

便中メチル化 DNA 検出による消化器がんスクリーニング： 消化器がんを非侵襲的にスクリーニングすることは可能か？

永坂 岳司^{a*}, 田中 紀章^b, 孫 冬生^a, 猶本 良夫^c, 松原 長秀^d, 八木 孝仁^a,
藤原 俊義^a

^a岡山大学大学院医歯薬総合研究科 消化器・腫瘍外科学, ^b鳥取市立病院, ^c川崎医科大学附属病院 外科, ^d兵庫医科大学 外科

キーワード: methylation, stool, colorectal cancer, gastric cancer, screening

Analysis of fecal DNA methylation to detect gastrointestinal neoplasia

Takeshi Nagasaka^{a*}, Noriaki Tanaka^b, Dong-Sheng Sun^a, Yoshio Naomoto^c, Nagahide Mastubara^d, Takahito Yagi^a,
Toshiyoshi Fujiwara^a

^aDepartment of Gastroenterological Surgery, Transplant, and Surgical Oncology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences,
^bTottori Municipal Hospital, ^cDepartment of General Surgery, Kawasaki Medical School, ^dDepartment of Surgery, Hyogo College of Medicine

はじめに

大腸がんでは、誰でも容易に参加可能なスクリーニング方法である便潜血反応が行われている。そして、便潜血反応検査を定期的に行うことにより、がん死亡数を減少させることが示されている¹⁻³。しかしながら、便潜血反応は便中に存在する血液を検出する方法であり、大腸がんだけに認められる変化を検出してはならない。したがって、その検出原理から、早期腸がんや大腸腺腫に対する検出感度は低いことが知られている^{4,5}。このように早期大腸がんや大腸腺腫に対し低い感度を示す検査にもかかわらず、その効果は思っている以上に大きい¹⁻³。そのために、近年、便潜

血反応を越える新しいスクリーニング方法として、がん細胞だけに認められる遺伝子変異を便から検出する方法の開発・検討が行われている⁶⁻¹⁰。

便中のがん由来 DNA から遺伝子変異を検出する

では実際に、現在、米国で行われている便中のがん由来の DNA を検出することによる大腸がんスクリーニング方法の効果はどの程度だろうか？米国の EXACT SCIENCE 社による便中のがん由来 DNA から遺伝子変異を検出する方法 (PreGen-Plus) にて行われた多施設による試験の結果では、大腸がんに対する感度等は便潜血反応よりも少し良い程度(ほぼ同程度)であり、前がん病変に対する感度も便潜血反応と同様に低いままであった⁹。この感度の低いことの原因としては、便からヒト由来 DNA を増幅させる技術的な困難さよりもむしろ、腫瘍特異的な変化とされる突然変異を検出することの困難さが原因であると考えられる。

