

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10628

研究課題名(和文)大腸癌合併潰瘍性大腸炎患者の早期診断を目指した新たなスクリーニング方法の確立

研究課題名(英文) Establishment of the method to identify the ulcerative colitis patients with high risk of colorectal cancer

研究代表者

問山 裕二 (Toiyama, Yuji)

三重大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：00422824

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：潰瘍性大腸炎患者の直腸粘膜の網羅的DNAメチル化解析を施行した。大腸癌合併潰瘍性大腸炎患者の直腸粘膜と大腸癌非合併潰瘍性大腸炎患者の直腸粘膜を用いて、全ゲノムのメチル化プロファイルを行った。大腸癌合併潰瘍性大腸炎に有意に変化を認める11の部位を同定した(11DMRs)。直腸粘膜における11DMRsを用いた大腸癌合併潰瘍性大腸炎患者診断能は極めて高かった。網羅的DNAメチル化解析により11DMRsを選択できた。これらのマーカーは大腸癌合併する潰瘍性大腸炎患者を選抜できることが示唆され、今後の前向き試験を検討している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

同一臓器内に同時・異時性多発癌が生じやすくする"Field cancerization"の概念がDNAメチル化の分野で提唱されており、その変化を評価することにより、発癌の素地を検出可能と考え、本研究へ応用した。直腸粘膜の採取で、全大腸のどの部位にも大腸癌が発生しているリスク評価ができる結果であり、この結果を臨床応用可能であれば、潰瘍性大腸炎患者の癌化診断に対して、年に一度繰り返し行われる大腸内視鏡検査やそれに伴う多数の生検による侵襲的負担の軽減、癌化の見落としによる不幸な予後の回避、さらには高齢化による高騰する医療費の削減にも効果が発揮されるものであると考えている。

研究成果の概要(英文)：We conducted comprehensive methylation array to identify novel DNA methylation markers for predicting the risk of neoplasia in UC patients. We collected 23 rectal samples from UC patients with CRC and 24 rectal samples from UC patients in cohort1. We also collected 8 rectal samples from UC patients with CRC and 24 rectal samples from UC patients without CRC in cohort 2. We identified 486 differentially methylated regions (DMRs) with absolute delta beta-value > 0.1 in rectal mucosal tissues of UC patients with CAC compared with that without neoplasia. Next, pathway enrichment analysis was performed to select coordinately methylated DMRs, and 180 DMRs were extracted. Finally, optimal 11 DMRs were selected by the Elastic Net classification algorithm. In the ROC analysis for cohort 1, the AUC was 0.96. For cohort 2, the AUC was 0.81. We identified 11 DMRs for identifying UC patients with high risk of developing CAC.

研究分野：消化器外科

キーワード：潰瘍性大腸炎 大腸癌 DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎は、大腸の粘膜に糜爛や潰瘍ができる原因不明の大腸びまん性非特異性炎症疾患である。食生活の欧米化に伴い潰瘍性大腸炎の患者数は2014年には17万人を超え、年間約1万人が発症し、患者数は増加の一途を辿っている。近年の内科的治療の進歩により従来は外科治療を考慮してきた潰瘍性大腸炎の重症例(劇症例、内科的治療抵抗例)でも、手術を回避できる症例も見られるようになってきている。その一方で、潰瘍性大腸炎は大腸癌のハイリスク群とされ、罹患期間の年月とともに増加する。メタアナリシス解析によれば、癌、dysplasiaの累積発生率は発症後10年で2%、20年で8%さらに30年で18%であると報告されている。本邦からの報告では、内科的治療の奏功により、大腸癌による潰瘍性大腸炎患者の外科的適応の相対的割合が増加している。潰瘍性大腸炎合併大腸癌は患者の予後を左右する重大な腸管合併症であるために、早期発見し外科的治療へのスムーズな移行が極めて重要である。

長期罹患した潰瘍性大腸炎患者は大腸癌の発見率向上を目的に、定期的にサーベイランスを行うことが推奨されている。わが国では8-10年以上罹患する全大腸炎型、左側結腸炎型患者に年1回以上の全大腸内視鏡検査下のrandom-step biopsyあるいは拡大内視鏡を併用した有所見部位のtarget biopsyによるサーベイランスが推奨されている。生検組織に癌、高度の細胞異型を認める場合には、絶対的手術適応となる。しかし、潰瘍性大腸炎に合併する大腸癌は、多発癌で、低分化型腺癌、印環細胞頻度が高く、背景粘膜に炎症を伴うため色調での判別も困難で、このような背景がサーベイランス大腸内視鏡による潰瘍性大腸炎合併大腸癌の発見を困難にしている。またやみくもに生検をするrandom-step biopsyは患者の侵襲性から好ましくないと考えられている。若年発症の潰瘍性大腸炎患者の外科的手術には機能的(良好な排便機能、性機能の温存)予後を確保することが極めて重要であるとともに、早期診断、早期外科的治療がなされれば一般人口の死亡率に有意差がないことが知られており、長期罹患により誘発される潰瘍性大腸炎癌化のメカニズムを解明し、低侵襲で精度の高い診断マーカーを確立することが期待される。

