

便中 DNA・RNA マーカーを用いた大腸がん 検診の可能性について

— 英語論文のレビューから —

日山 亨¹⁾, 横崎 恭之¹⁾, 吉原 正治¹⁾

Feasibility of clinical application of stool DNA/RNA marker for screening of colon cancer
— A review of English literatures —

Toru HIYAMA¹⁾, Yasuyuki YOKOSAKI¹⁾, Masaharu YOSHIHARA¹⁾

I. はじめに

大腸がん検診には、現在、便潜血反応検査免疫法が主に用いられている。全大腸内視鏡検査も一部では行われているが、厚生労働省がん研究班による大腸がん検診ガイドライン¹⁾では、全大腸内視鏡検査による大腸がん死亡率減少効果を示す相応の証拠はあるものの、検査に伴う不利益が無視できないため、対策型検診として実施することはすすめられないとされている。一方、任意型検診として実施する場合には、全大腸内視鏡検査に伴う前処置、前投薬、検査による不利益を事前に十分説明することが必要であり、その実施は事前の説明が可能なこと、さらに緊急時の対応可能な施設に限定されるとされている。

便潜血反応検査免疫法は侵襲性がなくどこでも実施できるものの、大腸がんに関する感度は56～93%、特異度は94～98%であり、3年以内の大腸がん死亡率減少効果は46～76%と、精度が

十分に高いとまではいえない¹⁾。そのため、近年、より精度を上げるために、便中 DNA・RNA マーカーを用いた大腸がん診断に関する研究がなされている。そこで、今回、このような研究の現状を把握するために、これまでに発表された便中 DNA・RNA マーカーを用いた大腸がん診断に関する英語論文を検索し検討を行ったので、ここに報告する。

II. 方法

Medline を用い、2011年10月末までに発表された便中 DNA・RNA マーカーを用いた大腸がん診断に関する英語論文（抄録のみものは含む。レビュー論文は含まない）を検索した。それぞれの論文から、マーカーの種類、患者数および対象者数、大腸がん診断に対する感度・特異度、著者、発表年、発表雑誌等のデータを抽出した。

1) 広島大学保健管理センター

1) Health Service Center, Hiroshima University

著者連絡先：〒739-8514 広島県東広島市鏡山1-7-1 広島大学保健管理センター

Ⅲ. 結果および考察

該当するものは、遺伝子変異/LOHを用いたものが19研究²⁻²⁰⁾、遺伝子メチレーションを用いたものが17研究²¹⁻³⁷⁾、ロングDNAを用いたものが5研究^{21, 38-41)}、mRNA発現を用いたものが5研究^{30, 42-44)}、miRNA発現を用いたものが3研究⁴⁵⁻⁴⁷⁾、それらを組み合わせたものが10研究^{21, 48-55)}あった。

表1に遺伝子変異/LOHを用いた研究を示す。19研究中15研究(79%)がK-rasをターゲット遺

伝子としていた。うち5研究では、K-rasのほか、APCやp53等と組み合わせて検討したものであった。感度に関しては、13研究(68%)において60%を下回るという結果であり、便潜血反応検査免疫法を上回るとはとていえない結果であった。検討されている遺伝子はいずれも大腸がん発生に関与するものであるが、各遺伝子の変異/LOHの頻度は高くても半数と言われており、少数の遺伝子の変異/LOHの検討では、便潜血反応免疫法をしのぐことは困難なように思われる。

表1. 遺伝子変異/LOHを用いた研究

ターゲット遺伝子	患者数/コントロール数	感度 (%)	特異度 (%)	著者	文献
K-ras	30/15	56.7	93.3	Zhang H	2
APC, K-ras, p53	33/63	36.4	95.2	Onouchi S	3
APC, K-ras, p53, PIC3CA, CTNNB1	25/0	92.0	NA	Diehl F	4
K-ras	29/20	41.4	5.0	Chien CC	5
K-ras	28/0	50.0	NA	Mixich F	6
APC, K-ras, p53, MSI	16/0	68.8	NA	Brand RE	7
MSI	46/0	37.0	NA	Traverso G	8
APC, p53	30/15	96.7	100.0	Koshiji M	9
APC	46 (inc. adenoma)/28	56.5	100.0	Traverso G	10
K-ras	31/5	41.9	100.0	Nishikawa T	11
K-ras, p53, MSI	51/0	70.6	NA	Dong SM	12
K-ras, p53, MSI	46/18	67.4	100.0	Rengucci C	13
K-ras	11/0	54.5	NA	Puig P	14
p53	25/0	28.0	NA	Eguchi S	15
K-ras	25/11	40.0	100.0	Ratto C	16
K-ras	5/46	80.0	95.7	Villa E	17
K-ras	40/0	25.0	NA	Kohata Y	18
K-ras	55 (inc. adenoma)/0	27.3	NA	Hasegawa Y	19
K-ras	24/0	33.3	NA	Sidransky D	20

