

学位論文（博士）

A novel index combining fecal immunochemical test, DNA test,
and age improves detection of advanced colorectal adenoma

（便潜血検査、DNA 検査、および年齢を組み合わせた
新たな指標が、大腸進行腺腫の検出率を向上させる）

氏名 石黒 旭代

所属 山口大学大学院医学系研究科

医学専攻 臨床検査・腫瘍学講座

令和 7 年 12 月

目 次

1. 要旨	3
2. 研究の背景	4
3. 方法	4
(1) 臨床材料	4
(2) FIT	5
(3) メチル化解析	5
(4) 統計解析	6
4. 結果	6
5. 考察	8
6. 結語	9
7. 謝辞	9
8. 参考文献	10

1. 要旨

【背景】

免疫学的便潜血検査 (Fecal immunochemical test for hemoglobin: FIT) は、大腸癌のスクリーニング検査として広く用いられているが、大腸進行腺腫を検出するには感度が不十分である。この問題に対処するため、本研究では FIT とメチル化ソマトスタチン (*SST*) を標的とした便 DNA 検査を組み合わせることで、進行腺腫の診断性能が向上するかどうかを検討した。

大腸内視鏡検査で腫瘍を認めなかった健常人 79 名、非進行腺腫患者 43 例、進行腺腫患者 117 例、および大腸癌患者 126 例を対象とした。便 DNA をメチル化感受性制限酵素で処理後、droplet digital PCR 法により *SST* メチル化レベルを測定した。ロジスティック多変量解析を用い、大腸腫瘍を検出する予測式を確立し、これを FAMS index (FIT、age、methylated *SST*) と命名した。進行腺腫に対する FIT 単独の診断性能は、感度 29.1% (34/117)、特異度 89.3% (109/122) を示した。一方で、FAMS index は、同程度の特異度 91.0% (111/122) で 56.4% (66/117) の感度を示した。さらに、特異度を 94.3% (115/122) と高く設定した場合でも、感度は FIT よりも高く 42.7% (50/117) に達した。FAMS index は、FIT の単独使用よりも進行腺腫の診断性能に優れているため、進行腺腫の検出に有望なツールとなり得る。

2. 研究の背景

大腸癌 (Colorectal cancer: CRC) は、世界の部位別癌罹患率では第 3 位、死亡率では第 2 位の疾患である。2020 年には 190 万件以上の新規 CRC 症例と 93 万 5 千件の CRC による死亡が発生したと推定され、これらの数値はそれぞれ当年の新規総癌患者数と総癌死亡者数の約 10 人に 1 人に相当する¹。CRC は、早期あるいは前癌病変で検出することができれば、症例の約 95% 以上において根治手術の恩恵を受けられることがわかっており、早期発見と早期治療が非常に重要である²。便潜血検査 (Fecal immunochemical test for hemoglobin: FIT) は、世界で最も広く用いられている CRC 検診法の一つである³。しかし、FIT は CRC 診断において高い検査感度と特異度を示すが、前癌病変であり悪性化リスクの高い進行腺腫 (Advanced colorectal adenoma: AA) に対する感度は低い⁴。実際、FIT の CRC に対する感度は 65.8%~73.8% であるのに対し、AA に対する感度はわずか 23.8%~27.1% である^{5,6}。さらに、50 歳未満の AA 患者数が増加していることから⁷、AA の存在を効率的に予測できる臨床検査法の開発が急務となっている。

Cologuard® (Exact Sciences, Madison, WI, USA) は、2014 年に米国食品医薬品局 (FDA) が承認した CRC スクリーニング検査であり、FIT と、*KRAS* 変異、*BMP3* および *NDRG* のメチル化、ならびに *ACTB* のコピー数を含む便 DNA 検査を組み合わせたものである。CRC に対する感度は 92.3% であるのに対し、AA を含む進行した前癌病変に対する感度はわずか 42.4% である⁵。さらに、Cologuard は検査試料として排便 1 回分の便全体 (推定約 200 g) を必要とするため⁵、このような大量の便検体を衛生的に輸送・処理できる臨床検査システムが米国以外では不足しているため、Cologuard の便 DNA 検査の実施は困難である。

これらの課題に対処するため、我々は少量 DNA サンプル中のメチル化遺伝子を 1 コピーでも検出可能な高感度 DNA メチル化検査法である combined restriction デジタル PCR (CORD) アッセイを開発した^{8,9}。様々な過メチル化遺伝子の中でも、ソマトスタチン (*SST*) が大腸腫瘍組織において過メチル化されることを我々は発見した (未発表データ)。したがって、メチル化 *SST* は大腸腫瘍性病変のバイオマーカーとして有用であり、CORD アッセイによる便 *SST* メチル化レベルの測定が AA 検出に有用であると考えられた。本研究では、便 *SST* メチル化検査と FIT を併用した検査法による AA の診断性能を評価した。

3. 方法

3.1 臨床材料

山口大学病院で外科的切除を受けた AA 患者 1 例および CRC 患者 10 例から、大腸腫瘍および腫瘍に隣接する正常粘膜の新鮮凍結組織を採取した。また、山口大学病院で内視鏡的粘膜切除術または外科的治療を受けた非進行腺腫 (Non-advanced colorectal adenoma: NAA) 患者 1 例、AA 患者 30 例、CRC 患者 9 例から、便検体とホルマリン固定パラフィン包埋大腸腫瘍組織検体を収集した。2007 年 10 月から 2019 年 12 月にかけて、セントヒル病院、阿知須共立病院、東京大学医科学研究所附属病院、山口大学医学部附属病院で前向きに集積した 377 名のうち、解析可能な 365 名を対象とした。対照群として大腸内視鏡検査において腫瘍を認めなかったコントロール被検者 79 名 (コントロール群)、鋸歯状腺腫 2 例を含む NAA 43 例を登録した。疾患群として鋸歯状腺腫 8 例を含む AA 117 例、CRC 126 例を登録した (表 1、図 1)。過去の報告の参加者も本研究に含めた^{8,10}。AA は、径 1cm 以上の腺腫、または病理組織学的に絨毛成分を有するもの、または高度異形成 [本邦の粘膜内癌 (Tis) にほぼ相当] があるものと定義した^{5,11,12}。非腫瘍性ポリープおよび AA 以外の非進行性腺腫性ポリープは NAA に分類した⁵。病期分類は International Union Against Cancer (Union for International Cancer Control) の基準に準拠した¹³。被験

者の臨床病理学的特徴を表 1 に示す。

3.2 FIT

FIT 用の便検体を S 採便容器（栄研化学株式会社、東京、日本）に採取した。具体的には、大腸内視鏡検査前の腸管準備前に、新鮮便検体 10mg を 2 mL のヘモグロビン安定化緩衝液を満たしたサンプリング容器に採取した。ヘモグロビン濃度測定には、ラテックス凝集法キット OC-Hemodia および便免疫化学検査装置 OC センサー I0（いずれも栄研化学株式会社、東京、日本）を用いた。カットオフ値として 20 μg ヘモグロビン/g faces (100 ng ヘモグロビン/mL 緩衝液に相当) を採用した^{14,15}。

