

Combination of CA19-9 and Blood Free-circulating
Methylated RUNX3 May Be Useful to Diagnose Stage I
Pancreatic Cancer

(CA19-9 と血清メチル化 RUNX3 の組み合わせに
よる早期の膵癌診断の可能性)

氏名 藤本 祐子

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12月

所属 消化器内科学

氏名 藤本 祐子

〔題名〕

Combination of CA19-9 and Blood Free-circulating Methylated RUNX3 May Be Useful to Diagnose Stage I Pancreatic Cancer

(CA19-9 と血清メチル化 RUNX3 の組み合わせによる早期の膵癌診断の可能性)

Oncology (令和2年9月アクセプト済み)

〔研究背景〕

膵癌は2018年において世界で4番目の死亡原因として報告されている。ほとんどの膵癌患者は症状が出現した段階で受診し、転移や血管浸潤を伴うなど病期が進行した状態で診断されるため、膵癌の5年生存率は約6%と他の癌と比較して非常に低い。また、膵癌全体に占めるステージI膵癌の割合は約2%と報告されており、診断される患者の多くは検診や他疾患の経過観察中に異常を指摘されているため、早期に膵癌を発見するための新しい診断法が求められている。

CA19-9は膵癌の治療効果や再発をみるためのバイオマーカーであり、広く臨床診療で用いられている。しかしながらCA19-9は早期の膵癌においては感度が約50%と低く、早期に膵癌を診断するスクリーニング検査としては通常、用いられていない。さらにルイス遺伝子を持たない患者ではCA19-9が合成されないため、約5%の患者はCA19-9が測定限界値以下となる。そこで、CA19-9の弱点を補い、より早期に膵癌を診断するための感度の高い新しいバイオマーカーの開発が必要である。

癌化に關与する遺伝子異常としてDNAのメチル化が様々な悪性腫瘍で報告されている。多くの癌抑制遺伝子がDNAメチル化により不活化されることが知られており、癌診断における重要な役割を果たしているとされる。また、腫瘍由来のDNAを検出する方法として、リキッドバイオプシーが近年、注目されている。リキッドバイオプシーは内視鏡や針を使って腫瘍細胞を採取する従来の生検に代わる低侵襲な診断法である。膵癌においてもこのリキッドバイオプシーを利用したDNAメチル化の検出がCA19-9の弱点を補う検査法として期待されている。リキッドバイオプシーのターゲットとしてはRUNX3などの腫瘍特異的なメチル化遺伝子であるが、従来のメチル解析法では循環血液中の腫瘍DNA量が少ない場合はDNAメチル化レベルを測定することが極めて困難であり、臨床応用までは至っていなかった。この問題を解決するため、我々は複数のメチル化感受性制限酵素での処理後、デジタルPCRによるメチル化レベルを測定するcombined restriction digital PCR (CORD) assayを開発した。この方法により、高感度にメチル化レベルの測定が可能となり、メチル化DNAを1コピーだけでも検出することが可能となった。

今回、本技術を用いたメチル化RUNX3をターゲットとしたリキッドバイオプシーとCA19-9の併用がステージI膵癌の検出率向上させ、早期に膵癌を診断することに寄与するかを検討するため、本研究を行った。

〔要旨〕

<対象と方法>

対象は健常者(healthy control)80人、良性膵疾患患者12人、膵癌患者55人とした。健常者は健診にて上部消化管内視鏡と下部消化管内視鏡検査で異常がなく、過去に悪性腫瘍の指摘がないことを確認した。良性膵疾患患者の内訳は慢性膵炎6人、自己免疫性膵炎4人、膵管内乳頭粘液性腫瘍1人であった。55人の膵癌患者のステージはそれぞれI/II/III/IV:9/13/13/20であった。(表1に本研究の臨床病理学的特徴を示す。)対象期間は2017年4月から2020年5月までであり、DNAは0.4mlの血清から抽出された。メチル化感受性制限酵素を用いてDNAを2段階で処理した後にデジタルPCRを行い、メチル化レベルを測定するcombined restriction digital PCR(CORD) assayを行った。

