

# 大腸がんにおけるDNAメチル化の役割とメチル化検出キットの臨床的有用性

The role of DNA methylation in colorectal cancer and the clinical utility of a methylation detection kit

すえ ひろ ゆたか やま さき たか ひろ  
末 廣 寛：山 崎 隆 弘  
Yutaka SUEHIRO Takahiro YAMASAKI

## はじめに

切除不能な進行再発結腸・直腸がんの1次治療選択に際し、バイオマーカーとしての *RAS* 遺伝子、*BRAF* 遺伝子およびマイクロサテライト不安定性 (MSI/MMR) 検査の実施が推奨されている<sup>1)</sup>。*RAS* 野生型 (*RAS* 遺伝子に変異を認めない場合) で、原発腫瘍部位が左側 (下行結腸～直腸) であれば抗 EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor、上皮成長因子受容体) 抗体薬の効果が期待できるが、右側 (盲腸～横行結腸) の場合には効果が期待できないとされている。しかし、大腸がん組織の DNA メチル化ステータスを検出する診断薬

OncoGuide™ EpiLight™ の登場により、右側、左側といったがんの占拠部位によらず、抗 EGFR 抗体薬の効果を予測することが可能となった。本稿では、この DNA メチル化検査 OncoGuide™ EpiLight™ の概要と臨床的有用性について概説する。

## I. 切除不能な進行・再発大腸がんにおける抗EGFR抗体薬選択の現状

切除不能な進行再発結腸・直腸がんの1次治療選択に際し、バイオマーカーとしての *RAS* 遺伝子 (図1)、*BRAF* 遺伝子およびマイクロサテライト不安定性 (MSI/MMR) 検査の実施が大腸がん治療ガイドラインで推奨されている (図2)<sup>1)</sup>。

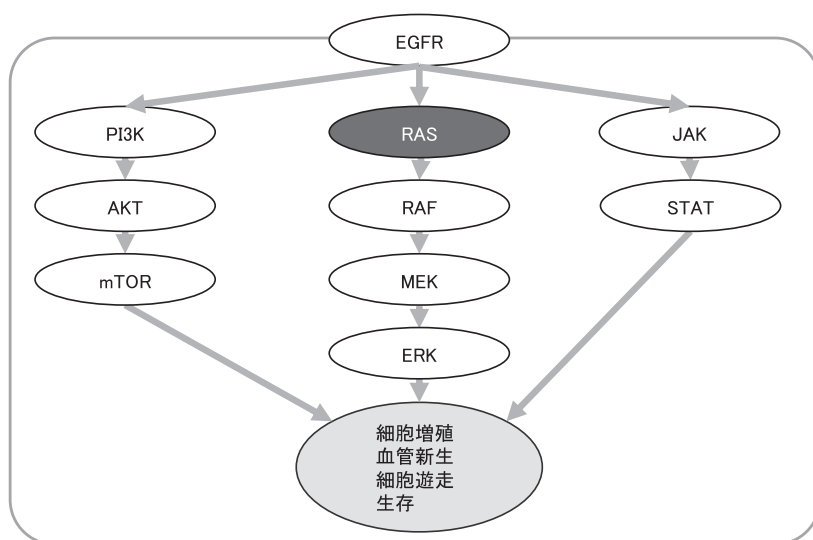


図1 EGFR シグナル経路

*RAS* が活性型に変異している場合は、いくら EGFR レベルで阻害しても効果は薬効が期待できない。このため、抗 EGFR 効果を期待できるか知るために、*RAS* 変異の有無を調べる必要がある。