3.3 メチル化解析

DNA 抽出試薬として、新鮮凍結組織検体には AllPrep DNA/RNA Mini Kit、ホルマリン固定パラフィン包埋組織検体には QIAamp DNA FFPE tissue kit、便検体には QIAamp FAST DNA Stool Mini Kit（いずれも QIAGEN、Hilden、Germany）を用いて、DNA を抽出した。DNA 検査用の便検体は、大腸内視鏡検査または外科手術のための腸管準備前に採取し、 -20°C で保存した。便検体を -20°C から解凍後、各サンプルから約 200mg の便を DNA 抽出に用いた。各 DNA は 100 μL の ATE 緩衝液（QIAGEN 社製）で溶出した。human telomerase reverse transcriptase (*hTERT*) およびメチル化 *SST* のコピー数を測定するために、従来の CORD アッセイと比較して、簡便で酵素反応時間が短い改良型 CORD アッセイを用いた⁹。詳細な手順は以下の通りである。

まず、溶出した DNA 10 μL を酵素反応液 6 μL と混合し、 37°C で 1 時間、 60°C で 16 時間インキュベーションして酵素反応させ、その後 98°C で 10 分間加熱し酵素を失活させた。酵素反応液には、AmpliTaQ Gold Buffer II 1 μL 、Hha I、Hpa II、Exo I 各 1 μL （いずれも Thermo Fisher Scientific、Waltham, MA, USA）、BstU I 1 μL （New England Biolabs、Hitchin, UK）、25 mM MgCl_2 1 μL （Thermo Fisher Scientific、Waltham, MA, USA）からなる。BstU I、Hha I、Hpa II はそれぞれ 5' -CGCG-3'、5' -GCGC-3'、5' -CCGG-3' の塩基配列を認識するメチル化感受性制限酵素である。Exo I はエキソヌクレアーゼであり、制限酵素による切断を逃れた一本鎖 DNA を分解することで、これらの断片が PCR で増幅されるのを防ぐ。

次に、酵素処理済み DNA 2 μL を、プライマーミックス 1 μL 、プローブミックス 1 μL 、2 $\times$ ddPCR supermix for Probes 10 μL （BioRad, Hercules, CA, USA）、および水 8 μL を含む PCR 反応液 20 μL と混合した。プライマーミックスは、*SST* 遺伝子のセンスおよびアンチセンスプライマー各 10 $\mu\text{mol/L}$ 、*hTERT* 遺伝子のセンスおよびアンチセンスプライマー各 5 $\mu\text{mol/L}$ を含む。プローブミックスは、*SST* プローブ 10 $\mu\text{mol/L}$ および *hTERT* プローブ 5 $\mu\text{mol/L}$ を含む。プライマーおよびプローブの DNA 配列は、図 2 および我々の以前の報告^{9,16} に示す通りである。*hTERT* は Hha I、Hpa II、BstU I の認識部位を持たないため、検体にヒト DNA が存在する場合、常に PCR で増幅される⁹。したがって、*hTERT* は便検体の適性を反映する内部コントロールとして使用している。酵素処理済み DNA と PCR 反応液の混合液は、Automated droplet generator（Bio-Rad）を用いて Droplet（小水滴）に分画し、PCR を実施した。PCR 条件は以下の通りである。サーマルサイクラーを用いて 95°C で 10 分間予熱した後、 94°C で 30 秒間の熱変性、続いて 56°C で 60 秒間のアニーリングを行うという操作を 40 サイクル繰り返し、*SST* および *hTERT* を同時に増幅した。最後に、 98°C で 10 分間加熱した。その後、PCR プレートに QX200 droplet reader（Bio-Rad）にセットして Droplet の蛍光を読み取り、QuantaSoft Analysis Pro ソフトウェア（Bio-Rad）を用いて DNA の濃度を測定した。

3.4 統計解析

Mann-Whitney U 検定、Fischer の直接確率検定、単純線形回帰分析、Dunn 検定による多重比較、多重ロジスティック回帰分析、および Receiver operating characteristic (ROC) 分析を実施した。p<0.05 を統計学的有意と判定した。統計解析には、StatFlex Ver. 7 (Artec、大阪、日本)、Microsoft 365 内の Microsoft Excel ソフトウェア (Microsoft, Redmond, WA, USA)、および GraphPad Prism Ver. 9 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) を用いた。

4. 結果

4.1 FIT

FIT の感度は、NAA で 7.0% (3/43)、AA で 29.1% (34/117)、CRC で 91.3% (115/126) であった。特異度はコントロール群で 87.3% (69/79)、コントロール/NAA 群で 89.3% (109/122) であった (表 2)。左側 AA/CRC に対する感度は、右側 AA/CRC に対する感度よりも有意に高かった (70.8% vs. 50.4%、P = 0.0015、表 2)。

4.2 腫瘍組織と隣接正常粘膜における SST メチル化レベルの比較

SST メチル化レベルは、隣接する正常粘膜よりも大腸腫瘍で有意に高かった (P = 0.0029) (図 3)。

4.3 便 DNA 検査

大規模なサンプルを用いた便 DNA 検査を実施した。便 DNA 検査は二つの評価要素で構成される。一つはメチル化 SST のコピー数であり、もう一つはメチル化 SST の絶対コピー数を *hTERT* の絶対コピー数で除して算出されるメチル化 SST の比率 (補正メチル化 SST 値) である。便検体中のヒト DNA コピー数は、糞便の状態 (水様性または固形) の影響を受けるため、あらゆる糞便形態において SST メチル化レベルを評価可能とするため、便 DNA 検査に補正メチル化 SST 値を評価要素として追加した。メチル化 SST コピー数、*hTERT* コピー数、補正メチル化 SST 値の分布を、図 4A、B、C に示す。メチル化 SST コピー数はコントロール群と比較して AA 群で有意に高く (図 4A)、また CRC 群ではコントロール群および NAA 群と比較して有意に高かった (図 4A)。*hTERT* については、CRC 群のコピー数が他の全群と比較して有意に高かった (図 4B)。興味深いことに、補正メチル化 SST 値は AA 群が他の全群と比較して有意に高かった (図 4C)。

メチル化 SST コピー数のカットオフ値を 67.9 コピー/test (図 4A)、補正メチル化 SST 値のカットオフ値を 0.50 (図 4C) に設定した。各カットオフ値は、特異度約 95% となるように設定した。便 DNA 検査陽性の基準は、メチル化 SST コピー数または補正メチル化 SST 値のいずれかがカットオフ値以上、あるいは両方がカットオフ値以上の場合に、便 DNA 検査陽性とした。その結果、NAA では感度 14.0% (6/43)、AA では 39.3% (46/117)、CRC では 30.2% (38/126) であった。コントロール群の特異度は 92.4% (73/79)、コントロール/NAA 群では 90.2%

(110/122) であった (表 2)。AA については、右側 AA に対する便 DNA 検査の感度が、左側 AA よりも高い傾向が認められた (45.1% vs. 30.4%、p = 0.1256)。しかし CRC では、右側 CRC の感度が左側 CRC より有意に低かった (16.7% vs. 36.9%、p = 0.0236、表 2)。

糞便サンプルと腫瘍組織の補正メチル化 SST 値には正の相関が認められた ($R^2 = 0.5589$ 、図

5A)。大腸腫瘍組織における補正メチル化 *SST* 値を便 DNA 検査結果と比較したところ、便 DNA 検査陽性群では、陰性群と比較して腫瘍組織の補正メチル化 *SST* 値が高い傾向が認められた ($p = 0.0899$ 、図 5B)。これは、便 DNA 検査がある程度大腸腫瘍組織の *SST* メチル化レベルを反映する可能性を示唆している。