表1: 本研究の臨床病理学的特徴

Parameters	Category	Healthy (n = 80)	Benign pancreatic disease (n = 12)	Pancreatic cancer (n = 55)
Age, years	Median (range)	55 (34-88)	69.5 (54-80)	71 (51-92)
Sex, n	Male	43	10	29
	Female	37	2	26
Tumor size, mm	Median (range)			27 (10-64)
Stage, N (n/n)	I (IA/IB)			9 (6/3)
	II (IIA/IIIB)			13 (0/13)
	III			13
	IV			20

<結果>

カットオフ値は血清DNAにおいては膵癌患者のメチル化RUNX3コピー数の中央値である8.6コピーを、CA19-9においては100 U/mLで設定した。(メチル化RUNX3値とCA19-9の分布を図1に示す。)メチル化RUNX3単独では全ステージにおいて感度は50.9%(28/55)、ステージIにおいて55.6%(5/9)であった。CA19-9の感度は全ステージにおいて74.5%(41/55)、ステージIにおいて55.6%(5/9)であった。特異度はメチル化RUNX3単独では93.5%(86/92)、CA19-9単独では100%(92/92)であった。CA19-9とメチル化RUNX3のいずれかあるいは両方がカットオフ値以上の値をとる際にCA19-9とメチル化RUNX3の併用が陽性と定義した。CA19-9とメチル化RUNX3の併用により全ステージで感度は85.5%(47/55)、ステージIにおいて感度は77.8%(7/9)であった。特異度は93.5%(86/92)であった。(表2に全ステージとステージI膵癌におけるメチル化RUNX3、CA19-9、メチル化RUNX3とCA19-9の組み合わせによる感度・特異度を示す。図2にコントロール群と膵癌(全ステージならびにステージI)を識別するためのメチル化RUNX3コピー数とCA19-9のROC曲線、各ステージの膵癌患者におけるRUNX3とCA19-9陽性の分布を示す。)