表2. 遺伝子メチレーションを用いた研究

ターゲット遺伝子	患者数/コントロール数	感度 (%)	特異度 (%)	著者	文献
TFPI2	60/30	68.3	100.0	Zhang J	21
miR-34b/c	28/0	75.0	NA	Kalimutho M	22
RARB2, p16, MGMT, APC	26/20	61.5	100.0	Azuara D	23
ITGA4, SFRP2, p16	30/31	70.0	96.8	Chang E	24
Vimentin	22/38	40.9	94.7	Li M	25
MGMT, hMLH1, vimentin	60/37	75.0	86.5	Baek YH	26
TFPI2	47/30	76.0	93.0	Glockner SC	27
SFRP2	69/30	87.0	93.3	Wang DR	28
SFRP1	36 (inc. 7 adenomas)/17	89.0	86.0	Zhang W	29
APC, ATM, hMLH1, sFRP2, HLTF, MGMT, GSTP1	20/30	75.0	90.0	Leung WK	30
SFRP2, HPP1, MGMT	52/24	93.7	77.1	Huang Z	31
p16	25/20	20.0	100.0	Abbaszadegan MR	32
SFRP2	52/24	94.2	95.8	Huang Z	33
HIC1	26/32	34.6	100.0	Lenhard K	34
Vimentine	94/198	46.0	90.0	Chen WD	35
ATM, APC, hMLH1, HLTF, MGMT	20/20	70.0	100.0	Leung WK	36
SFRP2	13/13	77.0	77.0	Muller HM	37

表2に遺伝子メチレーションを用いた研究を示す。ターゲットとされた遺伝子は、変異/LOHをターゲットとした研究に比べ、多様である。感度は、ターゲット遺伝子により異なっているが、おおむね70～80%である。この中で最も感度・特異度とも高かったと報告されたのはSFRP2³³⁾である。この遺伝子の正式名はSecreted Frizzled-related Protein 2である。SFRPファミリーの一つをコードし、Wntシグナリングの調整を行っていると考えられ、大腸がん発生に関与しているとされている。ただし、この研究の対象患者数は比較的少数(大腸がん52名、コントロール24名)であることから、今後、多くの対象患者での検討が必要である。

ロングDNAは、がん細胞におけるアポトーシス(プログラムされた細胞死)の異常により、生じるものである。通常、アポトーシスが生じるとDNAは断片化されるが、大腸がん患者では便中にロングDNA(200bp以上)が高頻度に検出される。このようなロングDNA検出を用いた研究が5つなされている(表3)。その感度は53～86%、特異度は81～97%であり、単独では便潜

血反応検査免疫法と同等の結果であった。

RNA発現を用いた研究結果を表4に示す。mRNA発現を用いたものが5研究、miRNA発現を用いたものが3研究認められた。COX-2の発現を検討したもの^{42,44)}で感度90%、特異度100%と良好な結果が報告されている。動物実験では、COX-2発現により腫瘍増殖の亢進やCOX-2経路阻害により発がん抑制が見られるなど、COX-2の発がんへの関与が報告されている。COX-2発現が大腸がん検診への応用の可能性があるとともに、COX-2を選択的に阻害する薬剤によるがん治療薬の臨床応用も期待されている。特に、COX-2の高発現が大腸がんやその転移でみられることから、COX-2選択的阻害剤を利用した大腸がんの予防や治療への応用が期待され、その臨床試験も実施されている。

最後に、これら各遺伝子検査を組み合わせたものが10研究報告されていた(表5)。遺伝子メチレーションとロングDNA検出を組み合わせたもの、遺伝子変異とロングDNA検出を組み合わせたもの等が報告されているが、感度・特異度ともに90%を超えたものは1研究⁵⁵⁾しかなかった。

