

Blood Free-Circulating DNA Testing of
Methylated RUNX3 Is Useful for Diagnosing
Early Gastric Cancer

（血清中のRUNX3メチル化DNAの定量解析は早期胃癌の診断に有用である）

氏名 秀浦 栄三郎
所属 山口大学大学院医学系研究科
医学専攻
消化器内科学講座

令和 2年 6月

目次

1. 要旨	1
2. 研究の背景	2
3. 目的	2
4. 方法	3
(1) 対象	3
(2) 方法	4
(3) 統計解析	5
5. 結果	6
6. 考察	10
7. 結語	12
8. 謝辞	12
9. 参考文献	13

1. 要旨

本邦において、胃癌の罹患者数および死亡者数は多いが、早期発見により完治が期待できる癌である。現在、胃癌のスクリーニング検査として上部消化管内視鏡検査と胃X線造影検査が用いられているが、前者は侵襲が大きく、後者は偽陰性が多い。より低侵襲で、精度の高い胃癌スクリーニング検査が求められており、その候補としてリキッドバイオプシーがある。プロモータ領域のメチル化による転写因子RUNX3の発現低下が胃癌発生に重要であることが明らかになっており、その検出が胃癌のバイオマーカーとして期待されている。我々は複数のメチル化感受性制限酵素処理とデジタルPCRを併用することにより、微量な検体であってもメチル化DNAを定量できる高感度な検出法を開発した。本方法を用いることにより、血清中のRUNX3メチル化DNAを従来の100倍の感度で定量することが可能となった。我々は、本方法を用いて、血清中のRUNX3メチル化DNAが早期胃癌の診断に有用かを検討した。

対象は健常コントロール群61名、早期胃癌群50名の計111名とした。血清からDNAを抽出し、RUNX3メチル化DNA量を定量化した。血清中RUNX3メチル化DNA量の中央値はコントロール群2.8コピー、早期胃癌群6.4コピーと早期胃癌群で有意に高かった。ROC解析にて6.4コピーをカットオフ値としたところ、早期胃癌の診断能は感度50.0%、特異度80.3%であった。また、血清中RUNX3メチル化DNA量は腫瘍径の増大・腫瘍の深達度・脈管侵襲との関連がみられた。多変量解析でRUNX3メチル化DNA量は早期胃癌の独立した危険因子であることが証明された。また、早期胃癌の根治切除後にRUNX3メチル化DNA量は有意に低下した。

我々の開発した超高感度アッセイによる血清中のRUNX3メチル化DNA定量解析は低侵襲かつ安価な早期胃癌スクリーニング検査として有用である。

2. 研究の背景

胃癌は2018年の統計によると世界で5番目に多い悪性腫瘍で、癌死亡原因の第3位であり、モンゴル、日本、大韓民国を含む東アジアで発症率が著しく高い [1]。2018年の本邦における胃癌の5年生存率は、早期を含むStage Iでは94.9%と非常に高い一方、Stage IIでは68.2%、Stage IIIでは43.4%、Stage IVでは9.6%にまで低下する [2]。したがって、胃癌の死亡率を低下させるためには、早期発見が非常に重要である。

腫瘍マーカーであるCEAやCA19-9は、胃癌の根治的治療後の腫瘍再発予測に広く利用されている有用なバイオマーカーであるが [3]、感度や特異度が低いため、National Comprehensive Cancer Networkのガイドラインでは胃癌のスクリーニング検査には推奨されていない [4]。胃癌スクリーニングに有用なバイオマーカーの検討は十分ではなく、胃癌のスクリーニング方法はほぼ上部消化管内視鏡検査と胃X線造影検査に限られている [5]が、どちらの検査にも欠点がある。上部消化管内視鏡検査は侵襲が高く高価であり [5]、胃X線造影検査は早期胃癌では感度が低く、偽陰性率が高い [6, 7]。したがって、低侵襲、安価、かつ容易な早期胃癌を検出するための検査法を開発することが重要である。

その一つの解決策として、血液中の血中循環遊離DNAをターゲットとしたリキッドバイオプシーが考えられる。メチル化されたRUNX3は、胃癌のバイオマーカーとされている [8]。RUNX3のDNAメチル化は*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 感染によって引き起こされるが [9]、これは胃粘膜の炎症を引き起こし、胃粘膜の萎縮、腸上皮化生、および異形成を誘発する [10]。世界の胃癌の約80%が*H. pylori*感染と関連している [11]。

我々は、非常に感度の高い技術であるcombined restriction digital PCR (CORD) を開発した。この方法は、バイサルファイト処理を必要とせずに、少量のDNA中のメチル化DNAを1コピーでも検出することができる、非常に感度の高いメチル化DNAの検出法である。CORD法の感度は、従来のバイサルファイト処理を行うメチル化DNA検出法に比べて100倍以上高く、対象となるDNA量が少なくても検出が可能となっている。 [12-14]。

3. 目的

本研究では、CORD法による血清中のRUNX3メチル化DNAの定量が早期胃癌の検出に有用か検討した。

4. 方法

(1) 対象

対象は、2016年11月25日から2020年2月29日までの間に山口大学医学部附属病院において、内視鏡的切除あるいは外科的切除により病理学的に早期胃癌と確定診断され、画像診断等で他の臓器に癌がないことが確認されている患者50例とした。コントロール群として、同期間にセントヒル病院、阿知須共立病院を受診した、胃癌の既往歴がなく、上部消化管内視鏡検査で胃癌がないことが判明している検診受診者61例のサンプルを用いた。被験者は全員日本人であった。腫瘍深達度は、粘膜 (m)、粘膜下層浅層浸潤 (sm1) (< 500 μ mの粘膜下層への浸潤)、粘膜下層深部浸潤 (sm2) (\geq 500 μ mの粘膜下層への浸潤) に分類した[15]。高分化型管状腺癌、中分化型管状腺癌および乳頭状腺癌は分化型癌に分類し、低分化腺癌および印環細胞癌は未分化型癌に分類した。分化型癌と未分化型癌のいずれも含む病変は、どちらが顕微鏡的に優勢であるかに基づいて分類した [15]。萎縮性胃炎の進展度については、木村-竹本分類 [16] を用いた。病期分類は、Union for International Cancer Control (UICC) [17] に準じて分類した。