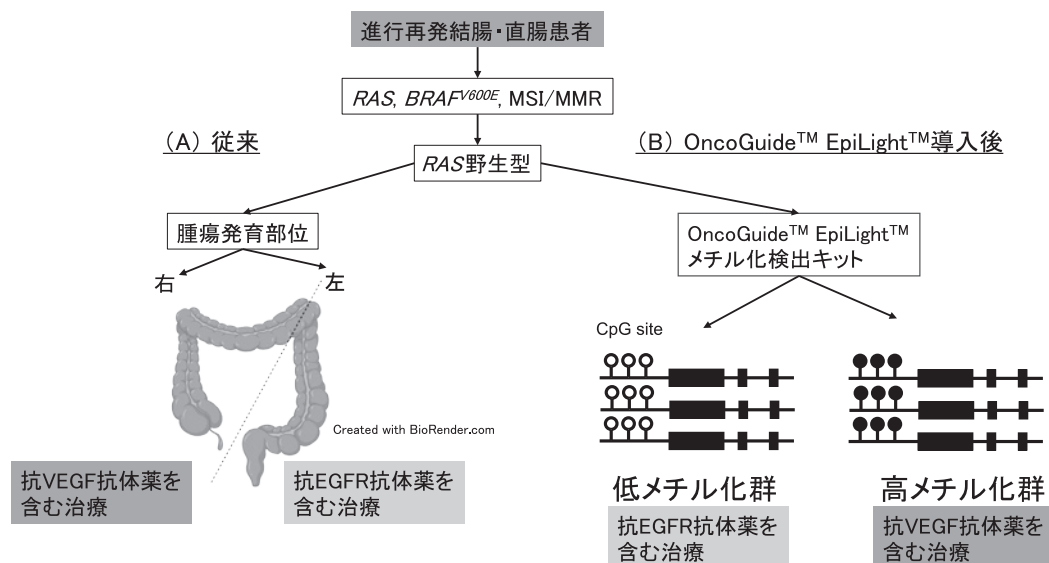


図2 RAS野生型の進行再発結腸・直腸癌における治療薬選択フロー

(A) 従来フロー、(B) OncoGuide™ EpiLight™ 導入後のフローを示す。

文献1) を参考に著者より作成

RAS 遺伝子変異があると抗 EGFR 抗体薬に抵抗性を示すため (図1)、RAS 遺伝子に変異を認めない場合にのみ、抗 EGFR 抗体薬の適応となる。ただしその場合でも、原発巣占居部位を考慮する必要がある。すなわち、原発巣占居部位が左側 (下行結腸～直腸) であれば抗 EGFR 抗体薬の適用が推奨されるが、右側 (盲腸～横行結腸) の場合は同薬剤の適用は推奨されず、代わりに抗 VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor、血管内皮増殖因子) 抗体薬が推奨される (図2A)<sup>1)</sup>。しかし、右側腫瘍でも抗 EGFR 抗体薬の効果があるものや、左側腫瘍であっても抗 EGFR 抗体薬の効果がないものもあり、腫瘍発育部位によらず、抗 EGFR 抗体薬の治療選択に有効なバイオマーカーの開発が望まれていた。

## II. 大腸がんにおけるDNAメチル化異常

DNA メチル化は、DNA メチル化転移酵素による、5'-シトシンへのメチル基の付加によって引き起こされる化学的修飾であり、CpG (CG ジヌクレオチド配列) 領域のシトシン (C) がターゲットとなる。腫瘍組織における DNA メチル化は、主に遺伝子のプロモーター領域の CpG アイランドに生じ、転写を負に抑制することで遺伝子の発現を抑制させると考えられている (図3)。

豊田、Issa らは大腸がん特異的な DNA メチル化マーカーを単離・解析することで、CpG アイランドのメチル化を高頻度に示す大腸がんの一群を見出し、DNA メチル化が関連する大腸がんの重要な発がん機構として、CpG island methylator phenotype (CIMP) を提唱した<sup>2)</sup>。CIMP「陽性」大腸がんは、右側結腸 (盲腸～横行結腸) に生じる割合が高く、*BRAF* 遺伝子変異例およびマイクロサテライト不安定性 (MSI) 例の割合が高い。また、病理組織学的特徴として、前駆病変として過形成性ポリープや Sessile serrated polyp を多く