表3. ロングDNAを用いた研究

ターゲット遺伝子	患者数/コントロール数	感度 (%)	特異度 (%)	著者	文献
Alu	60/30	53.3	83.3	Zhang J	21
APC, K-ras, B-raf, p53	31/99	86.0	81.0	Kalimutho M	38
APC	28/96	75.0	91.7	Kalimutho M	39
APC, p53	100/100	79.0	89.0	Calistri D	40
APC, p53, BRCA1, BRCA2	27/77	55.6	97.4	Boynton KA	41

表4. RNA発現を用いた研究

ターゲットRNA	患者数/コントロール数	感度 (%)	特異度 (%)	著者	文献
mRNA expression					
COX-2, MMP-7	62/29	90.0	100.0	Takai T	42
MMP7, MYBL2, PTGS2, p53	66/134	58.3	88.1	Koga Y	43
COX-2	20/30	50.0	93.3	Leung WK	30
COX-2	29/22	90.0	100.0	Kanaoka S	44
CEA	29/22	100.0	5.0	Kanaoka S	44
miRNA expression					
miR-17-92 cluster miR-135	197/119	74.1	79.0	Koga Y	45
miR-144	35/40	74.3	87.2	Kalimutho M	46
miR-92a	88/101	71.6	73.3	Wu CW	47

表5. 複数の方法を組み合わせた研究

ターゲット遺伝子/RNA	患者数/コントロール数	感度 (%)	特異度 (%)	著者	文献
TFPI2 methylation+long DNA detection (1 site)	60/30	86.7	83.3	Zhang J	21
APC, K-ras, p53 mutation+MSI+long DNA detection (4 sites)	157 (inc. adenoma)/1473	20.0	96.0	Ahlquist DA	48
Vimentine methylation+KRAS, APC mutation	142 (inc. adenoma)/0	40.0	NA	Ahlquist DA	48
Vimentin methylation+long DNA detection (2 sites)	82/363	83.0	82.0	Itzkowitz S	49
APC, K-ras, p53 mutation+MSI+long DNA detection (4 sites)	91 (inc. adenoma)/0	53.8	NA	Syngal S	50
APC, K-ras, p53 mutation+MSI+long DNA detection (4 sites)	86/0	69.8	NA	Whitney D	51
APC, K-ras, p53 mutation+MSI+long DNA detection (4 sites)	31/1423	51.6	94.4	Imperiale TF	52
APC, K-ras, p53 mutation+MSI+long DNA detection (7 sites)	53/38	62.3	97.4	Calistri D	53
APC, K-ras, p53 mutation+MSI+long DNA detection (4 sites)	52/212	63.5	96.2	Tagore KS	54
APC, K-ras, p53 mutation+MSI+long DNA detection (7 sites)	22/28	90.9	92.9	Ahlquist DA	55

これらの研究で、患者群の持つ大腸がん組織が実際の程度、DNA・RNA マーカーの異常を有するかの検討はなされたものはない。ただし、感度・特異度を見てみると、いずれの研究も比較的高いことから、大腸がん組織が有するDNA・RNA マーカーの異常は、かなり高頻度に便中DNA・RNA マーカー異常として検出されているものと思われる。

全体を通してみて、感度・特異度がともに90%を超えると報告されたものは5研究^{9, 33, 42, 44, 55)}あった。これらの研究の大きなリミテーションとして、患者群の人数が22～62人、対照群の人数が15～29人であり、症例数が限られていることが挙げられる。

現在、大腸がん検診で用いられている便潜血検査の大腸がんに関する感度は56～93%、特異度は94～98%¹⁾であることから、これらの便中DNA・RNA マーカーは、特に感度が90%以上で、特異度が100%に近いものは、将来的にがんのスクリーニングやサーベイランスに用いる可能性もある。今後、多数症例での検討が必要であり、臨床例で示された検査の精度が、多くの健常者が存在するフィールドでどの程度の効力として示されるかの検討が必要であろう。実際に大腸がん検診に用いるためには、検診システムに組み込んだ場合の有効性の検討も必要であろう。そして、多数例にも応用できる処理能力とコストパフォーマンスに優れていなければならない。試算では、便中DNAを用いた検診は便潜血検査免疫法に比べ、約15倍かかるとの報告⁵⁶⁾もあり、臨床応用化にはコスト軽減は今後の大きな課題の一つと思