同意書での説明に加え、本研究の目的や上部消化管内視鏡検査に伴う偶発症リスクについて、被験者との対面診察で口頭にて説明した。非癌コントロールは全員自発的に参加し、上部消化管内視鏡検査のリスクを明確に理解し、書面による同意書に署名した。表1に本研究の臨床病理学的特徴を示す。

この研究は山口大学大学院医学系研究科、セントヒル病院、阿知須共立病院の倫理審査委員会の認証を得ており（認証番号：H28-124）、研究に参加するすべての患者および非癌コントロールから書面による同意を得ている。

表1：本研究の臨床病理学的特徴

	カテゴリー	胃癌群 (n = 50)	コントロール群 (n = 61)	P値
年齢	中央値 (範囲)	72.2 (34-90)	58 (39-86)	<0.0001
性別	男性	41	32	0.0013
	女性	9	29	
メチル化RUNX3	中央値 (範囲)	6.4 (0.0-26.0)	2.8 (0.0-18.4)	0.0003
萎縮性胃炎の進展度	Closed type	12	52	<0.0001
	Open type	38	9	
腫瘍径 (mm)	中央値 (範囲)	14.5 (4.0-65.0)	NA	NA
腫瘍深達度	粘膜内	42	NA	NA
	粘膜下層浅層	4		
	粘膜下層深層	4		
分化度	分化型	46	NA	NA
	未分化型	4		

リンパ管-静脈侵襲	あり	4	NA	NA
	なし	46		
<i>H. pylori</i> 除菌歴	あり	23	NA	NA
	なし	27		
血清抗 <i>H. pylori</i> 抗体	> 10 U/mL	16	NA	NA
	3-10 U/mL	14		
	< 3 U/mL	20		
CEA	> 6.0 ng/mL	2	NA	NA
	≤ 6.0 ng/mL	48		
CA19-9	> 37.0 U/mL	0	NA	NA
	≤ 37.0 U/mL	50		

NA, not available.

(2) 方法

血清サンプルの採取

2016年11月25日から2020年2月29日までの間に、山口大学医学部附属病院、セントヒル病院、阿知須共立病院のいずれかの施設で上部消化管内視鏡検査に先立って血清を採取し、DNA抽出まで-80℃で保存した。内視鏡的生検が結果に影響することを避けるため、生検を行った場合は生検後3週間以上経過した時点で採血を行った。また、内視鏡的切除または外科的切除後2ヶ月以上経過した時点でも血清を採取した。

癌胎児性抗原（CEA）の測定

50例の早期胃癌患者の血清で、市販のCEA免疫測定キット「TOSOH」IIと自動免疫測定装置AIA-2000（Tosoh Corporation、Tokyo）を用いて山口大学医学部附属病院でCEAを測定した。血清CEA値のカットオフ値はメーカーの指示に従い、6 ng/mLとした。

CA19-9の測定

50例の早期胃癌患者の血清で、市販のCA19-9免疫測定キット「ARCHITECT CA19-9XR」と自動免疫測定装置ARCHITECT i2000（Abbot Corporation、Tokyo）を用いて、山口大学医学部附属病院でCA19-9を測定した。血清CA19-9のカットオフ値はメーカーの指示に従い、37 U/mLとした。

血清抗*H. pylori*抗体の測定

早期胃癌患者50例の血清抗*H. pylori*抗体の測定は、LSIメディエンス株式会社（Tokyo、Japan）に委託した。*H. pylori*に対する抗体の測定には、市販のキット（LZ test「Eiken」*H. pylori*抗体、Eiken Kagaku、Tokyo）と臨床化学自動分析装置BM9130（JEOL、Tokyo）を使用した。*H. pylori*感染症の評価には、抗体価のカットオフ値を10 U/mL以上を現感染状態とした [11, 18]。患者を血清中の*H. pylori*抗体価によって[< 3 U/mL、3~10 U/mL、および > 10 U/mL [19]]と3グループに分けた。

サンプルの調製およびDNA抽出

非メチル化RUNX3のコントロールとして末梢血白血球由来のDNAを、メチル化RUNX3のコントロールとしてEpiScope methylated HCT116gDNA (Takara Bio Inc.) を用いた。血清を-80°Cから解凍した後、MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche, Tokyo) を用いて、各サンプル0.4 mLからDNAを抽出した。抽出したDNAを50 μ Lの溶出液に溶出し、Qubit 2.0フロロメーター (Thermo Fisher Scientific, Yokohama) を用いて二本鎖DNAを定量した。

CORDアッセイ

CORDアッセイでは、まず複数のメチル化感受性制限酵素でDNAの処理を行う。溶出した10 μ LのDNA (血清80 μ Lに相当するDNA量) を1 μ LのGeneAmp 10 \times PCR Buffer II, 1 μ Lの25 mmol/L MgCl₂, 10 UのHha IとHpa II, 20 Uのエキソヌクレアーゼ I (Exo I) (すべて、Thermo Fisher Scientific) を加えて、37°Cで16時間酵素処理を行う。Exo Iは、制限酵素による切断から逃れた一本鎖DNAを除去し、未切断のDNAをPCR増幅しないために使用している[20]。次に10 UのBstUI (New England Biolabs, Hitchin, UK) を用いて、60°Cで16時間追加処理を行い、さらに98°Cで10分間加熱を加える。RUNX3はメチル化感受性酵素Hpa IIの認識部位 (CCGG) を有しており、その部位がメチル化されると上記処理でもDNAの切断は起こらずPCR増幅されるため、ドロップレットデジタルPCRを用いてメチル化されたRUNX3の絶対コピー数を定量することが出来る。PCR反応液は、酵素処理されたDNA 8 μ L (血清40 μ Lに相当するDNA量)、1 \times ddPCR Supermix for Probes (BioRad, Tokyo)、各プライマー0.25 μ mol/L、RUNX3プローブ0.125 μ mol/Lの合計20 μ Lを組み合わせて調製した。

