

博士論文

論文題目 大腸癌予後・診断バイオマーカーとしての

組織中 *RAD54B* および血漿遊離 DNA *LINE-1* の役割

氏名 永井 雄三

## 目次

目次 .....	1
略語一覧 .....	3
要旨 .....	4
序文 .....	5
第 1 章 大腸癌予後マーカーとしての大腸癌組織における <i>RAD54B</i> 遺伝子発現の解析	
1-1 背景 .....	8
1-2 実験方法 .....	11
1-3 実験結果 .....	16
1-4 考察 .....	34
第 2 章 大腸癌診断マーカーとしての上漿遊離 DNA における <i>LINE-1</i> 低メチル化レベルの解析	
1-1 背景 .....	39
1-2 実験方法 .....	45
1-3 実験結果 .....	56
1-4 考察 .....	73

結論 .....	82
謝辭 .....	83
引用文獻 .....	84

## 略語一覽

AQAMA: absolute quantitative analysis of methylated alleles

ASP: antisense promoter

BMI: body mass index

cfDNA: cell-free DNA

DRFS: distant recurrence free survival

LHI: *LINE-1* hypomethylation index

mSEPT9: methylated Septin 9

MGB: minor groove binder

NFQ: nonfluorescent quencher

ORF: open reading frame

ROC: Receiver Operating Characteristic

SD: standard deviation;

SP: sense promoter

UICC: Union of International Cancer Control

UTR: untranslated region

## 要旨

本研究では、大腸癌患者における新規バイオマーカーの探索をテーマとして、大腸癌患者の手術検体および血液検体を用い、大腸癌組織における *RAD54B* 遺伝子発現量の定量、および血漿遊離 DNA における *LINE-1* 遺伝子のメチル化レベルの定量を施行し、大腸癌バイオマーカーとしての臨床的有用性を検討した。その結果、大腸癌組織における *RAD54B* 遺伝子発現量が、大腸癌患者の術後の遠隔再発の予測マーカーになりうること、および血漿遊離 DNA における *LINE-1* 遺伝子の低メチル化が大腸癌の早期診断マーカーとして有用である可能性を見出した。

## 序文

近年の大腸癌診療における大腸癌検診と集学的治療の進歩にも関わらず、大腸癌は依然として高い罹患率と死亡率を呈する悪性疾患である [1]。厚生労働省の人口動態調査によれば、本邦においても大腸癌罹患数は年次的に増加傾向であり、2013 年の癌による総死亡数のうち、大腸癌による死亡数は男性では 25808 人で第 3 位、女性では 21846 人で第 1 位を占めるまでに至っており、その治療成績の向上は喫緊の課題となっている [2]。

近年、癌診療においては個々の患者の病態に応じた個別化治療を可能とする様々なバイオマーカーが模索されてきた。代表的なものとして、臨床経過の予測に有用な予後・予測マーカー (prognosis marker/ predictive marker) や、早期発見・治療を可能とする診断マーカー (diagnostic marker) 等が挙げられる [3]。前者の予後・予測マーカーとして、大腸癌診療においては従来から Union of International Cancer Control (UICC) による TNM 分類、および本邦の大腸癌取扱い規約による Stage 分類が広く臨床で使用されてきた [4, 5]。これらの Stage 分類に基づいた大腸癌患者の層別化は、術後の再発率・生存率といった予後予測に有用であると同時に、近年では Stage III および high-risk Stage II の患者に選択的に術後補助化学療法が推奨されるなど [6-8]、大腸癌の進行度に応じた個別化治療にも応用される有用な指標となっている。一方、TNM 分類や大腸癌取扱い規約で Stage I/II と診断された症例や術後補助化学療法を施行した患者にも再発例が存在し、また反対に Stage IV でも長期生存例が存在するなど、Stage 分類による予後予測にも限界がある。このような背景および近年の分子生物学の発展を受けて、TNM 分類に加えてさ

らなる個別化治療を可能とする予後・予測マーカーが開発されてきた。例えば microsatellite instability (MSI) を示す大腸癌症例は microsatellite stable (MSS) の症例に比較して良好な術後成績を示すことが報告されている [9]。また、薬剤の効果や副作用を予測するものとして、*UGT1A1* の遺伝子多型の解析は CPT-11 による化学療法の細胞毒性の予測に使用され [10]、また *KRAS/NRAS* 変異の解析は抗 EGFR 抗体薬による化学療法の効果予測判定に広く普及し使用されている [11, 12]。このような予後・予測マーカーは個々の患者の病態に応じたより選択的な治療指針を与えることを通じて、大腸癌診療の成績向上に寄与するものであると考えられる。

また、早期発見・治療を可能とする診断マーカーの開発も重要である。現在、大腸癌の確定診断法としては大腸内視鏡検査が一般的であるが、患者への侵襲性が高く合併症のリスクも有し、また医療経済的にも高価で医療従事者側の負担も高い検査法であり、大腸癌の診断を目的としたスクリーニング検査として最適とは言い難い。大腸癌の非侵襲的な診断法として、本邦では 1992 年の老人保健法改正に伴い 40 歳以上を対象として便潜血検査による大腸癌スクリーニングが実施されているが、便検査に対する心理的抵抗といった問題もあり、平成 25 年度の国民生活基礎調査によれば便潜血反応による大腸癌検診の受診率は男性 41.4%、女性 34.5% に過ぎず、その検査コンプライアンスは必ずしも高いとは言えないのが現状である [13]。便潜血検査に抵抗のある受診者の多くは血液検査を好むという報告もあり [14]、非侵襲的かつ検査コンプライアンスも良好な血液を対象とした大腸癌診断マーカーの開発に対する需要は高い。

以上のような背景を踏まえ、本論文では大腸癌診療における新規バイオマーカーの探索を目的とし、第 1 章では予後マーカーとして大腸癌組織における

*RAD54B* 遺伝子の発現を、また第 2 章では診断マーカーとして大腸癌患者の血液中の遊離 DNA における *LINE-1* 低メチル化レベルを解析し、それぞれのバイオマーカーとして有用性を検討した。



# 第 1 章

## 大腸癌予後マーカーとしての

## 大腸癌組織における *RAD54B* 遺伝子発現の解析

### 1-1 背景

本章において予測マーカーとして大腸癌組織において解析を行った *RAD54B* は 1999 年に *RAD54* の homolog として初めて同定されたタンパクである [15]。*RAD54B* は SWI/SNF superfamily に属し、DNA の相同組み換え (homologous recombination) において重要な役割を果たすことが複数の基礎実験により報告されている [15-18]。この相同組み換えによる修復は、特に DNA の二本鎖切断による損傷を修復する過程において重要な役割を担っており、したがって相同組み換え修復の異常はゲノム不安定性を引き起こし、さらには癌の発生・進行につながる事が報告されている [19-21]。2014 年にこの *RAD54B* に関する新たな知見として、Yasuhara らは HCT116 大腸癌細胞株の実験によって、*RAD54B* が細胞周期の調節に関与しており、MDM2-MDMX ユビキチンリガーゼ複合体に直接作用して p53 の分解に寄与することで、相同組み換え修復とは異なるメカニズムでゲノム不安定を惹起し、大腸癌の発生・進行に関与する可能性があることを報告した(図 1) [22]。

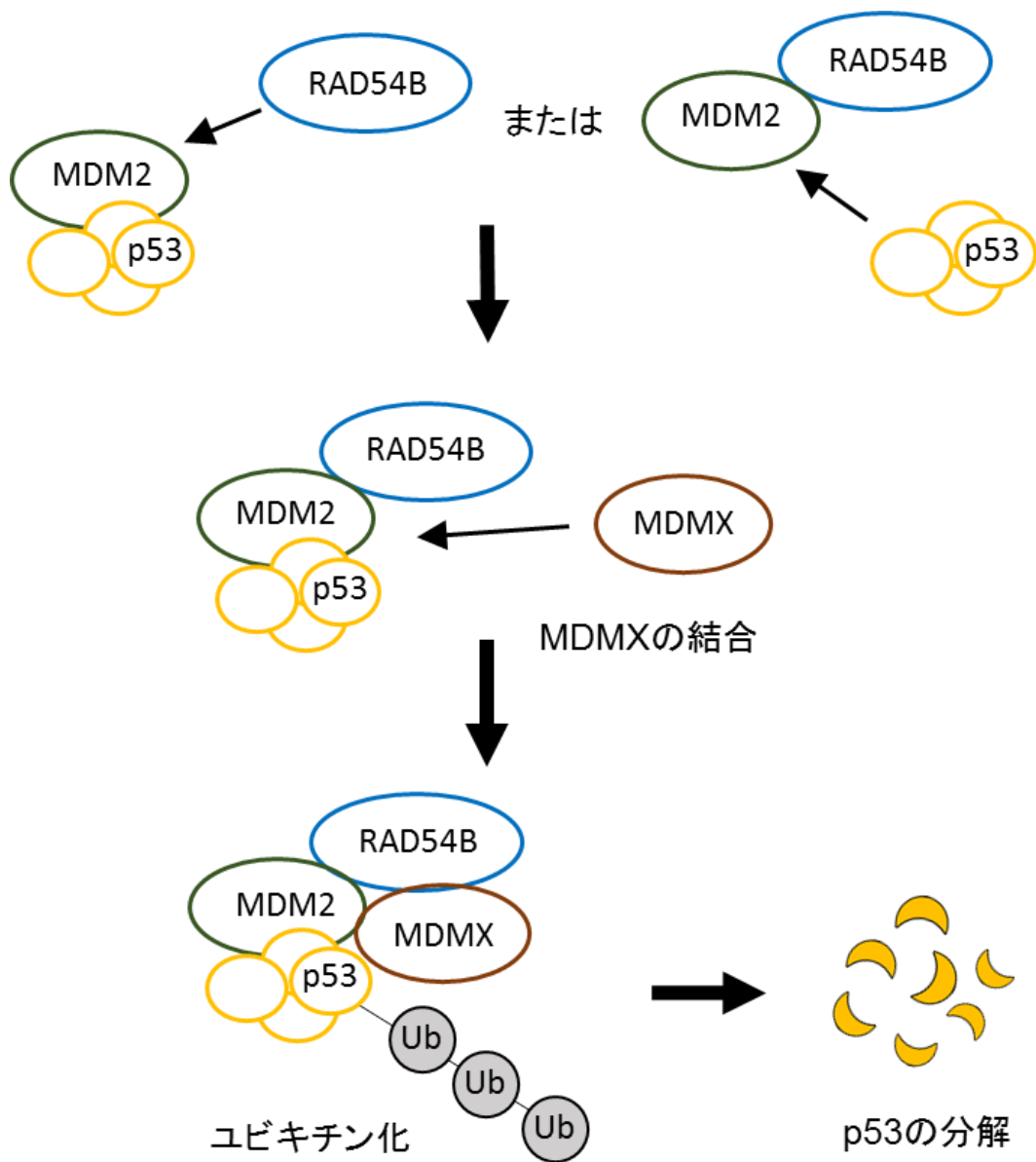


図1 文献 [22] より改変して引用。RAD54Bとp53の関係を示したモデル。  
 p53がRAD54B-MDM2複合体に結合、またはRAD54Bがp53-MDM2複合体に結合し、RAD54B-MDM2-p53複合体が形成されると、RAD54BによってMDMXがMDM2上にリクルートされ、p53のユビキチン化と分解が生じる。

この基礎実験の結果を踏まえ、大腸癌組織における *RAD54B* の高発現が大腸癌患者の予後不良因子として機能するのではないかという仮説を立てた。この仮説に基づき、東京大学医学部附属病院大腸肛門外科で施行した手術で得られた検体を使用し、大腸癌組織における *RAD54B* 遺伝子の発現量をリアルタイム PCR で定量し、臨床病理学的因子や患者の予後との関連性を調べた。

ここで、*RAD54B* と同様に DNA の組み換え相同修復経路に関与する重要なタンパクに *RAD51* がある [23-26]。大腸癌を含む複数の癌において、*RAD51* の発現と予後との関連性を報告した既存の報告が存在した [27-32]。そこで、本研究では *RAD54B* 遺伝子とともに、同一の検体において *RAD51* 遺伝子の発現も調べ、さらに両社の結果を比較することで、*RAD54B* の新規バイオマーカーとしての有用性をより詳細に評価することとした。また、前述の大腸癌細胞株での結果を踏まえ、本研究では *RAD54B* が p53 の分解に関与しているかどうかを実際の大腸癌組織においても調べることにした。この解析は、p53 の標的遺伝子の1つである *CDKN1A (p21/WAF1)* 遺伝子と *RAD54B* 遺伝子の発現量との関連性を検討することで行った。

実臨床における *RAD54B* 遺伝子発現を検討したものとして、これまでカペシタビン + 放射線療法を施行したグリオブラストーマ患者において、*RAD54B* を含む 8 種類の遺伝子発現を解析した報告が存在する [33]。この中で *RAD54B* 遺伝子の発現増加症例は予後が不良であったと報告されているが、少数の検体 (n = 18) を対象としたものでありその評価は限定的である。特に大腸癌においては、*RAD54B* 遺伝子の発現が大腸癌患者に及ぼす影響について詳細に検討した報告は存在せず、本検討が初の報告となる。

## 1-2 実験方法

### 【症例と検体収集】

2008年1月から2012年12月の期間に、東京大学医学部附属病院大腸肛門外科において手術を施行した連続する212例の大腸癌患者を対象とした。このうち2008年1月から2010年12月までの123例を training set、2011年1月から2012年12月までの89例を validation set として解析に用いた。なお大腸癌組織内の遺伝子発現に及ぼす影響を排除するため、術前に化学療法および放射線治療が施行されている症例は本研究からは除外とした。本研究は東京大学医学部附属病院の倫理委員会の承認を受けて施行した(審査番号 G3084-1)。

検体として使用した大腸癌組織と正常粘膜組織は、手術検体より5 mm x 5 mm 大ざつ採取し、ただちに RNAlater Tissue Protect Tubes (QIAGEN) に入れて4°Cで一昼夜反応させたのち、-20°C で保存したものを使用した。

### 【RNA 抽出と cDNA 合成】

大腸癌組織と正常粘膜組織片をバイオマッシャーII (Nippi) を用いて TRIzol Reagent (Life Technologies) 中でホモジナイズしたのち、total RNA を抽出した。抽出した total RNA は DNase I (TAKARA BIO INC) で処理して DNA を除いた。逆転写反応は PrimeScript RT Master Mix (TAKARA BIO INC) を使用して行い、1500 ng の total RNA、PrimeScript RT Master Mix 6  $\mu$ l、DEPC 処理水で全量 30  $\mu$ l に調製した後、37°C 15 分間→85°C で反応させて cDNA を合成し、リアルタイム PCR および cDNA sequencing におけるテンプレートとして使用した。

## 【リアルタイム PCR】

*RAD54B* 遺伝子発現の解析はリアルタイム PCR 法により行った。また背景で述べたように、大腸癌の予後因子として既存の報告があった *RAD51* 遺伝子、および p53 の標的遺伝子のひとつである *CDKN1A* 遺伝子の発現も、同一検体を用いてリアルタイム PCR 法で解析した。内在性コントロールには TATA-binding protein (*TBP*)を用いた。反応には KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (KAPA Biosystems) 使用し、機器は 7500 Fast realtime PCR system (Life Technologies) を用いた。PCR 反応はリアルタイム PCR 用 96 穴プレート 1well あたりに cDNA テンプレート 1.0  $\mu$ l (10 ng)、KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2 x) 10  $\mu$ L、forward および reverse プライマー (10  $\mu$ M) 各々 0.4  $\mu$ l (最終濃度 200 nM)、Rox Reference Dye Low (50 x) 0.4  $\mu$ l、滅菌蒸留水 7.8  $\mu$ l を混合し、初期変性 95°C 20 秒間→(変性反応 95°C 3 秒間→アニーリング/伸長反応 60°C 30 秒間) x 40 サイクルで行い、最後に融解曲線分析(95°C 15 秒間→60°C 1 分間→95°C 15 秒間→60°C 1 分間)を行い PCR 産物の特異性を確認した。使用したプライマーの配列を表 1 に示した。

リアルタイム PCR は全て triplicate で施行し、大腸癌組織および正常粘膜組織の各マーカーの cycle threshold (Ct) の平均値を計算した。それぞれのプライマーセットにおいて PCR 増幅効率の予備実験を行い、*RAD54B* および *RAD51* の遺伝子発現解析には  $\Delta\Delta$ Ct 法を使用し、また *CDKN1A* の遺伝子発現解析には標準曲線法を使用した [34]。*TBP* は内因性コントロールとして *RAD54B*、*RAD51*、*CDKN1A* の解析に用いた。 $\Delta$ Ct 値は標的遺伝子 (*RAD54B* および *RAD51*) の Ct 値と *TBP* の Ct 値の差、 $\Delta\Delta$ Ct 値は個々の患者の大腸癌組織の平均  $\Delta$ Ct 値と正常粘膜組織の  $\Delta$ Ct 値の差として計算し、標的遺伝子の発現量を  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  として求め、解析に使用した。

### 【TP53 遺伝子の cDNA sequencing】

大腸癌組織における TP53 遺伝子の sequencing を行うため、大腸癌組織由来の cDNA をテンプレートに PrimeSTAR HS DNA Polymerase (TAKARA BIO INC) を使用して TP53 遺伝子の PCR を行った。PCR 反応は cDNA テンプレート 1.0  $\mu$ l (50 ng)、5 x PrimeSTAR Buffer 5  $\mu$ l、PrimeSTAR HS DNA Polymerase 0.125  $\mu$ l、2.5 mM each dNTP 混合液 2.0  $\mu$ l、forward および reverse プライマー (10  $\mu$ M) 各々 0.5  $\mu$ l、滅菌蒸留水 15.875  $\mu$ l を混合して全量 25.0  $\mu$ l とした後、(98°C 10 秒間→60°C 5 秒間→72°C 30 秒間) x 35 サイクルで施行した。プライマーは TP53 遺伝子の最初の ATG コドンから 167 番目のグルタミン(Gln167) コドンの領域、および 156 番目のアルギニン(Arg156) コドンから 301 番目のプロリン(Pro301) コドン までの領域をカバーする 2 種類のセットを使用し、大腸癌組織における TP53 ホットスポット変異および後述する 72 番目のコドンのアミノ酸多型を解析した。使用したプライマーの配列を表 1 に示した。

PCR 増幅産物は NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL) のキットを使用してクリーンアップを行い、キット中の Elution Buffer NE 30  $\mu$ l で溶出後、シーケンス反応のテンプレートとして使用した。DNA シーケンス反応は BigDye terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies) を使用し、テンプレート DNA 0.5  $\mu$ l、BigDye Sequencing Buffer 3.5  $\mu$ l、1.6  $\mu$ M プライマー 2.0  $\mu$ l、Ready Reaction Mix 1  $\mu$ l、滅菌蒸留水 13  $\mu$ l を混合して全量 20  $\mu$ l とした後、96°C 1 分間→(96°C 10 秒間→50°C 10 秒間→60°C 4 分間) x 25 サイクルで行った。得られたサンプルはエタノール沈殿で精製後、Hi-Di Formamide (Life Technologies) 20  $\mu$ l に溶解し、3100 Genetic Analyzer (Life Technologies) を用いて塩基配列を解析した。

表 1. プライマーの配列

遺伝子		配列 5' to 3'
<i>RAD54B</i>	Forward	TCCAGGTCTGAATGAAGAGATTAC
	Reverse	TCTAGTACTTTCTTCACTAGGCAG
<i>RAD51</i>	Forward	TATCCAGGACATCACTGCCA
	Reverse	GGTGAAGGAAAGGCCATGTA
<i>CDKN1A</i>	Forward	GACTCTCAGGGTCGAAAACGG
	Reverse	GCGGATTAGGGCTTCCTCTTG
<i>TBP</i>	Forward	TGCTGCGGTAATCATGAGGATA
	Reverse	TGAAGTCCAAGAAGCTTAGCTGGAA
<i>TP53</i> (ATG–Gln167)	Forward	GTGACACGCTTCCCTGGAT
	Reverse	CTCACAAACCTCCGTCATGTG
<i>TP53</i> (Arg156–Pro301)	Forward	GTGCAGCTGTGGGTTGATT
	Reverse	CTCACAAACCTCCGTCATGTG