平成22年 5 月受理

*〒700-8558 岡山市北区鹿田町 2-5-1

電話: 086-235-7257 FAX: 086-221-8775

E-mail: takeshin@cc.okayama-u.ac.jp

プロフィール



永坂 岳司

昭和42年 5 月 3 日生

平成 7 年 3 月 岡山大学医学部卒業

平成 16 年 3 月 岡山大学大学院医歯薬総合研究科博士課程修了

平成 7 年 4 月 岡山大学医学部附属病院麻酔・蘇生科 医員

平成 7 年 7 月 岡山赤十字病院麻酔科 医員

平成 8 年 3 月 広島市民病院麻酔・集中治療科 医員

平成 9 年 4 月 岡山大学医学部附属病院第一外科 医員

平成 9 年 7 月 金光病院外科 医長

平成 16 年 10 月 Baylor University Medical Center (Dallas, TX) Research Fellow

平成 19 年 1 月 法務技官医師(岡山刑務所医務課), 岡山大学医学部客員研究員,

岡山大学大学院医歯薬総合研究科 非常勤講師

岡山大学病院消化管外科 助教

現在に至る

腫瘍細胞は heterozygosis であり、すべての大腸がんには必ず認められるような遺伝子変異は現在のところ確認されていない。したがって、遺伝子変異を検出することによって大腸がんを100%検出するためには、様々な遺伝子の突然変異を検索する必要がある。事実、PreGen-Plus は合計21カ所の遺伝子突然変異を便中のヒト DNA から検出する方法である（近年、Vimencin 遺伝子プロモーター領域のメチル化もマーカーに加わり、合計22個になっている）^{9,11)}。しかしながら、合計21カ所の突然変異を検出しても、そのスクリーニング能力は便潜血反応と同等程度であった⁹⁾。この検出しなければならぬ遺伝子突然変異部位数の増加は検出手技の煩雑さ、コストの増加を招く。現在までのところ、結果的には便潜血反応を凌駕することはできてない。しかし、これら一連の研究成果は我々に重要な驚きを与えてくれた。

“便にはヒト DNA が存在し、それらを増幅し解析することができる”

Scatology

本当に便からヒト由来 DNA を解析できるのか？ほとんどの人はこの概念に懐疑的である。なぜなら、おそらくほとんどの人は便の内容物について、かつては子供の本などで説明されていたように、「便は食べ物が消化しきれなかった“かす”である」と考えているからである。現在、正しいとされている便の構成物について、以下に記載する。

人間の便は、食物繊維など摂取した食物のうち消化しきれなかったもの、新陳代謝によってはがれた腸内細胞、大腸菌などの腸内細菌、胆汁などの体内分泌液、水分、または体内に蓄積していた毒素などで、未消化物の組成は摂取した食物により左右される。したがって、便を構成する成分のうち、食べ物の残滓はおよそ5%に過ぎない。大半は水分（60%）が占め、次が多いのが腸壁細胞の死骸（15~20%）である。また、細菌類の死骸（10~15%）も食べ物の残滓より多く含まれる（『糞』『フリー百科事典 ウィキペディア日本語版』（<http://ja.wikipedia.org/wiki/%E7%B3%9E>）。2010年5月3日14時（日本時間）現在での最新版を取得）。

そう、もはや便は食べ物が消化しきれなかった“かす”ではない。そして、重要なのは、便を構成するものの中で、水分の次に多いのが「腸壁細胞の死骸（15

~20%）」であること。「腸壁細胞」には必ず、DNA が含まれる。ならば、「腸壁細胞の死骸（15~20%）」を含む便はとても豊富に DNA を含むはずである。ならば、DNA を抽出し、増幅することは思っている以上に簡単かもしれない。しかし、現実には、確かにDNA は抽出できるが、そのほとんどは細菌由来のDNA であり、ヒト由来の DNA を増幅するのは難しいのが現実である。

検出技術の開発

そのような背景を十分承知した上で、我々は便からヒト由来の DNA のメチル化を簡便に検出することができるように、

- ① One-step Bisulfite Modification
- ② High-Sensitive Assay for Bisulfite DNA (Hi-SA ; 図1)

の開発を行った¹²⁾。

すなわち、①の技術により、便から DNA を精製することなく、直接 bisulfite 変性を行い、便から DNA のメチル化の検出を行う際の複雑な手順の簡略化を行い、②の Hi-SA にて、メチル化 DNA を高感度に検出することを可能にし、蛍光標識を加えることによって、より簡単に感度よく、便からメチル化 DNA を検出することを可能にした。

New Scatology

そして実際に、上記2つの方法を用いてヒト DNA 由来の領域を便から増幅を試みた。ヒト DNA 由来の領域には今回、*RASSF2* 及び *SFRP2* 遺伝子の5'領域 CpG island を各々2つの領域に分けた部分をマーカーに設定し増幅を行った (Region1 と Region2 ; 図2)。尚、この2つの遺伝子は機能的にはがん抑制遺伝子と考えられている。そして、その5'領域 CpG island のメチル化によって発現がコントロールされており、胃がんや大腸がんを高頻度に異常なメチル化が起きていることが報告されている¹³⁻¹⁷⁾。今回の研究では（2つの遺伝子）×（2つの領域）= 4カ所の増幅を行った。この4つのうち何個が増幅可能であったかを recovery score と定義し、様々な疾患を伴う患者（健常人も含む）から得られた便検体を用いて検討を行った（表1）。その結果を表2に示す。健常人の便検体の recovery score 平均値は1.27であるのに対して、大腸ポリープを認めた患者の便検体の recovery score 平

