

DNA メチル化を利用した早期膵癌診断マーカーの開発

業務分担責任者 山下 聡

国立がん研究センター研究所・エピゲノム解析分野・ユニット長

研究要旨

膵管内乳頭粘液性腫瘍（IPMN）患者の中でも、がん化リスクがより高い、高リスクな患者を早期に特定できれば、臨床上非常に有用である。DNA メチル化異常は、ヒト発がんに関与することがよく知られるが、IPMN における DNA メチル化異常についての研究例は限られている。本研究では、膵癌、IPMN、膵臓非腫瘍部の網羅的 DNA メチル化解析を行い、膵癌リスクに関連してメチル化状態が変化する領域を特定し、その後のリスクマーカー開発に応用することを目的とした。本年度は合計 31 サンプルについて、網羅的 DNA メチル化解析を行い、10 個のリスクマーカー候補領域を同定した。

A．研究目的

膵管内乳頭粘液性腫瘍（Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm, IPMN）は膵管内に乳頭状に増殖する膵腫瘍である。いわゆる「通常の膵がん」とは異なり、良性から悪性まで様々な段階があって、経過中に悪性化することがあることも知られる。よって、IPMN 患者の中でも、がん化リスクがより高い、高リスクな患者を早期に特定できれば、臨床上非常に有用である。

DNA メチル化異常は、ヒト発がんに関与することがよく知られ、各種臨床マーカーへの応用展開も始まっているが、IPMN における DNA メチル化異常についての研究例は限られている。

そこで本研究では、膵癌、IPMN、膵臓非腫瘍部の網羅的 DNA メチル化解析を行い、膵癌リスクに関連してメチル化状態が変化する領域を特定し、その後のリスクマーカー開発に応用することを目的とした。このメチル化変化に同調して発現が変化する miRNA を特定し、血中の存在量を測定する（村上分担者による）ことで、血液を用いたリスク診断の可能性が開ける。また、血漿中の cell free DNA は非常に量が少なく、DNA メチル化解析は困難であるが、仮に安定した解析が可能になれば、DNA メチル化測定によるリスク診断の可能性もある。

本年度は、そのアプローチの途中段階として、少数サンプルについて膵癌、IPMN、膵臓非腫瘍部の網羅的 DNA メチル化解析を行い、リスクマーカー候補の同定を試みた。

B．研究方法

(1) ヒトゲノム DNA サンプル

ヒト膵癌関連臨床材料（大阪市立大学病院の膵癌患者の手術後凍結標本に由来する膵癌、IPMN、膵臓非腫瘍部）およびヒト膵臓上皮細胞株（HPDE4）のゲノム DNA は、萩原主任研究者から供与を受けた。ヒト膵臓がん細胞株は、ATCC から購入または JCRB から分与を受け、フェノール・クロロホルム法によりゲノム DNA を抽出した。

(2) ゲノム網羅的 DNA メチル化解析

ヒトゲノム DNA の網羅的メチル化解析には、Infinium HumanMethylation450 beadchip (Illumina) を用いた。重亜硫酸処理したゲノム DNA を増幅し、482,421 CpG 部位および 3,091 non-CpG 部位が解析可能な BeadChip にハイブリダイズして、プライマー伸長反応後、iSCAN (Illumina) スキャナを用いてデータを取得した。完全メチル化を 1、完全非メチル化を 0 とする値を用いてメチル化の程度を判定した。

(3) DNA メチル化を用いた腫瘍組織中のがん細胞含有率の測定

膵臓非がん部での値が 0.2 以下（正常で非メチル化）のプローブを抽出した。これらのプローブに限定して腫瘍組織の値のヒストグラムを描画することにより、がん細胞特異的にメチル化されている CpG の値を取得、腫瘍組織中のがん細胞含有率とした。

（倫理面への配慮）

臨床材料は同意を得て採取した材料を、文部科学

省・厚生労働省「疫学研究に関する倫理指針」に従い使用した。

C. 研究結果

DNA メチル化異常が膵癌リスクに関連しているゲノム領域の同定

膵癌 (N = 5)、IPMN (がんを伴う高リスク IPMN N = 1, がんを伴わない低リスク IPMN N = 4)、膵臓非腫瘍部 (膵炎を伴うもの N = 6, 膵炎を伴わないもの N = 8)、ヒト膵癌細胞株 (N = 6)、ヒト膵臓上皮細胞株 (N = 1) について、HumanMethylation450 を用いてゲノム網羅的 DNA メチル化解析を行った (合計 31 サンプル)。別の研究で解析した末梢血 (N = 3) の結果を併せて DNA メチル化プロファイルの階層的クラスター解析を行った。