RUNX3のプライマーおよびプローブの塩基配列は以下の通りである。

Forward primer : 5' -TATGCGTATTCCCGTAGACCC-3'

Reverse primer : 5' -GCTGTTCTCGCCCATCTTG-3'

probe : 5' -FAM-TCCCGGGCCTTCCCTGCGG-TMARA-3'

PCRによるアンプリコン長は、第1染色体 (ヒトアセンブリGRCh37/hg19) の25,256,261~25,256,360からの100bpである。我々は、既報[8]に基づいて、RUNX3のプライマーとプローブを設定した。自動液滴生成装置 (BioRad) で液滴生成を完了した後、95°Cで10分間の予熱、94°Cで30秒間の変性を40サイクル、50°Cで60秒間のアニーリング、98°Cで10分間の加熱というサイクルでPCRを行った。増幅後、PCRプレートをQX100 droplet reader (BioRad) に入れ、蛍光増幅データをQuantaSoftソフトウェア (BioRad) で解析した。

(3) 統計解析

変数をMann-Whitney U 検定、対応のあるt検定、Fisher's exact検定、ROC曲線分析で比較し、線形回帰分析も行った。P値は < 0.05を統計学的に有意性と定めたと定めた。統計解析には、GraphPad Prism Ver. 6とGraphPad InStat Ver. 3

を使用した (GraphPad Software, La Jolla, CA)。胃癌の独立した危険因子を同定するために、BellCurve for Excel (SSRI、Tokyo) を用いて二項ロジスティック回帰分析を行った。

5. 結果

CEA、CA19-9、血清抗*H. pylori*抗体価

早期胃癌群では、CEA (> 6 ng/mL) およびCA19-9 (> 37 U/mL) の増加がそれぞれ2/50例 (4.0%) および0/50例 (0.0%) に認められた。抗*H. pylori*抗体価の上昇 (> 10 U/mL) は、早期胃癌患者の16/50例 (32.0%) にのみ認められたが、これは23/50例 (46%) がすでに*H. pylori*の除菌治療を受けていたためと考える。コントロール群ではCEA、CA19-9、抗*H. pylori*抗体価を測定していないため特異性の評価はできない。

CORDアッセイの基本性能

白血球から採取したDNA (RUNX3の脱メチル化対照DNA) にEpiScope methylated HCT116gDNA (Takara Bio Inc) を以下の比率(100%、50%、25%、12.5%、6.25%、3.12%、1.56%、および0%) で含有することにより、癌由来のメチル化DNAを検出するCORDアッセイの基本性能を検証した。そして、各サンプルのメチル化RUNX3のコピー数を測定した。図1および表2は、CORD法が、メチル化されていない対象DNA 3691 pgのバックグラウンドで、メチル化されたDNA 59 pgからRUNX3のコピー数を定量することができることを示している。これらの結果より、CORDアッセイで必要とするテンプレートDNA量は40 μLの血清に由来するDNA量と同等であることがわかった。

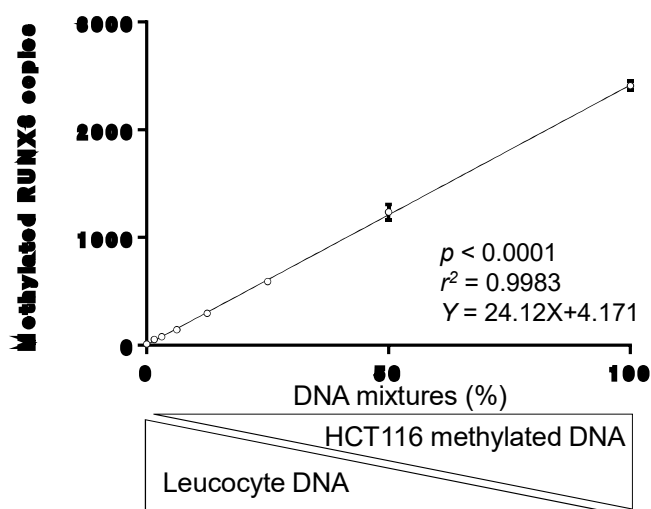


図1：CORDアッセイ性能の基本テスト。x軸はテンプレートDNA中の白血球DNAに対するメチル化

HCT116 DNAの比率を示す。y軸は実験的に決定されたRUNX3のメチル化コピー数を表す。

Factors	Mixtures (%)							
	0	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100
Amount of template DNAs (pg)								
HCT116 methylated DNA	0	59	117	234	469	938	1875	3750
Leukocyte DNA	3750	3691	3633	3516	3281	2813	1875	0
Measured methylated RUNX3								
Mean copy numbers	11	54	78	144	296	592	1237	2408
SD	3.4	10.6	9.8	13.4	27.5	28.9	69.7	43.8

表2：CORDアッセイの基本性能の概要

早期胃癌のバイオマーカーとしてのメチル化RUNX3

メチル化されたRUNX3コピー数の中央値は、コントロール群では2.8コピー（0.0～18.4）、治療前の胃癌群では6.4コピー（0.0～26.0）であった（図2a）。ROC曲線分析によると、area under the curve(AUC)は0.6952であった（図2b）。胃癌群のメチル化RUNX3コピー数の中央値である6.4コピーを暫定的にカットオフ値に設定したところ、カットオフ値以上となる割合は、コントロール群では19.7%（12/61例）、胃癌群では50.0%（25/50例）であった（特異度80.3%）。メチル化RUNX3コピー数の増加は、腫瘍径、粘膜下層深部浸潤（sm2）、脈管侵襲（図3a-c）と有意に関連がみられたが、血清抗*H. pylori*抗体価、*H. pylori*の除菌歴、および内視鏡的胃粘膜萎縮の進展度とは関連がみられなかった（図3d-f）。また、二項ロジスティック回帰分析により、年齢、性別、内視鏡的胃粘膜萎縮の進展度、およびメチル化RUNX3レベルが胃癌の独立した危険因子であることが示された（表3）。