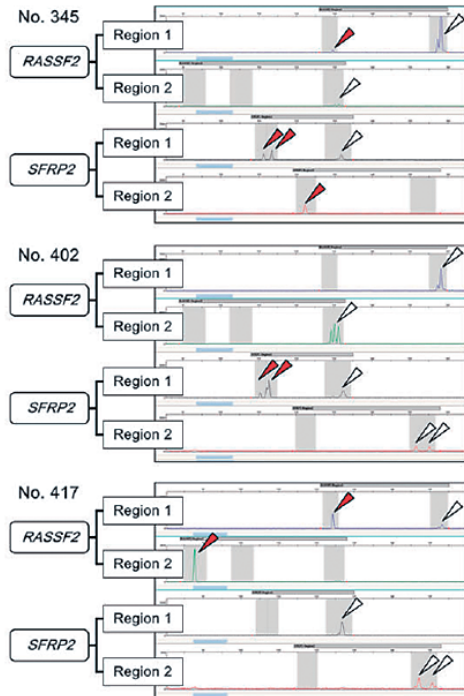


図1 High-Sensitive Assay for Bisulfite DNA (Hi-SA) キャピラリーシーケンサーを用いた便中メチル化 DNA の検出例を提示する。各 No は便検体の番号を示す。各レーンは便中ヒトメチル化 DNA 検出のマーカを示す。マーカは各々の遺伝子 (RASSF2, SFRP2) のプロモーター領域の 2 つの異なる CpG のメチル化を検出している (Region 1 & 2)。赤矢印はメチル化 DNA の存在を示し、白矢印は非メチル化 DNA の存在を示す。

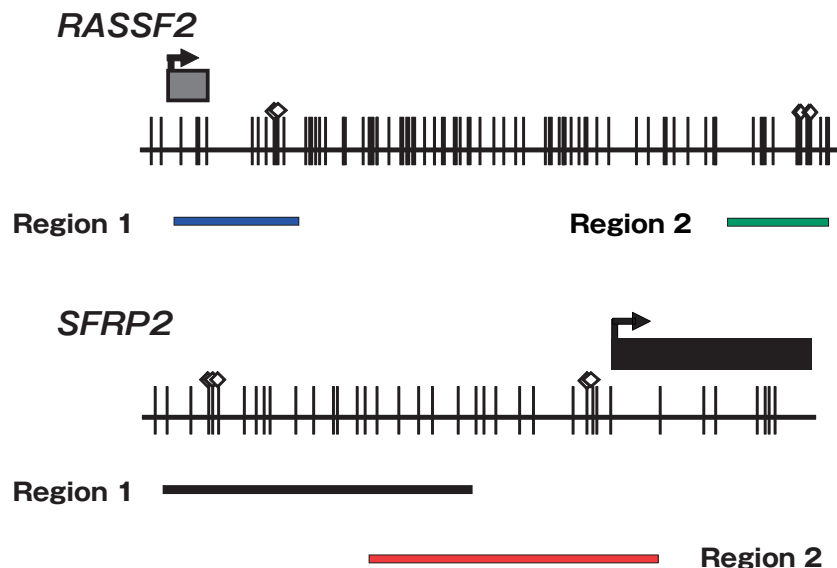


図2 RASSF2 と SFRP2 プロモーター領域 Region 1 と 2 の場所を示した模式図
灰色の四角は noncoding exon 1 領域を示し、黒四角は coding exon 1 領域を示す。矢印は transcriptional start sites を示す。縦線はひとつの CpG site を示す。白四角は制限酵素 *Hha* I 認識部位を示す。

均値は1.86 ($P = .009$, vs. 健常人), 大腸がん患者の便検体の recovery score 平均値は3.21 ($P < .001$, vs. 大腸ポリープを認めた患者)であった。すなわち, 大腸になんらかの腫瘍を認めた患者からの便のほうが有為に DNA を増幅しやすいことが示された。便中には腸壁細胞の死骸が15~20%認められるはずである。もし, それら細胞の DNA をそのまま便から抽出することができるならば, 腫瘍の有無により recovery score に差が出るとは考えられにくい。いったい何が起きているのだろうか?