4.4 FIT/便 DNA 検査 (組み合わせ検査)

FIT と便 DNA 検査の組み合わせ検査の陽性判定基準は、FIT または便 DNA 検査のいずれかが陽性、もしくは両方が陽性とした。検査感度は、NAA で 20.9% (9/43)、AA で 61.5% (72/117)、CRC では 94.4% (119/126) であった。コントロール群の特異度は 79.7% (63/79)、コントロール/NAA 群では 79.5% (97/122) であった (表 2、図 6)。興味深いことに、右側 AA では左側 AA よりも感度が高い傾向が認められた (69.0% vs. 50.0%, $p = 0.0518$ 、表 2)。AA を有する 117 例中、72 例が組み合わせ検査で陽性であり、このうち 26 例は FIT 単独で陽性、38 例は便 DNA 検査単独で陽性、両検査で陽性だったのはわずか 8 例であった (図 6、7)。便 DNA 検査単独で陽性であった 38 例の AA 患者に焦点を当てると、メチル化 *SST* コピー数検査単独で陽性だったのは 14 例、補正メチル化 *SST* 値検査単独で陽性だったのは 19 例、両検査で陽性だったのはわずか 5 例であった (図 7)。FIT の単独使用では、CRC stage I に対して 80.0% (32/40) という十分な感度を示した一方で、残りの 20% (8/40) は FIT では検出できなかった。FIT 陰性であった CRC stage I 患者 8 例のうち、4 例が便 DNA 検査で検出され、組み合わせ検査による CRC stage I の感度は 90% となった (図 6)。

4.5 多変量解析と FAMS index

便 DNA 検査、FIT、年齢、性別を説明変数とした多重ロジスティック回帰分析を実施し、AA/CRC に関連する独立因子を同定した。その結果、便 DNA 検査、FIT、年齢が独立した予測因子であった (表 3)。次に、以下の予測式を確立し、これを **FAMS (FIT、age、methylated *SST*) index** と命名した。

$$FAMS\ index = \frac{1}{1 + e^{-X}}$$

$$X = -6.441 + 1.622 \times [Fecal\ DNA\ test] + 2.69 \times [FIT] + 0.09609 \times Age$$

この式における [便 DNA 検査] と [FIT] はそれぞれ二値データであり、各検査結果が陽性の場合には各変数に 1 が代入され、陰性の場合には 0 が代入される。年齢は連続変数 (年) である。FAMS index は 0 から 1 の範囲で、0 に近い値は AA/CRC の確率が低いことを示し、1 に近い値は AA/CRC の確率が高いことを示す。各群における FAMS index の分布を図 8A に示す。AA 群ではコントロール群および NAA 群と比較して FAMS index が有意に高かった ($p < 0.0001$)。さらに、CRC 群は他の全群と比較して有意に高い FAMS index を示した ($p < 0.0001$)。

次に ROC 解析を実施した。コントロール/NAA 群と AA/CRC 群の判別における ROC 曲線下面積 (AUC) は 0.90 (図 8B)、コントロール/NAA 群と AA 群の判別では 0.85 (図 8C) であった。特異度 80.3%、86.1%、91.0%、94.3% における AA の感度はそれぞれ 68.4%、61.5%、56.4%、42.7%、CRC stage I の感度はそれぞれ 87.5%、82.5%、80.0%、75.0% であった (表 4)。上記特異度における FAMS index の感度は、左側腫瘍と右側腫瘍間で統計的差異は認めなかった (表 5)。

5. 考察

5.1 メチル化 SST

本研究では、大腸腫瘍組織の SST のメチル化レベルが、隣接する正常粘膜と比較して有意に高かった (図 3)。この知見は他の研究者の報告と一致した¹⁷⁾。図 5A に示すように、便検体と腫瘍組織の補正メチル化 SST 値には正の相関が認められたが、相関は弱かった ($R^2 = 0.5589$)。これは、サンプルサイズが小さいこと ($n = 40$)、各腫瘍の大きさ、位置、増殖型、腫瘍細胞割合の差異、および各便サンプルにおける正常ヒト細胞の混入度の差異が便中補正メチル化 SST 値に影響を与える可能性があるためと考えられる。それにもかかわらず、便 DNA 検査が陽性であった群は、陰性であった群と比較して、腫瘍組織における SST メチル化レベルが高い傾向にあることがわかった ($p = 0.0899$ 、図 5B)。我々は、便 DNA 検査がある程度大腸腫瘍の SST メチル化レベルを反映し、FIT と便 DNA 検査の組み合わせ検査が大腸腫瘍性病変の検出に適用可能と考えた。したがって、併用検査の診断性能を評価するため、以下の研究を実施した。

5.2 FIT/便 DNA 検査 (組み合わせ検査)

5.2.1 進行腺腫

FIT 単独および便 DNA 検査単独における AA の感度は、それぞれ 29.1% および 39.3% であった (表 2)。興味深いことに、両検査は互いに補完し合い、組み合わせ検査では感度が 61.5% となり、FIT および便 DNA 検査単独と比較してそれぞれ 32.4% および 22.2% 高い感度を示した (表 2、図 6)。これらの結果は、組み合わせ検査が AA の検出率向上に有用であることを示唆している。

5.2.2 大腸癌

CRC 患者 126 例における各検査の陽性数は、FIT が 115 例 (91.3%)、メチル化 SST コピー数検査が 36 例 (28.6%)、補正メチル化 SST 検査はわずか 4 例 (3.2%) であった (図 7)。補正メチル化 SST 検査の極めて低い陽性率は、メチル化 SST と比較して *hTERT* コピー数の相対的に高い増加に起因すると考えられる (図 4B, C)。CRC 患者の糞便における *hTERT* コピー数の上昇は、糞便サンプル中のヒト DNA 量の増加を示唆している可能性がある。慢性炎症が CRC の発症と進行に関与していることから¹⁸⁾、ヒト DNA の一部は CRC および隣接粘膜由来の炎症細胞や上皮細胞に由来する可能性がある。さらに、CRC からの滲出液や出血に伴う白血球がヒト DNA 量の増加に影響を与え、*hTERT* コピー数の増加をもたらす可能性がある。

5.3 FAMS index

前述のように、組み合わせ検査は AA に対して中程度の高感度 (61.5%) を示したが、約 80% の特異度は臨床応用には不十分と考えられる (表 2、図 6)。この課題を解決するため、AA/CRC の予測因子を特定する多変量解析を実施した。その結果、FIT、年齢、および便 DNA 検査が独立した予測因子であることが判明した (表 3)。次に、コントロール/NAA 群と AA/CRC 群を識別する予測モデル FAMS index を確立した。FAMS index は AUC が 0.90 と極めて高く、コントロール/NAA 群と AA 群の識別においても AUC は 0.85 と高い値を示した (図 8B, C)。加えて、FAMS index の感度は左側腫瘍と右側腫瘍で統計的に有意な差は認められなかった (表 5)。これは FAMS index が腫瘍の位置に関わらず AA および CRC を検出するのに有用であることを示唆している。これは、左側 AA/CRC に比べ右側 AA/CRC に対する感度が低い FIT 単独使用 (表 2) と比較して、FAMS index の大きな利点である。