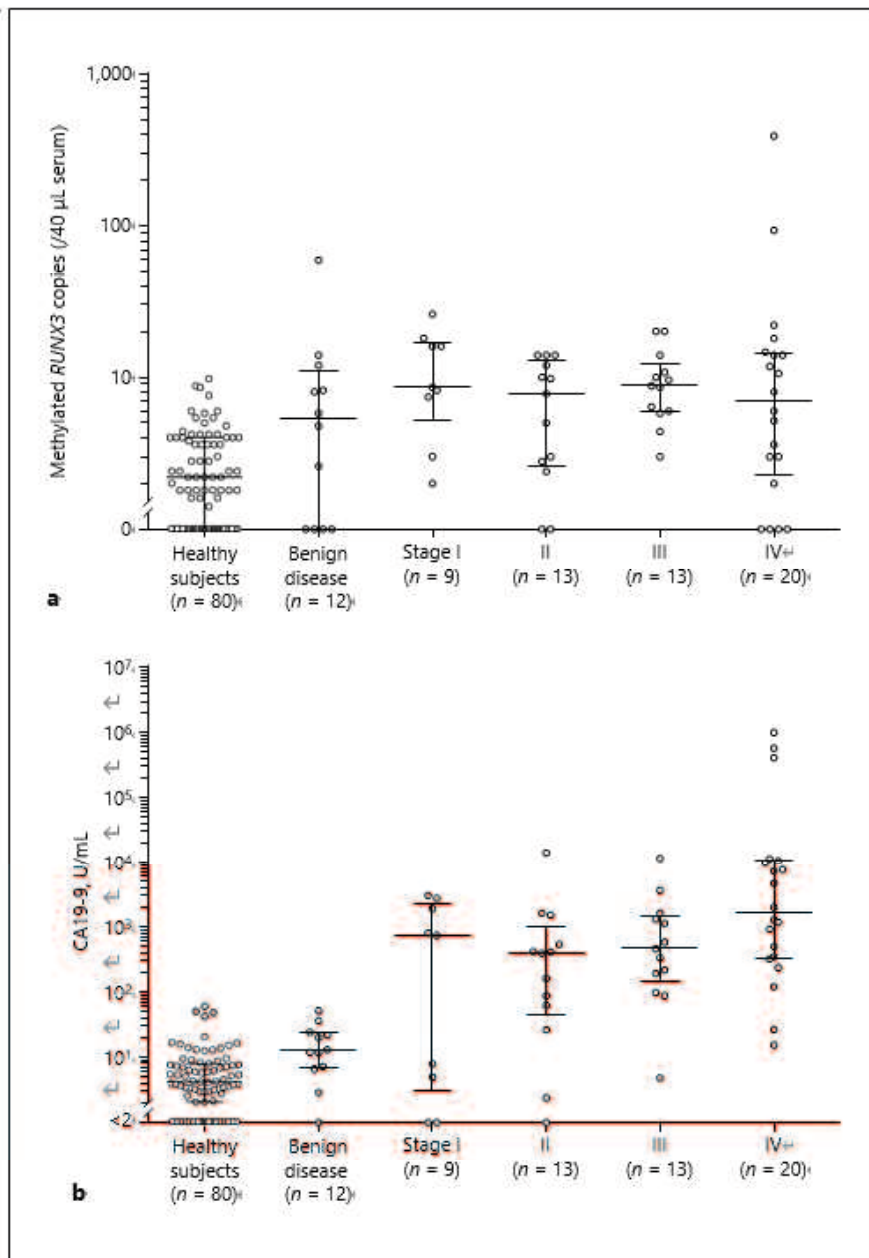


図 1：メチル化 RUNX3 コピー数(a)と CA19-9(b)の分布。丸は個々のサンプルを示す。

表 2：全ステージとステージ I 膵癌におけるメチル化 RUX3、CA19-9、メチル化 RUNX3 と CA19-9 の組み合わせによる感度・特異度

Group ^{1,2}	N ²	Methylated RUNX3 ³				CA19-9 ⁴					Combination ²				
		positive results ² , n (95% CI), % ²	specificity (95% CI), % ²	sensitivity (95% CI), % ²	p value ²	OR (95% CI) ²	positive results ² , n ²	specificity (95% CI), % ²	sensitivity (95% CI), % ²	p value ²	OR (95% CI) ²	positive results ⁴ , n ²	specificity (95% CI), % ²	sensitivity (95% CI), % ²	p value ²
No pancreatic cancer ^{1,2}	92 ²	6 ²	93.5 ² (86.4–97.6) ²		1 ² (Reference) ²	0 ²	100 ² (96.1–100) ²			1 ² (Reference) ²	6 ²	93.5 ² (86.4–97.6) ²			1 ² (Reference) ²
<i>Pancreatic cancer</i> ²															
All stages	55 ²	28 ²	50.9 ² (37.1–64.6) ²	<0.0001 ²	14.9 ² (5.6–39.7) ²	41 ²	74.5 ² (61.0–85.4) ²	<0.0001 ²		529.5 ² (30.8–9,095) ²	47 ²	85.5 ² (73.3–97.6) ²	<0.0001 ²	84.2 ² (27.6–257.3) ²	
Stage I	9 ²	5 ²	55.6 ² (21.2–86.3) ²	0.0006 ²	17.9 ² (3.8–84.8) ²	5 ²	55.6 ² (21.2–86.3) ²	<0.0001 ²		226.1 ² (10.7–4,757.7) ²	7 ²	77.8 ² (40.0–97.2) ²	<0.0001 ²	50.2 ² (8.5–296.4) ²	

CI, confidence interval; OR, odds ratio. ¹The “no pancreatic cancer” group includes the healthy subject group and the benign pancreatic disease group. ²Criterion for a positive result of CA19-9: 100 U/mL or more of CA19-9. ³Criterion for a positive result of methylated RUNX3: 8.6 or more copy numbers of methylated RUNX3. ⁴Criterion for a positive result with the combination of CA19-9 and methylated RUNX3: either positive CA19-9 or methylated RUNX3, or both positive.