すでにお気づきの方もおられるだろう。本稿では「腸壁細胞」ではなく「腸壁細胞の死骸」とあえて記載している。これから, この意味するところを明らかにしたい。

一般に, 正常消化管粘膜はアポトーシスを介して, 数日以内に腸管から脱落していることが認められている。一方, 腫瘍細胞はアポトーシスを介した脱落ではなく, 剥離によって便内に放出されると考えられている。もう少し細かく記載するなら, 正常消化管粘膜 (正常腸壁細胞) の死骸の DNA はアポトーシスのために“細切れ”にされている。一方, 腫瘍細胞はアポトーシスを介さないため, DNA は長いまま便中に存在する^{5,10}。要するに, 健常人・大腸腫瘍の患者を問わず, ヒトの便には確かに腸壁細胞の死骸が15~20%存在するが, 健常人ではその DNA は“細切れ”になってい

表1 便検体提供者の臨床的特徴

| 上部・下部内視鏡による診断 | n | 平均年齢 (標準偏差) | 男性, n (%) | 右側大腸腫瘍*, n (%) |
|--------------------------------|-----|-------------|-----------|----------------|
| 健常人 † | 113 | 66.1 (12.5) | 48 (42.5) | — |
| Colorectal Hyperplastic Polyps | 12 | 61.2 (9.7) | 7 (58.3) | 0 (0) |
| Colorectal Adenomas | 56 | 64.6 (12.2) | 36 (64.3) | 25 (44.6) |
| Non-advanced adenomas ‡ | 29 | 62.7 (12.5) | 18 (62.1) | 17 (58.6) |
| Advanced adenomas § | 27 | 66.7 (11.7) | 18 (66.7) | 8 (29.6) |
| Colorectal Cancer | 84 | 65.2 (11.3) | 48 (57.1) | 28 (33.3) |
| TNM Stage (I & II) | 40 | 66.4 (11.2) | 22 (55.0) | 15 (37.5) |
| TNM Stage (III & IV) | 44 | 64.1 (11.5) | 26 (59.1) | 13 (29.6) |
| 虚血性大腸炎 | 4 | 72.0 (15.1) | 1 (25.0) | 0 (0) |
| 潰瘍性大腸炎 | 2 | 68.5 (6.4) | 1 (50.0) | 0 (0) |
| 胃・十二指腸潰瘍 | 4 | 60.0 (16.6) | 3 (75.0) | — |
| Gastric Cancer | 21 | 67.2 (13.8) | 18 (85.7) | — |
| TNM Stage (I & II) | 10 | 66.8 (12.8) | 10 (100) | — |
| TNM Stage (III & IV) | 11 | 67.6 (15.2) | 8 (72.7) | — |

* 脾湾曲部よりも口側に存在する腫瘍の数 (%)。

† 胃炎, 大腸憩室症, 内外痔核を伴う患者を含む。

‡ Non-advanced adenomas は直径 1 cm以下の1つの tubular adenoma を伴う患者を指す。

§ Advanced adenomas は villous architecture を含む polyp, 直径 1 cm以上の tubular adenoma, 多発 tubular adenoma を伴う患者を指す。