## 【統計学的解析】

全ての統計学的解析には JMP pro version 10 software packages (SAS Institute) を使用した。大腸癌の Stage 分類には、UICC の TNM 分類 第 7 版を用いた [4]。*RAD54B* と *RAD51* の遺伝子発現と臨床病理学的因子(性別、年齢、腫瘍部位、腫瘍径、腫瘍分化度、リンパ管侵襲、静脈侵襲、術前 CEA 値、術前 CA19-9 値、UICC Stage、T 因子、N 因子、遠隔転移、補助化学療法)との検討においては、連続変数は「中央値(四分位範囲)」で記載し比較には Mann-Whitney U 検定(2 群)または Kruskal-Wallis 検定を用い(3 群以上)、カテゴリー変数は「数(%)」で記載し比較には Pearson's chi-squared 検定を用いた。腫瘍部位は結腸または直腸で 2 群に分類し、また腫瘍径は既存の大腸癌研究で一般的である 5.0 cm をカットオフ値として 2 群に層別化して解析した。遠隔転移再発を予測するための *RAD54B* 遺伝子のカットオフ値は、Receiver Operating Characteristic (ROC) 曲線上で、(感度+特異度-1)が最大値となる点 (Youden index) から決定した [35]。標的遺伝子発現の相関関係の解析は Spearman の順位相関係数で行った。生存曲線解析は Kaplan-Meier 法で行い、2 曲線の比較は Log-rank 検定で行った。多変量解析には Cox 比例ハザードモデルを使用し、結果は「ハザード比(95%信頼区間)」で記載した。単変量解析および多変量解析における T 因子、および N 因子は、既存の大腸癌予後マーカー研究において T 因子は深達度 SS 以上かどうか、また N 因子はリンパ節転移があるかどうか、を基準に層別化して解析するものが多いことから、本研究でも同様に T1-2 vs T3-4、N0 vs N1-2 によって層別化して解析した。また、多変量解析においては、*RAD54B* の発現量に加え、予後因子として重要と考えられた T 因子および N 因子を含めた 3 因子による解析を行った。*P* 値が 0.05 未満を統計学的に有意とした。



### 1-3 実験結果

#### 【大腸癌組織における *RAD54B* と *RAD51* の遺伝子発現の解析】

はじめに training set の 123 例の大腸癌組織における *RAD54B* と *RAD51* 遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法で検討した(表 2)。*RAD54B* 遺伝子発現量は中央値 2.60 (2.50-3.99) であり、123 例中 116 例 (94.3%) において、発現量が 1.00 以上であり対応する正常粘膜組織に比べて大腸癌組織で *RAD54B* の遺伝子発現が増加していることが確認された。これに対して大腸癌組織における *RAD51* 遺伝子の発現量は中央値 1.15 (0.80-1.56) であり、対応する正常粘膜に比較して発現が増加している症例は 74 例 (60.2%) と *RAD54B* に比較して有意に少なかった ( $P = 0.0008$ )。

表 2. training set における *RAD54B* および *RAD51* 遺伝子発現量の比較 (n = 123)

	n	<i>RAD54B</i> 発現量*	n	<i>RAD51</i> 発現量*	<i>P</i> 値
全患者	123	2.60 (2.50–3.99)	123	1.15 (0.80–1.56)	
発現量 <1.00	7 (5.7%)		49 (39.8%)		<b>0.0008</b>
発現量 ≥1.00	116 (94.3%)		74 (60.2%)		

*P* 値: Pearson's chi-squared 検定

\* 遺伝子発現量は対応する正常粘膜に対する比

【*RAD54B* と *RAD51* 遺伝子発現量と臨床病理学的因子との関連】

training set における *RAD54B* と *RAD51* 遺伝子発現と臨床病理学的因子との関連を表 3 に示す。性別、年齢、腫瘍部位、腫瘍径、腫瘍分化度、リンパ管侵襲、静脈侵襲、術前 CEA 値、術前 CA19-9 値、UICC Stage、T 因子、N 因子について検討を加えたが、これらの因子と *RAD54B* の遺伝子発現量との間に有意な関連は認められなかった。同様に *RAD51* 遺伝子発現量とこれら臨床病理学的因子の間にも有意な関連は認められなかったが、唯一リンパ管侵襲陽性例で *RAD51* 遺伝子発現量が有意に高値であった ( $P = 0.027$ )。

表 3. training set における *RAD54B*、*RAD51* 発現と臨床病理学的因子 (n = 123)

因子		n (%)	<i>RAD54B</i> 発現量*	P 値	<i>RAD51</i> 発現量*	P 値
性別	男性	65 (53)	2.46 (1.52–3.60)	0.11	1.02 (0.71–1.50)	0.65
	女性	58 (47)	2.78 (2.16–4.16)		1.23 (0.84–1.62)	
年齢	<65	56 (46)	2.72 (1.97–4.19)	0.91	1.14 (0.81–1.56)	0.97
	≥65	67 (54)	2.50 (2.10–3.65)		1.15 (0.77–1.57)	
腫瘍部位	結腸	96 (78)	2.69 (2.05–4.22)	0.28	1.19 (0.79–1.58)	0.34
	直腸	27 (22)	2.42 (1.97–3.40)		1.02 (0.80–1.48)	
腫瘍径 (cm)	<5.0	66 (54)	2.48 (2.05–3.24)	0.12	1.17 (0.80–1.53)	0.93
	≥5.0	57 (46)	2.88 (1.98–4.73)		1.05 (0.78–1.58)	
腫瘍分化度	高分化	57 (46)	2.48 (1.98–3.33)	0.42	1.20 (0.79–1.56)	0.68
	中分化	62 (51)	2.62 (2.08–4.33)		1.11 (0.78–1.57)	
	低分化	4 (3)	4.47 (1.97–5.40)		1.50 (0.82–2.74)	
リンパ管侵襲	陽性	47 (38)	2.66 (1.57–4.57)	0.92	1.35 (0.97–1.79)	0.027
	陰性	76 (62)	2.56 (2.14–3.69)		1.01 (0.79–1.48)	
静脈侵襲	陽性	27 (22)	2.58 (2.00–4.12)	0.94	1.13 (0.80–1.57)	0.97
	陰性	96 (78)	2.56 (2.05–3.41)		1.18 (0.79–1.53)	
術前 CEA	<5.0 ng/ml	61 (50)	2.44 (1.87–4.11)	0.67	1.17 (0.80–1.56)	0.28
	≥5.0 ng/ml	61 (50)	2.72 (2.10–3.82)		1.14 (0.79–1.56)	
術前 CA19-9	<37 ng/ml	99 (81)	2.56 (1.98–3.78)	0.59	1.10 (0.80–1.56)	0.26
	≥37 ng/ml	23 (19)	2.97 (2.10–4.54)		1.35 (0.69–1.93)	
Stage (UICC)	I	13 (11)	2.58 (2.13–3.04)	0.20	1.09 (0.76–1.38)	0.078
	II	51 (41)	2.72 (2.23–4.45)		1.18 (0.80–1.56)	
	III	44 (36)	2.42 (1.43–3.59)		1.02 (0.73–1.53)	
	IV	15 (12)	2.98 (2.11–5.26)		1.56 (1.13–2.67)	
T 因子	T1	5 (4)	2.21 (1.05–5.31)	0.16	0.68 (0.36–9.42)	0.51
	T2	18 (15)	2.76 (2.08–3.03)		1.09 (0.87–1.40)	
	T3	60 (49)	2.44 (1.62–3.94)		1.13 (0.78–1.53)	
	T4	40 (32)	2.87 (2.18–5.32)		1.28 (0.81–1.79)	
N 因子	N0	67 (55)	2.72 (2.21–3.87)	0.23	1.15 (0.80–1.51)	0.38
	N1	47 (38)	2.46 (1.53–3.42)		1.04 (0.78–2.28)	
	N2	9 (7)	4.54 (1.77–6.00)		1.39 (1.11–1.76)	
遠隔再発 (Stage I–III)	有	15 (12)	3.87 (2.55–4.88)	0.031	1.16 (0.81–1.79)	0.69
	無	93 (76)	2.46 (1.92–3.24)		1.07 (0.78–1.52)	

P 値: Mann-Whitney U 検定 (2 群)、Kruskal-Wallis 検定 (3 群以上)

\* 遺伝子発現量は対応する正常粘膜に対する比

### 【*RAD54B*と*RAD51* 遺伝子発現量と患者予後との関連】

training set の 123 例を使用して *RAD54B* と *RAD51* 遺伝子発現量と患者予後との関連性を検討した。Stage I-III の症例は 108 例であり、術後観察期間中央値 50.7 ヶ月 (40.9-59.9 ヶ月) の期間中に 15 例に遠隔転移再発が認められた (表 3)。遠隔転移再発が認められた群と認められない群において、*RAD54B* の遺伝子発現量を検討してみると、遠隔転移再発群において有意に *RAD54B* 遺伝子発現量が高く [再発有り: 3.87 (2.55-4.88) vs. 再発無し: 2.46 (1.92-3.24);  $P = 0.031$ ]、*RAD54B* の発現増加が予後不良因子として働く可能性が示唆された。これに対し *RAD51* の遺伝子発現量と遠隔転移再発の有無に有意差は認められなかった [1.16 (0.81-1.79) vs. 1.07 (0.78-1.52);  $P = 0.69$ ]。この結果を踏まえ、*RAD54B* の新規バイオマーカーとしての可能性をさらに検討するため、術後の無遠隔再発生存率 (DRFS: Distant recurrence free survival) を予後解析の主要エンドポイントとし、さらなる解析を進めた

### 【*RAD54B* 高値群と低値群の臨床病理学的因子の特徴】

*RAD54B* 遺伝子発現量の遠隔転移再発を予測するマーカーとしての可能性を検討するため、*RAD54B* 遺伝子発現量と遠隔転移再発の有無から ROC 解析によって最適なカットオフ値を決定した (図 2A)。得られたカットオフ値 3.63 を用いて、training set における 108 例の Stage I-III 症例を *RAD54B* 低値群 79 例と高値群 29 例の 2 群に層別化した。

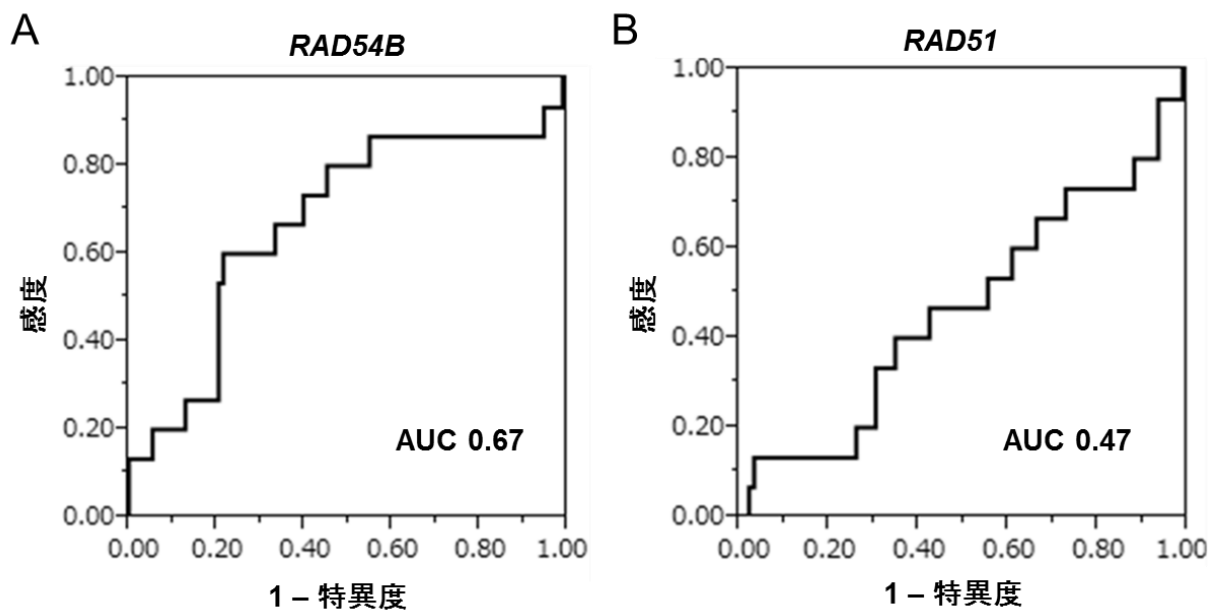


図 2 遠隔転移再発の有無における *RAD54B* と *RAD51* の ROC 曲線による解析。  
 (A) training set における *RAD54B* の解析。Youden Index による *RAD54B* 遺伝子発現の最適カットオフ値は 3.63 (AUC 0.67,  $P = 0.011$ ) と計算された。  
 (B) 同じく training set における *RAD51* の解析。*RAD51* では ROC 曲線における AUC が低く、臨床的に意義のあるカットオフ値を定めることができなかった ( $P = 0.96$ )。

表 4 に *RAD54B* 低値群と高値群の臨床病理学的特徴を示したが、高値群において T 因子が進行した症例が有意に多かったものの ( $P = 0.027$ )、その他の性別、年齢、腫瘍部位、腫瘍径、腫瘍分化度、リンパ管侵襲、静脈侵襲、術前腫瘍マーカー値 (CEA、CA19-9)、UICC Stage、N 因子において 2 群に有意差は認められず、また術後補助化学療法の実施率も 2 群間で有意差はなかった ( $P = 0.95$ )。一方、術後観察期間中央値 50.7 ヶ月 (40.9-59.9 ヶ月) の期間中、低値群の 6 / 79 例 (7.6%) および高値群の 9 / 29 例 (31.0%) に遠隔転移再発が認められ、高値群で有意に遠隔転移再発をきたす症例が多かった ( $P = 0.002$ )。

なお、*RAD51* 遺伝子においては、ROC 曲線における AUC が低く、臨床的に意義のあるカットオフ値を定めることができなかった (図 2B)。

表 4. *RAD54B* 低値群と高値群の臨床病理学的因子の比較 ( training set)

training set (Stage I–III, n = 108)		<i>RAD54B</i> 発現量		P 値
		低値 (n=79)	高値 (n=29)	
因子		n (%)	n (%)	
性別	男性	44 (55.7)	13 (44.8)	0.32
	女性	35 (44.3)	16 (55.2)	
年齢	<65	32 (40.5)	14 (48.3)	0.47
	≥65	47 (59.5)	15 (51.7)	
腫瘍部位	結腸	58 (73.4)	26 (89.7)	0.072
	直腸	21 (26.6)	3 (10.3)	
腫瘍径 (cm)	<5.0	48 (60.8)	14 (48.3)	0.24
	≥5.0	31 (39.2)	15 (51.7)	
腫瘍分化度	高分化	41 (51.9)	12 (41.4)	0.33
	中・低分化	38 (48.1)	17 (58.6)	
リンパ管侵襲	陽性	24 (30.4)	12 (41.4)	0.28
	陰性	55 (69.6)	17 (58.6)	
静脈侵襲	陽性	59 (74.7)	5 (17.2)	0.38
	陰性	20 (25.3)	24 (82.8)	
術前 CEA	<5.0 ng/ml	41 (51.9)	16 (55.2)	0.76
	≥5.0 ng/ml	38 (48.1)	13 (44.8)	
術前 CA19-9	<37 ng/ml	69 (87.3)	24 (82.8)	0.88
	≥37 ng/ml	10 (12.3)	5 (17.2)	
Stage (UICC)	I	12 (15.2)	1 (3.4)	0.17
	II	34 (43.0)	17 (58.6)	
	III	33 (41.8)	11 (37.9)	
T 因子	T1–2	21 (26.6)	2 (6.9)	0.027
	T3–4	58 (73.4)	27 (93.1)	
N 因子	N0	46 (58.2)	18 (62.1)	0.72
	N1–2	33 (41.8)	11 (37.9)	
補助化学療法	有	24 (30.4)	9 (31.0)	0.95
	無	55 (69.6)	20 (69.0)	
遠隔転移再発	有	6 (7.6)	9 (31.0)	0.002
	無	73 (92.4)	20 (69.0)	

P 値: Pearson's chi-squared test



### 【*RAD54B* 遺伝子発現量と遠隔無再発生存率 (DRFS) の関連性の検討】

前述の通り ROC 曲線解析による結果を用いて training set における Stage I-III の 108 例を *RAD54B* 低値群と高値群に層別化し、Kaplan-Meier 曲線によって DRFS を Log-rank 検定で検討すると、*RAD54B* 高値群は有意に予後不良であった (3 年 DRFS: 低値群 93.5%、高値群 68.5%、 $P = 0.0013$ 、図 3A)。*RAD54B* 発現、および予後因子として臨床的に重要と考えられた T 因子および N 因子を含めた Cox 比例ハザードモデルによる多変量解析では、*RAD54B* 遺伝子の高発現は DRFS における唯一の独立した予後不良因子であった (ハザード比 4.31、95%信頼区間 1.53-13.1、 $P = 0.006$ 、表 5)。

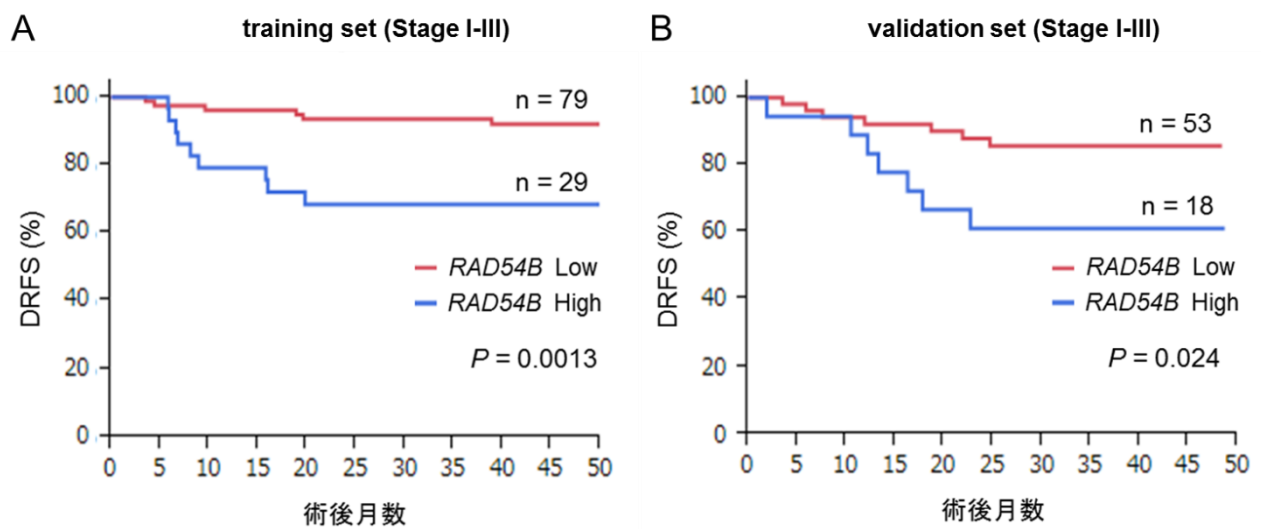


図3 Kaplan-Meier 曲線による遠隔無再発生存率 (DRFS) の解析。  
 (A) training set における Stage I-III の大腸癌患者 108 人の解析。*RAD54B* 遺伝子高発現群は、*RAD54B* 遺伝子低発現群よりも有意に予後不良であった (Log-rank 検定、 $P = 0.0013$ )。 (B) validation set における Stage I-III の大腸癌患者 71 人の解析。validation set においても *RAD54B* 遺伝子高発現群は低発現群よりも有意に予後不良であった (Log-rank 検定、 $P = 0.024$ )。

表 5. DRFS における単変量および多変量解析 (training set)

training set (Stage I–III, n = 108)	単変量	多変量		
	P 値	ハザード比	95%信頼区間	P 値
<i>RAD54B</i> (高発現 vs 低発現)	<b>0.0013</b>	4.31	1.53 – 13.1	<b>0.006</b>
T 因子 (T1–2 vs T3–4)	0.14	2.96	0.57 – 54.4	0.23
N 因子 (N0 vs N1–2)	0.14	2.44	0.88 – 7.23	0.09
腫瘍分化度 (高 vs 中・低分化)	0.07	–	–	–
リンパ管侵襲 (陽性 vs 陰性)	0.09	–	–	–
静脈侵襲 (陽性 vs 陰性)	0.33	–	–	–
術前 CEA (<5.0 vs ≥5.0 ng/ml)	0.51	–	–	–
術前 CA19-9 (<37 vs ≥37 ng/ml)	0.89	–	–	–
年齢 (<65 vs ≥65)	0.37	–	–	–
腫瘍部位 (結腸 vs 直腸)	0.94	–	–	–
性別 (男性 vs 女性)	0.34	–	–	–
腫瘍径 (cm) (<5.0 vs ≥5.0)	0.49	–	–	–

P 値: 単変量解析は Log-rank 検定、多変量解析は Cox 比例ハザードモデルで解析

略語: DRFS, Distant recurrence free survival.

