1遺伝子のpromotor領域(148bp)を対象に、パイサルファイト処理後、absolute quantitative analysis of methylated alleles realtime PCR (AQAMA)によって定量した。LINE-1 hypomethylation index (LHI) を unmethylation copy number / methylation + unmethylation copy number と定義し解析に用いた。

4 . 研究成果

結果 1

大腸癌患者の血漿遊離 DNA 量は健康人より有意な上昇を示した(遊離 DNA : 16.1 ±

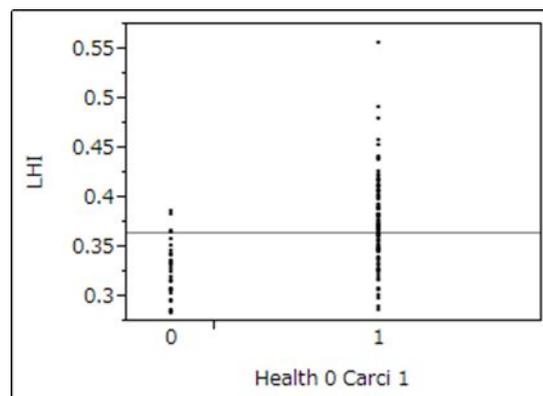
9.72 ng/ml vs 11.3 ± 3.41 ng/ml, $P = 0.0014$)。



	N	遊離DNA量 (ng/ml)	標準偏差
He	31	11.8374	5.04562
PT	112	16.1353	9.72056
			p=0.0022

結果 2

大腸癌患者の血漿遊離 DNA 中 LHI は健康人より有意な上昇を示した(血漿 LHI : 0.33 ± 0.029 vs 0.37 ± 0.042, $P < 0.0001$)。



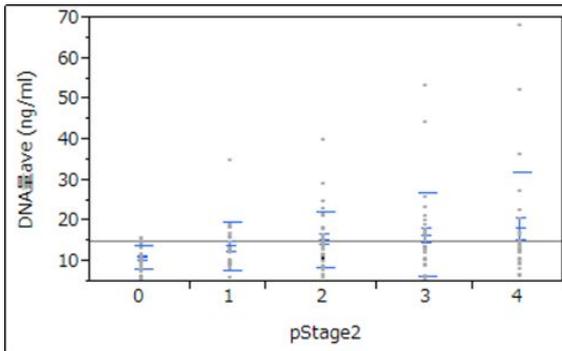
	N	LHI	標準偏差
He	30	0.3293	0.028052
Pt	112	0.373902	0.042499
			p<0.0001

結果 3

臨床病理学的因子の検討では腫瘍長径と血漿 LHI の間に弱い有意な相関を認めた($r = 0.19$, $P = 0.039$)。一方、遠隔転移例で血

漿 LHI が高い傾向があったが($P = 0.096$)、Stage I-IV 間で有意差は無かった。組織中の hypomethylation は腫瘍進展の早期より生じるとする報告があり、同様の傾向を血漿遊離 DNA が反映する可能性を示唆した。

・大腸癌患者のステージ毎の遊離 DNA 量



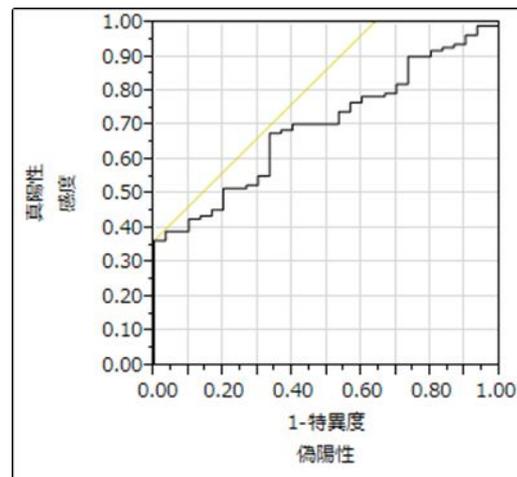
	N	遊離DNA量 (ng/ml)	標準偏差
He	30	11.0827	2.8404
St 1	23	13.9349	5.9383
St 2	33	15.5895	6.8851
St 3	29	16.5903	10.2576
St 4	27	18.188	13.8792

水準	水準2	スコア平均の差	差の標準誤差	Z	p値
2	0	14.2227	4.623992	3.07585	0.0021
3	0	12.3086	4.472713	2.75194	0.0059
4	0	11.9278	4.403	2.70901	0.0067
1	0	7.4123	4.28005	1.73183	0.0833
2	1	4.4269	4.430104	0.99927	0.3177
4	1	3.9452	4.136363	0.9538	0.3402
3	1	3.8981	4.231436	0.92121	0.3569
4	3	0.143	4.361682	0.03279	0.9738
4	2	-0.0673	4.531967	-0.01486	0.9881
3	2	-0.1296	4.592143	-0.02822	0.9775

結果 4

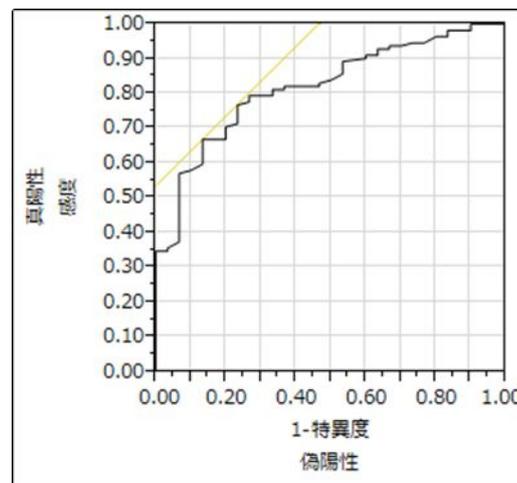
健常人と癌患者を識別するスクリーニング検査としての有用性はROC曲線で評価し、血漿遊離 DNA 量は至適カットオフ値 12.1ng/ml、感度 67.0%、特異度 66.7%、AUC 0.69、血漿 LHI は至適カットオフ値 0.36、感度 67.0%、特異度 86.7%、AUC 0.82 と計算され、AUC の比較では血漿 LHI が有意に優れた ($P = 0.048$)。

遊離 DNA 量と健常/癌患者の ROC 曲線



AUC	0.7002
Cut OFF	16.192
感度	36.61%
特異度	100.00%

血漿 LHI と健常/癌患者の ROC 曲線



AUC	0.81979
Cut OFF	0.36
感度	66.96%
特異度	86.67%

結論として血漿遊離 DNA における LINE1 非メチル化の割合は大腸癌を早期発見可能なバイオマーカーとして有用である可能性が示された。

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 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

第70回消化器外科学会
2015年7月浜松(発表決定)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

須並英二 (SUNAMI, Eiji)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 70345205

(2)研究分担者

津野寛和 (TSUNO, Hirokazu)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 50282637

川合 一茂 (KAWAI, Kazushige)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 80571942

(3)連携研究者

()

研究者番号: