

## 学 位 論 文 要 旨

博士課程 甲・㉞	第 1 号	氏 名	原 田 拓
<p>[論文題名]</p> <p>Analysis of DNA methylation in bowel lavage fluid for detection of colorectal cancer (Cancer Prevention Research, 7:1002-10, 2014.)</p> <p>[要 旨]</p> <p>【背景・目的】</p> <p>大腸癌は早期に発見できれば高い確率で根治が期待できるが、早期には自覚症状を認めないことがほとんどであり、スクリーニング方法として普及している便潜血反応検査の精度は十分ではない。近年、遺伝子マーカーを用いた便検査が大腸癌の早期発見に有用であるとの研究成果が数多く発表されている。しかし、便中に微量に含まれる大腸癌由来の DNA を検出する必要があり、さらにマーカー分子やその感度・特異度は研究報告ごとに異なっているのが現状である。今回我々は、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) を直腸から回収し、その中に含まれる 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検討を行った。</p> <p>【材料と方法】</p> <p>2011年1月から2012年7月までに秋田赤十字病院消化器病センターで全大腸内視鏡検査が施行され遺伝子解析に同意を得た 508 症例 (うち大腸癌 56 症例) を対象とし、無作為に Training set (n=355 症例、うち大腸癌 39 症例)、Test set (n=153、うち大腸癌 17 症例) の 2 群に分けた。内視鏡挿入時に直腸に貯留している洗浄液 (約 10 ml) 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、Sodium Bisulfite 処理を行った。大腸癌で高頻度にメチル化を認める 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。</p> <p>【結果】</p> <p>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</p>			

認められた (AUC 0.808)。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。

#### 【考察】

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、精密検査の受診動機を高める効果が期待される。糞便を検体とした解析法では、便中に微小に含まれる腫瘍細胞由来の DNA を効率的に抽出する技術や工夫が要求されるが、腸管洗浄液を用いた本研究では通常フェノール・クロロホルム抽出で良好な結果を得ることができた。これは腸内細菌等の非ヒト DNA が除去されたことによると考えられ、腸管洗浄が検査成績の向上に寄与することが示唆された。将来的には、洗浄液の回収に内視鏡を用いず、腸管洗浄が十分に行われた後に排泄された便汁 (洗浄液) を回収するという形も可能と考えられる。一方で、現状では多量の腸管洗浄液服用による被検者の負担が問題として残る。今後、腸管洗浄をどの程度まで減量可能か再検討する必要がある。また、非侵襲的大腸癌スクリーニング法として普及しつつある CT colonography は検査に際して腸管洗浄が必要であり、洗浄液のメチル化解析を補完的な検査として併用することも、検討の余地があると考えられる。

【結語】腸管洗浄液のメチル化検出は大腸癌診断において有用な Biomarker となりうる可能性が示唆された。