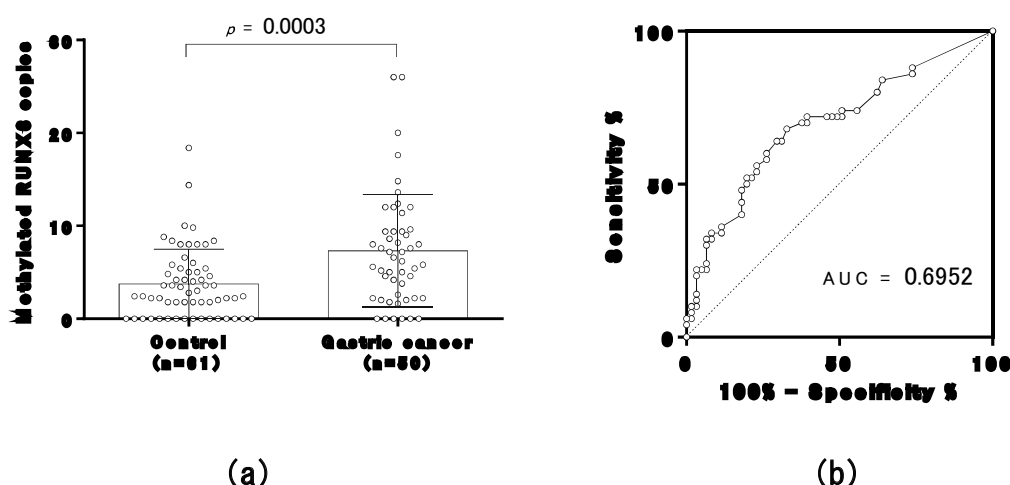


図2：メチル化RUNX3コピー数の分布を示す。(a) メチル化RUNX3コピー数の分布をグループごとに示す。丸は個々のサンプルであり、血清40 μ Lに相当するDNA量あたりのメチル化RUNX3コピー数を示す。ボックスプロットは中央値と四分位の範囲（25%と75%）を示す。(b) コントロール群