われる。このようなエビデンスの積み重ねが、臨床応用化につながっていくものと思われる。実際に、p53抗体が乳がん、食道がんおよび大腸がんの腫瘍マーカーとして臨床応用化されているように、便中DNA・RNA マーカーは、さまざまな課題があるものの、新たな重要な情報を与えてくれる方法になるものであり、今後の研究の進展に期待したい。

IV. 結語

これまでの便中DNA・RNA マーカーを用いた大腸がん診断に関する報告の中には、感度・特異度がともに高いマーカーがあり、将来的にがんのスクリーニングやサーベイランスに用いる可能性がある。これらマーカーを用いて、多数症例での検討、処理能力、コスト軽減、検診システムに組み込んだ場合の有効性等について、今後の検討が必要である。

参考文献

- 1) 平成16年度厚生労働省がん研究助成金「がん検診の適切な方法とその評価法の確立に関する研究」班：有効性評価に基づく大腸がん検診ガイドライン、2005.
- 2) Zhang H, Wang X, Ma Q, Zhou Z, Fang J. Rapid detection of low-abundance K-ras mutation in stools of colorectal cancer patients using chip-based temperature gradient capillary electrophoresis. *Lab Invest* 91: 788-98, 2011.

- 3) Onouchi S, Matsushita H, Moriya Y, Akasu T, Fujita S, Yamamoto S, Hasegawa H, Kitagawa Y, Matsumura Y. New method for colorectal cancer diagnosis based on SSCP analysis of DNA from exfoliated colonocytes in naturally evacuated feces. *Anticancer Res* 28: 145-50, 2008.
- 4) Diehl F, Schmidt K, Durkee KH, Moore KJ, Goodman SN, Shuber AP, Kinzler KW, Vogelstein B. Analysis of mutations in DNA isolated from plasma and stool of colorectal cancer patients. *Gastroenterology* 135: 489-98, 2008.
- 5) Chien CC, Chen SH, Liu CC, Lee CL, Yang RN, Yang SH, Huang CJ. Correlation of K-ras codon 12 mutations in human feces and ages of patients with colorectal cancer (CRC). *Transl Res* 149: 96-102, 2007.
- 6) Mixich F, Ioana M, Voinea F, Săftoiu A, Ciurea T. Noninvasive detection through REMS-PCR technique of K-ras mutations in stool DNA of patients with colorectal cancer. *J Gastrointestin Liver Dis* 16: 5-10, 2007.
- 7) Brand RE, Ross ME, Shuber AP. Reproducibility of a multitarget stool-based DNA assay for colorectal cancer detection. *Am J Gastroenterol* 99: 1338-41, 2004.
- 8) Traverso G, Shuber A, Olsson L, Levin B, Johnson C, Hamilton SR, Boynton K, Kinzler KW, Vogelstein B. Detection of proximal colorectal cancers through analysis of faecal DNA. *Lancet* 359: 403-4, 2002.
- 9) Koshiji M, Yonekura Y, Saito T, Yoshioka K. Microsatellite analysis of fecal DNA for colorectal cancer detection. *J Surg Oncol* 80: 34-40, 2002.
- 10) Traverso G, Shuber A, Levin B, Johnson C, Olsson L, Schoetz DJ Jr, Hamilton SR, Boynton K, Kinzler KW, Vogelstein B. Detection of APC mutations in fecal DNA from patients with colorectal tumors. *N Engl J Med* 346: 311-20, 2002.
- 11) Nishikawa T, Maemura K, Hirata I, Matsuse R, Morikawa H, Toshina K, Murano M, Hashimoto K, Nakagawa Y, Saitoh O, Uchida K, Katsu K. A simple method of detecting K-ras point mutations in stool samples for colorectal cancer screening using one-step polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism analysis. *Clin Chim Acta* 318: 107-12, 2002.
- 12) Dong SM, Traverso G, Johnson C, Geng L, Favis R, Boynton K, Hibi K, Goodman SN, D'Allesio M, Paty P, Hamilton SR, Sidransky D, Barany F, Levin B, Shuber A, Kinzler KW, Vogelstein B, Jen J. Detecting colorectal cancer in stool with the use of multiple genetic targets. *J Natl Cancer Inst* 93: 858-65, 2001.
- 13) Rengucci C, Maiolo P, Saragoni L, Zoli W, Amadori D, Calistri D. Multiple detection of genetic alterations in tumors and stool. *Clin Cancer Res* 7: 590-3, 2001.
- 14) Puig P, Urgell E, Capellá G, Sancho FJ, Pujol J, Boadas J, Farré A, Lluís F, González-Sastre F, Mora J. A highly sensitive method for K-ras mutation detection is useful in diagnosis of gastrointestinal cancer. *Int J Cancer* 85: 73-7, 2000.
- 15) Eguchi S, Kohara N, Komuta K, Kanematsu T. Mutations of the p53 gene in the stool of patients with resectable colorectal cancer. *Cancer* 77 (Suppl): 1707-10, 1996.
- 16) Ratto C, Flamini G, Sofò L, Nucera P, Ippoliti M, Curigliano G, Ferretti G, Sgambato A, Merico M, Doglietto GB, Cittadini A, Crucitti F. Detection of oncogene mutation from neoplastic colonic cells exfoliated in feces. *Dis Colon Rectum* 39: 1238-44, 1996.
- 17) Villa E, Dugani A, Rebecchi AM, Vignoli A, Grottola A, Buttafoco P, Losi L, Perini M, Trande P, Merighi A, Lerosé R, Manenti F.