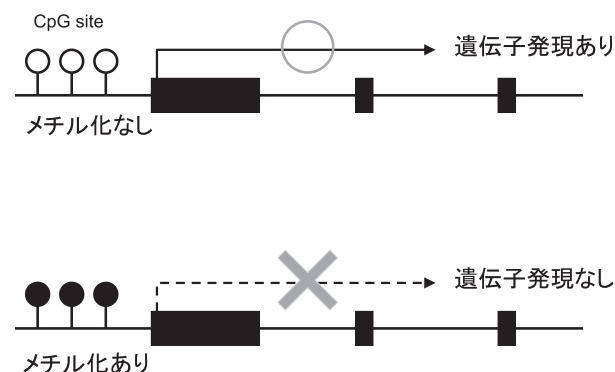


図3 プロモーター領域の DNA メチル化と遺伝子発現

一般的に、遺伝子のプロモーター領域の CpG アイランドにメチル化がない (○) と転写が起こり、メチル化があると (●) 転写が抑制される。

認めることが知られており、管状腺腫から生じる CIMP「陰性」大腸がんとは異なる発がん機構を有すると考えられている<sup>3)</sup>。大腸がんにおける DNA メチル化状態の分類法は他にも報告があり、さらに、大腸がんにおける予後因子としてのメチル化状態の報告はあるものの<sup>4,5)</sup>、抗 EGFR 抗体薬の適応に関するゲノムワイドな DNA メチル化の研究はこれまでに報告がなかった。

### Ⅲ. 抗EGFR抗体薬の治療効果予測因子としてのDNAメチル化

東北大学の研究グループにより、進行・再発大腸がんの RAS 遺伝子野生型の症例についての網羅的な解析により、ゲノムワイドの DNA メチル化解析が行われ、低メチル化群では高メチル化群と比較して抗 EGFR 抗体薬の治療効果が有意に良好であることが明らかとなった。さらに、切除不能 RAS 野生型大腸がんの後方視的検討で、原発巣占居部位や DNA メチル化ステータスを含む多変量解析が行われ、DNA 高メチル化ステータスが抗 EGFR 抗体薬投与後の唯一の独立予後不良因子であることが示された(図4)<sup>6,7)</sup>。

これを踏まえて、「大腸がん診療における遺伝子関連検査等のガイダンス(第5版)」において、ゲノムワイドな DNA メチル化ステータスが抗 EGFR 抗体薬の治療効果予測因子として新たに記載された<sup>3)</sup>。このゲノムワイドな DNA メチル化ステータスを反映する検査薬が、OncoGuide™ EpiLight™ である。

## Ⅳ. Oncoguide™ EpiLight™について

### 1. 検査のフロー

ホルマリン固定パラフィン標本材料から DNA を抽出し、DNA をバイサルファイト処理後に、ゲノムワイドな DNA メチル化ステータスを反映する 16 のターゲット DNA 領域、および内部コントロール遺伝子についてリアルタイム PCR を行う。内部コントロールと各領域との Ct 値の差により、当該領域のメチル化の有無を判定する(図5)<sup>8)</sup>。