FAMS index の診断性能を他の検査と比較したところ、AA 検出における感度は特異度 91.0% の

点で 56.4%を示した（表 4）。これは FIT（感度 29.1%、特異度 89.3%；表 2）の約 2 倍の感度である。FAMS index は組み合わせ検査と比較しても AA に対する感度が優れており、特異度約 80%において、各々の検査感度は、FAMS index 68.4%、組み合わせ検査 61.5%であった（表 2、4）。進行性前癌病変に対する感度 42.4%、特異度 86.6%を示した Cologuard と比較すると、FAMS index は AA に対する感度 42.7%で同等ながら、特異度は 94.3%と高かった。本研究は、AA の検出における FAMS index の有用性を示した初めての報告である。ただし、診断性能に関しては、Cologuard は日本で利用できないため、FAMS index と Cologuard を直接比較することはできない。さらに、本研究は無症状および有症状の被験者双方を対象として限られたサンプルサイズで行われたのに対し、Cologuard の研究は無症状の被験者のみを対象とした大規模なサンプルサイズ（n = 9,989）を対象として行われた⁵。FAMS index と Cologuard の診断性能を比較するには、日本国外での臨床性能試験を実施する必要がある。

FAMS index と Cologuard には共通点があり、いずれも FIT と便 DNA 検査を組み合わせ、大腸腫瘍を検出する点である。遺伝子検査では、Cologuard は *KRAS* 変異、*BMP3* および *NDRG4* のメチル化、*ACTB* コピー数を個別に測定する⁵。これに対し、FAMS index はメチル化 *SST* コピー数と *hTERT* コピー数を同時に測定するため、FAMS index の方がより簡便で手間がかからない。さらに、Cologuard は排便 1 回分の便全体（推定約 200g）を必要とするのに対し、我々の便 DNA 検査はわずか 0.2g の便検体しか必要としないため、衛生的な輸送が可能であり、糞便検体の処理に要する労力が少なく、結果としてコストを低く抑えられる。

本研究の限界は以下の通りである。第一に、メチル化 *SST* コピー数および補正メチル化 *SST* 値のカットオフ値は単一コホートをを用いて決定したため、感度・特異度は他のコホートと多少異なる可能性がある。したがって、便 DNA 検査の診断性能を検証するには独立コホートでの追加研究が必要である。第二に、*SST* の過剰メチル化は様々な臓器のがんにおいて報告されているため¹⁷、*SST* メチル化に関する便 DNA 検査陽性結果は、CRC 以外の悪性腫瘍の存在を反映している可能性がある。しかし、本研究では大腸腫瘍のみに焦点を当てたため、便 DNA 検査で検出されるがんの種類を特定できなかった。したがって、この問題に対処するためにはさらなる研究が必要である。

6. 結語

FAMS index は AA 診断において有望な検査法となり得る。ただし、本研究はトレーニング研究であり、検証研究はまだ実施されていないため、その診断性能を明らかにするには、より大規模なサンプルを用いた検証研究が必要である。

7. 謝辞

本研究において、検体管理に携わっていただいた山口大学検査部の方々、データ解析の支援をいただいた保健学科の市原清教授に感謝申し上げます。また検体提供いただいた消化器・腫瘍外科の永野昭浩教授ならびに消化器内科学の高見太郎教授に御礼を申し上げます。そして、ご指導賜りました臨床検査・腫瘍学講座の末廣 寛准教授、山崎隆弘教授に感謝の意を示します。

8. 参考文献

- 1 Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71:209-249.
- 2 Pawa N, Arulampalam T, Norton JD. Screening for colorectal cancer: established and emerging modalities. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2011;8:711-722.
- 3 Allison JE, Fraser CG, Halloran SP, Young GP. Population screening for colorectal cancer means getting FIT: The past, present, and future of colorectal cancer screening using the Fecal Immunochemical Test for Hemoglobin (FIT). *Gut Liver.* 2014;8:117-130.
- 4 Pan Y, Zhang L, Zhang R, et al. Screening and diagnosis of colorectal cancer and advanced adenoma by Bionic Glycome method and machine learning. *Am J Cancer Res.* 2021;11:3002-3020.
- 5 Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, et al. Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening. *N Engl J Med.* 2014;370:1287-1297.
- 6 Morikawa T, Kato J, Yamaji Y, Wada R, Mitsushima T, Shiratori Y. A comparison of the immunochemical fecal occult blood test and total colonoscopy in the asymptomatic population. *Gastroenterology.* 2005;129:422-428.
- 7 Penz D, Waldmann E, Hackl M, et al. Colorectal cancer and precursor lesion prevalence in adults younger than 50 years without symptoms. *JAMA Netw Open.* 2023;6:e2334757.
- 8 Suehiro Y, Hashimoto S, Goto A, et al. Fecal DNA testing of TWIST1 methylation identifies patients with advanced colorectal adenoma missed by Fecal Immunochemical Test for Hemoglobin. *Clin Transl Gastroenterol.* 2020;11:e00176.
- 9 Suehiro Y, Zhang Y, Hashimoto S, 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.
- 10 Yamaoka Y, Sasai M, Suehiro Y, et al. Comparison of two primer-probe sets of *Fusobacterium nucleatum* using droplet digital polymerase chain reaction for the detection of colorectal neoplasia from faecal samples. *Ann Clin Biochem.* 2022;59:396-403.
- 11 Regula J, Rupinski M, Kraszewska E, et al. Colonoscopy in colorectal-cancer screening for detection of advanced neoplasia. *N Engl J Med.* 2006;355:1863-1872.
- 12 Winawer SJ, Zauber AG. The advanced adenoma as the primary target of screening. *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 2002;12:1-9.
- 13 Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C. TNM Classification of Malignant Tumours, 8th ed. Wiley-Blackwell; 2017:xviii, 253.
- 14 Fraser CG, Allison JE, Halloran SP, Young GP. A proposal to standardize reporting units for fecal immunochemical tests for hemoglobin. *J Natl Cancer Inst.* 2012;104:810-814.

- 15 Chiang TH, Chuang SL, Chen SLS, et al. Difference in performance of fecal immunochemical tests with the same hemoglobin cutoff concentration in a nationwide colorectal cancer screening program. *Gastroenterology*. 2014;147:1317–1326.
- 16 Suehiro Y, Suenaga S, Kunimune Y, et al. CA19-9 in combination with methylated HOXA1 and SST is useful to diagnose stage I pancreatic cancer. *Oncology*. 2022;100:674–684.
- 17 Manoochehri M, Wu Y, Giese NA, 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;14:1252–1267.
- 18 Shimomura K, Hattori N, Iida N, et al. Sleeping Beauty transposon mutagenesis identified genes and pathways involved in inflammation-associated colon tumor development. *Nat Commun*. 2023;14:6514.

表 1. 臨床病理学的特徴

	Control <i>n</i> = 79	NAA <i>n</i> = 43	AA <i>n</i> = 117	CRC ^a <i>n</i> = 126
Age, years, median (range)	50 (33–83)	58 (37–78)	69 (36–91)	69 (33–91)
Sex				
Men	34	27	77	65
Women	45	16	40	61
Tumor location				
Left		20	46	84
Right		23	71	42
Tumor size, mm, median (range)		4 (2–8)	22 (5–100)	35 (6–150)

Abbreviations: AA, advanced colorectal adenoma; CRC, colorectal cancer; NAA, non-advanced colorectal adenoma.