- Identification of subjects at risk for colorectal carcinoma through a test based on K-ras determination in the stool. *Gastroenterology* 110: 1346-53, 1996.
- 18) Kohata Y. Detection of K-ras point mutations in the stool of patients with colorectal tumors. *Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi* 93: 391-7, 1996.
- 19) Hasegawa Y, Takeda S, Ichii S, Koizumi K, Maruyama M, Fujii A, Ohta H, Nakajima T, Okuda M, Baba S, et al. Detection of K-ras mutations in DNAs isolated from feces of patients with colorectal tumors by mutant-allele-specific amplification (MASA). *Oncogene* 10: 1441-5, 1995.
- 20) 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* 256: 102-5, 1992.
- 21) Zhang J, Yang S, Xie Y, Chen X, Zhao Y, He D, Li J. Detection of methylated tissue factor pathway inhibitor 2 and human long DNA in fecal samples of patients with colorectal cancer in China. *Cancer Epidemiol* 36: 73-7, 2012.
- 22) Kalimutho M, Di Cecilia S, Del Vecchio Blanco G, Roviello F, Sileri P, Cretella M, Formosa A, Corso G, Marrelli D, Pallone F, Federici G, Bernardini S. Epigenetically silenced miR-34b/c as a novel faecal-based screening marker for colorectal cancer. *Br J Cancer* 104: 1770-8, 2011.
- 23) Azuara D, Rodriguez-Moranta F, de Oca J, Soriano-Izquierdo A, Mora J, Guardiola J, Biondo S, Blanco I, Peinado MA, Moreno V, Esteller M, Capellá G. Novel methylation panel for the early detection of colorectal tumors in stool DNA. *Clin Colorectal Cancer* 9: 168-76, 2010.
- 24) Chang E, Park DI, Kim YJ, Kim BK, Park JH, Kim HJ, Cho YK, Sohn CI, Jeon WK, Kim BI, Kim HD, Kim DH, Kim YH. Detection of colorectal neoplasm using promoter methylation of ITGA4, SFRP2, and p16 in stool samples: a preliminary report in Korean patients. *Hepatogastroenterology* 57: 720-7, 2010.
- 25) Li M, Chen WD, Papadopoulos N, Goodman SN, Bjerregaard NC, Laurberg S, Levin B, Juhl H, Arber N, Moinova H, Durkee K, Schmidt K, He Y, Diehl F, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA Jr, Kinzler KW, Markowitz SD, Vogelstein B. Sensitive digital quantification of DNA methylation in clinical samples. *Nat Biotechnol* 27: 858-63, 2009.
- 26) Baek YH, Chang E, Kim YJ, Kim BK, Sohn JH, Park DI. Stool methylation-specific polymerase chain reaction assay for the detection of colorectal neoplasia in Korean patients. *Dis Colon Rectum* 52: 1452-63, 2009.
- 27) Glöckner SC, Dhir M, Yi JM, McGarvey KE, Van Neste L, Louwagie J, Chan TA, Kleeberger W, de Bruïne AP, Smits KM, Khalid-de Bakker CA, Jonkers DM, Stockbrügger RW, Meijer GA, Oort FA, Iacobuzio-Donahue C, Bierau K, Herman JG, Baylin SB, Van Engeland M, Schuebel KE, Ahuja N. Methylation of TFPI2 in stool DNA: a potential novel biomarker for the detection of colorectal cancer. *Cancer Res* 69: 4691-9, 2009.
- 28) Wang DR, Tang D. Hypermethylated SFRP2 gene in fecal DNA is a high potential biomarker for colorectal cancer noninvasive screening. *World J Gastroenterol* 14: 524-31, 2008.
- 29) Zhang W, Bauer M, Croner RS, Pelz JO, Lodygin D, Hermeking H, Stürzl M, Hohenberger W, Matzel KE. DNA stool test for colorectal cancer: hypermethylation of the secreted frizzled-related protein-1 gene. *Dis*