と早期胃癌群を識別するためのメチル化RUNX3コピー数のROC曲線解析を示す。

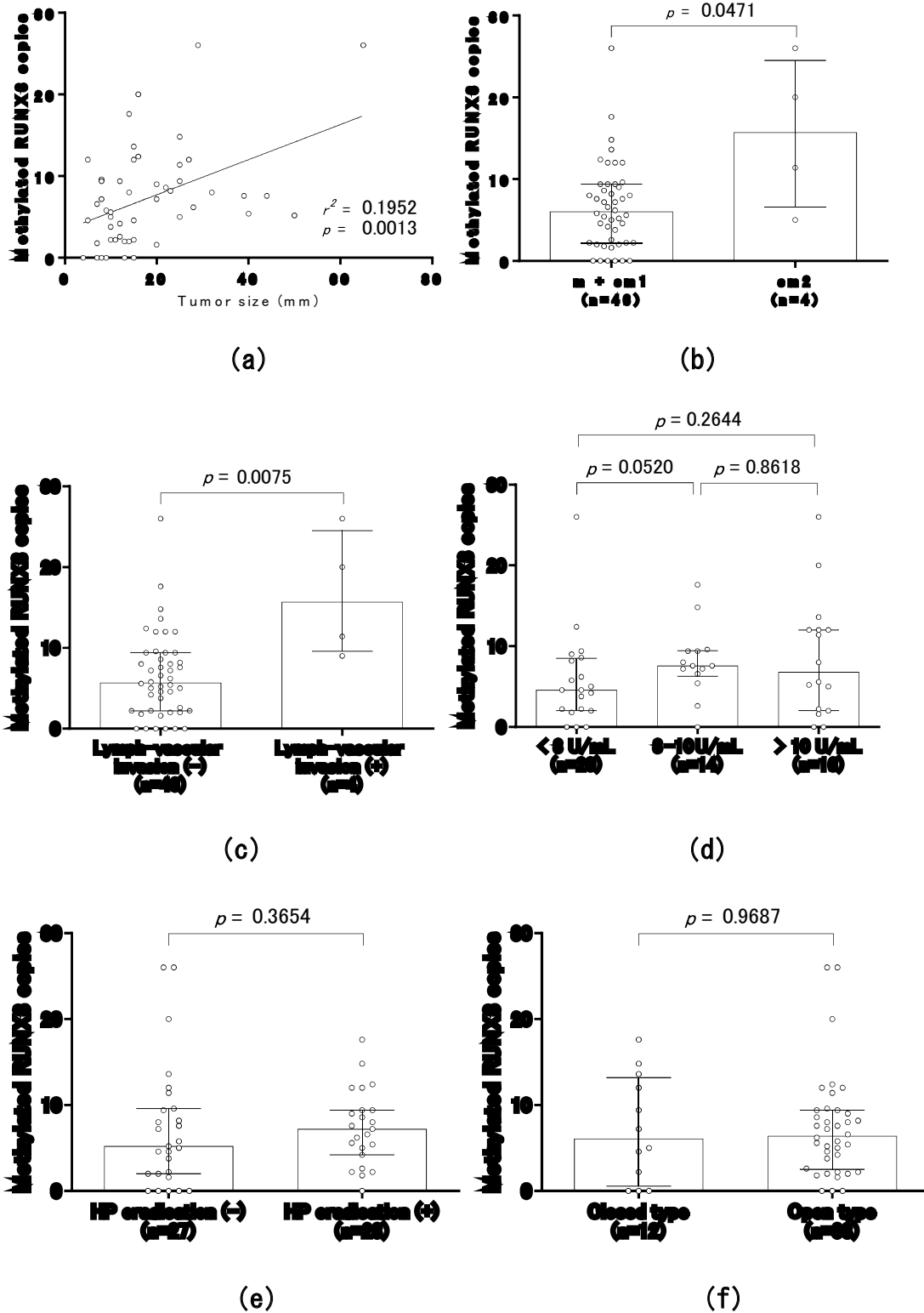


図3: メチル化RUNX3コピー数と腫瘍の特徴および臨床的特徴の比較。すべてのパネルにおいて血清40 μ Lに相当するDNA量あたりのメチル化RUNX3コピー数を示し、丸は個々のサンプルを示す。(a)腫瘍径とメチル化RUNX3コピー数との相関を示す。(b-f): 腫瘍深達度(b)、脈管侵襲の

有無(c)、抗*H. pylori*抗体価(d)、*H. pylori*除菌の有無(e)、内視鏡的胃粘膜萎縮の進展度(f)に応じたメチル化RUNX3コピー数の分布を示す。ボックスプロットは中央値および四分位の範囲(25%および75%)を示す。

表3:胃癌の危険因子

因子	単変量解析		多変量解析	
	OR (95% CI)	P-値	OR (95% CI)	P-値
年齢	1.11 (1.06-1.16)	< 0.001	1.09 (1.03-1.15)	0.0048
性				
男性	4.13 (1.71-9.95)	0.0013	7.47 (2.05-27.23)	0.0023
女性	Reference			
胃粘膜萎縮				
Open type	18.30 (7.00-47.80)	<0.001	9.50 (2.97-30.35)	< 0.001
Closed type	Reference			
メチル化RUNX3コピー数				
> 6.4 copies	4.08 (1.76-9.46)	0.0011	4.43 (1.38-14.28)	0.0126
≤ 6.4 copies	Reference			

OR:odds ratio, CI:confidence interval

治療前後での血清メチル化RUNX3コピー数の変化

内視鏡的切除あるいは外科的切除後、メチル化RUNX3コピー数の中央値は6.4コピーから2.7コピー(0.0~26.0)に有意に減少した(図4)。また、カットオフ値として設定した6.4コピーを治療後に超える割合は、14.0%(7/50例)であった。7例の内、2例ではメチル化RUNX3のコピー数は治療後に減少したが、他の5例では増加した(図4)。

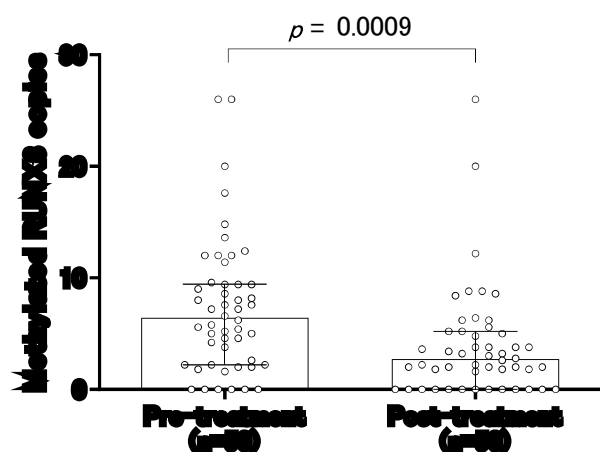


図4: 血清メチル化RUNX3コピー数の治療前後の変化。ボックスプロットは、中央値および四分位の範囲(25%および75%)を示す。

6. 考察

本研究では、血清CEAとCA19-9の感度は、他の研究者の報告と同様に、早期胃癌の検出において非常に低い（それぞれ3.0%と0.0%）ことが示された[4]。抗*H. pylori*抗体価の上昇（> 10 U/mL）は、胃癌群の16/50例（32.0%）で認められた。しかし、日本では*H. pylori*感染率が高く、スクリーニング検査で994例中604例（60.8%）に抗*H. pylori*抗体価の上昇（> 10 U/mL）が認められたと報告されている[21]。したがって、抗*H. pylori*抗体価検査は胃癌のスクリーニング検査としては不相当である。また、胃粘膜の萎縮は*H. pylori*感染によって引き起こされるが、早期胃癌群で抗*H. pylori*抗体価の上昇が32%であったにも関わらず、高度の胃粘膜萎縮は76%にみられた。この結果の解離は、*H. pylori*の除菌が関係していると考えられる。本研究では胃癌群の23/50例に*H. pylori*の除菌歴があった。また、*H. pylori*は自然除菌されることがあり、これもこの結果の解離に関係している可能性がある。

従来のメチル化アッセイでは一般的にDNAのバイサルファイト処理が行われるが、この反応により高度の断片化を伴い [22]、約90%のDNAが失われる[23]。これらのアッセイでは、バイサルファイト処理後にテンプレートDNA中の標的遺伝子の最低10コピーが必要である[24]。したがって、各テンプレートDNAは、バイサルファイト処理を行うためには標的遺伝子の少なくとも100コピーを必要とする[22]。これに対して、CORDアッセイではDNAのバイサルファイト処理を必要としないため、必要とされるテンプレートDNAの量は、40 µLの血清中で必要とされる量と同等である[13]。そして、メチル化レベルの評価は、標的遺伝子の1コピーでもカウントができるドロップレットデジタルPCRを用いて行われる[25]。これらの要因により、CORDアッセイは従来のメチル化アッセイよりも容易にメチル化DNAの測定を行うことが出来る[12-14, 26-28]。CORD アッセイを含む制限酵素ベースのメチル化アッセイの問題点は、不完全なDNA切断による偽陽性の可能性があることである。この問題を回避するために、我々はExo Iを添加して一本鎖DNAを除去し、制限酵素による切断から逃れた一本鎖DNAがPCR増幅を受けないようにした。さらに、DNAの不完全な切断を避けるために、制限酵素のインキュベーション時間をメーカー指定時間の最長時間である16時間に設定し、我々はCORDアッセイを実施する度に白血球のDNAを外部コントロールとして使用し、非メチル化DNAが完全に切断されたことを確認した。