### 【validation set における解析】

続いて training set で求めた *RAD54B* 遺伝子発現のカットオフ値 3.63 を用いて、validation set における Stage I-III 71 例を同様に低値群 53 例と高値群 18 例に層別化した。表 6 に示す様に validation set における低値群と高値群の間において、性別、年齢、腫瘍部位、腫瘍径、腫瘍分化度、リンパ管侵襲、静脈侵襲、術前腫瘍マーカー値 (CEA、CA19-9)、UICC Stage、T 因子、N 因子に有意差は認められなかったが、術後観察期間中央値 37.0 ヶ月 (28.5-46.0 ヶ月) の期間中、低値群の 7 / 53 例 (13.2%) および高値群の 7 / 18 例 (38.9%) に遠隔転移再発を認め、training set と同様に高値群で有意に遠隔転移再発をきたす症例が多かった ( $P = 0.024$ )。

Kaplan-Meier 曲線による解析でも、training set と同様に *RAD54B* 高値群は有意に予後不良であった (3 年 DRFS: 低値群 85.7%、高値群 61.1%、 $P = 0.024$ 、図 3B)。また、Cox 比例ハザードモデルを用いた多変量解析においても、*RAD54B* 遺伝子の高発現は DRFS における独立した予後不良因子であった (ハザード比 3.63、95%信頼区間 1.23-10.7、 $P = 0.021$ 、表 7)。

表 6. *RAD54B* 低値群と高値群の臨床病理学的因子の比較 (validation set)

validation set (Stage I-III, n = 81)		<i>RAD54B</i> 発現量		P 値
		低値 (n =53)	高値 (n =18)	
因子		n (%)	n (%)	
性別	男性	33 (62.3)	10 (55.6)	0.61
	女性	20 (37.7)	8 (44.4)	
年齢	<65	22 (41.5)	4 (22.2)	0.14
	≥65	31 (58.5)	14 (77.8)	
腫瘍部位	結腸	37 (69.8)	12 (66.7)	0.80
	直腸	16 (30.2)	6 (33.3)	
腫瘍径 (cm)	<5.0	28 (52.8)	8 (44.4)	0.54
	≥5.0	25 (47.2)	10 (55.6)	
腫瘍分化度	高分化	26 (49.1)	6 (33.3)	0.25
	中・低分化	27 (50.9)	12 (66.7)	
リンパ管侵襲	陽性	19 (35.8)	3 (16.7)	0.13
	陰性	34 (64.2)	15 (83.3)	
静脈侵襲	陽性	37 (69.8)	12 (66.7)	0.80
	陰性	16 (30.2)	6 (33.3)	
術前 CEA	<5.0 ng/ml	29 (54.7)	7 (38.9)	0.25
	≥5.0 ng/ml	24 (45.3)	11 (61.1)	
術前 CA19-9	<37 ng/ml	43 (81.1)	15 (83.3)	0.83
	≥37 ng/ml	10 (18.9)	3 (16.7)	
Stage	I	7 (13.2)	3 (16.7)	0.88
	II	19 (35.8)	7 (38.9)	
	III	27 (50.9)	8 (44.4)	
T 因子	T1-2	9 (17.0)	4 (22.2)	0.62
	T3-4	44 (83.0)	14 (77.8)	
N 因子	N0	26 (49.1)	11 (61.1)	0.38
	N1-2	27 (50.9)	7 (38.9)	
補助化学療法	有	23 (43.4)	6 (33.3)	0.45
	無	30 (56.6)	12 (66.7)	
遠隔転移再発	有	7 (13.2)	7 (38.9)	0.024
	無	46 (86.8)	11 (61.1)	

P 値: Pearson's chi-squared test

表 7. DRFS における単変量および多変量解析 (validation set)

validation set (Stage I–III, n = 81)	単変量		多変量	
	P 値	ハザード比	95%信頼区間	P 値
<i>RAD54B</i> (高発現 vs 低発現)	<b>0.024</b>	3.63	1.23 – 10.7	<b>0.021</b>
T 因子 (T1–2 vs T3–4)	0.18	3.43	0.66 – 63.1	0.17
N 因子 (N0 vs N1–2)	0.13	2.18	0.74 – 7.21	0.16
腫瘍分化度 (高 vs 中・低分化)	0.34	–	–	–
リンパ管侵襲 (陽性 vs 陰性)	0.54	–	–	–
静脈侵襲 (陽性 vs 陰性)	0.10	–	–	–
術前 CEA (<5.0 vs ≥5.0 ng/ml)	0.07	–	–	–
術前 CA19-9 (<37 vs ≥37 ng/ml)	0.19	–	–	–
年齢 (<65 vs ≥65)	0.41	–	–	–
腫瘍部位 (結腸 vs 直腸)	0.74	–	–	–
性別 (男性 vs 女性)	0.71	–	–	–
腫瘍径 (cm) (<5.0 vs ≥5.0)	0.84	–	–	–

P 値: 単変量解析は Log-rank 検定、多変量解析は Cox 比例ハザードモデルで解析

略語: DRFS, Distant recurrence free survival.

### 【RAD54B 遺伝子発現と CDKN1A 遺伝子発現の関連性の検討】

本章の背景で述べたように大腸癌細胞株を用いた *in vitro* の実験によって、RAD54B は MDM2-MDMX ユビキチンリガーゼ複合体に直接作用して p53 の分解に関与することで、ゲノム不安定を惹起し、大腸癌の発生・進行に関与する可能性があることが報告されていることから [22]、RAD54B と p53 の関連性を大腸癌組織において検討した。野生型の p53 タンパクは turn over が早く発現の定量化が困難であるが p53 タンパクは標的遺伝子である CDKN1A 遺伝子の転写を活性化するため、CDKN1A 遺伝子の発現量の変化は p53 タンパクの機能を反映することが報告されている [36, 37]。p53 タンパクをコードする TP53 遺伝子は大腸癌の約 40-50% の症例でホットスポット変異を有し [38]、また p53 タンパクにホットスポット変異があるとその転写活性が低下することが知られている。したがって TP53 遺伝子ホットスポット変異例を含めると解析が困難となることが予想されたため、本検討は TP53 遺伝子ホットスポット変異のない症例に限定することとし、CDKN1A 遺伝子発現量をリアルタイム PCR で定量後、RAD54B 遺伝子発現量との関連性を調べることとした。TP53 遺伝子変異の解析においては、図 4 に示すように大腸癌における TP53 のホットスポット変異が存在するコドン 100 から 300 の領域をカバーするように cDNA sequencing を行った。

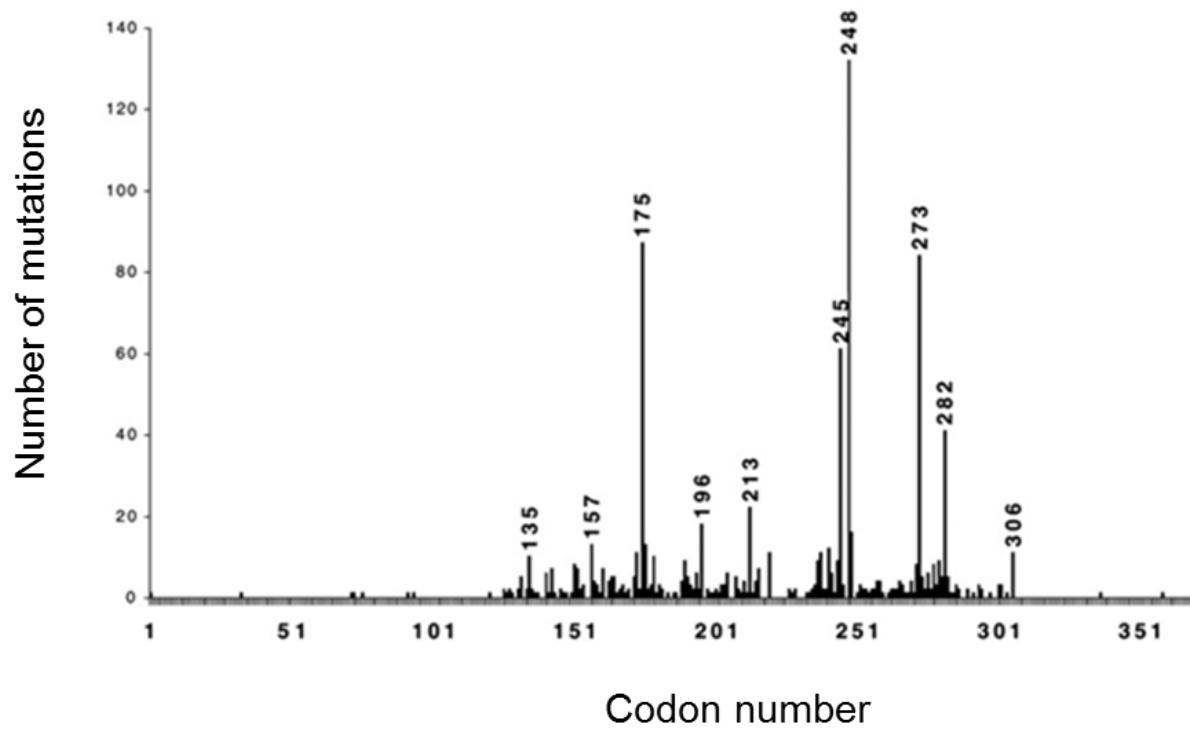


図4 大腸癌における *TP53* 遺伝子の変異。文献 [39] から改変して引用。  
*TP53* 遺伝子の変異はそのほとんどが 100 番目から 300 番目のコドンに集中している。



*TP53* 遺伝子の cDNA sequencing は training set と validation set の両者を合計した計 212 例において施行し、計 92 例の *TP53* 遺伝子のホットスポット変異のない症例を選別した。この 92 例において、*CDKN1A* と *RAD54B* の遺伝子発現量の関連性を調べると、*RAD54B* 遺伝子発現量が中程度 (1.00-2.95) の 60 症例において両者の遺伝子発現量の間には弱いながらも有意な負の相関関係が認められた ( $\rho = -0.29$ ,  $P = 0.027$ , 図 5A)。

前述のように既存の報告において *RAD54B* による p53 タンパクの分解に *MDM2* が関与することが報告されていることから [22]、p53 の 72 番目のアミノ酸のプロリン (Pro72) とアルギニン (Arg72) の多型に注目した。両者は標的遺伝子である *CDKN1A* の転写活性化能に差はないものの、Arg72 であるものは Pro72 であるものよりも *MDM2* を介したユビキチン化による分解を受けやすいことが報告されている [40]。そこで *TP53* ホットスポット変異のない 92 例のうち、Arg72 であったものを調べてみると 34 例であった。これら 34 例において *RAD54B* と *CDKN1A* の発現量の関係を調べてみると、*RAD54B* 遺伝子発現量が 6.00 未満の範囲において、両者の間にはさらに強い負の相関関係が認められた ( $\rho = -0.44$ ,  $P = 0.0099$ , 図 5B)。

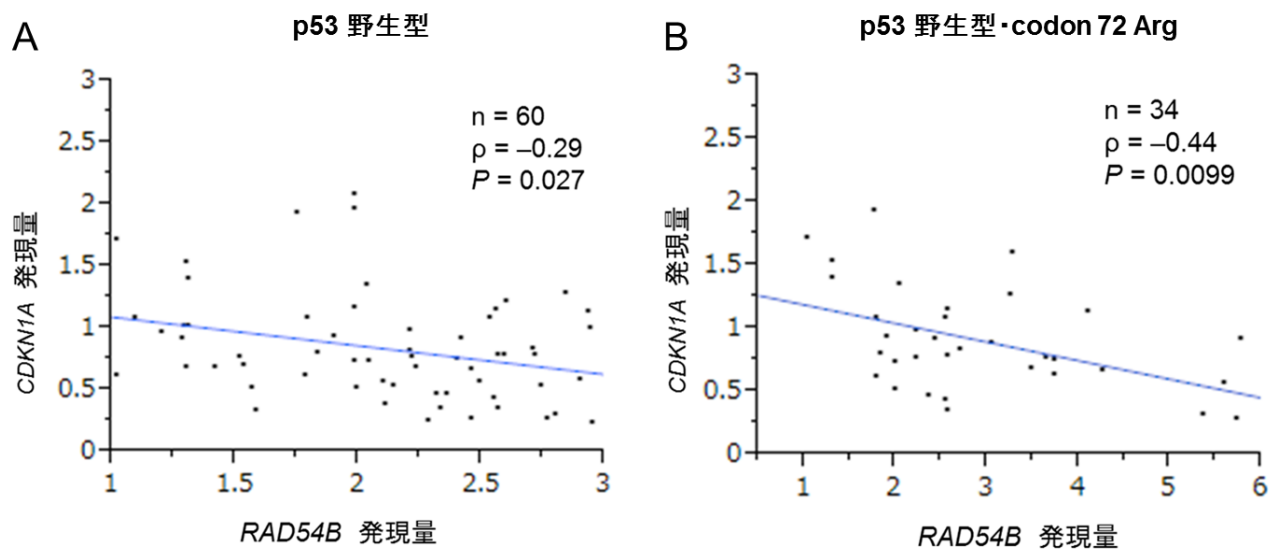


図5 *RAD54B* 遺伝子と *CDKN1A* 遺伝子の発現量の相関関係の検討。  
 (A) *TP53* にホットスポット変異がない野生型の大腸癌における両遺伝子の発現量には、*RAD54B* 遺伝子発現量が 1.00-2.95 の範囲において、弱いながらも有意な負の相関関係が認められた (Spearman の順位相関係数、 $\rho = -0.29$ ,  $P = 0.027$ )。 (B) *TP53* にホットスポット変異がなくかつ 72 番目のアミノ酸が Arg 多型であった大腸癌における両遺伝子の発現量には、*RAD54B* 遺伝子発現量が 6.00 未満の範囲において、有意な負の相関関係が認められた (Spearman の順位相関係数、 $\rho = -0.44$ ,  $P = 0.0099$ )。

## 1-4 考察

RAD54B は 1999 年に RAD54 の homolog として同定され、基礎実験によって相同組み換えによる DNA 修復系に重要な役割を果たすことが報告されている [15-18]。しかし、これまで RAD54B の臨床における有用性を報告した研究はほとんど存在しない。本研究は大腸癌患者における *RAD54B* 遺伝子発現の予後予測因子としての臨床的有用性を初めて報告したものである。

本研究では、training set としてまず 2010 年以前に手術を施行された 123 例を対象とし、切除標本を用いて *RAD54B* の mRNA 発現量をリアルタイム PCR で定量し、94.3%にあたる 116 例において、*RAD54B* 遺伝子発現量が正常粘膜組織に比較して有意に増加していたことを確認した。この結果に基づき、*RAD54B* 遺伝子発現と患者予後を含めた各種の臨床病理学的因子との関連を解析し、術後の遠隔転移再発を呈した症例において *RAD54B* 遺伝子発現量が有意に高いことを見出した。この結果に基づき ROC 解析を用いて *RAD54B* の至適カットオフ値を決定し、Stage I-III の症例において *RAD54B* 遺伝子の高発現群が、低発現群に比較して有意に不良な遠隔無再発生存率 (DRFS) を呈することを示した。さらに Cox 比例ハザードモデルにおける多変量解析においても *RAD54B* 遺伝子の高発現が DRFS における有意な予後不良因子であることを示した。さらに 2011 年以降の 89 例を validation set として用い、training set で求めたカットオフ値を適用して同様の解析を施行し、validation set においても *RAD54B* の高発現が有意な予後不良因子であることを再現した。本研究では 2 つの独立したコホートを使用して解析を施行したことにより、*RAD54B* の遺伝子高発現が大腸癌患者の予後不良因子として有用であることを再現

性をもって十分に示すことができたと考える。本研究の結果から、術後の大腸癌患者を *RAD54B* の発現量の高低で層別化することでその再発リスクを予測し、補助化学療法を施行したり、より術後の再発フォローアップをより慎重に行ったりする症例を選択するなどの臨床的な有用性が期待される。

また *RAD54B* の解析と同時に、*RAD51* についても同様のリアルタイム PCR 法により mRNA 発現量を定量した。*RAD51* も *RAD54B* 同様に相同組み換えによる DNA 修復において中心的な役割を果たすとされているタンパクである [23-26]。*RAD51* の発現と癌との関連性については過去に複数の報告が存在し、これまで非小細胞肺癌、頭頸部癌、食道癌、乳癌、悪性黒色腫、および大腸癌において、*RAD51* の高発現が予後不良因子であると報告されている [27-32]。しかしながら、乳癌とグリオブラストーマにおいては、*RAD51* の高発現が予後良好因子であったという相反する結果を報告した研究もあり [41, 42]、その予後予測因子としての評価はいまだ定まってはいない。本研究では、この *RAD51* 遺伝子の発現も *RAD54B* と同じ検体を用いて同時に解析し、結果を比較することで *RAD54B* のバイオマーカーとしての有用性をより客観的に評価した。*RAD51* 遺伝子発現は training set の 123 例中、60.2%に相当する 74 例で正常粘膜組織に比較して大腸癌患者で上昇していたが、この比率は *RAD54B* と比較すると有意に低率であり、また発現量自体も少ない結果であった。*RAD54B* 同様に予後因子としての検討を試みたものの、ROC 曲線において臨床的に意義のあるカットオフ値を定めることができず、本研究の患者群では *RAD51* 遺伝子発現の予後因子としての有用性を見出すことはできなかった。大腸癌を含む既存の報告と本研究の *RAD51* 遺伝子発現の結果が相違した理由として、既存の報告では *RAD51* の発現を免疫組織化学染色法によって検討しているが、本研究ではリアルタイム PCR を用いて検討して

おり、結果として前者では RAD51 のタンパク量を、後者では RAD51 の mRNA 量を評価したこととなる。これらの解析方法、解析対象の違いは、本研究と既存の報告との相違を説明する一因であると考ええる。本研究の結果では、RAD51 タンパク発現量と大腸癌患者の予後との関連性は未検討であるため不明であるが、RAD51 遺伝子発現は大腸癌患者の予後因子とはならないことが示唆された。一方で、RAD54B と RAD51 はともに DNA 相同組み換え修復における重要な因子と考えられているが、同一の大腸癌組織において RAD54B 発現量の方が RAD51 発現量よりも多く、さらに大腸癌患者の予後とも関連していたという本研究の結果からは、RAD54B が相同組み換え修復機構とは異なる経路を通じて、大腸癌の予後不良因子として働く可能性が示唆されるものと考えられた。

そこで、Yasuhara らが報告した RAD54B が MDM2-MDMX ユビキチンリガーゼ複合体を介して p53 の分解を促進するという HCT116 大腸癌細胞株を用いた基礎実験結果に基づき [22]、本研究では RAD54B 遺伝子発現の解析に用いたものと同じ検体を用いて p53 の標的遺伝子のひとつである CDKN1A の遺伝子発現量をリアルタイム PCR で定量し、RAD54B 遺伝子発現量との関連性を検討した。この検討に際しては、TP53 遺伝子は大腸癌の約 40-50%の症例でホットスポット変異を有し [38]、ホットスポット変異例では p53 の転写因子としての機能が低下することが判明していることから、解析結果を明瞭にするために p53 ホットスポット変異のない症例のみを対象とすることとした。全 212 例の大腸癌組織を対象として TP53 遺伝子のホットスポット変異の有無を cDNA シークエンシングで調べ、p53 野生型の 92 症例を抽出した。その結果、RAD54B の遺伝子発現量が 1 以上 3.00 未満の症例において、RAD54B と CDKN1A の遺伝子発現量の間には弱いながらも負の相関があることを見出した。さらに、p53 の多

型が Arg72 である場合、Pro72 の多型よりも MDM2 を介したユビキチン化による分解をうけやすいという報告があることから [40]、より解析結果を明瞭にするために 34 例の Arg72 型の症例に限って解析したところ、*RAD54B* と *CDKN1A* の遺伝子発現量の間さらに強い有意な負の相関関係を見出した。これらの結果から、間接的にはあるが、大腸癌細胞株のみならず大腸癌組織の検体においても *RAD54B* が MDM2 を介した p53 の分解に寄与することで大腸癌患者の予後不良因子として働いていることが示唆された。一方で、*RAD54B* の遺伝子発現量が非常に高い大腸癌組織においては、*CDKN1A* との有意な相関関係を示すことはできず、*RAD54B* が異常高発現する大腸癌においては *RAD54B* と p53 の系以外の別のメカニズムの存在が示唆され、この点に関しては今後更なる検討が必要であると考えられた。