- Colon Rectum 50: 1618-27, 2007.
- 30) Leung WK, To KF, Man EP, Chan MW, Hui AJ, Ng SS, Lau JY, Sung JJ. Detection of hypermethylated DNA or cyclooxygenase-2 messenger RNA in fecal samples of patients with colorectal cancer or polyps. *Am J Gastroenterol* 102: 1070-6, 2007.
- 31) Huang ZH, Li LH, Yang F, Wang JF. Detection of aberrant methylation in fecal DNA as a molecular screening tool for colorectal cancer and precancerous lesions. *World J Gastroenterol* 13: 950-4, 2007.
- 32) Abbaszadegan MR, Tavasoli A, Velayati A, Sima HR, Vosooghnia H, Farzadnia M, Asadzadeh H, Gholamin M, Dadkhah E, Aarabi A. Stool-based DNA testing, a new noninvasive method for colorectal cancer screening, the first report from Iran. *World J Gastroenterol* 13: 1528-33, 2007.
- 33) Huang Z, Li L, Wang J. Hypermethylation of SFRP2 as a potential marker for stool-based detection of colorectal cancer and precancerous lesions. *Dig Dis Sci* 52: 2287-91, 2007.
- 34) Lenhard K, Bommer GT, Asutay S, Schauer R, Brabletz T, Göke B, Lamerz R, Kolligs FT. Analysis of promoter methylation in stool: a novel method for the detection of colorectal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol* 3: 142-9, 2005.
- 35) Chen WD, Han ZJ, Skoletsky J, Olson J, Sah J, Myeroff L, Platzer P, Lu S, Dawson D, Willis J, Pretlow TP, Lutterbaugh J, Kasturi L, Willson JK, Rao JS, Shuber A, Markowitz SD. Detection in fecal DNA of colon cancer-specific methylation of the nonexpressed vimentin gene. *J Natl Cancer Inst* 97: 1124-32, 2005.
- 36) Leung WK, To KF, Man EP, Chan MW, Bai AH, Hui AJ, Chan FK, Lee JF, Sung JJ. Detection of epigenetic changes in fecal DNA as a molecular screening test for colorectal cancer: a feasibility study. *Clin Chem* 50: 2179-82, 2004.
- 37) 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* 363: 1283-5, 2004.
- 38) Kalimutho M, Del Vecchio Blanco G, Cretella M, Mannisi E, Sileri P, Formosa A, Pallone F, Federici G, Bernardini S. A simplified, non-invasive fecal-based DNA integrity assay and iFOBT for colorectal cancer detection. *Int J Colorectal Dis* 26: 583-92, 2011.
- 39) Kalimutho M, Blanco Gdel V, Gravina P, Cretella M, Mannucci L, Mannisi E, Formosa A, Pallone F, Federici G, Bernardini S. Quantitative denaturing high performance liquid chromatography (Q-dHPLC) detection of APC long DNA in faeces from patients with colorectal cancer. *Clin Chem Lab Med* 48: 1303-11, 2010.
- 40) Calistri D, Rengucci C, Molinari C, Ricci E, Cavargini E, Scarpi E, Milandri GL, Fabbri C, Ravaoli A, Russo A, Amadori D, Silvestrini R. Quantitative fluorescence determination of long-fragment DNA in stool as a marker for the early detection of colorectal cancer. *Cell Oncol* 31: 11-7, 2009.
- 41) Boynton KA, Summerhayes IC, Ahlquist DA, Shuber AP. DNA integrity as a potential marker for stool-based detection of colorectal cancer. *Clin Chem* 49: 1058-65, 2003.
- 42) Takai T, Kanaoka S, Yoshida K, Hamaya Y, Ikuma M, Miura N, Sugimura H, Kajimura M, Hishida A. Fecal cyclooxygenase 2 plus matrix metalloproteinase 7 mRNA assays as a marker for colorectal cancer screening. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18: 1888-93, 2009.