従来のバイサルファイト処理ベースの血清メチル化アッセイによって測定された胃癌患者の血中循環メチル化RUNX3は、これまでに他の研究者によって報告されているが[8, 9, 29, 30]、早期胃癌を含むStage I胃癌に対する感度は0.0~19.0%と極めて低い[9, 30]。従来のバイサルファイト処理を用いた血清メチル化アッセ

イの問題点は、微量の血中循環腫瘍DNAに対して十分な感度が得られないことである。*Sakakura*らは、バイサルファイト処理をされたDNAと2段階のPCRからなるRUNX3のリアルタイムメチル化特異的PCRを用いて、微量の血中循環腫瘍DNAに対する感度を高めたが、Stage I 胃癌の感度は0.0% (0/28)であった[30]。*Lu*らもバイサルファイト処理をされたDNAとRUNX3のリアルタイムメチル化特異的PCRを用いており、Stage I 胃癌の感度は19.0% (4/21)であった[9]。一方、我々のCORDアッセイではDNAのバイサルファイト処理が不要であり、従来のメチル化アッセイの100倍の感度を有していることから、CORDアッセイは臨床成績を向上させることができると考えた。実際に、メチル化RUNX3の血清CORDアッセイでは、早期胃癌の検出において50%の感度が得られ、既報 (0-19.0%) と比較しても優れた性能を示した[9, 30]。

我々は、早期胃癌におけるメチル化RUNX3コピー数の増加と脈管侵襲および腫瘍径の間に有意な関連があることを発見した。これらは既報と一致するが、その報告ではStage I ~ Stage IVの胃癌を対象としており、Stage Iに限定したものではなかった[30]。報告ではStage I 胃癌患者におけるRUNX3のメチル化レベルが非常に低いため、RUNX3のメチル化レベルを脈管侵襲および腫瘍径と比較することは困難であった[30]としている。したがって、我々の知る限りでは、早期胃癌における脈管侵襲および腫瘍径に伴うメチル化RUNX3コピー数の増加、および粘膜下層深層 (sm2) 浸潤とメチル化RUNX3コピー数の増加のいずれにも有意な関連があることを示した世界初の報告である。早期胃癌におけるリンパ節転移の危険因子として、腫瘍径、粘膜下層深層 (sm2) 浸潤、脈管侵襲が挙げられることが多い[31-34]。リンパ節転移のない早期胃癌の治療には内視鏡的切除が適応とされている[35]ので、血清中に循環するメチル化RUNX3コピー数は、早期胃癌に対する内視鏡的切除の適応を判断するためのバイオマーカーともなりうるかもしれない。

本研究にはいくつかの限界がある。サンプルサイズが小さく、コントロール群と早期胃癌群では年齢と性別の分布が異なることである。したがって、本研究は、血中に循環するメチル化RUNX3コピー数が早期胃癌の有望なバイオマーカーであることを示す予備的なデータであると考えられる。このレベルの上昇は、肺、乳房、膵臓、大腸、肝臓など他臓器の癌[8]や良性疾患の患者でも観察される[30]。このように、血中のメチル化RUNX3コピー数の増加は、胃癌に限らず、何らかの癌や良性疾患の存在を示唆している可能性がある。今回の研究では、コントロール群の約20%にメチル化RUNX3のコピー数の増加が認められた。また、根治治療後の胃癌患者7例においても、メチル化RUNX3のコピー数は高いままであった。それら対象者については、さらなる検診と追跡調査が必要である。血清中のメチル化RUNX3のDNAコピー数が普遍的な腫瘍マーカーとして有用であることを明らかにするためには、様々な癌種からなるレトロスペクティブおよびプロスペクティブなコホート研究が必要である。

CORDアッセイの使用は、バイオバンクの資源を利用してレトロスペクティブ研究を実施する場合に特に有用である。なぜなら、バイオバンクから市販されている血液サンプルの量は少量で、通常は1 mL未満であるからである [36]。従来の臨床検査のメチル化アッセイでは血漿または血清を最大4 mL必要とする場合があるが [27, 28, 37]、CORDアッセイでは1回の検査に必要なDNA量は血清40 μ Lに相当するDNA量のみである。このように、CORDアッセイでは、バイオバンクを利用した血液サンプル中の様々な遺伝子のメチル化レベルの測定およびデータの再現性の確認が容易である。

7. 結語

CORDアッセイによる血清メチル化RUNX3のDNA分析は、早期胃癌の検出に対して50%の感度と80.3%の特異度を示した。本研究はCORDアッセイによる血清メチル化RUNX3測定が早期胃癌患者の検出に有用である可能性を示唆しており、早期胃癌を検出するためのスクリーニング検査となり得る可能性がある。本研究で得られた知見を裏付けるために、より大規模で独立したデータを用いた検証研究が必要である。

