

早期大腸癌と大腸腺腫の診断に有用な血液バイオマーカーの探索

藤田医科大学医学部

消化管内科学教授

大宮直木

愛知県がんセンター中央病院

遺伝子病理診断部部長

谷田部 恭

愛知県がんセンター

分子診断トランスレーショナルリサーチ分野長 田口 歩

1. 研究課題の背景・目的

我が国における 2017 年のがん統計予測（国立がん研究センター発表）によると大腸癌の罹患数は 149,500 人とがんの中で最多となり、死亡数も 53,000 人と肺がんについて 2 番目に多い。大腸癌は肺がんと並んで増加の一途を辿っているが、発見される大腸癌のうち進行癌の占める割合は 60%前後と診断の遅れが問題となっている。また、大腸癌の 5 年生存率（2004～2007 年全がん協加盟施設の生存率共同調査）は Stage I～III では 80%以上なのに対し、Stage IV では 20%以下であることから、大腸癌においては、早期診断と治療により予後の改善が期待できる。またほとんどの大腸癌は、10 年以上の長い経過の中で、腺腫から癌へと進展していくことが知られており、特にがん化のリスクの高い前癌病変として、1cm 以上の大きさを持つ大腸腺腫や高度異型大腸腺腫を診断することも、侵襲の少ない内視鏡治療を可能とし、さらにそれが大腸癌の予後を改善しうる有力なアプローチと考えられる。大腸癌を早期発見するためのスクリーニング検査としては、一次検診で免疫学的便潜血検査が行われ、陽性反応が出た場合は二次検診である大腸内視鏡による精密検査が行われる。しかし、2016 年の一次検診受診率は 39.1%（全国平均）と低い。また、免疫学的便潜血検査の問題として、疑陽性率が高く、また早期大腸癌に対する感度も約 50%と低いことが挙げられる。そのため、より簡便かつ高精度な高リスク大腸腺腫を含む早期大腸癌診断テストの開発が望まれている。近年、米国において免疫法便潜血検査と便中 DNA を組み合わせた診断キット（Cologuard）が米国食品医薬品局（FDA）に承認された。Cologuard の便中 DNA 検査は KRAS 変異、NDRG4（N-myc downstream gene-4）、BMP3（Bone Morphogenetic Protein 3）の異常メチル化と内部標準の β -actin を組み合わせたもので、大腸癌に対する感度は 92.3%と高いが、高リスクおよび低リスク大腸腺腫に対する感度は 42.4%、17.2%

であり、進行癌でない場合の特異度は 86.6%と報告されている (Imperiale et al. NEJM 2014)。一方、通常の免疫学的便潜血検査の大腸癌に対する感度は 73.8%、高リスクおよび低リスク大腸腺腫に対する感度は 23.8%、7.6%であり、進行癌でない場合の特異度は 94.9%と報告されている (Imperiale et al. NEJM 2014)。欧米の病理診断では、粘膜内癌は高リスク大腸腺腫 (high grade dysplasia) にされ、上述の結果から Cologuard を検診に使うのは未だ不十分であり、高リスク大腸腺腫や早期大腸癌に対する感度・特異度の高い検査法が望まれる。一方、血液を用いた大腸癌検査は、その簡便さと受容性の点から有望である。しかし、FDA に最近承認された血中メチル化 SEPT9 検査の高リスク大腸腺腫に対する感度は 11.2%と低い (Church et al. Gut 2014)。そこで今回、愛知県がんセンター分子診断トランスレーショナルリサーチ分野長・田口 歩博士と共同で高リスク大腸腺腫と早期大腸癌の内視鏡切除前、切除 6 ヶ月後のペア血漿より、血漿中のマイクロ RNA、エクソゾームの網羅的解析を行い、高リスク大腸腺腫と早期大腸癌の診断に有用な血液バイオマーカーの探索同定を目指す。また、愛知県がんセンター中央病院遺伝子病理診断部部长・谷田部 恭博士と共同で、内視鏡切除された腫瘍の遺伝子異常の解析も行い、腫瘍関連遺伝子・蛋白発現異常と血液バイオマーカーとの関連も調べる。

2. 研究の対象ならびに方法

1) 早期大腸癌・大腸腺腫の患者および健常対照者のエントリー

藤田医科大学病院消化管内科で大腸内視鏡下に切除する早期大腸癌、大腸腺腫の患者をエントリーし、切除前および切除 6 ヶ月後に採血を行い、ペア血漿をディープフリーザーで保管する。2018 年 3 月現在、2016 年 12 月～2017 年 8 月に内視鏡切除された大腸腫瘍 39 例のペア血漿がすでに保管されており、今後さらにエントリーを進める。

2) 血液バイオマーカーの探索・同定

1 で集めた患者ペア血漿と性別・年齢をマッチさせた対照者の血漿を共同研究者であるテキサス大学 MD Anderson がんセンター・田口 歩博士に運搬用液体窒素保存容器にて郵送する。そこで、血漿分子プロファイル (マイクロ RNA、エクソゾーム) の解析を質量分析とマイクロ RNA シークエンシングで行う。