これまで複数の研究で *RAD51* の高発現が化学療法および放射線療法に対する抵抗性を惹起すると報告されている [43-45]。*RAD54B* に関しても、*RAD54B* をノックアウトした HCT116 大腸癌細胞株のヌードマウスへのゼノグラフトモデルでは、*RAD54B* 野生型のものよりもオキサリプラチンや 5-FU によって増殖が遅くなることが報告されている [22]。これらの基礎実験の結果からは、*RAD54B* の高発現を認める大腸癌患者は化学療法に対する抵抗性を示すことが予想され、さらには *RAD54B* の発現を阻害することで化学療法への感受性を高める治療・創薬への応用可能性も示唆される。残念ながら本研究では限られた症例数のために *RAD54B* の遺伝子高発現が化学療法に及ぼす臨床的な影響については十分な検討を行うことができなかった。この点は今後の研究課題であると考ええる。

また、単施設における後ろ向き研究であることも本研究の限界として挙げられる。特に、training set および validation set の Stage I-III を対象とした多変量解析にお

いて、*RAD54B* 発現とともに解析した T 因子(T1-2 vs T3-4)および N 因子(N0 vs N1-2)は統計学的に有意な予後因子とはならなかった。解析した症例数が少なかったことやイベント数が限られていたことは一因と考えられるが、本研究で解析したコホートに症例の偏りがあった可能性は否めず、したがって *RAD54B* 遺伝子発現の予測マーカーとしての有用性は、より多数の患者を対象とした多施設での前向き研究による評価が必要であると考えられ、この点は今後の課題であると考ええる。

## 第 2 章

### 大腸癌診断マーカーとしての

### 血漿遊離 DNA における *LINE-1* 低メチル化レベルの解析

#### 2-1 背景

血液中には細胞から遊離した DNA (Circulating cell-free DNA; 以下 cfDNA) が微量ながら存在することが知られている。cfDNA は血球細胞をはじめとした正常細胞に由来するものの他に、特に担癌患者においては apoptosis、necrosis、active release といった機序を通じて、癌組織に由来する DNA が血液中に放出されることが知られており(図 6)、そのために担癌患者の血液中の cfDNA は健常人と比較して高濃度となることが報告されている。血液中の癌組織由来の cfDNA は原発巣または転移巣における癌組織の遺伝学的特徴を反映し、また通常の組織生検と比較してはるかに非侵襲的な採血手技のみの患者負担ですむことから、その解析は「liquid biopsy」として注目され、近年様々な解析に応用されている [46-51]。大腸癌領域に限定しても、リアルタイム PCR で定量した血漿中の cfDNA 濃度が大腸癌の予後や直腸癌における術前化学放射線療法の予後予測因子となる報告や [52, 53]、次世代シーケンサーによる cfDNA における体細胞変異の検出が大腸癌術後再発の早期発見に有用であったとする報告など [54]、多方面での臨床応用の可能性が示唆されている。



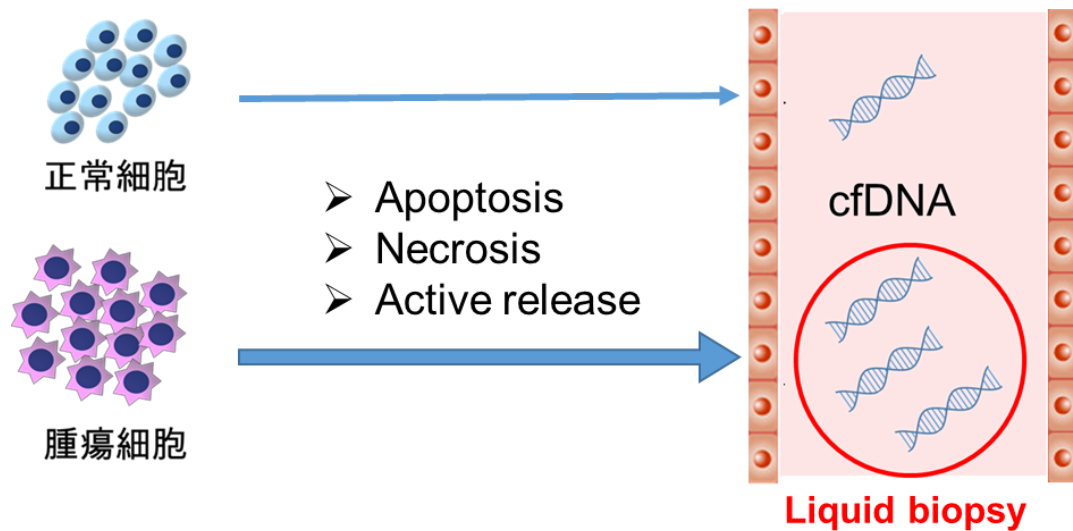


図 6 Circulating cell-free DNA (cfDNA)。

血液中の cfDNA は正常細胞に由来するもののほか、担癌患者では腫瘍細胞におけるアポトーシス、ネクローシス、active release の結果、腫瘍細胞に由来する DNA が血液中に放出されることが知られている。血液中の腫瘍細胞由来の cfDNA は、遺伝子変異やエピジェネティックな変化といった腫瘍細胞の特性や腫瘍量を反映し、また組織生検に比較して簡便に採取・解析可能であることから liquid biopsy として注目され、近年様々な遺伝子解析に応用されている。

一方、癌の発生・進行にエピジェネティックな異常が関与することが知られている。癌におけるエピジェネティックな異常には、DNA のメチル化異常、ヒストン修飾異常、ゲノムインプリンティング異常などがあるが [55]、この中でも、DNA のメチル化異常は最も研究が盛んな領域のひとつである。癌の発生・進行に関与する DNA のメチル化異常は、大別して DNA の高メチル化 (hypermethylation) と低メチル化 (hypomethylation) というふたつの現象が存在する。前者の DNA の高メチル化は、主に癌抑制遺伝子のプロモーター領域における CpG 配列頻度の高い領域 (CpG island) に生じ、癌抑制遺伝子の転写と発現を抑制することで発癌に関与する [56]。特に大腸癌組織の DNA の高メチル化においては、CpG island methylator phenotype (CIMP) という概念が知られており、いくつかの特定の遺伝子のプロモーター領域中の複数個所の CpG site の高メチル化が *BRAF* 変異、*KRAS* 変異、MSI 等に関連していることが報告されている [57-59]。後者の DNA の低メチル化は、long interspersed nucleotide element-1 (*LINE-1*) や short interspersed nucleotide elements (*SINE*) といったゲノム内に多数のコピーを有する遺伝子配列を中心として生じ、ゲノム不安定性を惹起することで発癌に関与すると報告されている [60, 61]。

本研究では DNA のエピジェネティック異常のうち DNA 低メチル化異常に着目し、大腸癌組織において複数の報告が存在する *LINE-1* 遺伝子を解析対象とした [62-66]。*LINE-1* 遺伝子は非 long terminal repeat (LTR) 型のレトロトランスポゾンに属する。全長は約 6 kb であり、5' untranslated region (UTR)、2つの open reading frame (ORF、ORF1 と ORF2)、3' UTR とポリ A 鎖を有する。ORF1 は 40 kDa のタンパクをコードしシャペロン活性を有し、ORF2 は 150 kDa のタンパクをコードしエンドヌクレアーゼ活性と逆転写酵素活性を有する [67]。*LINE-1* 遺伝子の 5' UTR には CpG

配列が多く含まれ、*LINE-1* 遺伝子の転写に関わる sense promoter (SP) および近傍の遺伝子の転写に関わる antisense promoter (ASP) 領域が存在する [68]。正常な細胞においてはプロモーター領域の CpG は高度にメチル化され、遺伝子の発現が抑制されている。図 7 に *LINE-1* 遺伝子の構造を示す。

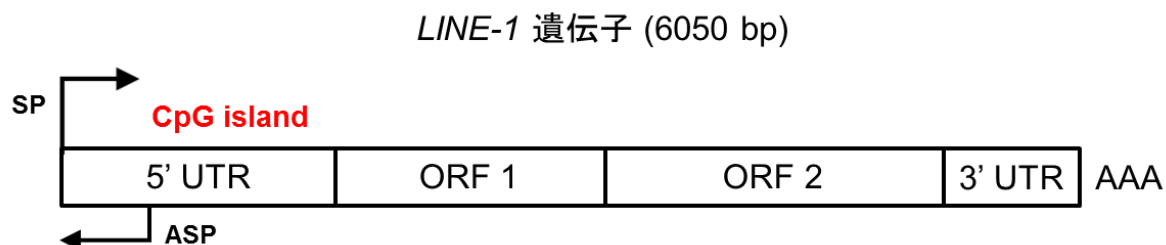


図7 *LINE-1* 遺伝子の構造。

全長約 6 kb であり、5' untranslated region (UTR)、2 つの open reading frame (ORF、ORF1 と ORF2)、3' UTR とポリ A 鎖を有する。5' UTR には CpG 配列が多く含まれ (CpG island)、*LINE-1* 遺伝子の転写に関わる sense promoter (SP) および近傍の遺伝子の転写に関わる antisense promoter (ASP) 領域が存在する。正常な細胞においてはプロモーター領域の CpG は高度にメチル化され、遺伝子の発現が抑制されている。

*LINE-1* 遺伝子はヒトゲノム中に非常に多数のコピーを有することが特徴であり、*LINE-1* 遺伝子配列は不完全なものも含めヒトゲノムの 17-18%をも占めるほど多数存在する。したがって *LINE-1* 遺伝子のメチル化異常は、DNA のグローバルなメチル化異常を反映するよい指標とされている [69]。大腸癌組織を対象とした既存の報告として、大腸癌組織における *LINE-1* の低メチル化が予後不良因子であること示した報告や [62, 63, 65]、18q LOH (loss of heterozygosity) との関連性を示した報告などが存在する [70]。一方、血液中の cfDNA を対象に *LINE-1* の低メチル化を検討した研究としては、悪性黒色腫および肝細胞癌において健常人との比較や予後因子としての検討を行った報告はあるものの [71-73]、大腸癌において同様の検討をした報告はない。以上のような背景を踏まえ、本研究では 114 人の大腸癌患者の血漿中の cfDNA における *LINE-1* 低メチル化レベルをリアルタイム PCR を用いた方法で定量し、臨床病理学的因子との関連性を検討した。また、大腸癌組織を用いた解析により *LINE-1* 遺伝子の低メチル化は大腸腺腫といった大腸癌発生の早期段階ですでに生じることが報告されていることから [66]、53 人のボランティアの健常人においても同様の解析を行い、大腸癌患者と比較することで大腸癌の早期診断マーカーとしての可能性を検討した。

## 2-2 実験方法

### 【症例と検体収集】

2012年4月から2014年6月の期間に東京大学医学部附属病院大腸肛門外科において手術を施行し血漿検体が入手可能であった連続する計114例の大腸癌患者を対象とした。大腸癌組織内の遺伝子発現に及ぼす影響を排除するため、術前に化学療法や放射線治療が施行されている症例は本研究から除外した。血漿の検体は手術直前の大腸癌患者から血液10 mlを採血し、EDTA入り真空採血管(ニプロ)に入れ、1500gで10分間遠心して約4 ml採取した。採取した血漿検体はただちに凍結させ、-80°Cで解析まで保存した。対照としてボランティアの健常人53人からも同意を得たのち、血液5 mlを採血し、同様に血漿検体を入手した。また、2013年10月から2014年6月に手術を施行し検体が採取可能であった30例において、手術検体から大腸癌組織および対応する正常粘膜を5 mm x 5 mm大ずつ採取し、-80°Cで解析まで保存した。本研究は東京大学医学部附属病院の倫理委員会の承認を受けて施行した(審査番号10883)。

### 【組織からの DNA 抽出】

大腸癌組織および対応する正常粘膜からの DNA の抽出は、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) を用い、製造元のマニュアルに従って施行した。

### 【血漿からの cfDNA 抽出】

凍結保存していた血漿を解凍後、デブリを除去するため 4°C 12000g で 3 分間遠心した。上清 500  $\mu$ l を採取し、0.9% NaCl 300  $\mu$ l、20 mg/ml Proteinase K 20  $\mu$ l、10% SDS 95  $\mu$ l を加え、50°C で 3 時間インキュベートした。続いて phenol–chloroform–isoamyl alcohol (25:24:1, pH 8.0; Nippon Gene) 1 ml を加えて混合した後、室温で 10 分間放置し、13000g で 10 分間遠心し、水層 800  $\mu$ l を回収した。回収した溶液にクロロホルム 1 ml を加えて混ぜた後、13000g で 10 分間遠心し、水層 700  $\mu$ l を回収した。回収した溶液にイソプロパノール 700  $\mu$ l を加えて混合した後、-30°C で一昼夜放置し、16500g で 30 分間遠心して cfDNA を沈殿させ、90% エタノール 1 ml で洗浄後、21  $\mu$ l の Tris-EDTA buffer に溶解した。

### 【血漿 cfDNA 濃度の測定】

血漿 cfDNA の濃度は Varioskan Flash (ThermoFisher Scientific) を使用し、製造元のマニュアルに従って Quanti-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Life Technologies) を用いて定量した。

### 【バイサルファイト処理】

組織または血漿から抽出した DNA 19  $\mu$ l (500 ng、500 ng 未満の場合は全量) に 6 M NaOH を 1  $\mu$ l 加え 37°C で 15 分間反応させた後、バイサルファイト処理液 (4 M Sodium metabisulfite (Sigma-Aldrich) 107  $\mu$ l、10 mM Hydroquinone 7  $\mu$ l (Sigma-Aldrich)、6 M NaOH 6  $\mu$ l を混合したもの) を加え混合し、(95°C 30 秒  $\rightarrow$  50°C 15 分) の反応を 15 サイクル行ってバイサルファイト処理を施行した。バイサルファイト処理後の溶液は、M-binding buffer (Zymo Research) 600  $\mu$ l と混合し、Zymo-Spin Column I (Zymo Research) に DNA を結合させた後、カラム上で 100  $\mu$ l の脱スルホン化溶液 (0.1 M NaOH、90% エタノール) と反応させ脱スルホン化させた。その後 80% エタノールで洗浄し、20  $\mu$ l の Tris-EDTA buffer で溶出した。



### 【*LINE-1* 低メチル化レベルの定量】

*LINE-1* の低メチル化レベルは absolute quantitative analysis of methylated alleles (AQAMA 法) で施行した [74]。AQAMA 法による解析原理のシェーマを図 8 に示す。AQAMA 法は標的となる CpG サイトに対応するメチル化特異的および非メチル化特異的プローブを設計し、共通のプライマーを使用して同一ウェル内でリアルタイム PCR 反応を行い、コピー数既知のプラスミドを用いた検量線からメチル化および非メチルのコピー数を定量する方法である。本論文で使用したプライマーとプローブは、大腸腺腫および早期大腸癌において *LINE-1* の低メチル化が報告されている配列を選択した (148 bp)。プローブは TaqMan MGB プローブ (Applied Biosystems) を使用した。使用したプライマーとプローブの配列を表 8 に示す。

### 標的CpG(3箇所)

5' — TG **CG CG** AGC **CG** AAGCAGGG — 3'

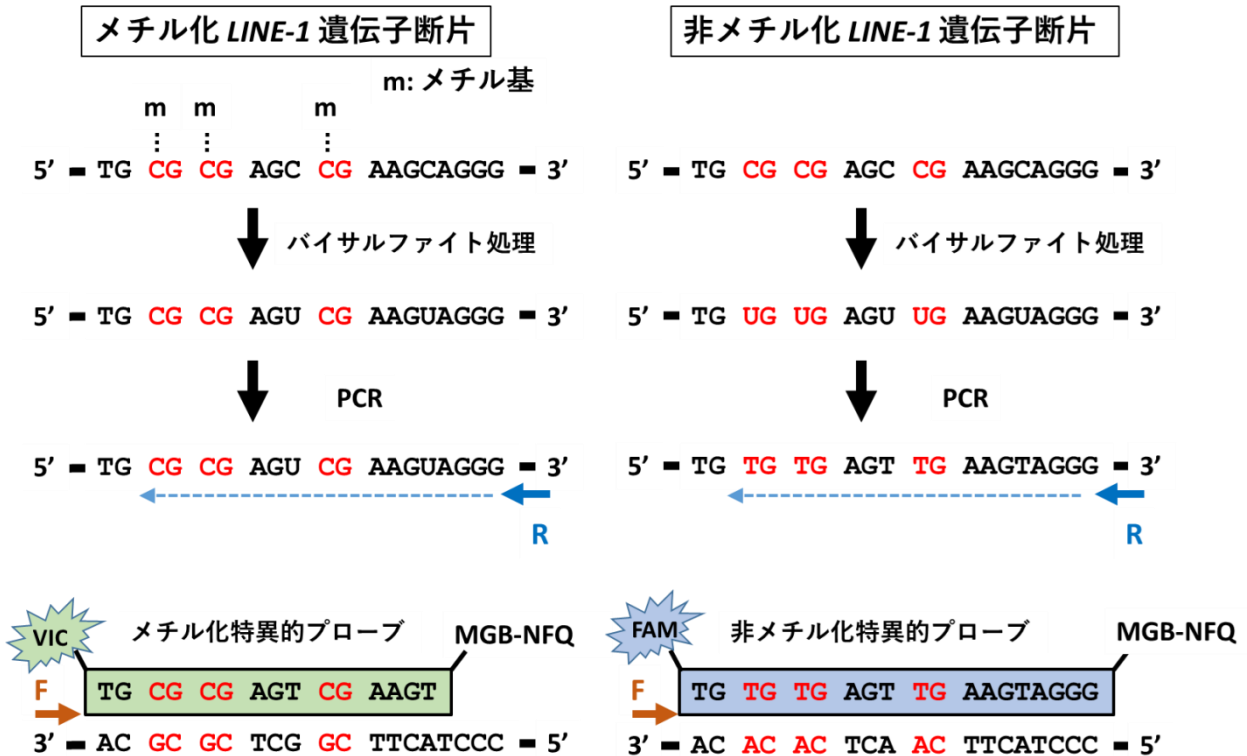


図 8 AQAMA 法の解析原理のシエーマ。

LINE-1 遺伝子のプロモーター領域の連続する 3 箇所の CpG サイトが標的である。バイサルファイト処理により、非メチル化シトシンはウラシル (C→U) に変換される。3 箇所の標的 CpG サイトがいずれもメチル化されている場合に結合するメチル化特異的プローブ (VIC で標識)、3 箇所がいずれもメチル化されていない場合に結合する非メチル化プローブ (FAM で標識)、および両者に共通のプライマー (図中の F と R) を用いて同一ウェル内でリアルタイム PCR 反応を行い、検量線からメチル化および非メチル化コピー数を算出する。グローバルな低メチル化が進んだ細胞・組織ほど、非メチル化特異的プローブが結合する非メチル化 LINE-1 遺伝子断片を多く含むと考えられる。

表 8. *LINE-1* プライマーとプローブの配列

		配列
<i>LINE-1</i>	Forward	5'-GGGTTTATTTTATTAGGGAGTGTTAGA-3'
	Reverse	5'-TCACCCCTTTCTTTAACTCAA-3'
	メチル化特異的プローブ	VIC-5'-TG <u>CGCG</u> AGT <u>CGA</u> AGT-3'-MGB-NFQ*
	非メチル化特異的プローブ	FAM-5'-TGT <u>GTG</u> AGT <u>TGA</u> AGTAGGG-3'-MGB-NFQ*

\*標的の CpG サイトを下線で示した

略語: MGB, minor groove binder; NFQ, nonfluorescent quencher

リアルタイム PCR は 7500 Fast realtime PCR system (Life Technologies) を使用し、KAPA PROBE FAST qPCR Master Mix (KAPA Biosystems) を用いた。バイサルファイト処理後テンプレート DNA (組織 1.0  $\mu$ l、血漿 2.0  $\mu$ l)、KAPA PROBE FAST qPCR Master Mix 10  $\mu$ l、forward および reverse プライマー (100  $\mu$ M) 各々 0.08  $\mu$ l (最終濃度 400 nM)、メチル化および非メチル化特異的プローブ (10  $\mu$ M) 各々 0.5  $\mu$ l (最終濃度 250 nM)、Rox Reference Dye Low (50 x) 0.40  $\mu$ l、滅菌蒸留水を全量 20  $\mu$ l になるように調製した。PCR 反応は酵素活性化 95°C 3 分間 → (変性反応 95°C 15 秒 → アニーリング/伸長反応 60°C 60 秒) x 40 サイクルで行った。PCR 反応は全て triplicate で施行し、また後述する  $2 \times 10^6$  から  $2 \times 10^1$  までの既知のコピー数からなる直鎖プラスミド DNA を用いて検量線を作成し、メチル化コピー数及び非メチル化コピー数を算出した。得られたメチル化コピー数および非メチル化コピー数を用いて、*LINE-1* hypomethylation index (LHI) を下記の様に定義し解析に用いた。LHI は 0 から 1 までの値を取り、この値が高くなるほど *LINE-1* 遺伝子の低メチル化異常が強く起きていることを示す。

$$\text{LHI} = \frac{\text{非メチル化コピー数}}{(\text{メチル化} + \text{非メチル化}) \text{コピー数}}$$