表2 便検体解析から得られた Recovery Score の特徴

| 上部・下部内視鏡による診断 | n | Recovery Score, n (%) | | | | | Mean Recovery Score (標準偏差) | P 値 (comparison)* |
|--------------------------------|-----|-----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------------------------------|-------------------------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | | |
| 健常人 | 113 | 41 (36.3) | 30 (26.6) | 21 (18.6) | 13 (11.5) | 8 (7.1) | 1.27 (1.26) | |
| Colorectal Hyperplastic Polyps | 12 | 4 (33.3) | 2 (16.7) | 3 (25.0) | 2 (16.7) | 1 (8.3) | 1.50 (1.38) | 0.563 (vs 健常人) † |
| Colorectal Adenomas | 56 | 12 (21.4) | 13 (23.2) | 12 (21.4) | 9 (16.1) | 10 (17.9) | 1.86 (1.41) | 0.009 (vs 健常人) † |
| Non-advanced adenomas (NAA) | 29 | 7 (24.1) | 7 (24.1) | 5 (17.2) | 8 (27.6) | 2 (6.9) | 1.69 (1.31) | |
| Advanced adenomas (AA) | 27 | 5 (18.5) | 6 (22.2) | 7 (25.9) | 1 (3.7) | 8 (29.6) | 2.04 (1.51) | |
| Colorectal Cancer | 84 | 3 (3.6) | 5 (6.0) | 13 (15.5) | 13 (15.5) | 50 (59.5) | 3.21 (1.13) | <.001 (vs adenoma) § |
| TNM Stage (I & II) | 40 | 3 (7.5) | 3 (7.5) | 7 (17.5) | 7 (17.5) | 20 (50.0) | 2.95 (1.30) | |
| TNM Stage (III & IV) | 44 | 0 (0) | 2 (4.6) | 6 (13.6) | 6 (13.6) | 30 (68.2) | 3.45 (0.90) | |
| 虚血性大腸炎 | 4 | 2 (50.0) | 1 (25.0) | 0 (0) | 1 (25.0) | 0 (0) | 1.00 (1.41) | 0.634 (vs 健常人) † |
| 潰瘍性大腸炎 | 2 | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 2 (100) | 4.00 (0) | 0.02 (vs 健常人) † |
| 胃・十二指腸潰瘍 | 4 | 0 (0) | 1 (25.0) | 2 (50.0) | 1 (25.0) | 0 (0) | 2.00 (0.82) | 0.154 (vs 健常人) † |
| Gastric Cancer | 21 | 4 (19.0) | 2 (9.5) | 4 (19.0) | 4 (19.0) | 7 (33.3) | 2.38 (1.53) | 0.002 (vs 健常人) † |
| TNM Stage (I & II) | 10 | 1 (10.0) | 1 (10.0) | 3 (30.0) | 1 (10.0) | 4 (40.0) | 2.60 (1.43) | |
| TNM Stage (III & IV) | 11 | 3 (27.3) | 1 (9.1) | 1 (9.1) | 3 (27.3) | 3 (27.3) | 2.18 (1.66) | |

*P 値のすべては the Wilcoxon rank-sum test にて計算。

るため増幅することが難しいのである。反対に、大腸腫瘍の患者の便中の腫瘍細胞由来の DNA は“細切れ”になっていないため、かえって増幅しやすくなっているということが推測される。この分子生物学的理論が正しければ、大腸になんらかの腫瘍を認めた患者から

の便のほうが無為 DNA を増幅しやすいことなる。そして、この便における分子生物学的理論と矛盾しない結果を我々は得たことになる。

便中ヒト DNA 検出によるスクリーニングの可能性

今までの話をまとめると、便中の DNA の状態は腫瘍からの場合と正常腸壁細胞からの場合とで異なるようである。それらはすべて大腸だけに適応されるのであろうか？それとも大腸よりも口側の消化器（管）にも応用できるのであろうか？

便中に含まれるヒト由来の細胞はすべて大腸由来であり、大腸よりも口側の消化器・消化管由来の細胞は存在しえないとされている¹⁸⁾。この事実は便を調べてわかるのは大腸の状態だけということになる。はたして本当だろうか？

確かに、便中に存在するヒト由来の細胞は大腸粘膜由来である。では、DNA としてはどうだろうか？

もう一度、表 2 を見てもらいたい。胃がん患者の便検体の recovery score 平均値は 2.38 ($P = .002$, vs. 健常人) と有為に健常人のそれよりも大きい。すなわち、胃がん細胞からの DNA も便中に増幅可能な状態である程度存在していることになる。大腸より口側の消化器腫瘍から剥離した細胞の DNA も便中には長鎖な状態で存在することが可能であり、大腸より口側の消化器腫瘍由来 DNA も便から増幅可能であるし、便から大腸がんだけでなく、そのほかの消化器がんもスクリーニングすることが可能となることが示唆される。