3) 大腸腫瘍の遺伝子・蛋白発現プロファイル解析

藤田医科大学病院で作成された早期大腸癌、大腸腺腫のパラフィンブロックからパラフィン切片を作成し、これを愛知県がんセンター中央病院遺伝子病理診断部・谷田部 恭博

士に郵送する。そこで、パラフィンブロックから DNA を抽出し、以下の遺伝子 (KRAS, EGFR, BRAF, PIK3CA, AKT1, ERBB2, PTEN, NRAS, STK11, MAP2K1, ALK, DDR2, CTNNB1, MET, TP53, SMAD4, FBX7, FGFR3, NOTCH1, ERBB4, FGFR1, FGFR2) の異常を解析する。また、パラフィン切片を hMLH1、hMSH6、hPMS1 の各種抗体で免疫染色を行い、マイクロサテライト不安定性の有無を調べる。

4) 血漿データと腫瘍関連遺伝子・蛋白発現プロファイルの比較

早期大腸癌・大腸腺腫より血中に遊離される血漿分子プロファイルと健常者血漿分子プロファイルの比較、および大腸腫瘍の遺伝子・蛋白発現プロファイル別、病理診断別の血漿分子プロファイルの比較を行い、早期大腸癌・大腸腺腫の血液マーカーを同定する。

3. 研究結果

1) 早期大腸癌・大腸腺腫の患者および健常対照者のエントリー

2018年3月現在、2017年1月～2018年10月に内視鏡切除された大腸腫瘍79例のペア血漿を収集し、そのうち45例はすでに愛知県がんセンター分子診断トランスレーショナルリサーチ分野長・田口 歩博士に搬送した。

血液検査、便検査、感染症検査、ピロリ菌尿素呼気試験、上部消化管内視鏡、大腸内視鏡で異常所見のない健常者44人(男性20例・女性24例、年齢中央値・範囲:44.5歳・24歳～71歳)の血漿は藤田医科大学・消化管内科学講座で冷凍保存されている。

2) 血液バイオマーカーの探索・同定

共同研究者である田口 歩博士は2018年7月にテキサス大学MD Andersonがんセンターから愛知県がんセンターに異動となり、実験の立ち上げに時間がかかったため、血漿分子プロファイル(マイクロRNA、エクソゾーム)は現在解析中である。

3) 大腸腫瘍の遺伝子・蛋白発現プロファイル解析

藤田医科大学病院で2017年1月～2017年10月に内視鏡的摘除が行われ、摘除前、摘除後6ヶ月後の血漿保存されている45例の早期大腸癌、大腸腺腫のパラフィン切片を愛知県がんセンター中央病院遺伝子病理診断部・谷田部 恭博士に郵送し、以下の遺伝子(KRAS, EGFR, BRAF, PIK3CA, AKT1, ERBB2, PTEN, NRAS, STK11, MAP2K1, ALK, DDR2, CTNNB1, MET, TP53, SMAD4, FBX7, FGFR3, NOTCH1, ERBB4, FGFR1, FGFR2)の解析が終了した。大腸腺腫27例(EMR2例、ESD25例)、大腸癌18例(EMR2例、ESD16例)の結果を以下に示す。

病理		大きさ	n	遺伝子異常	
腺腫	腺管腺腫	mild-moderate	<20mm	1	APC point MUT(1/1:100%)
			≥20mm	3	APC point MUT(3/3:100%), K-ras point MUT(1/3:33%)
		severe	<20mm	5	APC point MUT(5/5:100%)
			≥20mm	3	APC point MUT(3/3:100%), K-ras point MUT(2/3:66%)
	腺管絨毛腺腫	severe	≥20mm	13	APC point MUT(11/13:85%), K-ras point MUT(12/13:92%), FBXW7 point MUT(3/13:23%). PIK3CA point MUT(2/13:16%), TP53 point MUT(1/13:8%)
	鋸歯状腺腫	mild-moderate	<20mm	1	BRAF, APC, PTEN, AKT1 point MUT
severe		≥20mm	1	K-ras point MUT	
腺癌	Tis		<20mm	2	APC point MUT(2/2:100%), K-ras point MUT(1/2:50%), FBXW7 point MUT(1/2:50%). PTEN point MUT(1/2:50%), TP53 point MUT(1/2:50%), MSH6/PMS2: deficient
			≥20mm	10	APC point MUT(8/10:80%), APC fs MUT(1/10:10%), K-ras point MUT(7/10:70%). TP53 point MUT(4/10:40%), FBXW7 point MUT(3/10:30%), STK11 point MUT(2/10:20%), CTNNB1 point MUT(1/10:10%), ERBB2/Her2 point MUT(1/10:10%),
	T1a 癌		≥20mm	5	APC point MUT(3/5:60%), APC fs MUT(1/5:20%), K-ras point MUT(2/5:40%). TP53 point MUT(2/5:40%), PIK3CA point MUT(2/5:40%), BRAF point MUT(1/5:20%), AKT1 point MUT(1/5:20%)
	T1b 癌		≥20mm	1	APC point MUT. TP53 point MUT, CTNNB1 point MUT

4) 血漿データと腫瘍関連遺伝子・蛋白発現プロファイルの比較

血漿分子プロファイルが未解析のため、比較していない。