### 2. メチル化解析(図6A)

バイサルファイト(亜硫酸水素塩)処理により、DNA 中のメチル化されていないシトシン(C)が

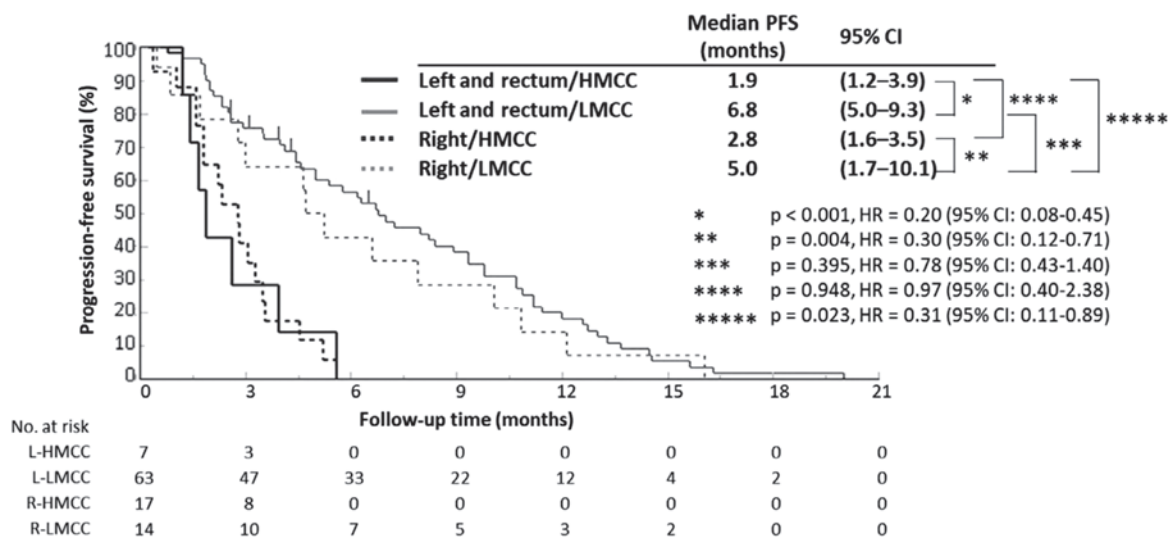


図4 DNA メチル化ステータスおよび原発腫瘍部位ごとの Kaplan-Meier 曲線

3次治療以降の症例について、PCR 法による DNA メチル化ステータスは、原発腫瘍部位に関わらず抗 EGFR 抗体薬の治療効果と強い関連を示した。すなわち、右側腫瘍と左側腫瘍の両方において、低メチル化群(LMCC)群は高メチル化群(HMCC)よりも有意に長い無増悪生存期間(PFS)を示した。低メチル化群(LMCC)群と高メチル化群(HMCC)のそれぞれについて右側腫瘍と左側腫瘍の PFS を比較すると、原発部位に基づく生存期間に有意差はなかった。

文献7)より転載

(図4は巻末カラーで掲載しています)

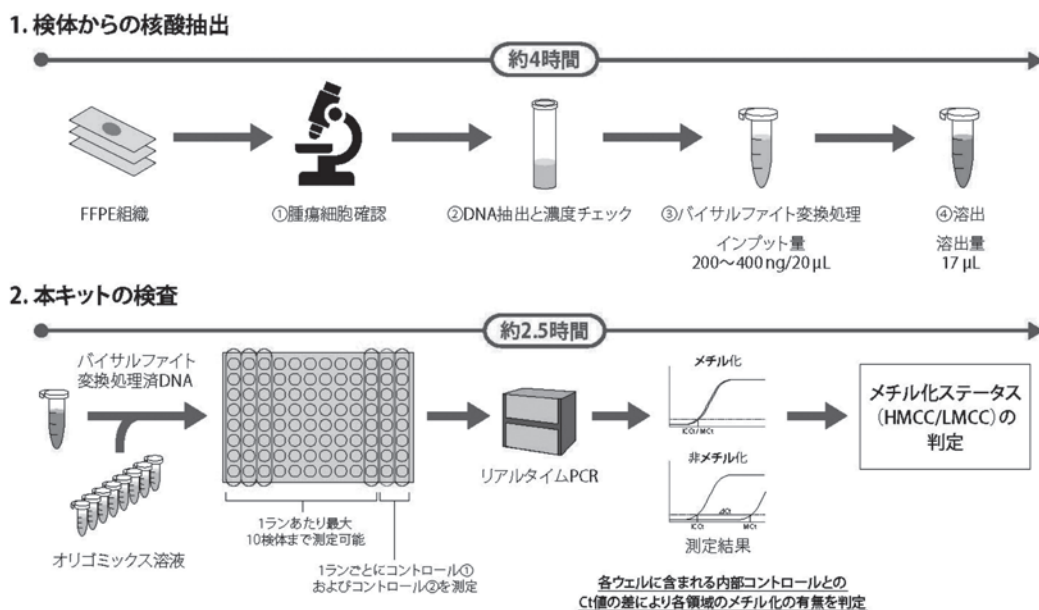


図5 Oncoguide™ EpiLight™ の測定フロー概要

ホルマリン固定パラフィン標本材料から DNA を抽出し、DNA をバイサルファイト処理する。次いで、ゲノムワイドなメチル化ステータスを反映する16のターゲット領域、および内部コントロールについてリアルタイム マルチプレックスPCRを行う。なお、PCR プレートの1ウェルには、2つのターゲット領域 (FAM, HEX 標識プローブ)、および、内部コントロール (Cy5 標識プローブ) が含まれている。内部コントロールと各領域との Ct 値の差により、各ターゲット領域のメチル化の有無を判定し、その後、メチル化ステータス、すなわち、高メチル化群 (HMCC) / 低メチル化群 (LMCC) の判定を行う。

