

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830103

研究課題名(和文)大腸鋸歯状病変の画期的な存在・質的診断方法の開発

研究課題名(英文)Development of novel diagnostic methods of serrated colorectal lesions

研究代表者

原田 拓(Harada, Taku)

札幌医科大学・医学部・訪問研究員

研究者番号：60468030

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：大腸洗浄液の中に含まれるDNAメチル化解析が大腸腫瘍診断法として臨床応用しうるか検討を行った。miR-124-3, LOC386758, SFRP1は、高感度で大腸癌を検出可能であった(miR-124-3, 71.8%; LOC386758, 79.5%; SFRP1, 74.4%)。これら3遺伝子のメチル化を点数化した診断パネル(M-score)を用いることで、さらに大腸癌検出能を向上させることが可能であった(感度82%、特異度79%、AUC 0.834)。大腸洗浄液のメチル化解析が大腸癌スクリーニングに臨床応用可能であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We assessed the clinical usefulness of aberrant DNA methylation in the bowel lavage fluid (BLF) for the colorectal tumor diagnosis. We found that a panel of three genes achieved highest sensitivities to detect colorectal cancer (miR-124-3, 71.8%; LOC386758, 79.5%; SFRP1, 74.4%). A scoring system based on the number of methylated genes (M-Score) enabled CRC detection with 82% sensitivity and 79% specificity. Our data indicate that DNA methylation in BLF could be a useful biomarker for colorectal cancer screening.

研究分野：消化器病

キーワード：大腸がん メチル化 スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

大腸鋸歯状病変は従来良性病変群として考えられてきた。しかし近年の分子生物学的な検討から鋸歯状病変の一部である Sessile serrated adenoma/polyp (SSA/P) でマイクロサテライト不安定性 (Microsatellite instability; MSI) を有する大腸癌と同様の BRAF 変異、プロモーター領域 CpG アイランドの同時多発的なメチル化を来す CpG island methylator phenotype (CIMP) といった極めて特徴的なゲノム・エピゲノム異常が認められることが示され MSI 大腸癌の前癌病変として注目されるようになった。

このように鋸歯状病変は新しい疾患概念であり、未だ臨床病理学的診断基準に一定のコンセンサスは得られておらず、今後解決すべき問題点が沢山存在する。

これまでに本申請者らは内視鏡下に腫瘍表面の粘液を洗浄し回収した洗浄液のメチル化測定が癌の浸潤度を高精度に判別すること (質的診断) を明らかとしてきた (Cancer Prev Res 2011)。また SSA/P からの発がん経路においてゲノムワイドなメチル化異常 CIMP が極めて重要な役割を担っていることを報告してきた (Am J Patol 2012)。これらの研究成果より、SSA/P の質的診断に洗浄液のメチル化測定を応用しうると考えた。

さらに便中 DNA のメチル化測定が大腸癌の存在診断に有用であることが多数報告されている。これは大腸癌表面の粘液層に脱落した腫瘍細胞が便中に含まれることを意味している。SSA/P は表面に多量の粘液が付着する特徴があり、前述の SSA/P 洗浄液中で多くの SSA/P 由来の細胞が回収されていたと考えられた。以上より大腸洗浄液のメチル化測定が SSA/P の存在診断に応用できることが十分に期待できる。

2. 研究の目的

大腸洗浄液を用いた非侵襲的な分子生物学的アプローチにより革新的な鋸歯状病変の存在・質的診断方法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

内視鏡下に腫瘍表面の粘液を洗浄し回収した洗浄液、大腸内視鏡検査の際に前処置薬として服用・排泄される経口腸管洗浄液 (bowel lavage fluid; BLF) の中に含まれる DNA メチル化を検出することで、大腸癌診断法に応用しうるかを検討を行った。洗浄液は遠心後に沈渣を回収し、ゲノム DNA をフェノール・クロロホルム法で抽出し、EpiTect Bisulfite kit (キアゲン) を用いて Sodium Bisulfite 処理を行った。