8. 謝辞

本論文を作成するに当たりデータ解析のご支援をいただいた山口大学医学部附属病院の岡山 直子様、水野 秀一様に心より感謝申し上げます。

この研究は科学研究費助成事業から助成をいただきました (No. 25460687)。

9. 参考文献

- [1] Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* 2018, 68, 394-424.
- [2] Hotta, T. *Cancer Statistics in Japan-2018*; Hotta, T., Ed.; Foundation for Promotion of Cancer Research: Tokyo, Japan, 2019.
- [3] Takahashi, Y.; Takeuchi, T.; Sakamoto, J.; Touge, T.; Mai, M.; Ohkura, H.; Kodaira, S.; Okajima, K.; Nakazato, H.; Tumor Marker Committee. The usefulness of CEA and/or CA19-9 in monitoring for recurrence in gastric cancer patients: A prospective clinical study. *Gastric Cancer* 2003, 6, 142-145.
- [4] Strong, V.E.; D'Amico, T.A.; Kleinberg, L.; Ajani, J. Impact of the 7th Edition AJCC staging classification on the NCCN clinical practice guidelines in oncology for gastric and esophageal cancers. *J. Natl. Compr. Cancer Netw.* 2013, 11, 60-66.
- [5] Chan, A.O.O. Gastric Cancer Screening [UpToDate®]. 2018 [Updated Feb 01, 2018]. Available online: <https://www.uptodate.com/contents/gastric-cancer-screening> (accessed on 10 December 2019).
- [6] Longo, W.E.; Zucker, K.A.; Zdon, M.J.; Modlin, I.M. Detection of early gastric cancer in an aggressive endoscopy unit. *Am. Surg.* 1989, 55, 100-104.
- [7] Dooley, C.P.; Larson, A.W.; Stace, N.H.; Renner, I.G.; Valenzuela, J.E.; Elia soph, J.; Colletti, P.M.; Halls, J.M.; Weiner, J.M. Double-contrast barium meal and upper gastrointestinal endoscopy. A comparative study. *Ann Intern. Med.* 1984, 101, 538-545.
- [8] Tan, S.H.; Ida, H.; Lau, Q.C.; Goh, B.C.; Chieng, W.S.; Loh, M.; Ito, Y. Detection of promoter hypermethylation in serum samples of cancer patients by methylation-specific polymerase chain reaction for tumor suppressor genes including RUNX3. *Oncol. Rep.* 2007, 18, 1225-1230.
- [9] Lu, X.X.; Yu, J.L.; Ying, L.S.; Han, J.; Wang, S.; Yu, Q.M.; Wang, X.B.; Fang, X.H.; Ling, Z.Q. Stepwise cumulation of RUNX3 methylation mediated by *Helicobacter pylori* infection contributes to gastric carcinoma progression. *Cancer* 2012, 118, 5507-5517.
- [10] Llorca-Cardenaosa, M.J.; Fleitas, T.; Ibarrola-Villava, M.; Peña-Chilet, M.; Mongort, C.; Martinez-Ciarpaglini, C.; Navarro, L.; Gambardella, V.; Castillo, J.; Roselló, S.; et al. Epigenetic changes in localized gastric cancer: The role of RUNX3 in tumor pr

- ogression and the immune microenvironment. *Oncotarget* 2016, 7, 63424-63436.
- [11] Shuto, M.; Fujioka, T.; Matsunari, O.; Okamoto, K.; Mizukami, K.; Okimoto, T.; Kodama, M.; Takigami, S.; Seguchi, C.; Nonaka, Y.; et al. Association between gastric cancer risk and serum *Helicobacter pylori* antibody titers. *Gastroenterol. Res. Pr.* 2017, 2017, 1286198.
- [12] Suehiro, Y.; Zhang, Y.; Hashimoto, S.; Takami, T.; Higaki, S.; Shindo, Y.; Suzuki, N.; Hazama, S.; Oka, M.; Nagano, H.; et al. Highly sensitive faecal DNA testing of TWIST1 methylation in combination with faecal immunochemical test for haemoglobin is a promising marker for detection of colorectal neoplasia. *Ann. Clin. Biochem.* 2018, 55, 59-68.
- [13] Suehiro, Y.; Hashimoto, S.; Higaki, S.; Fujii, I.; Suzuki, C.; Hoshida, T.; Matsumoto, T.; Yamaoka, Y.; Takami, T.; Sakaida, I.; et al. Blood free-circulating DNA testing by highly sensitive methylation assay to diagnose colorectal neoplasias. *Oncotarget* 2018, 9, 16974-16987.
- [14] Kotoh, Y.; Suehiro, Y.; Saeki, I.; Hoshida, T.; Maeda, M.; Iwamoto, T.; Matsumoto, T.; Hidaka, I.; Ishikawa, T.; Takami, T.; et al. Novel liquid biopsy test based on a sensitive methylated SEPT9 assay for diagnosing hepatocellular carcinoma. *Hepatol. Commun.* 2020, in press.
- [15] Goto, A.; Nishikawa, J.; Hideura, E.; Ogawa, R.; Nagao, M.; Sasaki, S.; Kawasato, R.; Hashimoto, S.; Okamoto, T.; Ogihara, H.; et al. Lymph node metastasis can be determined by just tumor depth and lymphovascular invasion in early gastric cancer patients after endoscopic submucosal dissection. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2017, 29, 1346-1350.
- [16] Kimura, K.; Satoh, K.; Ido, K.; Taniguchi, Y.; Takimoto, T.; Takemoto, T. Gastritis in the Japanese stomach. *Scand. J. Gastroenterol.* 1996, 214, 17-20.
- [17] Brierley, J.D.; Gospodarowicz, M.K.; Wittekind, C. *TNM Classification of Malignant Tumours*, 8th ed.; Brierley, J.D., Gospodarowicz, M.K., Wittekind, C., Eds.; Wiley-Blackwell: Hoboken, NJ, USA, 2016.
- [18] Kotachi, T.; Ito, M.; Yoshihara, M.; Boda, T.; Kiso, M.; Masuda, K.; Matsuo, T.; Tanaka, S.; Chayama, K. Serological evaluation of gastric cancer risk based on pepsinogen and *Helicobacter pylori* antibody: Relationship to endoscopic findings. *Digestion* 2017, 95, 314-318.
- [19] Kishikawa, H.; Kimura, K.; Takarabe, S.; Kaida, S.; Nishida, J. *Helicobacter pylori* Antibody Titer and Gastric Cancer Screening. *Dis. Markers* 2015, 2015, 156719.
- [20] Nygren, A.O.; Dean, J.; Jensen, T.J.; Kruse, S.; Kwong, W.; van den Boom, D.; Ehrich, M. Quantification of fetal DNA by use of methylation-based DNA discrimination. *Clin. Chem.* 2010, 56, 1627-1635.