^apStage I: 40, II: 37, III: 45, IV: 4.

表 2. 大腸内視鏡所見に対する各検査の診断性能

Most advanced finding	FIT				Fecal DNA test				Combination test				
	(n)	Positive results ^a (n)	Sensitivity (%)	95% CI (%)	p ^b	Positive results ^c (n)	Sensitivity (%)	95% CI (%)	p ^b	Positive results ^d (n)	Sensitivity (%)	95% CI (%)	p ^b
NAA	43	3	7.0	2.4–18.6		6	14.0	5.3–27.9		9	20.9	10.0–36.0	
Left	20	2	10.0	1.2–31.7	0.5900	2	10.0	1.2–31.7	0.6688	4	20.0	5.7–43.7	1.0000
Right	23	1	4.3	0.1–21.9		4	17.4	5.0–38.8		5	21.7	7.5–43.7	
AA	117	34	29.1	21.6–37.9		46	39.3	30.5–48.2		72	61.5	52.7–70.4	
Left	46	13	28.3	15.2–41.3	1.0000	14	30.4	17.1–43.7	0.1256	23	50.0	35.6–64.4	0.0518
Right	71	21	29.6	19.0–40.2		32	45.1	33.5–56.6		49	69.0	58.3–79.8	
CRC	126	115	91.3	85.0–95.1		38	30.2	22.1–38.2		119	94.4	88.9–97.7	
Left	84	79	94.0	86.7–98.0	0.1779	31	36.9	26.6–47.2	0.0236	81	96.4	90.0–99.3	0.2206
Right	42	36	85.7	71.5–94.6		7	16.7	7.0–31.4		38	90.5	77.4–97.3	
AA/CRC	243	149	61.3	55.1–67.2		84	34.6	28.6–40.5		191	78.6	73.4–83.8	
Left	130	92	70.8	63.0–78.6	0.0015	45	34.6	26.4–42.8	1.0000	104	80.0	73.1–86.9	0.6388
Right	113	57	50.4	41.2–59.7		39	34.5	25.7–43.3		87	77.0	69.2–84.8	
Specificity (%)										Specificity (%)			
Control	79	10	87.3	78.2–93.0		6	92.4	84.2–97.2		16	79.7	70.9–88.6	
Control/NAA	122	13	89.3	82.6–93.7		12	90.2	84.9–95.4		25	79.5	72.3–86.7	

Abbreviations: AA, advanced colorectal adenoma; CI, confidence interval; CRC, colorectal cancer; FIT, fecal immunochemical test for hemoglobin; NAA, non-advanced colorectal adenoma.

^aCriterion for a positive result of FIT is above 20µg hemoglobin/g feces (100ng Hb/mL buffer).

^bp values were calculated by Fisher's exact test between left-sided and right-sided tumors.

^cCriterion for a positive result of fecal DNA testing is either 67.9 or more copy numbers of methylated SST or SST methylation ratio of 0.5 or more or both.

^dCriterion for a positive result with the combination of FIT and fecal DNA test is either a positive FIT or fecal DNA test or positive for both.

表 3. AA/CRC 予測のための多変量解析

Variable	β (SE)	OR (95% CI)	<i>p</i>
Constant	-6.441 (0.8623)		
Fecal DNA test ^a	1.622 (0.3971)	5.062 (2.325–11.024)	0.00004
FIT	2.69 (0.3732)	14.74 (7.091–30.622)	<0.00001
Age (years)	0.09609 (0.01354)	1.101 (1.072–1.13)	<0.00001

Note: Each of Fecal DNA test and FIT in the table is binary data: substitute 1 into each variable if each test result is positive; substitute 0 into each variable if each test result is negative.

Abbreviations: AA, advanced colorectal adenoma; CI, confidence interval; CRC, colorectal cancer; FIT, fecal immunochemical test for hemoglobin; OR, odds ratio; SE, standard error.

^aCriterion for a positive result of fecal DNA testing is either 67.9 or more copy numbers of methylated SST or SST methylation ratio of 0.5 or more or both.

表 4. FAMS index の診断性能

Cutoff point	Control/NAA (n = 122)		AA/CRC (n = 243)		AA (n = 117)		CRC stage I (n = 40)		CRC stage II (n = 37)		CRC stages III-IV (n = 49)	
	Specificity % (n)	95% CI%	Sensitivity % (n)		95% CI%							
0.64	80.3 (98)	73.3-87.4	81.9 (199)	77.1-86.7	68.4 (80)	60.0-76.8	87.5 (35)	73.2-95.8	97.3 (36)	85.8-99.9	98.0 (48)	89.1-99.9
0.74	86.1 (105)	79.9-92.2	75.7 (184)	70.3-81.1	61.5 (72)	52.7-70.4	82.5 (33)	67.2-92.7	97.3 (36)	85.8-99.9	87.8 (43)	75.2-95.4
0.79	91.0 (111)	85.9-96.1	72.0 (175)	66.4-77.7	56.4 (66)	47.4-65.4	80.0 (32)	64.4-90.9	94.6 (35)	81.8-99.3	85.7 (42)	72.8-94.1
0.87	94.3 (115)	88.5-97.7	61.7 (150)	55.6-67.8	42.7 (50)	33.8-51.7	75.0 (30)	58.8-87.3	83.8 (31)	68.0-93.8	79.6 (39)	65.7-89.8

Abbreviations: AA, advanced colorectal adenoma; CI, confidence interval; CRC, colorectal cancer; FAMS, FIT, age, methylated SST; NAA, non-advanced colorectal adenoma.

表 5. 右側および左側大腸腫瘍に対する FAMS index の感度

Cutoff point	NAA			AA			CRC								
	Left (n = 20)		Right (n = 23)	Left (n = 46)		Right (n = 71)	Left (n = 84)		Right (n = 42)						
	Sensitivity % (n), 95% CI%			Sensitivity % (n), 95% CI%			Sensitivity % (n), 95% CI%								
					p				p						
0.64	20.0 (4)	5.7-43.7	30.4 (7)	13.2-52.9	0.5012	60.9 (28)	46.8-75.0	73.2 (52)	62.9-83.5	0.2218	94.0 (79)	86.7-98.0	95.2 (40)	83.8-99.4	1.0000
0.74	10.0 (2)	1.2-31.7	21.7 (5)	7.5-43.7	0.4205	56.5 (26)	42.2-70.8	64.8 (46)	53.7-75.9	0.4377	88.1 (74)	79.2-94.1	90.5 (38)	77.4-97.3	0.7728
0.79	5.0 (1)	0.1-24.9	17.4 (4)	5.0-38.8	0.3508	50.0 (23)	35.6-64.4	60.6 (43)	49.2-71.9	0.3401	86.9 (73)	79.7-94.1	85.7 (36)	71.5-94.6	1.0000
0.87	5.0 (1)	0.1-24.9	13.0 (3)	2.8-33.6	0.6105	41.3 (19)	27.1-55.5	43.7 (31)	32.1-55.2	0.8498	78.6 (66)	69.8-87.3	81.0 (34)	65.9-91.4	0.8193
	Stage I CRC			Stages II CRC			Stages III-IV CRC								
	Left (n = 27)		Right (n = 13)	Left (n = 24)		Right (n = 13)	Left (n = 33)		Right (n = 16)						
	Sensitivity % (n), 95% CI%			Sensitivity % (n), 95% CI%			Sensitivity % (n), 95% CI%			p					
0.64	85.2 (23)	66.3-95.8	92.3 (12)	64.0-99.8	1.0000	100.0 (24)	85.8-100.0	92.3 (12)	64.0-99.8	0.3514	97.0 (32)	84.2-99.9	100.0 (16)	79.4-100.0	1.0000
0.74	77.8 (21)	57.7-91.4	92.3 (12)	64.0-99.8	0.3930	100.0 (24)	85.8-100.0	92.3 (12)	64.0-99.8	0.3514	87.9 (29)	71.8-96.6	87.5 (14)	61.7-98.4	1.0000
0.79	77.8 (21)	57.7-91.4	84.6 (11)	54.6-98.1	1.0000	100.0 (24)	85.8-100.0	84.6 (11)	54.6-98.1	0.1171	84.8 (28)	68.1-94.9	87.5 (14)	61.7-98.4	1.0000
0.87	70.4 (19)	49.8-86.2	84.6 (11)	54.6-98.1	0.4507	87.5 (21)	67.6-97.3	76.9 (10)	46.2-95.0	0.6435	78.8 (26)	61.1-91.0	81.3 (13)	54.4-96.0	1.0000