- 43) Koga Y, Yasunaga M, Moriya Y, Akasu T, Fujita S, Yamamoto S, Kozu T, Baba H, Matsumura Y. Detection of colorectal cancer cells from feces using quantitative real-time RT-PCR for colorectal cancer diagnosis. *Cancer Sci* 99: 1977-83, 2008.
- 44) Kanaoka S, Yoshida K, Miura N, Sugimura H, Kajimura M. Potential usefulness of detecting cyclooxygenase 2 messenger RNA in feces for colorectal cancer screening. *Gastroenterology* 127: 422-7, 2004.
- 45) Koga Y, Yasunaga M, Takahashi A, Kuroda J, Moriya Y, Akasu T, Fujita S, Yamamoto S, Baba H, Matsumura Y. MicroRNA expression profiling of exfoliated colonocytes isolated from feces for colorectal cancer screening. *Cancer Prev Res* 3: 1435-42, 2010.
- 46) Kalimutho M, Del Vecchio Blanco G, Di Cecilia S, Sileri P, Cretella M, Pallone F, Federici G, Bernardini S. Differential expression of miR-144* as a novel fecal-based diagnostic marker for colorectal cancer. *J Gastroenterol* 46: 1391-402, 2011.
- 47) Wu CW, Ng SS, Dong YJ, Ng SC, Leung WW, Lee CW, Wong YN, Chan FK, Yu J, Sung JJ. Detection of miR-92a and miR-21 in stool samples as potential screening biomarkers for colorectal cancer and polyps. *Gut* 61: 739-45, 2012.
- 48) Ahlquist DA, Sargent DJ, Loprinzi CL, Levin TR, Rex DK, Ahnen DJ, Knigge K, Lance MP, Burgart LJ, Hamilton SR, Allison JE, Lawson MJ, Devens ME, Harrington JJ, Hillman SL. Stool DNA and occult blood testing for screen detection of colorectal neoplasia. *Ann Intern Med* 149: 441-50, 2008.
- 49) 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. *Am J Gastroenterol* 103: 2862-70, 2008.
- 50) Syngal S, Stoffel E, Chung D, Willett C, Schoetz D, Schroy P, Jagadeesh D, Morel K, Ross M. Detection of stool DNA mutations before and after treatment of colorectal neoplasia. *Cancer* 106: 277-83, 2006.
- 51) Whitney D, Skoletsky J, Moore K, Boynton K, Kann L, Brand R, Syngal S, Lawson M, Shuber A. Enhanced retrieval of DNA from human fecal samples results in improved performance of colorectal cancer screening test. *J Mol Diagn* 6: 386-95, 2004.
- 52) Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, Turnbull BA, Ross ME; Colorectal Cancer Study Group. Fecal DNA versus fecal occult blood for colorectal-cancer screening in an average-risk population. *N Engl J Med* 351: 2704-14, 2004.
- 53) Calistri D, Rengucci C, Bocchini R, Saragoni L, Zoli W, Amadori D. Fecal multiple molecular tests to detect colorectal cancer in stool. *Clin Gastroenterol Hepatol* 1: 377-83, 2003.
- 54) Tagore KS, Lawson MJ, Yucaitis JA, Gage R, Orr T, Shuber AP, Ross ME. Sensitivity and specificity of a stool DNA multitarget assay panel for the detection of advanced colorectal neoplasia. *Clin Colorectal Cancer* 3: 47-53, 2003.
- 55) 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* 119: 1219-27, 2000.
- 56) Kisiel JB, Ahlquist DA. Stool DNA screening for colorectal cancer: opportunities to improve value with next generation tests. *J Clin Gastroenterol* 45: 301-8, 2011.