- [21] Iino, C.; Shimoyama, T.; Oyama, T.; Chiba, D.; Umeda, T.; Takahashi, I.; Matsuzaka, M.; Iwane, K.; Fukuda, S. Evaluation of the appropriate cut-off value for serological diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by comparison with a stool antigen test. *Hirosaki Med. J.* 2012, 63, 48-54.
- [22] Raizis, A.M.; Schmitt, F.; Jost, J.P. A bisulfite method of 5-methylcytosine mapping that minimizes template degradation. *Anal. Biochem.* 1995, 226, 161-166.
- [23] Grunau, C.; Clark, S.J.; Rosenthal, A. Bisulfite genomic sequencing: Systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Res.* 2001, 29, E65.
- [24] Fantony, J. J.; Abern, M. R.; Gopalakrishna, A.; Owusu, R.; Tay, K. J.; Lance, R. S.; Inman, B. A. Multi-institutional external validation of urinary TWIST1 and NID2 methylation as a diagnostic test for bladder cancer. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* 2015, 33, 387.e1-387.e6.
- [25] Hindson, B. J.; Ness, K. D.; Masquelier, D. A.; Belgrader, P.; Heredia, N. J.; Makarewicz, A. J.; Bright, I. J.; Lucero, M. Y.; Hiddessen, A. L.; Legler, T. C.; et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal. Chem.* 2011, 83, 8604-8610.
- [26] Imperiale, T. F.; Ransohoff, D. F.; Itzkowitz, S. H.; Levin, T. R.; Lavin, P.; Lidgard, G. P.; Ahlquist, D. A.; Berger, B. M. Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening. *N. Engl. J. Med.* 2014, 370, 1287-1297.
- [27] Potter, N. T.; Hurban, P.; White, M. N.; Whitlock, K. D.; Lofton-Day, C. E.; Tetzner, R.; Koenig, T.; Quigley, N. B.; Weiss, G. Validation of a real-time PCR-based qualitative assay for the detection of methylated SEPT9 DNA in human plasma. *Clin. Chem.* 2014, 60, 1183-1191.
- [28] Mitchell, S. M.; Ho, T.; Brown, G. S.; Baker, R. T.; Thomas, M. L.; McEvoy, A.; Xu, Z. Z.; Ross, J. P.; Lockett, T. J.; Young, G. P.; et al. Evaluation of methylation biomarkers for detection of circulating tumor DNA and application to colorectal cancer. *Genes* 2016, 7, 125.
- [29] Lin, Z.; Luo, M.; Chen, X.; He, X.; Qian, Y.; Lai, S.; Si, J.; Chen, S. Combined detection of plasma ZIC1, HOXD10 and RUNX3 methylation is a promising strategy for early detection of gastric cancer and precancerous lesions. *J. Cancer* 2017, 8, 1038-1044.
- [30] Sakakura, C.; Hamada, T.; Miyagawa, K.; Nishio, M.; Miyashita, A.; Nagata, H.; Ida, H.; Yazumi, S.; Otsuji, E.; Chiba, T.; et al. Quantitative analysis of tumor-derived methylated RUNX3 sequences in the serum of gastric cancer patients. *Anticancer. Res.* 2009, 29, 2619-2625.
- [31] Yamao, T.; Shirao, K.; Ono, H.; Kondo, H.; Saito, D.; Yamaguchi, H.; Sasako, M.; Sano, T.; Ochiai, A.; Yoshida, S. Risk factors for lymph node metastasis from intramucosal gastric carcinoma. *Cancer* 1996, 77, 602-606.

- [32] Gotoda, T.; Yanagisawa, A.; Sasako, M.; Ono, H.; Nakanishi, Y.; Shimoda, T.; Kato, Y. Incidence of lymph node metastasis from early gastric cancer: Estimation with a large number of cases at two large centers. *Gastric Cancer* 2000, 3, 219-225.
- [33] Abe, N.; Sugiyama, M.; Masaki, T.; Ueki, H.; Yanagida, O.; Mori, T.; Watanabe, T.; Atomi, Y. Predictive factors for lymph node metastasis of differentiated submucosally invasive gastric cancer. *Gastrointest. Endosc.* 2004, 60, 242-245.
- [34] Hamabe, K.; Nishikawa, J.; Kiyotoki, S.; Saito, M.; Okamoto, T.; Yanai, H.; Hirahashi, M.; Oda, Y.; Matsusaki, K.; Kawano, T.; et al. Endoscopic resection is infeasible for early gastric cancers with undifferentiated components. *Hepatogastroenterology* 2014, 61, 594-598.
- [35] Tada, M.; Murakami, A.; Karita, M.; Yanai, H.; Okita, K. Endoscopic resection of early gastric cancer. *Endoscopy* 1993, 25, 445-450.
- [36] Nagai, A.; Hirata, M.; Kamatani, Y.; Muto, K.; Matsuda, K.; Kiyohara, Y.; Nishiyama, T.; Tamakoshi, A.; Yamagata, Z.; Mushiroda, T.; et al. Overview of the Biobank Japan Project: Study design and profile. *J. Epidemiol.* 2017, 27, S2-S8.
- [37] Pedersen, S.K.; Baker, R.T.; McEvoy, A.; Murray, D.H.; Thomas, M.; Molloy, P.L.; Mitchell, S.; Lockett, T.; Young, G.P.; LaPointe, L.C. A two-gene blood test for methylated DNA sensitive for colorectal cancer. *PLoS ONE* 2015, 10, e0125041
- [38] Hideura, E.; Suehiro, Y.; Nishikawa, J.; Shuto, T.; Fujimura, H.; Ito, S.; Goto, A.; Hamabe, K.; Saeki, I.; Okamoto, T.; et al. Blood Free-Circulating DNA Testing of Methylated RUNX3 Is Useful for Diagnosing Early Gastric Cancer. *Cancers* 2020, 12(4), 789.