さて、わが国においては、男性では 2 人に 1 人が、女性では 3 人に 1 人が一生のうちにがんを診断され、男性では 4 人に 1 人が、女性では 6 人に 1 人が、がんを死亡する時代を迎えている。その死亡数では、消化器がん（食道がん、胃がん、肝がん、胆道がん、膵臓がん、結腸がん、直腸がん）によるものが男女合わせて 17 万 5 千人以上（全がん死亡数の 53.6% 以上、2005 年）を占める。どのようにしたら、がん死亡数を減少せしめることができるのであろうか？ひとつはがんにならないこと（予防医学）の実践であり、もうひとつは、効果的なスクリーニングによる早期発見の実践である。

効果的なスクリーニングとはなんだろうか？極論を言えば、がん年齢になったら大腸がんでは下部消化管内視鏡を、胃がんならば上部消化管内視鏡を受けることだと考えられる。しかし、これも現実的ではない。平成 19 年に閣議決定された「がん対策推進基本計画」では、がん早期発見の重要性の観点から、がん検診の受診率を 5 年以内に 50% とすることを目標に掲げてい

る。しかしながら、がん検診の受診率はどれも 30% 前後と低い状態にある。その原因のひとつに、がん検診に伴う身体的時間的拘束が挙げられる。したがって、がん検診受診率の増加を促すためには、病院や検診機関等に向かうことなく、がん検診を行うことができる技術の開発が重要であると我々は考えている。かつ、多臓器のがんを一度に検診できるような（例えば、便から消化器がん、尿から泌尿器系のがん、痰から肺がん等）新しい形のがんスクリーニング技術を提供することができれば、よりいっそう検診の受診率の向上が期待でき、その結果、様々ながんの早期発見の増加、がん死亡数の減少を実践することができるかもしれない。我々の方法はこれら絵空事を現実のものにしてくれるのだろうか？

おわりに

便から大腸がん以外の消化器がんをスクリーニング？そんなことはできるわけがないと一笑して頂きたい。ただ、我々は、近い将来、この非侵襲的スクリーニング方法が臨床の場においてあたりまえに行われることを信じて今後も尽力していく所存である。

大腸癌研究会のデータによれば、大腸がんのステージ別の 5 年生存率は、ステージ 0 では約 95%、ステージ I では約 90%、ステージ II では約 80%、ステージ III では約 65%、ステージ IV では 13% である¹⁹⁾。そう、ステージ IV になる前に大腸がんを発見できさえすれば、5 年生存率は 65% を超えるのである。我々は、まず手始めに、我々の非侵襲的スクリーニング方法を行うことによりステージ IV で発見される大腸がん患者を撲滅することを目指す。

今回、我々は便中ヒト由来 DNA におけるメチル化を検出することによる消化器がんの非侵襲的スクリーニング技術の開発およびその効果の検討を行った。より専門的な検出技術や便中ヒト DNA 精製技術、具体的な感度や特異度等の話は今回割愛させて頂いた。興味ある方は林原賞受賞論文原著を参照して頂きたい¹²⁾。現在も、この消化器がん非侵襲的スクリーニング技術の改良を行っている。そして、岡山大学医学部消化器・腫瘍外科学教室または岡山大学病院消化管外科・肝胆膵外科外来にて検査希望者に対し随時この検査を無償で行っている。ご興味ある方はご一報頂きたい。

追 悼

山下富三様，吉田和男様をはじめとする大腸がんにて亡くなられた方のご冥福を心からお祈りいたします。そして，本研究により進行大腸がんが発見される患者が一人でも少なくなることを願い今後も誠心誠意努力していくことを誓うことによって哀悼の意とさせていただきます。