### 【検量線用プラスミドの作成】

メチル化対照 DNA は、健常人の血液の Buffy coat から抽出した DNA を Bam HI で消化し、断片化した DNA を CpG Methyltransferase である M.SssI (NEW ENGLAND BioLabs) で処理し、メチル化させて作成した。

非メチル化対照 DNA は、酵素的に増幅された DNA にはメチル化シトシンが含まれないことを利用し、健常人の血液の Buffy coat から抽出した DNA を illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit (GE Healthcare) を用いて増幅させて作成し、Hind III で消化し断片化させた。

このようにして得られたメチル化対照 DNA および非メチル化対照 DNA をバイサルファイト処理後、表 8 に示す *LINE-1* 遺伝子のプライマーと AmpliTaq Gold Polymerase (Life Technologies) を使用して、PCR を行った。得られた PCR 産物はアガロースゲル電気泳動を行ってシングルバンドが得られていることを確認したのち、これらメチル化および非メチル化対照 DNA の PCR 産物を、TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) を使用して、pCR2.1-TOPO vector に ligation し、大腸菌 (TOP10) に transform させてクローニングを行った。大腸菌からプラスミド DNA をアルカリ法で精製後、BigDye terminator v3.1 (Life Technologies) を使用し、3100 Genetic Analyzer (Life Technologies) を用いて DNA sequencing を行い、目的のメチル化および非メチル化対照 DNA の配列が挿入されていることを確認した。

続いて得られたメチル化対照 DNA プラスミドと、非メチル化対照プラスミドから検量線用の直鎖状 DNA を作成した。まずメチル化対照プラスミドを Hind III 処理し、DNA blunting kit (TAKARA) で blunting 反応を行い平滑末端とした後、Xho I で処理した。非メチル化対照プラスミドは、BamH I 処理後に DNA blunting kit で BamH I 処理後

の末端を平滑化して self-ligation させることで BamH I site を潰したのち、EcoR V(平滑末端)および Xho I で処理した。このようにして作成した目的の DNA 配列を含むメチル化対照プラスミドの断片を、非メチル化対照プラスミド内に ligation させ、メチル化対照プラスミドおよび非メチル化対照 DNA 配列を含む環状プラスミドを作製した。この環状プラスミドを大量調製後 BamH I で処理し、両端にメチル化対照 DNA および非メチル化 DNA 配列を含む直鎖状 DNA を得た。この DNA を用いて希釈勾配を作成し、メチル化および非メチル化コピー数の定量のための検量線として用いた。図 9 に検量線用プラスミド作成の手順を示す。

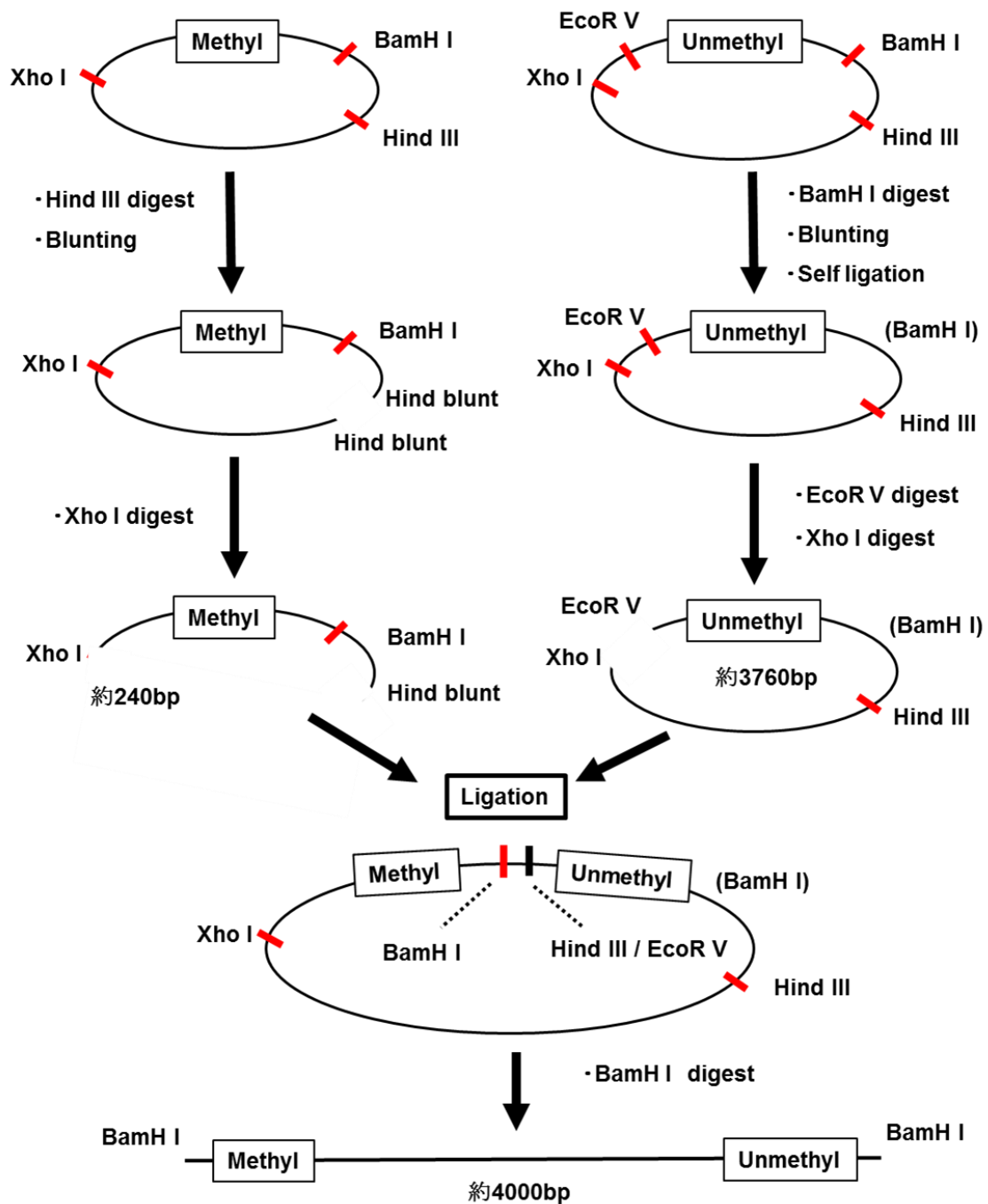


図9 検量線用プラスミドの作成手順。  
最終的に BamH I で制限酵素処理して得られた約 4000 bp の両端にメチル化対照 DNA (Methyl) および非メチル化対照 DNA (Unmethyl) を有する直鎖状 DNA を用いて、コピー数既知の希釈系列を作成し、リアルタイム PCR の検量線として用いた。

## 【統計学的解析】

全ての統計学的解析には JMP pro version 10 software packages (SAS Institute) を使用した。大腸癌の Stage 分類には、UICC の TNM 分類 第 7 版を用いた [4]。大腸癌組織と対応する正常粘膜の LHI の比較は Wilcoxon 符号付順位検定で行った。cfDNA 濃度、cfDNA LHI と臨床病理学的因子 (性別、年齢、body mass index (BMI)、喫煙歴、腫瘍径、腫瘍部位、腫瘍分化度、リンパ管侵襲、静脈侵襲、術前 CEA 値、術前 CA19-9 値、T 因子、N 因子、M 因子) の検討においては、連続変数は「中央値 (四分位範囲)」で記載し比較には Mann-Whitney U 検定を用いた。カテゴリ変数は「数 (%)」で記載し比較には Pearson's chi-squared 検定を用いた。本研究の腫瘍径に関しては、cfDNA LHI 値の検討の結果、最も顕著な差が認められた 6.0 cm をカットオフ値として 2 群に層別化した結果を記載した。また、腫瘍部位は、既存の大腸粘膜における DNA メチル化研究において大腸を右側または左側に分類する報告を認めることから [75]、本研究においても大腸癌を右側または左側の 2 群に層別化して解析した。なお、盲腸、上行結腸、横行結腸を右側結腸と定義し、また下行結腸、S 状結腸、直腸を左側結腸と定義した。大腸癌患者の識別能の検討における cfDNA 濃度と cfDNA LHI カットオフ値は、ROC 曲線上で (感度+特異度- 1) が最大値となる点 (Youden index) から決定した [35]。また健常人とステージ毎の大腸癌患者の cfDNA 濃度と cfDNA LHI の比較には、ノンパラメトリックな多重検定である Steel-Dwass 検定を用いた。P 値が 0.05 未満を統計学的に有意とした。



## 2-3 実験結果

### 【大腸癌組織における *LINE-1* 低メチル化レベルの検討】

血漿 cfDNA での解析の前に予備実験として大腸癌組織における *LINE-1* 低メチル化レベルを検討した。30 例の大腸癌患者の大腸正常粘膜、および対応する大腸癌組織のそれぞれについて LHI を測定した。図 10 に示すように、大腸癌組織では対応する正常粘膜に比べて有意に LHI が上昇していることが確認された ( $P < 0.0001$ )。

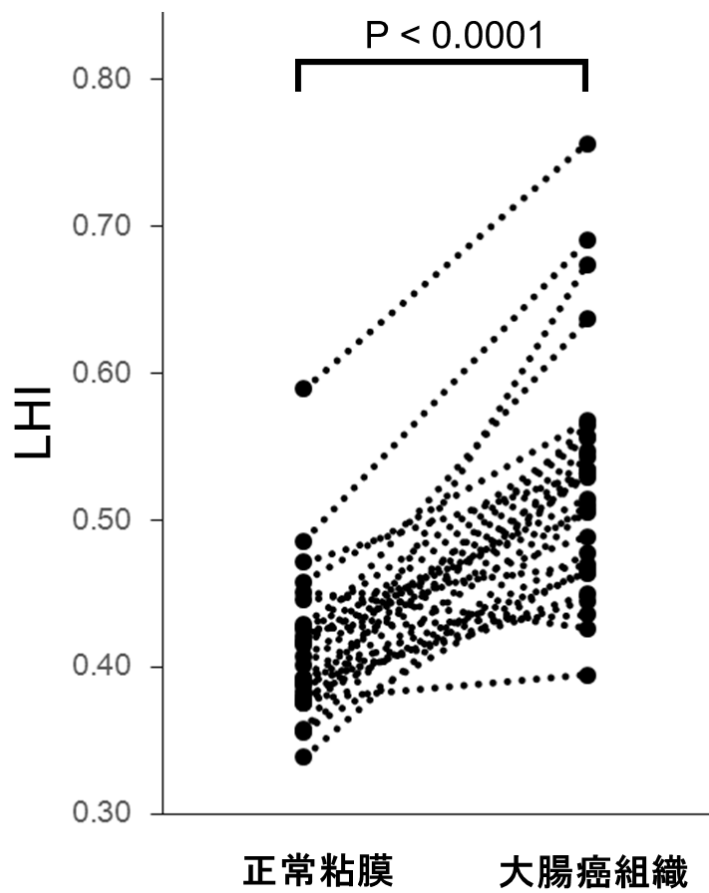


図 10 大腸癌組織および対応する正常粘膜における LHI の値の比較 (n = 30)。大腸癌組織では、正常粘膜に比較して有意に高い LHI を示した(Wilcoxon 符号付順位検定、 $P < 0.0001$ )。

### 【大腸癌患者における cfDNA 濃度と臨床病理学的因子の関係】

大腸癌患者計 114 人の cfDNA の濃度と各種の臨床病理学的因子との関係を検討した。結果を表 9 に示す。cfDNA 濃度は遠隔転移を有する M1 症例で有意に高値であった [10.2 (7.2–14.8) vs. 11.7 (9.8–17.8) ng/ml,  $P = 0.03$ ]。その他の因子 (性別、年齢、BMI、喫煙歴、腫瘍径、腫瘍部位、腫瘍分化度、リンパ管侵襲、静脈侵襲、術前 CEA 値、術前 CA19-9 値、T 因子、N 因子) との間には有意差は認められなかった。

表 9. 大腸癌患者における cfDNA 濃度と臨床病理学的因子の検討 (n = 114)

因子		n (%)	cfDNA 濃度 (ng/ml)	P 値
性別	男性	65 (57)	11.1 (7.7–14.5)	0.97
	女性	49 (43)	11.1 (7.8–15.4)	
年齢	<65	55 (48)	10.4 (7.5–13.4)	0.53
	≥65	59 (52)	11.5 (7.8–15.2)	
BMI	<25	89 (78)	11.1 (7.9–13.6)	0.52
	≥25	25 (22)	11.7 (7.2–16.8)	
喫煙歴	現喫煙者	29 (25)	11.1 (7.0–13.2)	0.48
	既喫煙者/なし	85 (75)	11.1 (8.0–15.4)	
腫瘍径 (cm)	<6.0	85 (75)	11.0 (7.7–14.4)	0.64
	≥6.0	29 (25)	11.2 (7.8–19.5)	
腫瘍部位	右側	34 (30)	11.8 (8.5–18.0)	0.08
	左側	80 (70)	10.4 (7.4–13.3)	
腫瘍分化度	高分化	46 (40)	10.9 (8.0–15.0)	0.83
	中・低分化	68 (60)	11.1 (7.6–15.2)	
リンパ管侵襲	陰性	69 (60)	10.5 (7.8–15.6)	0.98
	陽性	45 (40)	11.5 (7.5–14.3)	
静脈侵襲	陰性	25 (22)	10.4 (7.4–14.8)	0.72
	陽性	89 (78)	11.1 (7.7–15.1)	
術前 CEA	<5.0 ng/ml	52 (46)	10.3 (7.3–13.3)	0.17
	≥5.0 ng/ml	62 (54)	11.3 (8.1–15.9)	
術前 CA19-9	<37 ng/ml	83 (73)	10.4 (7.4–13.9)	0.28
	≥37 ng/ml	31 (27)	11.4 (8.9–16.6)	
T 因子	T1–2	28 (25)	10.1 (7.6–15.2)	0.57
	T3–4	86 (75)	11.2 (7.8–15.1)	
N 因子	N0–1	90 (79)	10.6 (7.7–14.9)	0.61
	N2–3	24 (21)	11.6 (8.2–16.5)	
M 因子	M0	87 (76)	10.2 (7.2–14.8)	0.03
	M1	27 (24)	11.7 (9.8–17.8)	

P 値: Mann-Whitney U 検定

略語: cfDNA, cell free DNA; BMI, body mass index.

### 【大腸癌患者における cfDNA LHI と臨床病理学的因子の関係】

続いて cfDNA LHI の結果を表 10 に示す。cfDNA LHI は T 因子との関連は認められなかったものの、6.0 cm 以上の腫瘍径を有する患者群において 6.0 cm 未満の患者群よりも有意に高値であり、T 因子よりも腫瘍径に依存することが示唆された [0.385 (0.352–0.420) vs. 0.368 (0.342–0.390),  $P = 0.04$ ]。また、N2 以上の高度なリンパ節転移、および遠隔転移を有する M1 の症例において、cfDNA LHI は有意に高値であった [N 因子:0.389 (0.366–0.416) vs. 0.368 (0.340–0.391),  $P = 0.01$ 、M 因子:0.388 (0.362–0.408) vs. 0.368 (0.340–0.391)]。その他の因子(性別、年齢、BMI、喫煙歴、腫瘍部位、腫瘍分化度、リンパ管侵襲、静脈侵襲、術前 CEA 値、術前 CA19-9 値)との間には有意な関連は認められなかった。

表 10. 大腸癌患者における cfDNA LHI と臨床病理学的因子の検討 (n = 114)

因子		n (%)	cfDNA LHI,	P 値
性別	男性	65 (57)	0.365 (0.341–0.390)	0.11
	女性	49 (43)	0.373 (0.354–0.403)	
年齢	<65	55 (48)	0.371 (0.345–0.399)	0.62
	≥65	59 (52)	0.372 (0.350–0.400)	
BMI	<25	89 (78)	0.373 (0.347–0.402)	0.27
	≥25	25 (22)	0.367 (0.342–0.382)	
喫煙歴	現喫煙者	29 (25)	0.373 (0.350–0.400)	0.41
	既喫煙者/なし	85 (75)	0.370 (0.343–0.396)	
腫瘍径 (cm)	<6.0	85 (75)	0.368 (0.342–0.390)	0.04
	≥6.0	29 (25)	0.385 (0.352–0.420)	
腫瘍部位	右側	34 (30)	0.372 (0.348–0.392)	0.77
	左側	80 (70)	0.371 (0.350–0.401)	
腫瘍分化度	高分化	46 (40)	0.370 (0.345–0.398)	0.64
	中・低分化	68 (60)	0.369 (0.357–0.384)	
リンパ管侵襲	陰性	69 (60)	0.373 (0.349–0.402)	0.54
	陽性	45 (40)	0.370 (0.340–0.392)	
静脈侵襲	陰性	25 (22)	0.372 (0.357–0.395)	0.86
	陽性	89 (78)	0.371 (0.340–0.399)	
術前 CEA	<5.0 ng/ml	52 (46)	0.368 (0.342–0.391)	0.57
	≥5.0 ng/ml	62 (54)	0.373 (0.350–0.399)	
術前 CA19-9	<37 ng/ml	83 (73)	0.371 (0.350–0.402)	0.49
	≥37 ng/ml	31 (27)	0.372 (0.340–0.390)	
T 因子	T1–2	28 (25)	0.372 (0.361–0.391)	0.69
	T3–4	86 (75)	0.371 (0.338–0.399)	
N 因子	N0–1	90 (79)	0.368 (0.340–0.391)	0.01
	N2–3	24 (21)	0.389 (0.366–0.416)	
M 因子	M0	87 (76)	0.368 (0.340–0.391)	0.03
	M1	27 (24)	0.388 (0.362–0.408)	

P 値: Mann-Whitney U 検定

略語: cfDNA, cell free DNA; LHI, *LINE-1* hypomethylation index; BMI, body mass index.

### 【健常人と大腸癌患者の背景因子の比較】

健常人と大腸癌患者の背景因子の比較を表 11 に示す。健常人と大腸癌患者間において性別の分布および BMI に有意差は認められなかった。喫煙歴は大腸癌患者群で現喫煙者が多い傾向があったものの有意ではなかった ( $P = 0.07$ )。一方、健常人の平均年齢 50.6 歳 (SD 19.3) に対し、大腸癌患者は 63.0 歳 (SD 12.5) であり、大腸癌患者群で年齢が有意に高値であった ( $P < 0.0001$ )。したがって年齢に対する cfDNA 濃度および cfDNA LHI の影響を検討するため、健常人を平均年齢の 50 歳未満 ( $n = 30$ ) と 50 歳以上 ( $n = 23$ ) に分けて cfDNA 濃度および cfDNA LHI を比較したところ、両群間に有意差は認められなかった [cfDNA 濃度: 50 歳未満 8.2 (2.6–11.8) ng/ml vs. 50 歳以上 7.2 (6.6–10.0) ng/ml,  $P = 0.61$ 、cfDNA LHI: 50 歳未満 0.331 (0.307–0.357) vs. 50 歳以上 0.334 (0.325–0.344),  $P = 0.47$ ]。これらの比較より、健常人と大腸癌患者群で年齢のミスマッチが認められるものの、年齢が cfDNA 濃度および cfDNA LHI に影響を与えないものと考え、以下の解析には健常人 53 例すべてを含めた。

表 11. 健常人と大腸癌患者の背景因子の比較

因子	健常人 (n = 53)	大腸癌患者 (n =114)	P 値
性別			0.38*
男性	34 (64.1%)	65 (57.0%)	
女性	19 (35.9%)	49 (43.0%)	
平均年齢	50.6 (SD 19.3)	63.0 (SD 12.5)	< 0.0001**
BMI	22.5 (SD 2.5)	22.2 (SD 3.3)	0.43**
喫煙歴			0.07*
現喫煙者	7 (13.2%)	29 (25.4%)	
既喫煙者/なし	46 (86.8%)	85 (74.6%)	

P 値: Pearson's chi-squared 検定\*、Mann-Whitney U 検定\*\*

略語: SD, standard deviation; BMI, body mass index.