4. 研究成果

鋸歯状病変も含めた大腸腫瘍生検組織と内視鏡下洗浄液の BRAF 変異、KRAS 変異、複

数候補のメチル化解析を行った。鋸歯状病変の内視鏡下洗浄液では腫瘍由来の DNA が十分採取できず、メチル化測定は困難である症例が多かった。検体採取方法を再度検討したところ、2回洗浄し、2回目の洗浄液を回収し DNA を抽出することにより、メチル化、生検組織と一致した BRAF 変異を同定することが可能であった。これらの知見は非侵襲的に分子診断することが可能であることを示唆し、今後臨床応用が期待できると考える。

次に経口腸管洗浄液について検討した。506 症例 (うち大腸癌 55 症例) を対象とし、無作為に Training set (n=345 症例、うち大腸癌 39 症例)、Test set (n=151、うち大腸癌 16 症例) の 2 群に分けた。13 遺伝子 (APC, SFRP1, SFRP2, DKK2, WIF1, miR-1-1, miR-9-1, miR-34b/c, miR-124-1, miR-124-2, miR-124-3, miR-137, LOC386758) を MethyLight 法で検出した。LOC386758 はゲノムワイドなスクリーニングにより大腸腫瘍で高頻度にメチル化している遺伝子として同定した。

まず Training set において 13 遺伝子の DNA メチル化を解析した。各遺伝子の大腸癌診断能を ROC (Receiver Operating Characteristic) 曲線で解析した。最も高い AUC (area under curve) 値を示した 3 遺伝子 (miR-124-3, 0.812; LOC386758, 0.767; SFRP1, 0.722) は、高感度で大腸癌を検出可能であった (miR-124-3, 71.8%; LOC386758, 79.5%; SFRP1, 74.4%)。これら 3 遺伝子のメチル化を点数化した診断パネル (M-score) を用いることで、さらに大腸癌検出能を向上させることが可能であった (感度 82%、特異度 79%、AUC 0.834)。M-Score は、癌の存在部位、腫瘍径、病期 (TNM stage) とは相関を示さず、早期癌や深部結腸癌に対する診断能の低下は認められなかった。また、Test set においても Training set と同様に、M-score による高い大腸癌診断能が確認された (AUC 0.804)。しかし、前癌病変である Advanced adenoma 群 (腫瘍径 10mm 以上または、villous component あるいは severe dysplasia の病理像を伴う大腸腺腫) とそれ以外の腺腫像を呈する Minor polyp 群、および病変を認めない Normal 群の間では M-Score に有意差は認めないことから、前癌病変の検出には不向きであることが示唆された。

本研究では、大腸内視鏡検査の際に服用される経口腸管洗浄液を直腸から回収し、DNA メチル化を検出することで、大腸癌スクリーニングに応用可能であることを提示した。検査結果をスコアにより層別化して示すことで大腸癌リスクの高い症例をより効率的に抽出することが可能であり、精密検査の受動機を高める効果が期待される。

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 4件)