文 献

- 1) Mandel JS, Bond JH, Church TR, Snover DC, Bradley GM, Schuman LM, Ederer F : Reducing mortality from colorectal cancer by screening for fecal occult blood. Minnesota Colon Cancer Control Study. *N Engl J Med* (1993) 328, 1365-1371.
- 2) Hardcastle JD, Chamberlain JO, Robinson MH, Moss SM, Amar SS, Balfour TW, James PD, Mangham CM : Randomised controlled trial of faecal-occult-blood screening for colorectal cancer. *Lancet* (1996) 348, 1472-1477.
- 3) Kronborg O, Fenger C, Olsen J, Jorgensen OD, Sondergaard O : Randomised study of screening for colorectal cancer with faecal-occult-blood test. *Lancet* (1996) 348, 1467-1471.
- 4) 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.
- 5) Osborn NK, Ahlquist DA : Stool screening for colorectal cancer : molecular approaches. *Gastroenterology* (2005) 128, 192-206.
- 6) Sidransky D, Tokino T, Hamilton SR, Kinzler KW, Levin B, Frost P, Vogelstein B : Identification of ras oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors. *Science* (1992) 256, 102-105.
- 7) Ahlquist DA, Skoletsky JE, Boynton KA, Harrington JJ, Mahoney DW, Pierceall WE, Thibodeau SN, Shuber AP : Colorectal cancer screening by detection of altered human DNA in stool : feasibility of a multitarget assay panel. *Gastroenterology* (2000) 119, 1219-1227.
- 8) Müller HM, Oberwalder M, Fiegl H, Morandell M, Goebel G, Zitt M, Mühlthaler M, Ofner D, Margreiter R, Widschwendter M : Methylation changes in faecal DNA : a marker for colorectal cancer screening? *Lancet* (2004) 363, 1283-1285.
- 9) Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, Turnbull BA, Ross ME : Fecal DNA versus fecal occult blood for colorectal-cancer screening in an average-risk population. *N Engl J Med* (2004) 351, 2704-2714.
- 10) Zou H, Harrington JJ, Klatt KK, Ahlquist DA : A sensitive method to quantify human long DNA in stool : relevance to colorectal cancer screening. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* (2006) 15, 1115-1119.
- 11) Itzkowitz S, Brand R, Jandorf L, Durkee K, Millholland J, Rabeneck L, Schroy PC 3rd, Sontag S, Johnson D, Markowitz S, Paszat L, Berger BM : A simplified, noninvasive stool DNA test for colorectal cancer detection. *The American journal of gastroenterology* (2008) 103, 2862-2870.
- 12) Nagasaka T, Tanaka N, Cullings HM, Sun DS, Sasamoto H, Uchida T, Koi M, Nishida N, Naomoto Y, Boland CR, Matsubara N, Goel A : Analysis of fecal DNA methylation to detect gastrointestinal neoplasia. *J Natl Cancer Inst* (2009) 101, 1244-1258.
- 13) Nagasaka T, Koi M, Kloor M, Gebert J, Vilkin A, Nishida N, Shin SK, Sasamoto H, Tanaka N, Matsubara N, Boland CR, Goel A : Mutations in both KRAS and BRAF may contribute to the methylator phenotype in colon cancer. *Gastroenterology* (2008) 134, 1950-1960, 1960e1.
- 14) Akino K, Toyota M, Suzuki H, Mita H, Sasaki Y, Ohe-Toyota M, Issa JP, Hinoda Y, Imai K, Tokino T : The Ras effector RASSF2 is a novel tumor-suppressor gene in human colorectal cancer. *Gastroenterology* (2005) 129, 156-169.
- 15) Suzuki H, Watkins DN, Jair KW, Schuebel KE, Markowitz SD, Chen WD, Pretlow TP, Yang B, Akiyama Y, Van Engeland M, Toyota M, Tokino T, et al. : Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat Genet* (2004) 36, 417-422.
- 16) Nojima M, Suzuki H, Toyota M, Watanabe Y, Maruyama R, Sasaki S, Sasaki Y, Mita H, Nishikawa N, Yamaguchi K, Hirata K, Itoh F, et al. : Frequent epigenetic inactivation of SFRP genes and constitutive activation of Wnt signaling in gastric cancer. *Oncogene* (2007) 26, 4699-4713.
- 17) Endoh M, Tamura G, Honda T, Homma N, Terashima M, Nishizuka S, Motoyama T : RASSF2, a potential tumour suppressor, is silenced by CpG island hypermethylation in gastric cancer. *Br J Cancer* (2005) 93, 1395-1399.
- 18) Albaugh GP, Iyengar V, Lohani A, Malayeri M, Bala S, Nair PP : Isolation of exfoliated colonic epithelial cells, a novel, non-invasive approach to the study of cellular markers. *Int J Cancer* (1992) 52, 347-350.
- 19) 大腸癌治療ガイドライン医師用2005年度版，大腸癌研究会編，金原出版，東京（2005）。