### 【健常人と大腸癌患者間の cfDNA 濃度と cfDNA LHI の比較】

53 人の健常人の血漿 cfDNA 濃度と cfDNA LHI を定量し、大腸癌患者の結果と比較した。図 11A に cfDNA 濃度の比較の結果を示す。大腸癌患者群の cfDNA 濃度は健常人よりも有意に高値であった [11.1 (7.7–15.1) vs. 7.7 (5.2–11.1) ng/ml,  $P = 0.0003$ ]。図 11B に cfDNA LHI の比較の結果を示す。cfDNA LHI についても大腸癌患者群で健常人よりも有意に高値であった [0.371 (0.348–0.399) vs. 0.332 (0.316–0.348),  $P < 0.0001$ ]。

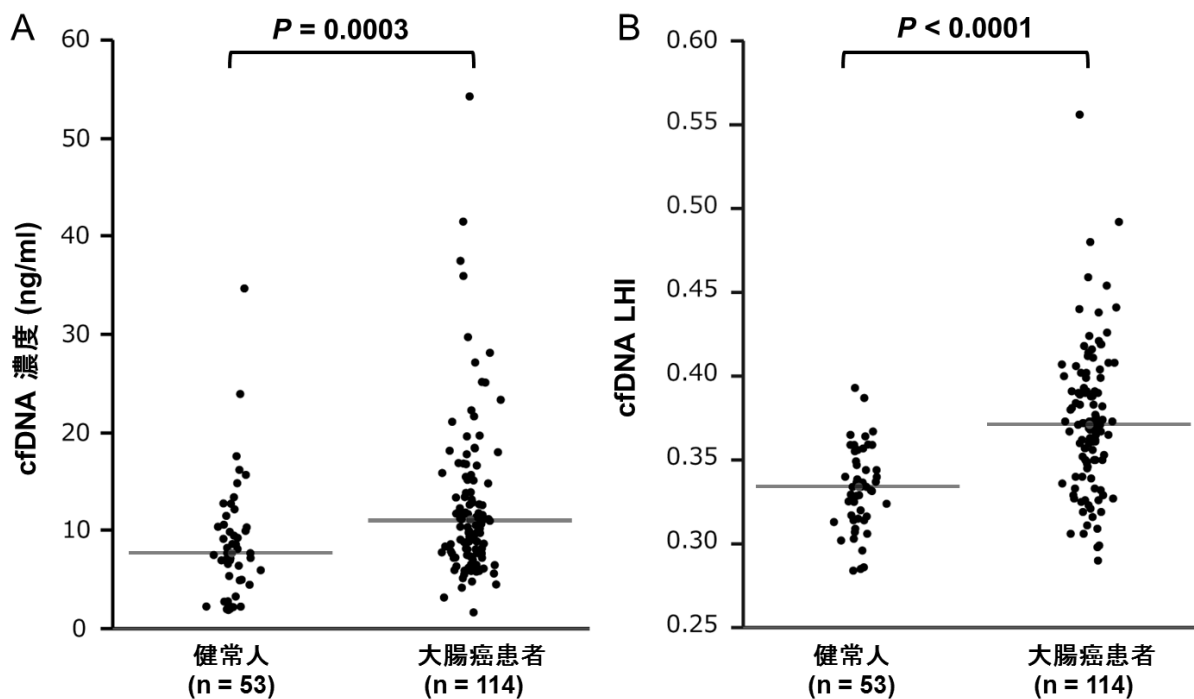


図 11 健常人と全大腸癌患者の cfDNA 濃度と cfDNA LHI の比較。  
 (A) 大腸癌患者群における cfDNA 濃度は健常人よりも有意に高値であった (Mann-Whitney U 検定、 $P = 0.0003$ )。 (B) 大腸癌患者群における cfDNA LHI は健常人よりも有意に高値であった (Mann-Whitney U 検定、 $P < 0.0001$ )。図中の横線は中央値を示す。

続いて、本研究では腫瘍が原発巣のみに限局している UICC Stage I/II を早期群 (n = 57)、腫瘍が所属リンパ節や他臓器に転移をきたした Stage III/IV を進行群 (n = 57) と定義し、大腸癌患者をこの 2 群に層別化して健常人と比較した。図 12 に結果を示す。Stage I/II の早期群において、cfDNA 濃度および cfDNA LHI はいずれも健常人よりも有意に高値であり、大腸癌の早期診断に有用である可能性が示唆された [cfDNA 濃度: 9.8 (7.4–14.4) vs. 7.7 (5.2–11.1) ng/ml,  $P = 0.03$ , 図 12A、cfDNA LHI: 0.369 (0.341–0.391) vs. 0.332 (0.316–0.348),  $P < 0.0001$ , 図 12B]。同様に Stage III/IV の進行群においても、cfDNA 濃度および cfDNA LHI は健常人よりも有意に高値であった [cfDNA 濃度 : 11.5 (8.2–16.0) vs. 7.7 (5.2–11.1) ng/ml,  $P = 0.0006$ , 図 12A; cfDNA LHI 0.372 (0.350–0.401) vs. 0.332 (0.316–0.348),  $P < 0.0001$ , 図 12B]。一方、cfDNA 濃度および cfDNA LHI とともに Stage I/II の早期群および Stage III/IV の進行群との間には有意差は認められなかった (cfDNA 濃度:  $P = 0.31$ , 図 12A、cfDNA LHI:  $P = 0.66$ , 図 12B)。表 12 に、健常人と Stage 別に層別化した大腸癌患者の cfDNA 濃度および cfDNA LHI の結果を示す。

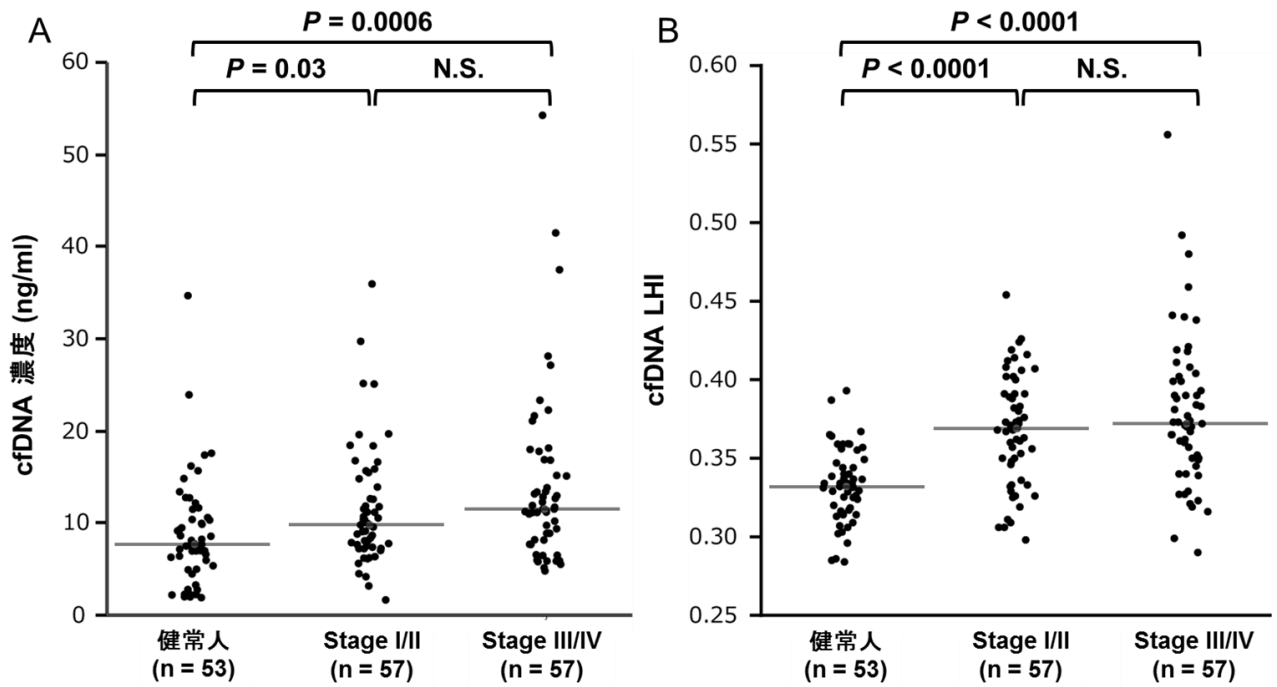


図 12 cfDNA 濃度と cfDNA LHI の健常人と Stage で層別化した大腸癌患者との比較。(A) cfDNA 濃度 Stage I/II および Stage III/IV のいずれの群においても健常人と比較して高値であった。一方、Stage I/II と Stage III/IV 間には有意差は認められなかった ( $P = 0.31$ )。 (B) cfDNA LHI も Stage I/II および Stage III/IV のいずれの群においても健常人と比較して高値であった。一方、Stage I/II と Stage III/IV 間には有意差は認められなかった ( $P = 0.66$ )。統計解析にはノンパラメトリックな多重比較である Steel-Dwass 検定を用いた。図中の横線は中央値を示す。

表 12. cfDNA 濃度と cfDNA LHI の健常人と大腸癌患者間の比較

	n	cfDNA 濃度 (ng/ml)	P 値	cfDNA LHI,	P 値
健常人	53	7.7 (5.2–11.1)		0.332 (0.316–0.348)	
全患者	114	11.1 (7.7–15.1)	<b>0.0003*</b>	0.371 (0.348–0.399)	<b>&lt; 0.0001*</b>
Stage I/II	57	9.8 (7.4–14.4)	<b>0.03**</b>	0.369 (0.341–0.391)	<b>&lt; 0.0001**</b>
Stage III/IV	57	11.5 (8.2–16.0)	<b>0.0006**</b>	0.372 (0.350–0.401)	<b>&lt; 0.0001**</b>

P 値: Mann-Whitney U 検定\*、Steel-Dwass 検定\*\*

略語: cfDNA, cell free DNA; LHI, *LINE-1* hypomethylation index.

### 【ROC 曲線による大腸癌識別能の解析】

cfDNA 濃度および cfDNA LHI の大腸癌患者の識別能を ROC 曲線で評価した。至適カットオフ値は Youden Index を用いて決定した。全大腸癌患者と健常人を比較した解析では (図 13A)、cfDNA 濃度は至適カットオフ値 10.7 ng/ml、感度 52.6%、特異度 75.5%、AUC 0.67 であるのに対し、cfDNA LHI は至適カットオフ値 0.360、感度 65.8%、特異度 90.0%、AUC 0.81 であり、cfDNA 濃度よりも高い感度・特異度を示し、また有意に高い AUC が認められた ( $P = 0.015$ )。

Stage I/II の早期群と健常人を比較した解析においても (図 13B)、cfDNA 濃度は感度 42.1%、特異度 75.0%、AUC 0.64 であるのに対し、cfDNA LHI は感度 63.2%、特異度 90.0%、AUC 0.79 であり、cfDNA LHI は cfDNA 濃度よりも高い感度・特異度を示し、また AUC も有意に高値であり ( $P = 0.037$ )、大腸癌の早期診断に有用である可能性が示唆された。同様に Stage III/IV の進行群と健常人の比較においても (図 13C)、cfDNA LHI は cfDNA 濃度よりも高い感度・特異度、および有意に高い AUC を示した ( $P = 0.043$ )。

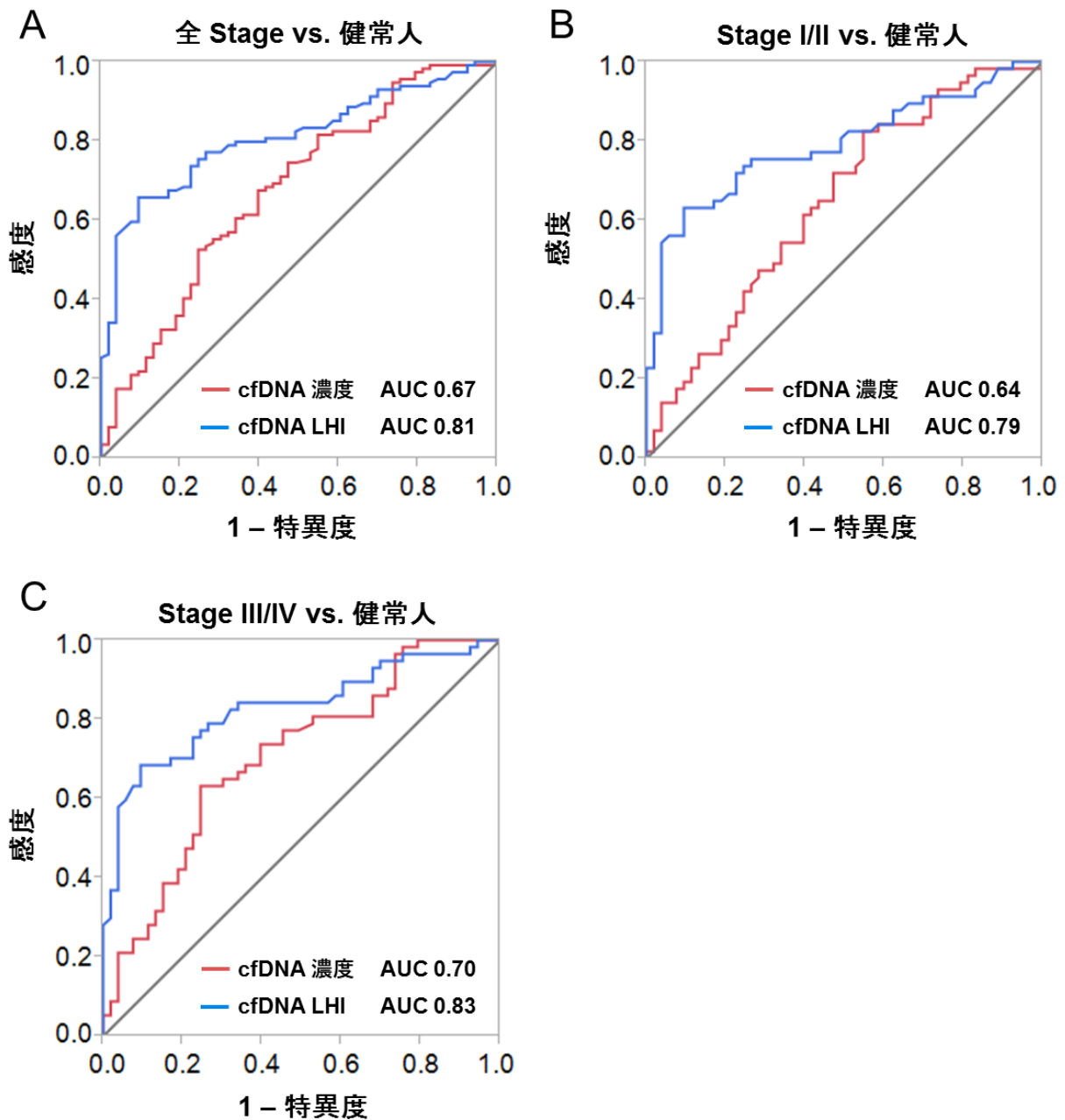


図 13 ROC 曲線による cfDNA 濃度と cfDNA LHI の大腸癌患者識別能の解析。  
 (A) 全大腸癌患者(n = 114)を対象とした解析。Youden index により決定した至適カットオフ値により、cfDNA 濃度は感度 52.6%、特異度 75.0%、AUC 0.67、cfDNA LHI は感度 65.8%、特異度 90.0%、AUC 0.81 を示した。AUC の比較では cfDNA LHI は有意に高い AUC を示した ( $P = 0.015$ )  
 (B) Stage I/II の早期群を対象とした解析。cfDNA 濃度は感度 42.1%、特異度 75.0%、AUC 0.64、cfDNA LHI は感度 63.2%、特異度 90.0%、AUC 0.79 を示した。cfDNA LHI は有意に高い AUC を示した ( $P = 0.037$ )。  
 (C) Stage III/IV の進行群を対象とした解析。cfDNA 濃度は感度 63.2%、特異度 75.0%、AUC 0.70、cfDNA LHI は感度 68.4%、特異度 90.0%、AUC 0.83 を示した。cfDNA LHI は有意に高い AUC を示した ( $P = 0.043$ )。

### 【CEAとcfDNA LHIの大腸癌患者識別における感度の比較】

cfDNA LHIの大腸癌患者における感度を、大腸癌診療において広く一般的に使用されている腫瘍マーカーであるCEAと比較した。結果を表13に示す。CEAのカットオフ値は東京大学医学部附属病院における基準値である5.0 ng/mlを適用した。Stage III/IVの進行群における感度はCEA 68.4% (39/57例)、cfDNA LHI 68.4% (39/57例)であり同等の感度であったが、Stage I/IIの早期群における感度はCEA 40.4% (23/57例)、cfDNA LHI 63.2% (36/57例)であり、cfDNA LHIはCEAよりも高い感度を示した。



表 13. 大腸癌患者における CEA と cfDNA LHI の感度の比較.

	全大腸癌患者 (n = 114)	Stage I/II (n = 57)	Stage III/IV (n = 57)
<b>CEA</b>			
<b>感度</b>	54.4% (62/114)	40.4% (23/57)	68.4% (39/57)
<b>cfDNA LHI</b>			
<b>感度</b>	65.8% (75/114)	63.2% (36/57)	68.4% (39/57)

略語: cfDNA, cell free DNA; LHI, *LINE-1* hypomethylation index.