文献8) より転載

(図5 は巻末カラーで掲載しています)

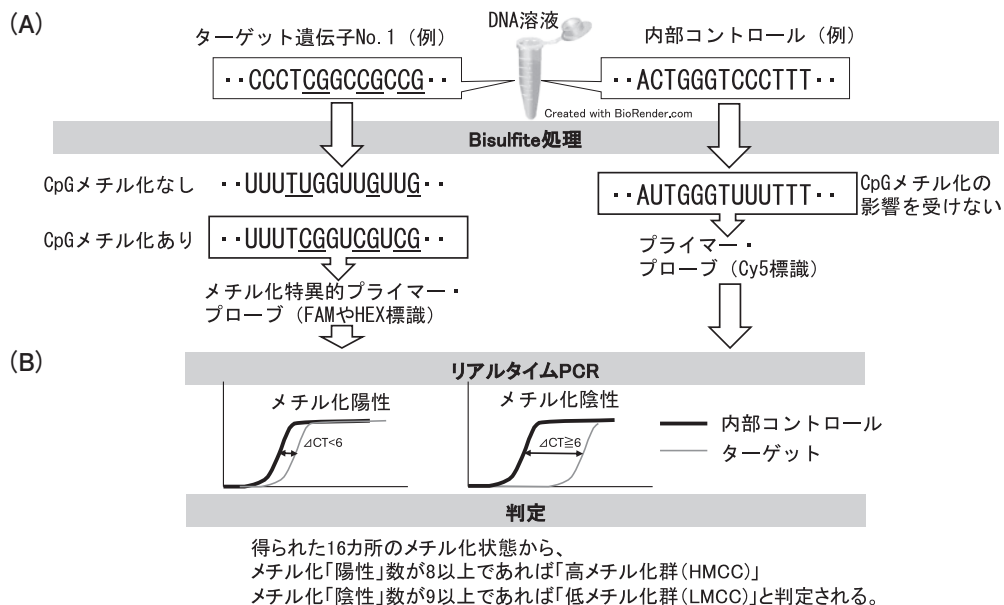


図6 バイサルファイト処理による塩基の変換、およびリアルタイム PCR でのメチル化判定

(A) バイサルファイト(亜硫酸水素塩) 処理により、DNA 中のメチル化されていないシトシン(C)が脱アミノ化されてウラシル(U)に変換されるのに対し、メチル化シトシンは変換されずシトシン (C) のまま残る。なお、DNA 塩基配列 CG の並び (アンダーライン) の C (シトシン) がメチル化修飾を受ける部位である。バイサルファイト処理により、この CG 配列におけるメチル化と非メチル化のシトシンの区別が可能となる。

(B) Oncoguide™ EpiLight™ キットのターゲット遺伝子のプライマー/プローブは、メチル化シトシンを含む配列のバイサルファイト変換処理後の配列に合わせて設計されている。そのため、リアルタイム PCR の工程でメチル化されている DNA 配列のみ増幅される。一方、内部コントロールについては、DNA メチル化の影響を受けない塩基配列が選択されており、リアルタイム PCR の工程で必ず増幅される。すなわち、検体 DNA の量や質による Ct 値への影響を補正する役割を持つ。

※図中の塩基配列は架空のものを示している。

脱アミノ化されウラシル (U) に変換されるのに対し、メチル化シトシンは変換されずシトシン (C) として残る。

なお、DNA 塩基配列 CG の並び (図のアンダーライン) の C (シトシン) がメチル化修飾を受ける部位である。バイサルファイト処理により、この CG 配列におけるメチル化シトシンと非メチル化シトシンの区別が可能となる。Oncoguide™ EpiLight™ キットのプライマー/プローブは、メチル化シトシンを含む配列のバイサルファイト変換処理後の配列に合わせて設計されている。そのため、リアルタイム PCR の工程でメチル化されている DNA 配列のみ増幅される。内部コントロールについては、DNA メチル化の影響を受けない配列が選択されている。