2. 研究の目的

エピゲノムの中心的な役割の一つを担っているDNAメチル化は、炎症によって引き起こされる潰瘍性大腸炎発癌(dysplasia-carcinoma sequence)において、DNA変異より早期の段階で変化を認めるため、早期診断または癌化リスク診断に優れている。そこで、慢性炎症の中心的な部位で、内視鏡検査にて簡便に評価可能かつ肛門鏡で生検可能な直腸粘膜を用い、そのDNAメチル化のfield effectまたはfield cancerizationを用いた大腸全体の癌化の状況を判別する概念を確立することにある。

3. 研究の方法

潰瘍性大腸炎切除例の大腸標本を用い、網羅的DNAメチル化解析を行うことで大腸部位依存的、粘膜年齢依存的かつ悪性新生物依存的メチル化遺伝子を選択する。上記スクリーニングで候補遺伝子を絞り込み、別コホートで最終的に同定遺伝子メチル化の直腸粘膜におけるfield effectが潰瘍性大腸炎癌化ハイリスク症例の選別に有効か評価する。

4. 研究成果

コホート1: 大腸癌合併潰瘍性大腸炎患者の直腸粘膜(n=24)と大腸癌非合併潰瘍性大腸炎患者の直腸粘膜(n=24)からDNAを抽出し、Illumina HumanMethylation450k BeadChip Arrayを用いて、全ゲノムのメチル化プロファイルを行った。ChAMP algorithmを用いて、大腸癌合併潰瘍性大腸炎患者の直腸粘膜で有意に異なる2,549のメチル化領域(differentially methylated regions: DMRs)を同定した。さらに $|\Delta B| > 0.1$ のものを選択することで、484DMRs(292:hypermethylated, 192:hypomethylated)に絞り込めた。さらに生物学的意義のある集団として機能するもの(“coordinately methylated”)が選択できるEnrichment Analysisを施行することで、180DMRs(90:hypermethylated, 90:hypomethylated)に絞り込めた。最後に100回のLogistic regression analysisを施行し、100回とも選択される11DMRs(10:hypermethylated, 1:hypomethylated)を選択し、癌との関連が報告されている遺伝子も抽出された。(図1)

直腸粘膜における11DMRsを用いた大腸癌合併潰瘍性大腸炎患者診断能は、ROC解析では、AUCが0.96(95%CI: 0.90-1.00)であった。(図2)

コホート2: 大腸癌合併潰瘍性大腸炎患者の直腸粘膜(n=8)と大腸癌非合併潰瘍性大腸炎患者の直腸粘膜(n=8)を用いた再検証試験では、AUCが0.81(95%CI: 0.55-1.00)であった。(図2)