## 2-4 考察

本研究では、大腸癌患者の血漿から cfDNA を抽出し、その濃度と *LINE-1* 遺伝子の低メチル化レベルを定量し、各種臨床病理学的因子との関連性を調べ、また健常人の結果と比較することで大腸癌発見に関する新規バイオマーカーとしての有用性を検討した。その結果、大腸癌患者における臨床病理学的因子との関連性の検討では、cfDNA LHI が腫瘍の T 因子よりも腫瘍径と関連し腫瘍径の大きい症例で高値を示すこと、また N2 以上のリンパ節転移および遠隔転移を有する高度進行症例で高値を示すことを見出した。また、健常人との比較では、cfDNA LHI は Stage I/II の局所に限局した大腸癌症例においても健常人よりも有意に高値であり、感度 63.2%、特異度 90.0%の大腸癌識別能を示し、早期大腸癌を含めた大腸癌の非侵襲的な診断マーカーとしての有用性が示唆された。

大腸癌診断の gold standard は大腸内視鏡検査であり、90%以上の感度・特異度を示す [76]。その一方で被検査者への侵襲性が高く合併症のリスクも有する検査であることからその検査コンプライアンスは高いとは言い難く、また医療従事者側の負担も大きい。本邦では大腸癌診断における非侵襲的な検査として便潜血検査が汎用されており、近年の免疫学的便潜血検査は高い感度・特異度を有することが報告されているが [77]、早期大腸癌や右側結腸癌における感度の低下や [77, 78]、便検査に伴う受診者の心理的抵抗といった問題点も存在する。序文で述べたように本邦での便潜血検査によるスクリーニング実施率はいまだ十分ではなく、また最近の欧米の報告においても大腸内視鏡および便潜血検査を主軸とした大腸癌スクリーニングプログラムの

普及率は 50%程度に過ぎないことが示されており [79, 80]、非侵襲的かつより検査コンプライアンスの高い大腸癌診断法の開発が期待されている。

非侵襲性および検査コンプライアンスの観点からは、採血のみの少ない負担で測定が可能な血液中の cfDNA は理想的な解析対象となりうる。特に腫瘍発生・進行の早期段階で生じる DNA のエピジェネティックな異常として代表的な DNA のメチル化は、大腸癌の予後・診断マーカーとして広く研究が行われてきた [81]。大腸癌の診断分野において、現在最も研究が進んでいる血液中 cfDNA のメチル化マーカーとして Methylated Septin 9 (mSEPT9) が挙げられる。mSEPT9 は GTP 結合タンパク群をコードする遺伝子のひとつであり、vesicle trafficking、アポトーシス、cytoskeletal formation 等の作用に関与するが [82]、大腸癌において高メチル化異常を示すことが知られている。2008 年に Lofton-Day らは血漿 cfDNA における mSEPT9 をリアルタイム PCR で解析し、その大腸癌患者と健常人の識別能を、感度 69%、特異度 86%と報告した [83]。本邦では 2016 年現在未承認であるが、海外では既に mSEPT9 を用いた診断キット (Epi proColon (Epigenomics AG, Berlin, Germany)) が市販され米国では FDA の認可も得られている。一方、2014 年に 7000 人以上を対象とした前向き試験の結果が報告されたが、mSEPT9 の大腸癌診断能は感度 48.2%、特異度 91.5%と特に感度の点において十分とは言えない結果であり [84]、より診断能の高い大腸癌メチル化マーカーの開発が依然として望まれているのが現状である。

mSEPT9 のようなゲノム内の単一の遺伝子座のメチル化を標的とする場合、血液中の微量かつ断片化された cfDNA 検体に含まれる標的のメチル化遺伝子コピー数は非常に限られたものとなる。ゆえにその解析にあたっては検査自体の測定感度が大きな問題となる。近年、血漿は血清よりも血球細胞由来のゲノム DNA のコンタミネーショ

ンが少ないことから cfDNA の解析対象として好まれる傾向があるが、一方で血漿は血清よりも cfDNA 含有量が少ないことが知られており [85, 86]、本研究の結果からも血漿中 cfDNA 量は血漿 1 ml あたり 10.0 ng 程度に過ぎなかった。さらにバイサルファイト処理の過程において、PCR の鋳型として使用可能な DNA 量は大幅に減少することが報告されており [87]、標的のメチル化遺伝子コピーの鋳型量が測定感度以下 (リアルタイム PCR の場合であれば 1 ウェルあたり 5 から 10 コピー以下) となることで生じる偽陰性は、検査結果の解釈において大きな問題となる。測定感度を向上させるため、前述の Epi ProColon の kit は 3.5 ml もの多量の血漿を必要とする [84]。

一方、本研究で標的とした *LINE-1* 遺伝子はヒトゲノム内に高頻度に多量に存在するため、単一の遺伝子座を標的とした場合よりもはるかに多量の癌由来の低メチル化 *LINE-1* 遺伝子コピーが血液 cfDNA 中に存在していると考えられる。本研究では 0.5 ml の血漿から抽出した cfDNA をバイサルファイト処理後に 20  $\mu$ l の Tris-EDTA buffer で溶出し、そのうち 2  $\mu$ l をリアルタイム PCR に用い triplicate で反応を行ったが、数百から数千コピーの絶対定量に十分な鋳型 DNA 量を得ることが可能であった。実際には 0.2 ml 程度の血漿量でも十分に定量可能と考えられ、この点は血漿中の cfDNA を対象とした腫瘍マーカーの実用化に向けての *LINE-1* 遺伝子の重要な長所となりうると考えられた。

本研究では、検量線の作成にも工夫を施した。従来の AQAMA によるリアルタイム PCR では [66, 74]、メチル化対照 DNA および非メチル化対照 DNA の検量線はそれぞれ別個に作成して使用する。一方、本研究ではメチル化対照 DNA および非メチル化対照 DNA を同一のプラスミドに組み込むことにより、両端にメチル化および非メチル化対照 DNA を有する直鎖状 DNA を作製した。この DNA を用いて希釈系列を作

成することにより、メチル化対照 DNA および非メチル化対照 DNA が同一ウェル内に正確に 1 対 1 のコピー数で含まれる検量線を作成した。これにより測定誤差を減少させ、より正確なメチル化および非メチル化コピー数の定量化に寄与したものと考えられた。

本研究では、cfDNA LHI の比較対象として cfDNA 濃度と CEA に注目した。大腸早期癌における CEA の診断能は高くないが [88]、CEA は日常診療において最も汎用されている腫瘍マーカーである。一般的な CEA のカットオフ値 5.0 ng/ml を適用した場合、Stage III/IV の進行群における感度(陽性率)は CEA と cfDNA LHI で同等であったものの、Stage I/II の早期群においては cfDNA LHI は CEA よりも高い感度を示した。本研究では健常人の CEA 測定は行っていないため、本研究のコホートにおける CEA の特異度は不明であるが、最近の systematic review によれば [89]、5.0 ng/ml をカットオフ値とした場合の CEA の特異度は 88.0% と本研究における cfDNA LHI の特異度(90.0%)と同等であった。以上より cfDNA LHI は Stage I/II の早期群において CEA よりも高い診断能を示すことが示唆された。また、大腸癌において cfDNA 濃度単独での診断マーカーとしての有用性を報告した複数の報告があるが [90-92]、本研究では cfDNA LHI は Stage I/II および Stage III/IV の両群において、cfDNA 濃度よりも高い感度、特異度、AUC を示した。cfDNA 濃度は炎症・外傷・過度の運動・急性/慢性疾患といった様々な病態や生理的変化によっても変化するためその定量化においてしばしば問題となることも知られており [93]、以上からも cfDNA LHI は cfDNA 濃度よりも優れた大腸癌診断マーカーとなりうる可能性が示唆されたが、一方で cfDNA 濃度は、採血量、血漿か血清かという検体の違い、採血管の種類(抗凝固剤は EDTA かクエン酸か)、採血から血漿/血清分離までの時間、血漿/血清分離

から凍結までの時間、フィルター使用の有無、血漿/血清分離時の遠心時間・速度および遠心の回数、凍結融解の回数、凍結から cfDNA 抽出までの保存期間、cfDNA 抽出法の違い(市販の kit を使用するかどうか、使用するならばどの kit か)、抽出時のキャリア RNA/DNA の有無、濃度測定法の違い(リアルタイム PCR ならば標的とする遺伝子の種類およびアンプリコンサイズ、蛍光色素法ならば標的は一本鎖 DNA か (OliGreen assay、Qubit ssDNA assay) か二本鎖 DNA か (PicoGreen Assay、Qubit dsDNA assay) など)、といった多岐に渡る因子に影響されるため、本研究の結果を他施設の結果と直接比較はできないことに注意を要する。このような cfDNA の実験手技における標準化の欠落はしばしば言及される問題点であり、今後解決されるべき課題と考える。

本研究では cfDNA LHI が原発巣のみに限局した Stage I/II の大腸癌患者においても健常人よりも有意に高値であったことを示した一方で、Stage I/II の早期群と Stage III/IV の進行群との間には有意な差は認められなかった。また cfDNA 濃度に関しても、Stage I/II および Stage III/IV の 2 群ともに健常人よりも有意に高い cfDNA 濃度を示したが、Stage I/II の早期群と Stage III/IV の進行群との間には有意差は認められなかった。既存の報告では、大腸癌組織における *LINE-1* 低メチル化は大腸腺腫といった癌発生の早期段階で既に生じることが報告されており [66]、複数の論文において大腸癌組織の *LINE-1* 低メチル化レベルは Stage 間で有意差がないことが報告されている [62-65]。以上より、大腸癌組織の *LINE-1* 低メチル化は腫瘍発生の早期段階で生じるが、その後の腫瘍進行の過程においては比較的な安定した低メチル化状態が維持され则认为られている [94]。一方、cfDNA 濃度と大腸癌の Stage の関連性に関しては、いずれも限られた症例数であるが様々な報告がなされている。Hao らは 54 人の Stage

I/II および 34 人の Stage III/IV 大腸癌患者、および 110 人の健常人の血清 cfDNA 濃度を *SINE* の一種である *ALU* 遺伝子を標的としてリアルタイム PCR で定量し、Stage I/II、Stage III/IV 群ともに健常人よりも有意に cfDNA 濃度は高く、また Stage I/II および Stage III/IV 間でも有意差があったとしている(中央値: Stage I/II: 935.9 ng/ml、Stage III/IV 1374.0 ng/ml、健常人 385.4 ng/ml) [95]。一方、cfDNA 濃度と大腸癌の Stage 間に明らかな相関を認めなかったとする報告も複数存在し [92, 96, 97]、例えば Flamini らは 75 人の大腸癌患者と 75 人の健常人の血清 cfDNA 濃度を *GAPDH* 遺伝子を標的としてリアルタイム PCR で定量し、Dukes A の早期大腸癌であっても健常人と比較して中央値で約 5 倍高い cfDNA 濃度を報告した一方で、Dukes A-D の Stage 間では明らかな差を認めなかったことを示している(中央値、健常人: 7.7 ng/ml、Dukes A: 37.5 ng/ml、Dukes B: 41.7 ng/ml、Dukes C: 22.4 ng/ml、Dukes D: 47.1 ng/ml) [92]。以上の報告からは cfDNA 濃度が大腸癌の Stage と相関するかについていまだ明確な結論はないものと考えるが、(1) 大腸癌組織における *LINE-1* の低メチル化レベルは癌発生の早期段階で上昇するがその後の Stage 進行では安定した値をとる、および(2) cfDNA 濃度は Stage I/II といった大腸癌早期群で健常人よりも有意に高値を示すが Stage の進行との関連性は明確ではない、という既存の報告から得られる知見は、cfDNA LHI が Stage I/II の大腸癌においても健常人よりも高値を示したが Stage I/II と Stage III/IV 間では有意差を認めなかったという本研究の結果を部分的に支持するものであると考えられた。なお、本研究では手術症例を対象としたために大腸腺腫と cfDNA LHI との関連性についての検討は行われていない。前述の SEPT9 の前向き臨床試験において、SEPT9 の大腸腺腫での感度は 11.2%に過ぎないことが報告されている [84]。このような結果からは、cfDNA メチル化マーカーを大腸腺腫の

発見・診断に使用することには限界があるものと予想されるが、cfDNA LHI と大腸腺腫の関連性の検討は今後の興味深い研究課題のひとつであると思われる。一方で、本研究では N2 以上のリンパ節転移のある症例および遠隔転移のある M1 症例といった高度進行症例に限定すると、cfDNA LHI はその他の症例よりも有意に高値を示した。今後さらなる検討が必要であるものの、この結果は大腸癌の Progression marker としての cfDNA LHI の可能性を示唆するものと考えられた。

本研究の限界として、第一に健常人と大腸癌患者の背景の違いが挙げられる。健常人と大腸癌患者の背景の比較では、性別および BMI には有意差を認めなかったものの喫煙歴が大腸癌患者群で高い傾向があり、また年齢は大腸癌患者群で有意に高く、交絡因子となりうる可能性が考えられた。本研究では、年齢の層別化解析において健常人の cfDNA 濃度および cfDNA LHI と年齢との関連性は認めなかったことから、健常人全例を大腸癌患者との比較解析に含めた。1400 人以上の健常人の白血球 DNA における *LINE-1* メチル化レベルを検討した報告でも、年齢のほか BMI、喫煙歴、飲酒歴との関連性は認めなかったと報告されている [98]。一方、DNA のメチル化と背景因子との関連性は様々な遺伝子においてしばしば言及される点であり [99]、今後さらなる検討のためには年齢、性別、喫煙歴、BMI といった因子のほか、併存疾患なども合致させたコホートでの解析が望ましいと考えられる。

第二に、*LINE-1* 遺伝子の低メチル化は乳癌 [100]、胃癌 [101, 102]、肺癌 [103]、肝細胞癌 [104]、悪性黒色腫 [71, 105] などの大腸癌以外の複数の癌種でも生じることが報告されており、大腸癌特異的な現象ではないことから、大腸癌の診断を目的として血漿中 cfDNA の *LINE-1* 低メチル化レベルを解析する場合、その特異性に注意が



必要である。現在、大腸癌に完全に特異的な血液中のメチル化マーカーは存在しない。前述した mSEPT9 も肺癌で陽性を示すことが報告されている [106]。血液中 cfDNA バイオマーカーにおける臓器特異性の問題は、メチル化マーカーのみならず *KRAS* をはじめとした遺伝子変異を解析対象とした場合にも存在する問題である。しかしながら序文で述べたように、近年の大腸癌の高い罹患率を考慮すれば、大腸癌診断の第一歩として血液中の cfDNA LHI を測定することは、特に便潜血検査や大腸内視鏡に抵抗のある集団において十分な意義があるものと考えられる。測定値が高い場合、大腸内視鏡検査といったより大腸特異的・確定的な検査を促す契機にもなりうる。

第三に、本研究では既存の報告がある AQAMA 法によるリアルタイム PCR によって *LINE-1* メチル化レベルを定量したが、メチル化レベルの定量法には Pyrosequencing、高感度な digital PCR、次世代シーケンサーによる target sequencing など他にも複数の方法が存在する。現在メチル化の定量に標準化された方法は存在しないが、本研究結果の妥当性を証明するためには、AQAMA 法以外の測定法でも結果が再現されるかどうかの検討が望ましいと考える。また、本研究結果は術前の単回の採血による結果であるため、今後大腸癌切除前後での遊離 DNA *LINE-1* 低メチル化レベルの比較など、複数回の採血による検討も望ましいと考える。

第四に、本研究は単一施設における集団を対象にした後ろ向き研究であり、症例数も比較的限られていることが挙げられる。臨床的な応用を目指すためには、より大規模な多施設での前向きな研究による validation が必要と考える。また、大腸癌切除前後での値の比較

以上のような研究の限界から、本研究で得られた知見の解釈と応用には今後のさら

なる検討が必要であると考え、一方で非侵襲的な大腸癌診断マーカーとしての cfDNA LHI の有用性を初めて示唆した点において意義があるものと考えられる。

## 結論

本研究では大腸癌患者における新規バイオマーカーの探索をテーマとして、手術検体および血液検体を使用して解析を行い、以下の結果を得た。

1. 大腸癌組織において、*RAD54B* 遺伝子発現は有意に上昇しており、その高発現は Stage I-III の大腸癌患者の術後遠隔再発と有意に関連しており、予後不良因子であった。そのメカニズムのひとつとして、大腸癌組織においても *RAD54B* の p53 の分解への関与が示唆された。
2. 血漿遊離 DNA の *LINE-1* 低メチル化レベルは、健常人に比較して Stage I/II の大腸癌患者においても有意に上昇しており、遊離 DNA 濃度および CEA よりも高い大腸癌識別能を示した。

以上より、大腸癌組織における *RAD54B* 遺伝子の発現量は大腸癌術後の再発予測マーカーとして有用である可能性があり、また大腸癌患者の血漿遊離 DNA における *LINE-1* 低メチル化レベルは、大腸癌の早期診断マーカーとして有用である可能性があることが示された。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、東京大学大学院 医学系研究科 外科学専攻 臓器病態外科学講座 腫瘍外科学・血管外科学 渡邊聡明教授には研究全般にわたり多大なる御指導・御鞭撻を賜り、深く感謝致します。また、東京大学大学院 医学系研究科 放射線分子医学 宮川清教授、東京大学医学部附属病院大腸肛門外科 石原聡一郎先生、畑啓介先生、山本陽子先生、日本赤十字社医療センター大腸肛門外科 須並英二先生、自治医科大学附属病院 山口博紀先生、東京大学大学院 医学系研究科 放射線分子医学 安原崇哲先生には、具体的な実験方法、データの解釈、研究の進め方、また論文の作成など、多岐に渡る詳細な御指導を頂き、深く感謝いたします。

また、実際の実験に際しましては、多くの先生方に多大なる御協力を頂きました。ここに深甚なる謝意を表します。

## 引用文献

1. Brenner H, Kloor M and Pox CP. Colorectal cancer. *Lancet*. 383(9927): 1490-1502. 2014.
2. Matsuda A, Matsuda T, Shibata A, Katanoda K, Sobue T, Nishimoto H; Japan Cancer Surveillance Research Group. Cancer incidence and incidence rates in Japan in 2008: a study of 25 population-based cancer registries for the Monitoring of Cancer Incidence in Japan (MCIJ) project. *Jpn J Clin Oncol*. 44(4): 388-396. 2014.
3. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 69(3): 89-95. 2001.
4. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. eds. *TNM Classification of Malignant Tumours*. 7th edition. Wiley-Blackwell. 2009
5. 大腸癌研究会 編. 大腸癌取扱い規約 第8版. 金原出版. 2013.
6. Haller DG, Taberero J, Maroun J, de Braud F, Price T, Van Cutsem E, Hill M, Gilberg F, Rittweger K, Schmoll HJ. Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer. *J Clin Oncol*. 29(11): 1465-1471. 2011.
7. André T, Boni C, Navarro M, Taberero J, Hickish T, Topham C, Bonetti A, Clingan P, Bridgewater J, Rivera F, de Gramont A. Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *J Clin Oncol*. 27(19): 3109-3116. 2009.
8. Kumar A, Kennecke HF, Renouf DJ, Lim HJ, Gill S, Woods R, Speers C, Cheung

- WY. Adjuvant chemotherapy use and outcomes of patients with high-risk versus low-risk stage II colon cancer. *Cancer*. 121(4): 527-534. 2015.
9. Vilar E and Gruber SB. Microsatellite instability in colorectal cancer-the stable evidence. *Nat Rev Clin Oncol*. 7(3): 153-162. 2010.
  10. Innocenti F, Schilsky RL, Ramírez J, Janisch L, Undevia S, House LK, Das S, Wu K, Turcich M, Marsh R, Karrison T, Maitland ML, Salgia R, Ratain MJ. Dose-finding and pharmacokinetic study to optimize the dosing of irinotecan according to the UGT1A1 genotype of patients with cancer. *J Clin Oncol*. 32(22): 2328-2334. 2014.
  11. Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, Juan T, Sikorski R, Suggs S, Radinsky R, Patterson SD, Chang DD. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 26(10): 1626-1634. 2008.
  12. Douillard JY, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, Humblet Y, Bodoky G, Cunningham D, Jassem J, Rivera F, Kocákova I, Ruff P, Błasińska-Morawiec M, Šmakal M, Canon JL, Rother M, Williams R, Rong A, Wietorek J, Sidhu R, Patterson SD. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 369(11): 1023-1034. 2013.
  13. 厚生労働省. 平成 25 年 国民生活基礎調査の概況.  
<<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/k-tyosa/k-tyosa13/>> (最終検索日:  
2016 年 11 月 1 日)
  14. Taber JM, Aspinwall LG, Heichman KA, Kinney AY. Preferences for blood-based colon cancer screening differ by race/ethnicity. *Am J Health Behav*. 38(3): 351-361. 2014.