### 3. 検査結果の判定フロー (図6B)

- 1) サイクルごとに測定した蛍光強度から増幅曲線を作成する。増幅曲線より蛍光強度が予め規定された値以上となるサイクル数を求めこれを Ct 値とする。
- 2) コントロール①、コントロール②の 8 ウェルのそれぞれの Ct 値が一定の基準を満たすことを確認する。基準を満たさない場合は測定無効とする。
- 3) 検体 DNA の 8 ウェルのそれぞれのメチル化検

出反応 (FAM および HEX それぞれ) の Ct 値と内部コントロール (Cy5) の Ct 値との差を求めて  $\Delta$  Ct 値とする。

#### 4) メチル化陽性・メチル化陰性判定

$\Delta$  Ct 値が 6 未満 (マイナスも含む) の場合はメチル化陽性と判定する。

$\Delta$  Ct 値が 6 以上の場合はメチル化陰性と判定する。

#### 5) メチル化ステータスの判定

メチル化陽性数・メチル化陰性数によってメチル化ステータスを判定する。メチル化「陽性」数が 8 以上であれば「高メチル化群 (Highly methylated colorectal cancer, HMCC)」、メチル化「陰性」数が 9 以上であれば「低メチル化群 (Low methylated colorectal cancer, LMCC)」と判定される。メチル化「陽性」数が 8 未満で、メチル化「陰性」数が 9 未満であれば「判定不能」と判定される。

### 4. 臨床試験成績

本製品を用いた臨床試験において、抗 EGFR 抗体薬の効果について、低メチル化群では高メチル化群と比較して無増悪生存期間 (progression-free survival, PFS) および全生存期間 (overall survival, OS) が統計学的に有意に良好であった (図 7)<sup>8)</sup>。

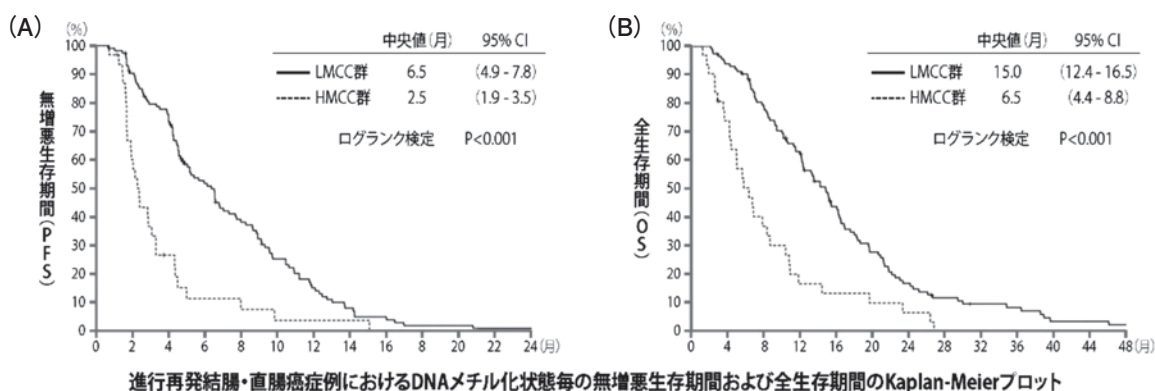


図 7 臨床試験成績 (臨床試験登録番号: UMIN000041205)

進行再発大腸がんの DNA メチル化ステータスに基づく抗 EGFR 抗体薬感受性予測能を検証する後ろ向き試験において、RAS 遺伝子野生型と診断された大腸がん症例 145 例を対象に、原発巣 FFPE から抽出した DNA を材料として本品を用いて DNA メチル化ステータスの測定が行われた。なお、評価対象の患者背景はオキサリプラチンおよびイリノテカンを含む治療レジメンが不応・不耐となった後、三次治療以降で、抗 EGFR 抗体薬とイリノテカンとの併用による治療が実施された症例であった。抗 EGFR 抗体薬の効果について、低メチル化群 (LMCC) では高メチル化群 (HMCC) と比較して無増悪生存期間 (progression-free survival, PFS) (A)、および全生存期間 (overall survival, OS) (B) が統計学的に有意に良好であった。