Note: p values were calculated by Fisher's exact test between left-sided and right-sided tumors.

Abbreviations: AA, advanced colorectal adenoma; CI, confidence interval; CRC, colorectal cancer; FAMS, FIT, age, methylated SST; NAA, non-advanced colorectal adenoma.

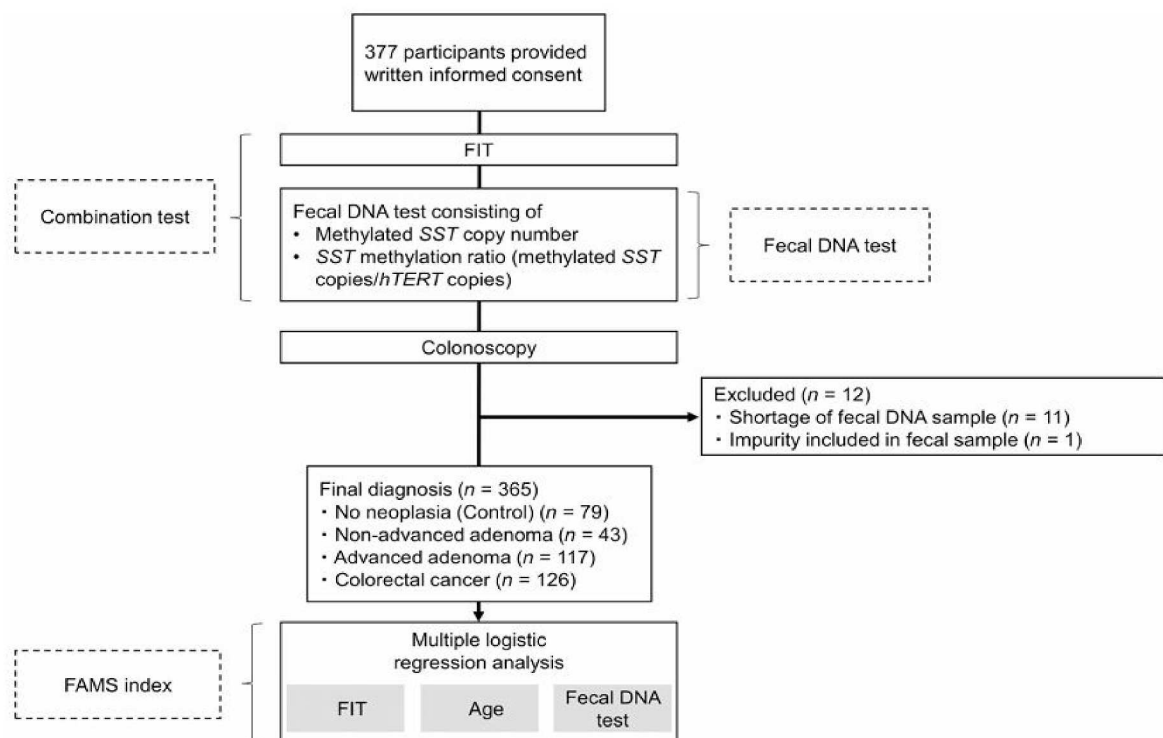


図 1. 登録フロー図.

インフォームド・コンセントを得た 377 名の参加者のうち、便検体の採取不備により 12 名を除外した。FAMS index, 免疫学的便潜血検査、年齢、およびメチル化 SST を用いた多変量解析。FIT, 免疫学的便潜血検査。

SST

Forward primer → 5'-AAAACAGAGGGAGACGGTTGAGAGCACACAAGCCGCTTTAGGAGCGAGGTTTCGGAGCCATCGCTGCTGCCTGCTGATCCGCGCCTAGAGTTTGACCAGCCACTC-3' ← TaqMan MGB probe ← Reverse primer
BstUI
HhaI

hTERT

Forward primer → 5'-GGGTCCTCGCCTGTGTACAGGGCACACCTTTGGTCACTCCAAATTCAGAGCTCCCAGG-3' ← TaqMan MGB probe ← Reverse primer

図 2. CORD assay 用 SST および hTERT の DNA 配列.

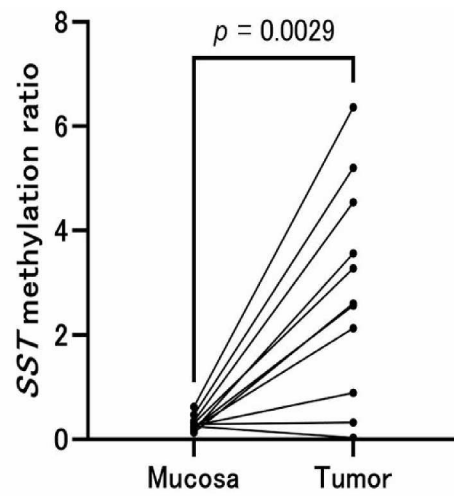


図 3. 腫瘍組織と隣接する正常粘膜における *SST* メチル化レベルの比較.
縦軸の *SST* メチル化比率は、メチル化された *SST* と *hTERT* コピー数の比率を表す。進行腺腫 1 例および大腸癌 10 例の患者から、大腸腫瘍および腫瘍に隣接する正常粘膜の新鮮凍結組織を採取した。