15. Hiramoto T, Nakanishi T, Sumiyoshi T, Fukuda T, Matsuura S, Tauchi H, Komatsu K, Shibasaki Y, Inui H, Watatani M, Yasutomi M, Sumii K, Kajiyama G, Kamada N, Miyagawa K, Kamiya K. Mutations of a novel human RAD54 homologue, RAD54B, in primary cancer. *Oncogene*. 18(22): 3422-3426. 1999.
16. Miyagawa K, Tsuruga T, Kinomura A, Usui K, Katsura M, Tashiro S, Mishima H, Tanaka K. A role for RAD54B in homologous recombination in human cells. *Embo j*. 21(1-2): 175-180. 2002.
17. Sarai N, Kagawa W, Fujikawa N, Saito K, Hikiba J, Tanaka K, Miyagawa K, Kurumizaka H, Yokoyama S. Biochemical analysis of the N-terminal domain of human RAD54B. *Nucleic Acids Res*. 36(17): 5441-5450. 2008.
18. Tanaka K, Kagawa W, Kinebuchi T, Kurumizaka H, Miyagawa K. Human Rad54B is a double-stranded DNA-dependent ATPase and has biochemical properties different from its structural homolog in yeast, Tid1/Rdh54. *Nucleic Acids Res*. 30(6): 1346-1353. 2002.
19. Helleday T. Homologous recombination in cancer development, treatment and development of drug resistance. *Carcinogenesis*. 31(6): 955-960. 2010.
20. Krejci L, Altmannova V, Spirek M, Zhao X. Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acids Res*. 40(13): 5795-5818. 2012.
21. Thompson LH and Schild D. Homologous recombinational repair of DNA ensures mammalian chromosome stability. *Mutat Res*. 477(1-2): 131-153. 2001.
22. Yasuhara T, Suzuki T, Katsura M, Miyagawa K. Rad54B serves as a scaffold in the DNA damage response that limits checkpoint strength. *Nat Commun*. 5: 5426. 2014.
23. Symington LS. Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination

- and double-strand break repair. *Microbiol Mol Biol Rev.* 66(4): 630-670. 2002.
24. Heyer WD, Li X, Rolfsmeier M, Zhang XP. Rad54: the Swiss Army knife of homologous recombination? *Nucleic Acids Res.* 34(15): 4115-4125. 2006.
  25. Ceballos SJ and Heyer WD. Functions of the Snf2/Swi2 family Rad54 motor protein in homologous recombination. *Biochim Biophys Acta.* 1809(9): 509-523. 2011.
  26. Benson FE, Baumann P and West SC. Synergistic actions of Rad51 and Rad52 in recombination and DNA repair. *Nature.* 391(6665): 401-404. 1998.
  27. Qiao GB, Wu YL, Yang XN, Zhong WZ, Xie D, Guan XY, Fischer D, Kolberg HC, Kruger S, Stuerzbecher HW. High-level expression of Rad51 is an independent prognostic marker of survival in non-small-cell lung cancer patients. *Br J Cancer.* 93(1): 137-143. 2005.
  28. Connell PP, Jayathilaka K, Haraf DJ, Weichselbaum RR, Vokes EE, Lingen MW. Pilot study examining tumor expression of RAD51 and clinical outcomes in human head cancers. *Int J Oncol.* 28(5): 1113-1119. 2006.
  29. Li Y, Yu H, Luo RZ, Zhang Y, Zhang MF, Wang X, Jia WH. Elevated expression of Rad51 is correlated with decreased survival in resectable esophageal squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol.* 104(6): 617-622. 2011.
  30. Tennstedt P, Fresow R, Simon R, Marx A, Terracciano L, Petersen C, Sauter G, Dikomey E, Borgmann K. RAD51 overexpression is a negative prognostic marker for colorectal adenocarcinoma. *Int J Cancer.* 132(9): 2118-2126. 2013.
  31. Barbano R, Copetti M, Perrone G, Paziienza V, Muscarella LA, Balsamo T, Storlazzi CT, Ripoli M, Rinaldi M, Valori VM, Latiano TP, Maiello E, Stanziale P, Carella M, Mangia A, Pellegrini F, Bisceglia M, Muda AO, Altomare V, Murgo R,



- Fazio VM, Parrella P. High RAD51 mRNA expression characterize estrogen receptor-positive/progesteron receptor-negative breast cancer and is associated with patient's outcome. *Int J Cancer*. 129(3): 536-545. 2011.
32. Jewell R, Conway C, Mitra A, Randerson-Moor J, Lobo S, Nsengimana J, Harland M, Marples M, Edward S, Cook M, Powell B, Boon A, de Kort F, Parker KA, Cree IA, Barrett JH, Knowles MA, Bishop DT, Newton-Bishop J. Patterns of expression of DNA repair genes and relapse from melanoma. *Clin Cancer Res*. 16(21): 5211-5221. 2010.
33. Grunda JM, Fiveash J, Palmer CA, Cantor A, Fathallah-Shaykh HM, Nabors LB, Johnson MR. Rationally designed pharmacogenomic treatment using concurrent capecitabine and radiotherapy for glioblastoma; gene expression profiles associated with outcome. *Clin Cancer Res*. 16(10): 2890-2898. 2010.
34. Livak KJ and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods*. 25(4): 402-408. 2001.
35. Youden WJ. Index for rating diagnostic tests. *Cancer*. 3(1):32-35. 1950.
36. Cox LS. Multiple pathways control cell growth and transformation: overlapping and independent activities of p53 and p21Cip1/WAF1/Sdi1. *J Pathol*. 183(2): 134-140. 1997.
37. Boulaire J, Fotedar A and Fotedar R. The functions of the cdk-cyclin kinase inhibitor p21WAF1. *Pathol Biol (Paris)*. 48(3): 190-202. 2000.
38. Olivier M, Hollstein M and Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2(1): a001008. 2010.

39. Smith G, Carey FA, Beattie J, Wilkie MJ, Lightfoot TJ, Coxhead J, Garner RC, Steele RJ, Wolf CR. Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53--alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(14): 9433-9438. 2002.
40. Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC 3rd, George DL, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet.* 33(3): 357-365. 2003.
41. Söderlund K, Skoog L, Fornander T, Askmalms MS. The BRCA1/BRCA2/Rad51 complex is a prognostic and predictive factor in early breast cancer. *Radiother Oncol.* 84(3): 242-251. 2007.
42. Welsh JW, Ellsworth RK, Kumar R, Fjerstad K, Martinez J, Nagel RB, Eschbacher J, Stea B. Rad51 protein expression and survival in patients with glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 74(4): 1251-1255. 2009.
43. Vispé S, Cazaux C, Lesca C, Defais M. Overexpression of Rad51 protein stimulates homologous recombination and increases resistance of mammalian cells to ionizing radiation. *Nucleic Acids Res.* 26(12): 2859-2864. 1998.
44. Slupianek A, Schmutte C, Tomblin G, Nieborowska-Skorska M, Hoser G, Nowicki MO, Pierce AJ, Fishel R, Skorski T. BCR/ABL regulates mammalian RecA homologs, resulting in drug resistance. *Mol Cell.* 8(4): 795-806. 2001.
45. Hansen LT, Lundin C, Spang-Thomsen M, Petersen LN, Helleday T. The role of RAD51 in etoposide (VP16) resistance in small cell lung cancer. *Int J Cancer.* 105(4): 472-479. 2003.
46. Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol.* 10(8): 472-484. 2013.
47. Heitzer E, Ulz P and Geigl JB. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for

- cancer. *Clin Chem.* 61(1): 112-123. 2015.
48. Schwarzenbach H, Hoon DS and Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer.* 11(6): 426-437. 2011.
49. Marzese DM, Hirose H and Hoon DS. Diagnostic and prognostic value of circulating tumor-related DNA in cancer patients. *Expert Rev Mol Diagn.* 13(8): 827-844. 2013.
50. van der Vaart M and Pretorius PJ. The origin of circulating free DNA. *Clin Chem.* 53(12): 2215. 2007.
51. van der Vaart M and Pretorius PJ. Circulating DNA. Its origin and fluctuation. *Ann N Y Acad Sci.* 1137: 18-26. 2008.
52. Lim SH, Becker TM, Chua W, Caixeiro NJ, Ng WL, Kienzle N, Tognela A, Lumba S, Rasko JE, de Souza P, Spring KJ. Circulating tumour cells and circulating free nucleic acid as prognostic and predictive biomarkers in colorectal cancer. *Cancer Lett.* 346(1): 24-33. 2014.
53. Zitt M, Müller HM, Rochel M, Schwendinger V, Zitt M, Goebel G, Devries A, Margreiter R, Oberwalder M, Zeillinger R, Ofner D. Circulating cell-free DNA in plasma of locally advanced rectal cancer patients undergoing preoperative chemoradiation: a potential diagnostic tool for therapy monitoring. *Dis Markers.* 25(3): 159-165. 2008.
54. Reinert T, Schøler LV, Thomsen R, Tobiasen H, Vang S, Nordentoft I, Lamy P, Kannerup AS, Mortensen FV, Stribolt K, Hamilton-Dutoit S, Nielsen HJ, Laurberg S, Pallisgaard N, Pedersen JS, Ørntoft TF, Andersen CL. Analysis of circulating tumour DNA to monitor disease burden following colorectal cancer surgery. *Gut.* 65(4): 625-634. 2015.

55. Messerschmidt DM, Knowles BB and Solter D. DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos. *Genes Dev.* 28(8): 812-828. 2014.
56. Heyn H and Esteller M. DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges. *Nat Rev Genet.* 13(10): 679-692. 2012.
57. Boland CR and Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology.* 138(6): 2073-2087. 2010.
58. Hinoue T, Weisenberger DJ, Lange CP, Shen H, Byun HM, Van Den Berg D, Malik S, Pan F, Noushmehr H, van Dijk CM, Tollenaar RA, Laird PW. Genome-scale analysis of aberrant DNA methylation in colorectal cancer. *Genome Res.* 22(2): 271-282. 2012.
59. Hughes LA, Khalid-de Bakker CA, Smits KM, van den Brandt PA, Jonkers D, Ahuja N, Herman JG, Weijenberg MP, van Engeland M. The CpG island methylator phenotype in colorectal cancer: progress and problems. *Biochim Biophys Acta.* 1825(1): 77-85. 2012.
60. Elbarbary RA, Lucas BA and Maquat LE. Retrotransposons as regulators of gene expression. *Science.* 351(6274): aac7247. 2016.
61. Pal A, Srivastava T, Sharma MK, Mehndiratta M, Das P, Sinha S, Chattopadhyay P. Aberrant methylation and associated transcriptional mobilization of Alu elements contributes to genomic instability in hypoxia. *J Cell Mol Med.* 14(11): 2646-2654. 2010.
62. Antelo M, Balaguer F, Shia J, Shen Y, Hur K, Moreira L, Cuatrecasas M, Bujanda L, Giraldez MD, Takahashi M, Cabanne A, Barugel ME, Arnold M, Roca EL, Andreu M, Castellvi-Bel S, Llor X, Jover R, Castells A, Boland CR, Goel A. A high

- degree of LINE-1 hypomethylation is a unique feature of early-onset colorectal cancer. *PLoS One*. 7(9): e45357. 2012.
63. Ogino S, Nosho K, Kirkner GJ, Kawasaki T, Chan AT, Schernhammer ES, Giovannucci EL, Fuchs CS. A cohort study of tumoral LINE-1 hypomethylation and prognosis in colon cancer. *J Natl Cancer Inst*. 100(23): 1734-1738. 2008.
  64. Baba Y, Huttenhower C, Nosho K, Tanaka N, Shima K, Hazra A, Schernhammer ES, Hunter DJ, Giovannucci EL, Fuchs CS, Ogino S. Epigenomic diversity of colorectal cancer indicated by LINE-1 methylation in a database of 869 tumors. *Mol Cancer*. 9: 125. 2010.
  65. Rhee YY, Kim MJ, Bae JM, Koh JM, Cho NY, Juhn YS, Kim D, Kang GH. Clinical outcomes of patients with microsatellite-unstable colorectal carcinomas depend on L1 methylation level. *Ann Surg Oncol*. 19(11): 3441-3448. 2012.
  66. Sunami E, de Maat M, Vu A, Turner RR, Hoon DS. LINE-1 hypomethylation during primary colon cancer progression. *PLoS One*. 6(4): e18884. 2011.
  67. Martin SL. The ORF1 protein encoded by LINE-1: structure and function during L1 retrotransposition. *J Biomed Biotechnol*. 2006(1): 45621. 2006.
  68. Hur K, Cejas P, Feliu J, Moreno-Rubio J, Burgos E, Boland CR, Goel A. Hypomethylation of long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) leads to activation of proto-oncogenes in human colorectal cancer metastasis. *Gut*. 63(4): 635-646. 2014.
  69. Cordaux R and Batzer MA. The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nat Rev Genet*. 10(10): 691-703. 2009.
  70. Ogino S, Nosho K, Irahara N, Shima K, Baba Y, Kirkner GJ, Meyerhardt JA, Fuchs CS. Prognostic significance and molecular associations of 18q loss of

- heterozygosity: a cohort study of microsatellite stable colorectal cancers. *J Clin Oncol.* 27(27): 4591-4598. 2009.
71. Hoshimoto S, Kuo CT, Chong KK, Takeshima TL, Takei Y, Li MW, Huang SK, Sim MS, Morton DL, Hoon DS. AIM1 and LINE-1 epigenetic aberrations in tumor and serum relate to melanoma progression and disease outcome. *J Invest Dermatol.* 132(6): 1689-1697. 2012.
72. Tangkijvanich P, Hourpai N, Rattanatanyong P, Wisedopas N, Mahachai V, Mutirangura A. Serum LINE-1 hypomethylation as a potential prognostic marker for hepatocellular carcinoma. *Clin Chim Acta.* 379(1-2): 127-133. 2007.
73. Ramzy II, Omran DA, Hamad O, Shaker O, Abboud A. Evaluation of serum LINE-1 hypomethylation as a prognostic marker for hepatocellular carcinoma. *Arab J Gastroenterol.* 12(3): 139-142. 2011.
74. de Maat MF, Umetani N, Sunami E, Turner RR, Hoon DS. Assessment of methylation events during colorectal tumor progression by absolute quantitative analysis of methylated alleles. *Mol Cancer Res.* 5(5): 461-471. 2007.
75. Tóth K1, Sipos F, Kalmár A, Patai AV, Wichmann B, Stoehr R, Golcher H, Schellerer V, Tulassay Z, Molnár B. Detection of methylated SEPT9 in plasma is a reliable screening method for both left- and right-sided colon cancers. *PloS One.* 7(9): e46000. 2012.
76. Pox CP, Altenhofen L, Brenner H, Theilmeier A, Von Stillfried D, Schmiegel W. Efficacy of a nationwide screening colonoscopy program for colorectal cancer. *Gastroenterology.* 142(7): 1460-1467. 2012.
77. Hirai HW, Tsoi KK, Chan JY, Wong SH, Ching JY, Wong MC, Wu JC, Chan FK, Sung JJ, Ng SC. Systematic review with meta-analysis: faecal occult blood tests

- show lower colorectal cancer detection rates in the proximal colon in colonoscopy-verified diagnostic studies. *Aliment Pharmacol Ther.* 43(7): 755-764. 2016.
78. Chiu HM, Lee YC, Tu CH, Chen CC, Tseng PH, Liang JT, Shun CT, Lin JT, Wu MS. Association between early stage colon neoplasms and false-negative results from the fecal immunochemical test. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 11(7): 832-838. 2013.
79. Smith RA, Andrews K, Brooks D, DeSantis CE, Fedewa SA, Lortet-Tieulent J, Manassaram-Baptiste D, Brawley OW, Wender RC. Cancer screening in the United States, 2016: A review of current American Cancer Society guidelines and current issues in cancer screening. *CA Cancer J Clin.* 66(2): 96-114. 2016.
80. von Wagner C, Baio G, Raine R, Snowball J, Morris S, Atkin W, Obichere A, Handley G, Logan RF, Rainbow S, Smith S, Halloran S, Wardle J. Inequalities in participation in an organized national colorectal cancer screening programme: results from the first 2.6 million invitations in England. *Int J Epidemiol.* 40(3): 712-718. 2011.
81. Toiyama Y, Okugawa Y and Goel A. DNA methylation and microRNA biomarkers for noninvasive detection of gastric and colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 455(1-2): 43-57. 2014.
82. Hall PA and Russell SE. The pathobiology of the septin gene family. *J Pathol.* 204(4):489-505. 2004.
83. Lofton-Day C, Model F, Devos T, Tetzner R, Distler J, Schuster M, Song X, Lesche R, Liebenberg V, Ebert M, Molnar B, Grützmann R, Pilarsky C, Sledziewski A. DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening. *Clin Chem.* 54(2): 414-423. 2008.

84. Church TR, Wandell M, Lofton-Day C, Mongin SJ, Burger M, Payne SR, Castañós-Vélez E, Blumenstein BA, Rösch T, Osborn N, Snover D, Day RW, Ransohoff DF; PRESEPT Clinical Study Steering Committee, Investigators and Study Team. Prospective evaluation of methylated SEPT9 in plasma for detection of asymptomatic colorectal cancer. *Gut*. 63(2): 317-325. 2014.
85. Wong FC, Sun K, Jiang P, Cheng YK, Chan KC, Leung TY, Chiu RW, Lo YM. Cell-free DNA in maternal plasma and serum: A comparison of quantity, quality and tissue origin using genomic and epigenomic approaches. *Clin Biochem*. 49(18): 1379-1386. 2016.
86. Warton K and Samimi G. Methylation of cell-free circulating DNA in the diagnosis of cancer. *Front Mol Biosci*. 2: 13. 2015.
87. Tanaka K and Okamoto A. Degradation of DNA by bisulfite treatment. *Bioorg Med Chem Lett*. 17(7): 1912-1915. 2007.
88. Locker GY, Hamilton S, Harris J, Jessup JM, Kemeny N, Macdonald JS, Somerfield MR, Hayes DF, Bast RC Jr; ASCO. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *J Clin Oncol*. 24(33): 5313-5327. 2006.
89. Nicholson BD, Shinkins B, Pathiraja I, Roberts NW, James TJ, Mallett S, Perera R, Primrose JN, Mant D. Blood CEA levels for detecting recurrent colorectal cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. (12): Cd011134. 2015.
90. El-Gayar D, El-Abd N, Hassan N, Ali R. Increased Free Circulating DNA Integrity Index as a Serum Biomarker in Patients with Colorectal Carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev*. 17(3): 939-944. 2016.
91. Schwarzenbach H, Stoecklacher J, Pantel K, Goekkurt E. Detection and



- monitoring of cell-free DNA in blood of patients with colorectal cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 1137: 190-196. 2008.
92. Flamini E, Mercatali L, Nanni O, Calistri D, Nunziatini R, Zoli W, Rosetti P, Gardini N, Lattuneddu A, Verdecchia GM, Amadori D. Free DNA and carcinoembryonic antigen serum levels: an important combination for diagnosis of colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 12(23): 6985-6988. 2006.
93. Fleischhacker M and Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer--a survey. *Biochim Biophys Acta.* 1775(1): 181-232. 2007.
94. Baba Y, Murata A, Watanabe M, Baba H. Clinical implications of the LINE-1 methylation levels in patients with gastrointestinal cancer. *Surg Today.* 44(10): 1807-1816. 2014.
95. Hao TB, Shi W, Shen XJ, Qi J, Wu XH, Wu Y, Tang YY, Ju SQ. Circulating cell-free DNA in serum as a biomarker for diagnosis and prognostic prediction of colorectal cancer. *Br J Cancer.* 111(8): 1482-1489. 2014.
96. Umetani N, Kim J, Hiramatsu S, Reber HA, Hines OJ, Bilchik AJ, Hoon DS. Increased integrity of free circulating DNA in sera of patients with colorectal or periampullary cancer: direct quantitative PCR for ALU repeats. *Clin Chem.* 52(6): 1062-1069. 2006.
97. Tóth K, Wasserkort R, Sipos F, Kalmár A, Wichmann B, Leiszter K, Valcz G, Juhász M, Miheller P, Patai ÁV, Tulassay Z, Molnár B. Detection of methylated septin 9 in tissue and plasma of colorectal patients with neoplasia and the relationship to the amount of circulating cell-free DNA. *PLoS One.* 9(12): e115415. 2014.
98. Zhu ZZ, Hou L, Bollati V, Tarantini L, Marinelli B, Cantone L, Yang AS, Vokonas

- P, Lissowska J, Fustinoni S, Pesatori AC, Bonzini M, Apostoli P, Costa G, Bertazzi PA, Chow WH, Schwartz J, Baccarelli A. Predictors of global methylation levels in blood DNA of healthy subjects: a combined analysis. *Int J Epidemiol.* 41(1): 126-139. 2012.
99. Terry MB, Delgado-Cruzata L, Vin-Raviv N, Wu HC, Santella RM. DNA methylation in white blood cells Association with risk factors in epidemiologic studies. *Epigenetics:* 6(7): 828-837. 2011.
100. van Hoesel AQ, van de Velde CJ, Kuppen PJ, Putter H, de Kruijf EM, van Nes JG, Giuliano AE, Hoon DS. Primary tumor classification according to methylation pattern is prognostic in patients with early stage ER-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 131(3): 859-869. 2012.
101. Bae JM, Shin SH, Kwon HJ, Park SY, Kook MC, Kim YW, Cho NY, Kim N, Kim TY, Kim D, Kang GH. ALU and LINE-1 hypomethylations in multistep gastric carcinogenesis and their prognostic implications. *Int J Cancer.* 131(6): 1323-1331. 2012.
102. Shigaki H, Baba Y, Watanabe M, Murata A, Iwagami S, Miyake K, Ishimoto T, Iwatsuki M, Baba H. LINE-1 hypomethylation in gastric cancer, detected by bisulfite pyrosequencing, is associated with poor prognosis. *Gastric Cancer.* 16(4): 480-487. 2013.
103. Ikeda K, Shiraishi K, Eguchi A, Shibata H, Yoshimoto K, Mori T, Baba Y, Baba H, Suzuki M. Long interspersed nucleotide element 1 hypomethylation is associated with poor prognosis of lung adenocarcinoma. *Ann Thorac Surg.* 96(5): 1790-1794. 2013.
104. Harada K, Baba Y, Ishimoto T, Chikamoto A, Kosumi K, Hayashi H, Nitta H,

- Hashimoto D, Beppu T, Baba H. LINE-1 methylation level and patient prognosis in a database of 208 hepatocellular carcinomas. *Ann Surg Oncol.* 22(4): 1280-1287. 2015.
105. Sigalotti L, Fratta E, Bidoli E, Covre A, Parisi G, Colizzi F, Coral S, Massarut S, Kirkwood JM, Maio M. Methylation levels of the "long interspersed nucleotide element-1" repetitive sequences predict survival of melanoma patients. *J Transl Med.* 9: 78. 2011.
106. Powrózek T, Krawczyk P, Kucharczyk T, Milanowski J. Septin 9 promoter region methylation in free circulating DNA-potential role in noninvasive diagnosis of lung cancer: preliminary report. *Med Oncol.* 31(4): 917. 2014.