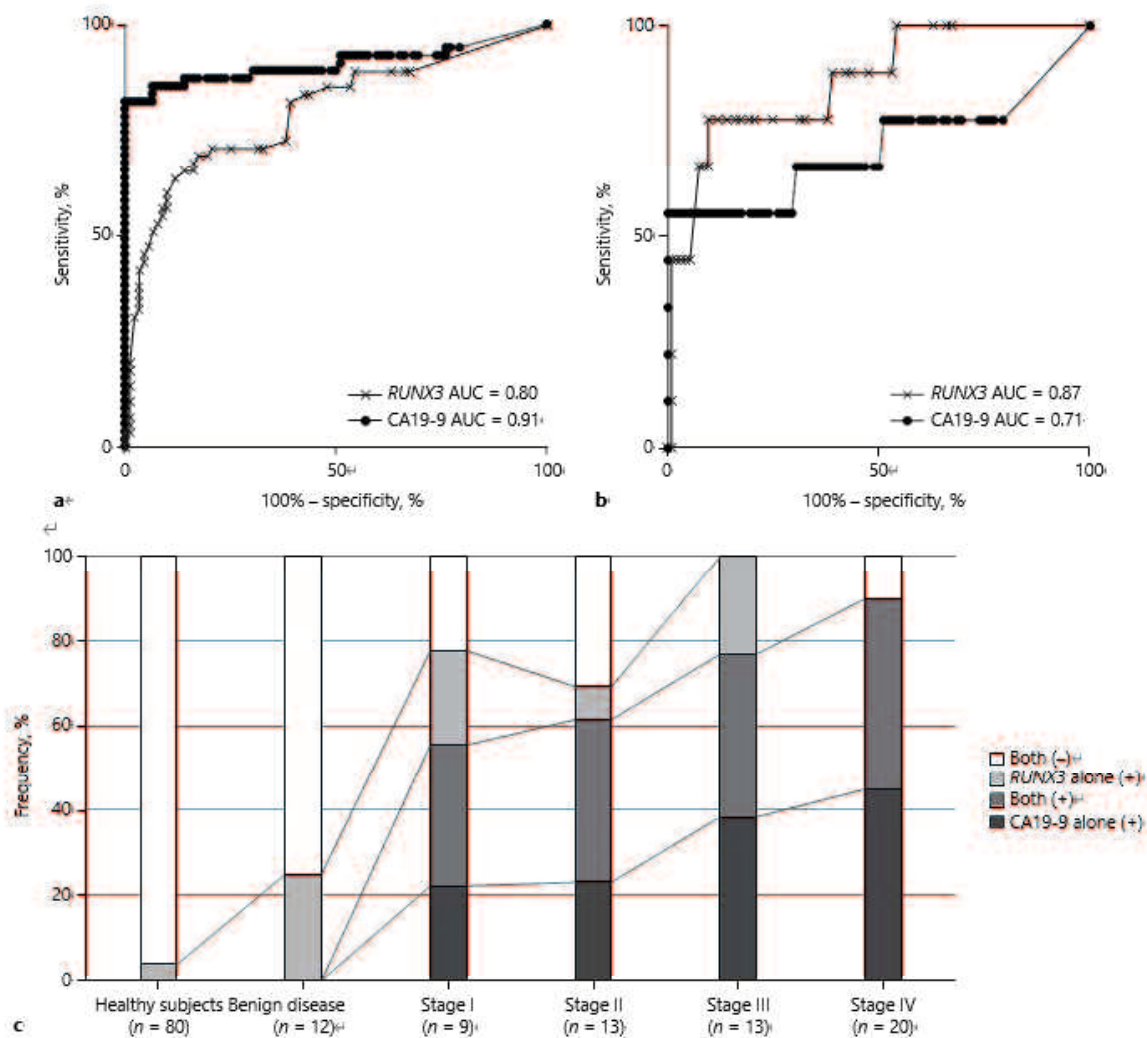


図2 (a):コントロール群と膵癌(全ステージ)を識別するためのメチル化 RUNX3 コピー数と CA19-9 の ROC 曲線。(b):コントロール群とステージ I 膵癌を識別するための RUNX3 コピー数と CA19-9 の ROC 曲線。(c):膵癌各ステージにおける RUNX3 と CA19-9 陽性の分布 (Both (-):メチル化 RUNX3 と CA19-9 がともに陰性、RUNX3 alone (+):メチル化 RUNX3 のみ陽性、Both (+):メチル化 RUX3 と CA19-9 がともに陽性、CA19-9 alone(+):CA19-9 のみ陽性)