図 1 : 潰瘍性大腸炎癌化ハイリスク症例の選別の為のメチル化領域の選択方法

Figure 1

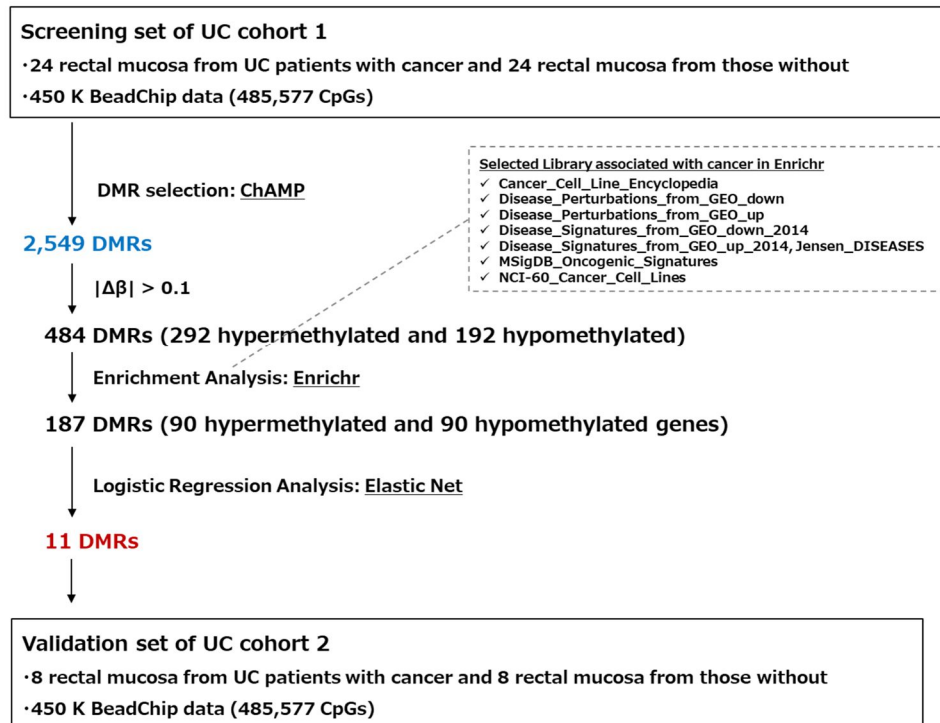
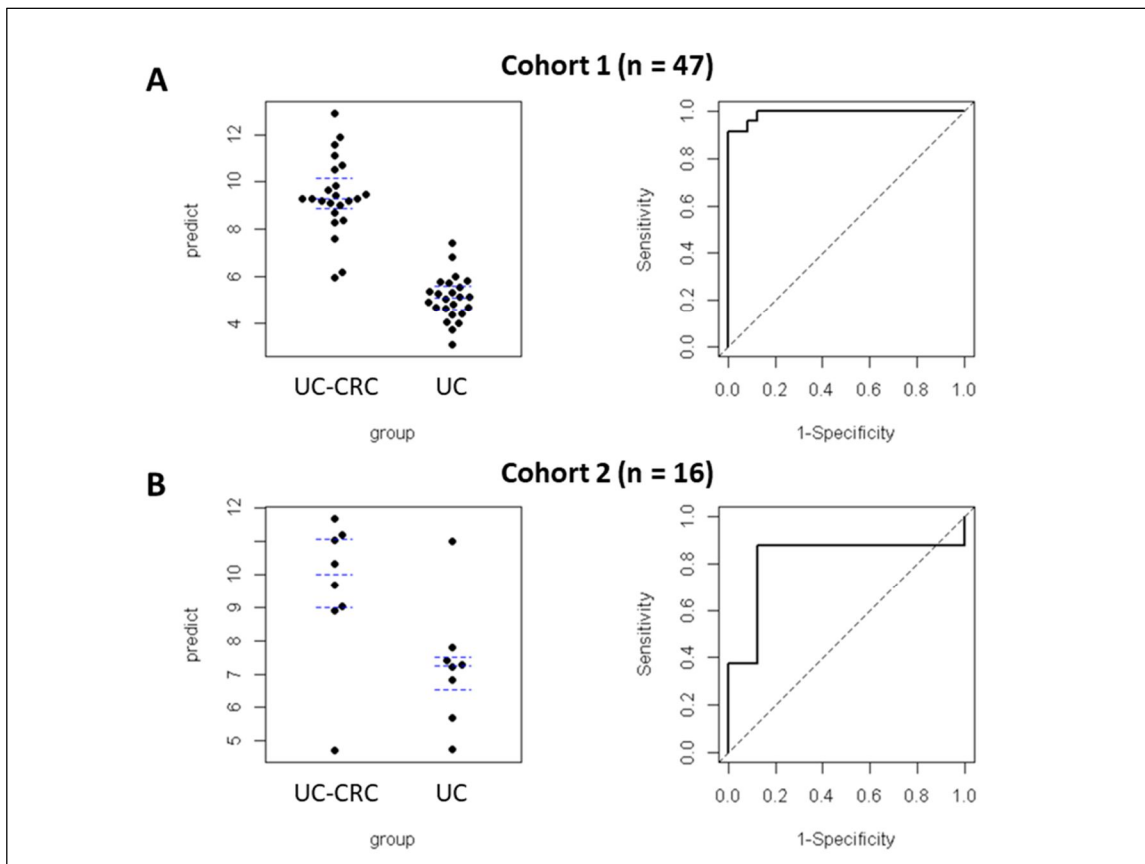