1. Harada T, Yamamoto E, Yamano H, Nojima M, Maruyama R, Kumegawa K, Ashida M, Yoshikawa K, Kimura T, Harada E, Takagi R, Tanaka Y, Aoki H, Nishizono M, Nakaoka M, Tsuyada A, Niinuma T, Kai M, Shimoda K, Shinomura Y, Sugai T, Imai K, Suzuki H.
Analysis of DNA Methylation in Bowel Lavage Fluid for Detection of Colorectal Cancer. *Cancer Prev Res*, 2014 Oct;7(10):1002-10. 査読あり、doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-14-0162.
2. Suzuki R, Yamamoto E, Nojima M, Maruyama R, Yamano H, Yoshikawa K, Kimura T, Harada T, Ashida M, Niinuma T, Sato A, Nosho K, Yamamoto H, Kai M, Sugai T, Imai K, Suzuki H, Shinomura Y. Aberrant methylation of microRNA-34b/c is a predictive marker of metachronous gastric cancer risk. *J Gastroenterol*. 2014 ;49:1135-44. 査読あり, doi: 10.1007/s00535-013-0861-7.
3. 原田拓, 山本英一郎, 鈴木拓, 山野泰穂 LST の遺伝子学的特徴 遺伝子研究の立場からみた LST の病態 *Intesitine* 2014; 8; 47-52 査読なし
4. Sawada T, Yamamoto E, Suzuki H, Nojima M, Maruyama R, Shioi Y, Akasaka R, Kamimae S, Harada T, Ashida M, Kai M, Adachi Y, Yamamoto H, Imai K, Toyota M, Itoh F, Sugai T. Association between genomic alterations and metastatic behavior of colorectal cancer identified by array-based comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*, 2013;52:140-9. 査読あり、doi: 10.1002/gcc.22013.

[学会発表](計 7件)

Eiichiro Yamamoto, Taku Harada, Hiroo Yamano, Yasuhisa Shinomura, Hiromu Suzuki
UEGW 2014年10月18日-22日ウィーン(オーストリア)
ANALYSIS OF DNA METHYLATION IN BOWEL LAVAGE FLUID FOR DETECTION OF COLORECTAL CANCER

Eiichiro Yamamoto, Reo Maruyama, Shintaro Takatusuka, Taku Harada, Akihiro Tsuyada, Takeshi Sawada, Takeshi Niinuma, Akiko Sato, Masahiro

kai, Hiroo Yamano, Tamotsu Sugai, Yasuhisa Shinomura, Hiromu Suzuki
日本癌学会 2013年10月10月3日-5日
パシフィコ横浜(横浜)
Intratatumoral variation in surface microstructures reflects genetic heterogeneity revealed by exome sequencing of colorectal tumor.

Sawada T, Yamamoto E, Yamano H, Harada T, Maruyama R, Sugai T, Suzuki H.
UEGW 2013年10月12日-16日ドイツ(ベルリン)
Differences of methylation, histology and endoscopic morphology between proximal and distal colorectal lesions with braf mutations.

Eiichiro Yamamoto, Hiroo Yamano, Reo Maruyama, Takeshi Sawada, Taku Harada, Tamotsu Sugai, Yasuhisa Shinomura, Hiromu Suzuki
UEGW 2013年10月12日-16日ベルリン(ドイツ)
Intratatumoral variations in pit patterns reflect genetic heterogeneity revealed by high-throughput sequencing of colorectal tumor.

Taku Harada, Eiichiro Yamamoto, Hiromu Suzuki, Masahiro Kai, Reo Maruyama, Hideaki Takahashi, Takeshi Sawada, Hiroo Yamano, Tamotsu Sugai, Kohzoh Imai
DNA methylation in bowel lavage fluid is a useful biomarker for colorectal cancer screening.
日本癌学会 2013年10月3日-5日
パシフィコ横浜(横浜)

鈴木拓, 山本英一郎, 丸山玲緒, 鈴木亮, 清水崇, 原田拓, 山野泰穂, 野島正寛, 高塚伸太郎, 新沼猛, 甲斐正広, 篠村恭久, 今井浩三.
マイクロRNA 遺伝子のエピジェネティクス異常と臨床応用.
日本癌学会 2013年10月3日-5日
パシフィコ横浜(横浜)

原田拓, 山本英一郎, 野島正寛, 丸山玲緒, 佐藤亜希子, 甲斐正広, 山野泰穂, 鈴木拓 腸管洗浄液のメチル化検出による大腸癌診断法の開発
第33回日本分子腫瘍マーカー研究会,
2013年10月2日, パシフィコ横浜(横浜).

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 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 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

原田 拓 (Harada Taku)
札幌医科大学・医学部・訪問研究員
研究者番号：60468030

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：