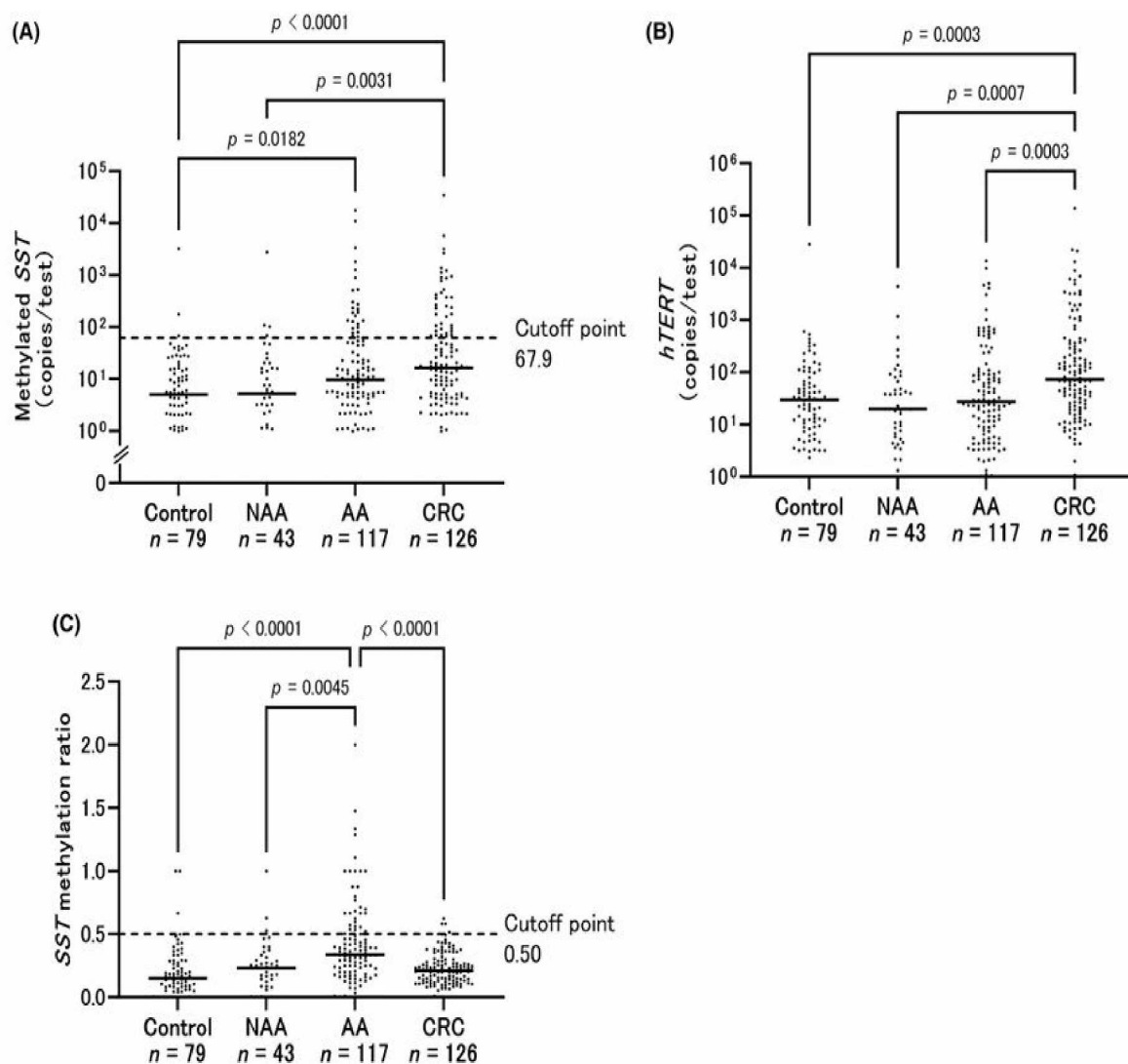


図 4 便 DNA 検査.

各群におけるメチル化 SST コピー数 (A)、hTERT コピー数 (B)、およびメチル化 SST と hTERT コピー数の比率 (C) の分布を示す。p 値は $p < 0.05$ の比較結果のみ示す。各サンプルの結果を実線で囲まれた●で示す。実線の水平線は中央値を示し、点線はカットオフ値を示す。AA, 進行腺腫。CRC, 大腸癌。NAA, 非進行腺腫。

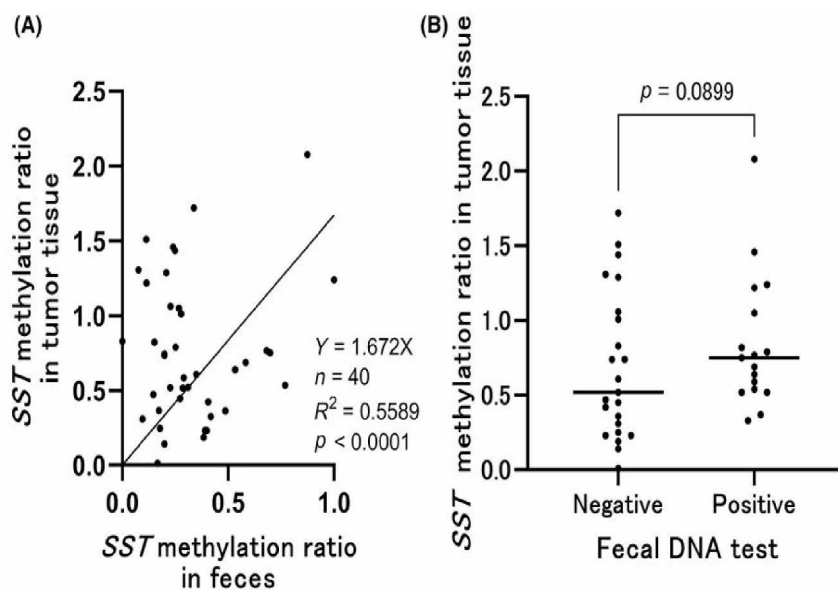


図 5. DNA 検査結果の比較.

便検体と組織検体間の *SST* メチル化比率の線形単回帰分析 (A) . R^2 は決定係数を示す。便 DNA 検査と大腸腫瘍組織における *SST* メチル化比率の比較 (B) . 便 DNA 検査の陽性判定基準は、メチル化 *SST* コピー数が 67.9 以上、または *SST* メチル化比率が 0.5 以上、もしくはその両方である。*SST* メチル化比率は、メチル化 *SST* と *hTERT* コピー数の比率を示す。便検体とホルマリン固定パラフィン包埋大腸腫瘍組織検体 40 組を収集した。便 DNA 検査陰性群の内訳は、非進行腺腫 (n=1)、進行腺腫 (n=18)、および大腸癌患者 (n=4) である。便 DNA 検査陽性群の内訳は、進行腺腫 (n=12) および大腸癌患者 (n=5) である。

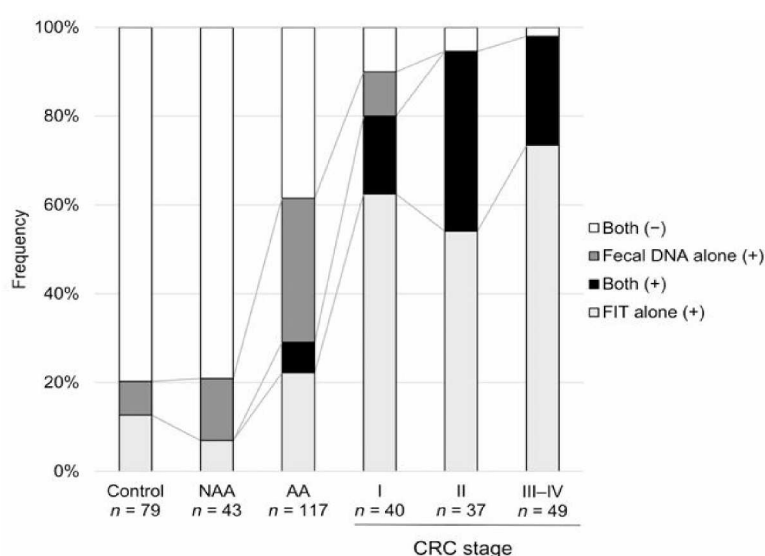


図 6. 組み合わせ検査結果.