図 2 : 大腸癌合併潰瘍性大腸炎患者診断能



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Toiyama Y, Okugawa Y, Kondo S, Okita Y, Araki T, Kusunoki K, Uchino M, Ikeuchi H, Hirota S, Mitsui A, Takehana K, Umezawa T, Kusunoki M.	4. 巻 4
2. 論文標題 Comprehensive analysis identifying aberrant DNA methylation in rectal mucosa from ulcerative colitis patients with neoplasia.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget.	6. 最初と最後の頁 33149-33159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.26032	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 Toiyama Y, Okugawa Y, Tanaka K, Araki T, Uchida K, Hishida A, Uchino M, Ikeuchi H, Hirota S, Kusunoki M, Boland CR, Goel A.	4. 巻 153
2. 論文標題 A Panel of Methylated MicroRNA Biomarkers for Identifying High-Risk Patients With Ulcerative Colitis-Associated Colorectal Cancer.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Gastroenterology.	6. 最初と最後の頁 1634-1646
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.gastro.2017.08.037	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Munakata K, Koi M, Kitajima T, Tseng-Rogenski S, Uemura M, Matsuno H, Kawai K, Sekido Y, Mizushima T, Toiyama Y, Yamada T, Mano M, Mita E, Kusunoki M, Mori M, Carethers JM.	4. 巻 10
2. 論文標題 Inflammation-Associated Microsatellite Alterations Caused by MSH3 Dysfunction Are Prevalent in Ulcerative Colitis and Increase With Neoplastic Advancement.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin Transl Gastroenterol.	6. 最初と最後の頁 e00105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14309/ctg.0000000000000105.	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 Kondo S, Araki T, Toiyama Y, Tanaka K, Kawamura M, Okugawa Y, Okita Y, Saigusa S, Inoue Y, Uchida K, Mohri Y, Kusunoki M.	4. 巻 16
2. 論文標題 Downregulation of trefoil factor-3 expression in the rectum is associated with the development of ulcerative colitis-associated cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncol Lett.	6. 最初と最後の頁 3658-3664
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2018.9120.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 問山 裕二, 北嶋 貴仁, 奥川 喜永, 廣 純一郎, 楠 正人
2. 発表標題 癌合併潰瘍性大腸炎患者診断マーカー同定のための直腸粘膜における網羅的DNAメチル化解析
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本 晃, 問山 裕二, 奥川 喜永, 重盛 恒彦, 市川 崇, 近藤 哲, 藤川 裕之, 廣 純一郎, 荒木 俊光, 楠 正人
2. 発表標題 遺伝子のメチル化レベルを指標にした潰瘍性大腸炎関連大腸癌の診断に有用なバイオマーカーの確立
3. 学会等名 日本消化器外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 問山裕二
2. 発表標題 Field effectとEpigenetic driftの概念を利用したMicroRNA のメチル化による潰瘍性大腸炎癌化のハイリスク診断
3. 学会等名 日本外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 問山裕二, 奥川喜永, 荒木俊光, 小林美奈子, 大北喜基, 田中光司, 井上靖浩, 内田恵一, 毛利靖彦, 楠正人
2. 発表標題 miRNAsメチル化マーカーパネルを用いた潰瘍性大腸炎患者の癌化リスク診断
3. 学会等名 日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小池 勇樹, 問山 裕二, 奥川 喜永, 長野 由佳, 松下 航平, 大北 喜基, 井上 幹大, 荒木 俊光, 内田 恵一, 楠 正人
2. 発表標題 小児潰瘍性大腸炎患者の直腸粘膜におけるmicroRNA-124メチル化の意義
3. 学会等名 日本外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 問山 裕二, 山本 晃, 奥川 喜永, 楠 蔵人, 大村 悠介, 藤川 裕之, 大北 喜基, 廣 純一郎, 大井 正貴, 楠 正人
2. 発表標題 網羅的DNAメチル化解析から抽出した潰瘍性大腸炎合併大腸癌診断マーカー
3. 学会等名 日本消化器外科学
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 問山 裕二, 山本 晃, 奥川 喜永, 楠 蔵人, 楠 由紀奈, 大村 悠介, 市川 崇, 井出 正造, 志村 匡信, 北嶋 貴仁, 藤川 裕之, 安田 裕美, 大北 喜基, 横江 毅, 廣 純一郎, 大井 正貴, 荒木 俊光, 内田 恵一, 楠 正人
2. 発表標題 網羅的メチル化解析から抽出したOPLAHメチル化異常の潰瘍性大腸炎における臨床的意義
3. 学会等名 日本大腸肛門病学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 問山 裕二, 楠 正人、他	4. 発行年 2019年
2. 出版社 メディカルレビュー社	5. 総ページ数 90
3. 書名 大腸がんperspective	

1. 著者名 荒木 俊光, 問山 裕二, 大北 喜基, 廣 純一郎, 楠 正人、他	4. 発行年 2018年
2. 出版社 日本臨床	5. 総ページ数 645
3. 書名 炎症性腸疾患 (第2版)	

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 METHOD FOR JUDGING ONSET POSSIBILITY OF LARGE BOWEL CANCER	発明者 Masato Kusunoki, et al.	権利者 EA pahrma
産業財産権の種類、番号 特許、WO/2018/008740	取得年 2018年	国内・外国の別 外国

〔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	井上 靖浩 (Inoue Yasuhiro) (20324535)	三重大学・医学系研究科・客員准教授 (14101)	
研究分担者	楠 正人 (Kusunoki Masato) (50192026)	三重大学・医学系研究科・教授 (14101)	
研究分担者	荒木 俊光 (Araki Toshimitsu) (70343217)	三重大学・医学系研究科・准教授 (14101)	