文献 8) より転載

## 文 献

### 5. 本検査に基づく治療選択

これまでの本製品に関連する臨床研究により、DNAメチル化ステータスによる抗EGFR抗体薬の治療効果予測バイオマーカーとしての臨床的有用性が評価され、大腸がん診療における遺伝子関連検査等のガイダンス第5版には、「DNAメチル化アッセイは、進行再発大腸がん治療の一次治療および既治療例における抗EGFR抗体薬の選択補助に有用と考えられる」、「一次治療における治療選択及び検体組織節約のため、DNAメチル化アッセイを実施するタイミングは一次治療開始前が合理的である」と記載された<sup>3)</sup>。

### おわりに

冒頭で述べたとおり、RAS野生型の切除不能な進行再発結腸・直腸がんにおいては、抗EGFR抗体薬の治療選択に有効なバイオマーカーの開発が望まれていた。今後は、RAS遺伝子野生型の患者に対する治療検討に際して、Oncoguide™ EpiLight™によるDNAメチル化ステータスを考慮したフローに移行すると考えられる。すなわち、抗EGFR抗体療法の対象を、従来の「原発巣占居部位が左側の大腸がん」から(図2A)、「低メチル化大腸がん(LMCC)」へ移行していくものと思われる(図2B)。

- 1) 大腸癌研究会. 大腸癌治療ガイドライン 医師用2024年版; 2024.  
<https://www.jscrc.jp/guideline/2024/particular.html>(引用日 2025/10/5)
- 2) Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, et al. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 1999;96:8681-8686.
- 3) 日本臨床腫瘍学会. 大腸がん診療における遺伝子関連検査等のガイダンス 第5版: 金原出版; 2023.
- 4) Yagi K, Akagi K, Hayashi H, et al. Three DNA methylation epigenotypes in human colorectal cancer. Clin Cancer Res 2010;16:21-33.
- 5) Dahlin AM, Palmqvist R, Henriksson ML, et al. The role of the CpG island methylator phenotype in colorectal cancer prognosis depends on microsatellite instability screening status. Clin Cancer Res 2010;16:1845-1855.
- 6) Ouchi K, Takahashi S, Yamada Y, et al. DNA methylation status as a biomarker of anti-epidermal growth factor receptor treatment for metastatic colorectal cancer. Cancer Sci 2015;106:1722-1729.
- 7) Ouchi K, Takahashi S, Okita A, et al. A modified MethylLight assay predicts the clinical outcomes of anti-epidermal growth factor receptor treatment in metastatic colorectal cancer. Cancer Sci 2022;113:1057-1068.  
Licence : CC BY-NC 4.0.  
(<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)
- 8) 理研ジェネシス 製品パンフレット.  
[https://www.rikengenesis.jp/product/product\\_ivd/product\\_ivd\\_05\\_EpiLight\\_MethylationDetectionKit.html](https://www.rikengenesis.jp/product/product_ivd/product_ivd_05_EpiLight_MethylationDetectionKit.html)  
(引用日 2025/10/5)