各群における FIT 検査と *SST* メチル化便 DNA 検査の結果分布を示す。便 DNA 検査陽性の基準は、メチル化 *SST* コピー数 67.9 以上または、*SST* メチル化比率 0.5 以上いずれか、もしくはその両方とした。ローマ数字は大腸癌のステージを示す。AA, 進行性大腸腺腫。Both(+), FIT と便 DNA 検査の両方が陽性。Both(-), FIT と便 DNA 検査の両方が陰性。CRC, 大腸癌。Fecal DNA alone(+), 便 DNA 検査単独で陽性。FIT, 免疫学的便潜血検査。FIT alone(+), FIT 単独で陽性。NAA, 非進行腺腫。

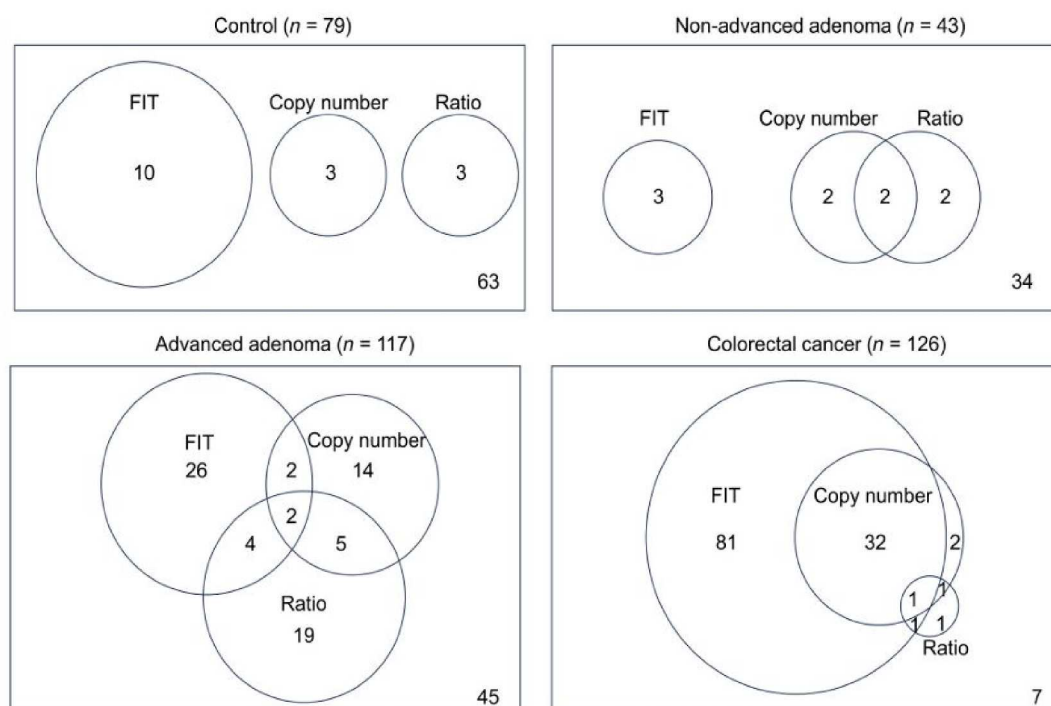


図 7. ベン図.

Copy number, メチル化 *SST* のコピー数が 67.9 copies/test 以上の被験者数。FIT, 免疫学的便潜血検査が陽性の被験者数。Ratio, メチル化 *SST* と *hTERT* のコピー数の比率が 0.5 以上の被験者数。

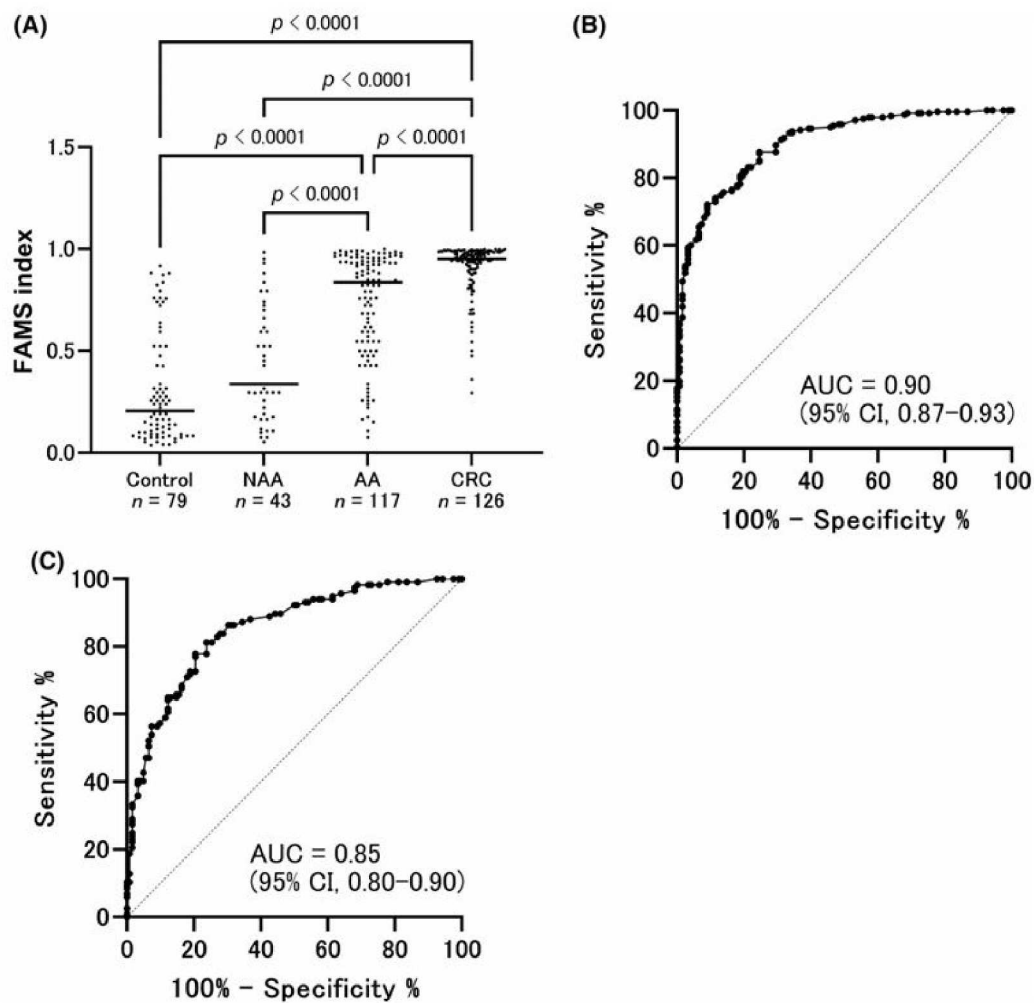


図 8. FAMS index の診断性能

各群における FAMS index の分布を (A) に示す。各サンプルの結果を●で示す。実線の水平線は中央値を示す。コントロール/非進行腺腫群と進行腺腫/大腸癌群 (B)、およびコントロール/非進行腺腫群と進行腺腫群間 (C) の ROC 曲線を示す。AA, 進行腺腫. AUC : ROC 曲線下面積. CI, 信頼区間. CRC, 大腸癌. FAMS index, 免疫学的便潜血検査、年齢、メチル化 *SST* からなる多変量解析. NAA, 非進行腺腫.