<考察>

本研究の結果から、CA19-9 とメチル化 RUNX3 のそれぞれ単独による診断であっても、ステージ I 膵癌は一定数の患者においては診断可能であったが、感度は不十分であった。しかしながら、両者を併用することで全ステージでは 85.5%、ステージ I では 77.8%と CA19-9、RUNX3 それぞれ単独による診断と比較し、感度の上昇を認めた。従来のバイサルファイト処理を用いたメチル化解析法での膵癌患者の循環血液中メチル化 RUNX3 を検出することは、他施設の研究グループから過去に報告されているが、サンプル数が非常に小さく、臨床での有用性に関して評価することは困難であった。しかし、我々が開発した CORD assay では少ない DNA 量でも検出が可能であり、従来の方法と比較し 100 倍の感度を認めている。本研究は早期での膵癌のスクリーニングにおいて CORD assay を用いたメチル化 RUNX3 の有用性を示した初めての報告である。本研究の課題としてはステージ I 膵癌や良性膵疾患患者においてはサンプル数が少ないため、症例数を増やした上での検討や解析が求められる。

CORD assay を用いた血清メチル化 RUNX3 と CA19-9 の併用は CA19-9 単独による診断と比較し、早期での膵癌の検出に有用である可能性が示唆された。今後の膵癌診療において CORD assay を用いた血清メチル化 RUNX3 の応用についても期待される。メチル化 RUNX3 の臨床応用に向けて、また研究成果を確立するため、より大規模での臨床研究が望まれる。

<結語>

CORD assay を用いた血清メチル化 RUNX3 と CA19-9 の併用は早期の膵癌検出に有用である可能性が示唆された。

<謝辞>

本研究において、山口大学検査部の方々によるデータ解析の支援に感謝いたします。また検体提供いただきました消化器・腫瘍外科の永野昭浩教授ならびに、ご指導いただきました臨床検査・腫瘍学の末廣 寛准教授、山崎隆弘教授および消化器内科学の坂井田 功教授に御礼申し上げます。

<参考文献>

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018 Nov;68(6):394-424.
2. Manoochehri M, Wu Y, Giese NA, Strobel O, Kutschmann S, Haller F, et al. SST gene hypermethylation acts as a pan-cancer marker for pancreatic ductal adenocarcinoma and multiple other tumors: toward its use for blood-based diagnosis. *Mol Oncol.* 2020 Apr 3.
3. Poruk KE, Gay DZ, Brown K, Mulvihill JD, Boucher KM, Scaife CL, et al. The clinical utility of CA 19-9 in pancreatic adenocarcinoma: diagnostic and prognostic updates. *Current molecular medicine.* 2013 Mar;13(3):340-51.
4. Steinberg W. The clinical utility of the CA 19-9 tumor-associated antigen. *The American journal of gastroenterology.* 1990 Apr;85(4):350-5.

5. Egawa S, Takeda K, Fukuyama S, Motoi F, Sunamura M, Matsuno S. Clinicopathological aspects of small pancreatic cancer. *Pancreas*. 2004 Apr;28(3):235-40.
6. Tan SH, Ida H, Lau QC, Goh BC, Chieng WS, Loh M, et al. Detection of promoter hypermethylation in serum samples of cancer patients by methylation-specific polymerase chain reaction for tumour suppressor genes including RUNX3. *Oncol Rep*. 2007 Nov;18(5):1225-30.
7. Lee JS, Park SS, Lee YK, Norton JA, Jeffrey SS. Liquid biopsy in pancreatic ductal adenocarcinoma: current status of circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Mol Oncol*. 2019 Aug;13(8):1623-50.
8. Suehiro Y, Zhang Y, Hashimoto S, Takami T, Higaki S, Shindo Y, 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 Jan;55(1):59-68.
9. Hideura E, Suehiro Y, Nishikawa J, Shuto T, Fujimura H, Ito S, et al. Blood Free-Circulating DNA Testing of Methylated RUNX3 Is Useful for Diagnosing Early Gastric Cancer. *Cancers (Basel)*. 2020 Mar 26;12(4).