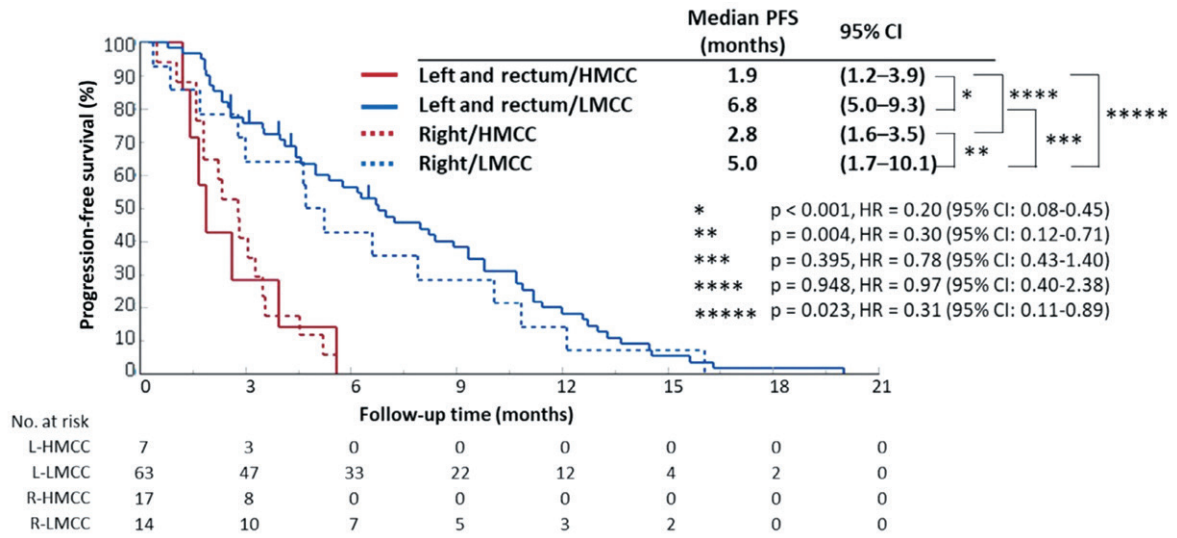
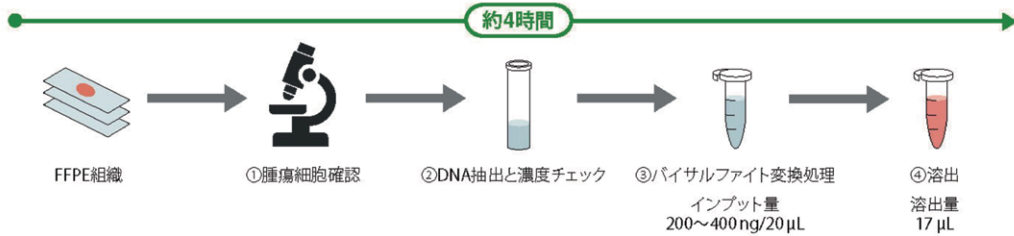


図4 DNAメチル化ステータスおよび原発腫瘍部位ごとのKaplan-Meier曲線

3次治療以降の症例について、PCR法によるDNAメチル化ステータスは、原発腫瘍部位に関わらず抗EGFR抗体薬の治療効果と強い関連を示した。すなわち、右側腫瘍と左側腫瘍の両方において、低メチル化群(LMCC)群は高メチル化群(HMCC)よりも有意に長い無増悪生存期間(PFS)を示した。低メチル化群(LMCC)群と高メチル化群(HMCC)のそれぞれについて右側腫瘍と左側腫瘍のPFSを比較すると、原発部位に基づく生存期間に有意差はなかった。

文献7)より転載

1. 検体からの核酸抽出



2. 本キットの検査

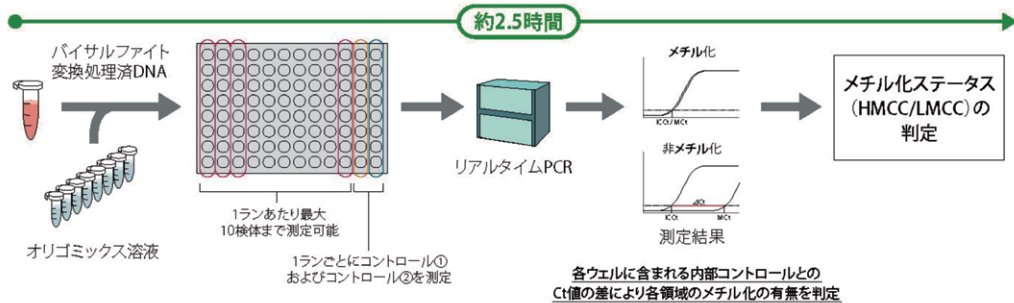


図5 Oncoguide™ EpiLight™ の測定フロー概要

ホルマリン固定パラフィン標本材料からDNAを抽出し、DNAをバイサルファイト処理する。次いで、ゲノムワイドなメチル化ステータスを反映する16のターゲット領域、および内部コントロールについてリアルタイムマルチプレックスPCRを行う。なお、PCRプレートの1ウェルには、2つのターゲット領域(FAM, HEX 標識プローブ)、および、内部コントロール(Cy5 標識プローブ)が含まれている。内部コントロールと各領域とのCt値の差により、各ターゲット領域のメチル化の有無を判定し、その後、メチル化ステータス、すなわち、高メチル化群(HMCC) / 低メチル化群(LMCC) の判定を行う。

文献8)より転載