ゲノム全体の CpG を用いた解析、転写開始点近傍の CGI (TSS200 CGI) の解析の双方において、膵癌のサンプルは全て非腫瘍部の一部と同一のクラスターに分類され、膵癌細胞株とは大きく異なるメチル化プロファイルを示した。そこで、膵癌のサンプルにおけるがん細胞の含有率を測定したところ、5 個中 1 個は 40% 程度であったが、残りの 4 個は 20% 以下であり、がん細胞特異的 DNA メチル化解析には用いることができないことがわかった。非腫瘍部については、胃や肝臓で認められるような慢性炎症に伴う高度なメチル化異常が膵臓では認められなかった。

膵癌およびがんを伴う高リスク IPMN それぞれ 1 個を用いて、リスクに伴い異常 DNA メチル化を示すゲノム領域の同定を試みた。膵臓非腫瘍部、血液で非メチル化 (値 < 0.2) を示す CpG 148,587 個にまず限定し、膵癌細胞株の半数以上でメチル化 (値 > 0.8) を示す CpG 6,106 個に絞った。これら膵癌細胞特異的に異常 DNA メチル化を示す CpG の中で、リスクに対応して異常 DNA メチル化を示す CpG、即ち、低リスク IPMN で非メチル化 (値 < 0.2) かつ、膵癌およびがんを伴う高リスク IPMN の少なくとも 1 個で DNA メチル化異常 (値 > 0.2) を示す CpG を検索し、529 個を抽出した。該当するプローブがゲノム中で 3 個以上連なっている領域を特定した結果、10 領域が同定された。そのうち 5 領域は、遺伝子転写開始点近傍のプロモーター CpG island (TSS200 CGI) に存在していた。

D. 考察

本研究で同定された 10 領域は、膵癌のリスクマーカー候補領域であるが、膵癌およびがんを伴う高リ

スク IPMN はそれぞれ 1 個であるため、偶然選ばれた可能性が非常に高い。また、今回同定された領域には直接的に特定の miRNA の発現に関係すると考えられる領域 (miRNA のプロモーター領域) は含まれていなかった。サンプル数を増加させることによって、より確からしい、他の候補領域が同定可能と考えられるので、今後、サンプル数を増加させて検討を進める。また、最新のゲノム annotation と照合することで、miRNA の発現に関係すると考えられる異常メチル化領域の同定も可能と考えられる。

血漿中 cell free DNA の安定的な DNA メチル化解析についても検討を進める。最近、良好な回収実績が報告されている血漿中 cell free DNA の抽出法を試みると共に、DNA 抽出と同一のチューブ内で重亜硫酸処理を行う One-step MSP 法 (Yamamoto et al. Breast Cancer Res Treat, 2012) を試みる予定である。

E. 結論

膵癌、IPMN、膵臓非腫瘍部等の合計 31 サンプルについて、網羅的 DNA メチル化解析を行い、10 個のリスクマーカー候補領域を同定した。今後サンプル数を増加させて同様の解析を行う。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

論文発表

本研究費に謝辞があるもの

該当無し

本研究費に密接に関係するもの

1. Takahashi T, Yamashita S, Matsuda Y, Kishino T, Nakajima T, Kushima R, Kato K, Igaki H, Tachimori Y, Osugi H, Nagino M and Ushijima T. ZNF695 methylation predicts a response of esophageal squamous cell carcinoma to definitive chemoradiotherapy. J Cancer Res Clin Oncol, 141:453-463 (2015).
2. Yamaguchi T, Mukai H, Yamashita S, Fujii S and Ushijima T. Comprehensive DNA methylation and extensive mutation analyses of HER2-positive breast cancer. Oncology, online.
3. Zong L, Hattori N, Yoda Y, Yamashita S, Takeshima H, Takahashi T, Maeda M, Katai H, Nanjo S, Ando T, Seto

Y, and Ushijima T. Establishment of a DNA Methylation Marker to Evaluate Cancer Cell Fraction in Gastric Cancer. Gastric Cancer, in press.

学会発表

1. Yamashita S, Nanjo S, Rehnberg E, Ando T, Maekita T, Ichinose M, Sugiyama T, Ushijima T CpG islands and genomic regions with basal low-level methylation to aberrant DNA methylation induction 第8回日本エピジェネティクス研究会年会 2014年5月26日 東京
2. 山下 聡, 岸野 貴賢, 永野 玲子, 牛島俊和 遺伝子点突然変異のターゲットシーケンシングによる高感度解析法の開発と Genetic な発がんの素地の解析 第29回発癌病理研究会 2014年9

月3日 いわき

3. Yamashita S, Kishino T, Nagano R, Ushijima T High-Sensitivity Analysis of Aberrant DNA Methylation by Targeted Deep Sequencing using a Benchtop Sequencer 第73回日本癌学会学術総会 2014年9月25日 横浜

H.知的財産権の出願、登録状況

- 1.特許取得
なし
- 2.実用新案登録
なし
- 3.その他
なし