

令和 4 年 8 月 31 日現在

機関番号：32610

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22821

研究課題名(和文) 膵癌のクローン進展におけるDNAメチル化の不均一性と可塑性

研究課題名(英文) Heterogeneity and Plasticity of DNA Methylation during Clonal Evolution in Pancreatic Cancer

研究代表者

林 玲匡 (Hayashi, Akimasa)

杏林大学・医学部・講師

研究者番号：40735396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：杏林大学病理学教室に保管されている膵癌症例のFFPE検体を用いてマルチサンプリングによる(1症例で複数のサンプルを使用して)網羅的なDNAメチル解析を行った。網羅的解析に適したDNAを取得するために、抽出プロトコルの最適化を行う必要があったが、高品質なDNAメチル化データを得ることに成功した。メモリアル・スロンケタリングがんセンターで得られたデータも含め、膵癌におけるDNAメチル化の不均一性、クローン進展におけるDNAメチル化の可塑性、腫瘍内メチル化変動遺伝子の意義などについて現在解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、膵癌の腫瘍内DNAメチル化不均一性が明らかになりつつある。膵癌は、その発生過程において、主要ながん抑制遺伝子にDNAメチル化が起こることが知られている。今回得られたDNAメチル化データの解析を進め、クローン進展過程におけるDNAメチル化の可塑性や腫瘍内メチル化変動遺伝子の生物学的意義を探索することは、分子遺伝学的な新たな腫瘍進展メカニズムの解明につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We performed genome-wide DNA methylation analysis using multisampling methods with FFPE samples at the department of pathology, Kyorin University, School of Medicine. We optimized our DNA extraction protocol and successfully gained high-quality genome-wide DNA methylation data. We are currently integrating our data with data from Memorial Sloan-Kettering Cancer Center to search for intratumoral heterogeneity in DNA methylation, its plasticity during clonal evolution, and functional annotations of these intratumoral differentially methylated genes.

研究分野：病理学

キーワード：膵癌 DNAメチル化 腫瘍内不均一性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、次世代シーケンサーに代表される解析技術の進歩によりがんの分子遺伝学的知見の蓄積が進み、発癌機序の解明や新たな治療標的の同定に飛躍的進歩を見た。同時に分子診断の有用性から分子生物学的に癌を分類しようという試みも数多く見られ、膵癌においても、分子情報に基づく新たな分類体系が複数提唱されている。ただ、これらの層別化が主として腫瘍(症例)ごとに1サンプルの解析からなされ、腫瘍間(症例間)の共通性と不均一性を明らかにしてきた一方で、個々の腫瘍内(症例内)の不均一性については不明な部分が多かった。近年の複数領域の網羅的解析、シングルセルの解析結果からは、癌がクローン進展を背景に徐々に不均一な集団となっていく様子が明らかになりつつある。最近林らは膵癌の組織形態像、遺伝子発現プロファイルの不均一性を示すとともに、クローン進展における可塑性を明らかにした(Hayashi et al, Nat Cancer, 2020)。この研究で未解明であった点の一つが、エピゲノムの状態がどの程度腫瘍内で不均一に存在し、それがクローン進展を背景にどのように変化し得るか、というものである。

2. 研究の目的

本研究では、空間的に不均一なサンプルを用いてゲノム・エピゲノムの網羅的解析を行うことで、DNAメチル化を主とするエピゲノムプロファイルの不均一性を明らかにし、その組織形態像の変化との関連を探究する。本研究は、米国メモリアル・スロンケタリングがんセンターとの共同研究によって行われる。

3. 研究の方法

杏林大学での解析

杏林大学での解析は外科手術材料のホルマリン固定パラフィン包埋組織検体(FFPE検体)を用いる。外科手術材料を用いる理由は、切り出し図などにより緻密で正確な空間位置の把握が行うことができ、また後述のメモリアル・スロンケタリングがんセンターでの研究解剖症例を用いて解析に比して組織形態像が保たれており、その対比が容易であることが挙げられる。解析対象は、膵癌の手術検体に対してホルマリン注入固定を併用するようになり、核酸の保存が良好であると考えられる2019年9月1日以降の外科手術症例とする。病理診断学的に組織像が多彩である症例を選定し、各症例6-8部位よりDNAを抽出してその質をチェックする。網羅的解析が可能なDNA40サンプルより、Infinium MethylationEPIC BeadChip kit(Illumina社)を用いた網羅的DNAメチル化解析を行う。

メモリアル・スロンケタリングがんセンターでの解析

メモリアル・スロンケタリングがんセンターでの解析は、膵癌研究解剖によって得られた凍結組織検体を用いる。研究解剖は、終末期の担癌患者の生前同意により行われる。原発巣、転移巣を含め1症例あたり30~150個の腫瘍サンプルが採取され、研究目的に凍結保存されている。本研究では原発・転移を含む8症例50サンプルを用いて、網羅的な体細胞変異解析(全エキソン解析、全ゲノム解析)を行うとともに網羅的DNAメチル化解析(EPIC-seq)を行う。同定された体細胞変異より症例ごとにtreeomicsモデル(JG Reiter et al, Nat Commun, 2017)を用いた癌の進化系統樹を作成する。また、網羅的DNAメチル化解析の結果から腫瘍横断的にクラスタリング解析を行い、DNAメチル化プロファイルの腫瘍内不均一性と偏在性を捉える。本解析にあたり、原データのやり取りは行わない。

4. 研究成果

1. 杏林大学での結果

1) 解析対象症例の選定

2019年9月1日以降、2021年4月1日までの症例を系統的にレビューし、すべてのスライドを再検鏡した。そして浸潤径が20mmをこえる(本件研究では1つの症例内から複数領域の検体を採取するため)間質の線維化が軽度であり腫瘍含有率の高い病理組織学的に多彩な像を示すの3点を満たす症例8例を選別した。各症例において組織像が異なる6-8領域を選定した。

2) DNA 抽出条件の最適化

上記 8 症例のうち、4 症例からマクロダイセクション法を用いて 30 領域 (サンプル) から DNA 抽出した。教室既存のプロトコルで DNA 抽出を行い quality check を行ったところ、図 1 左のごとく断片化した DNA の多く混在した低濃度 (低収容量) の DNA となった。そのため、抽出条件を見直し、脱パラフィンを行うタイミングやマクロダイセクションの方法などを適宜改定し、DNA の抽出方法全体を本研究用に最適化した。その結果、図 1 右のごとく非断片化 DNA を含む高濃度 (高収容量) の DNA を得ることに成功した。

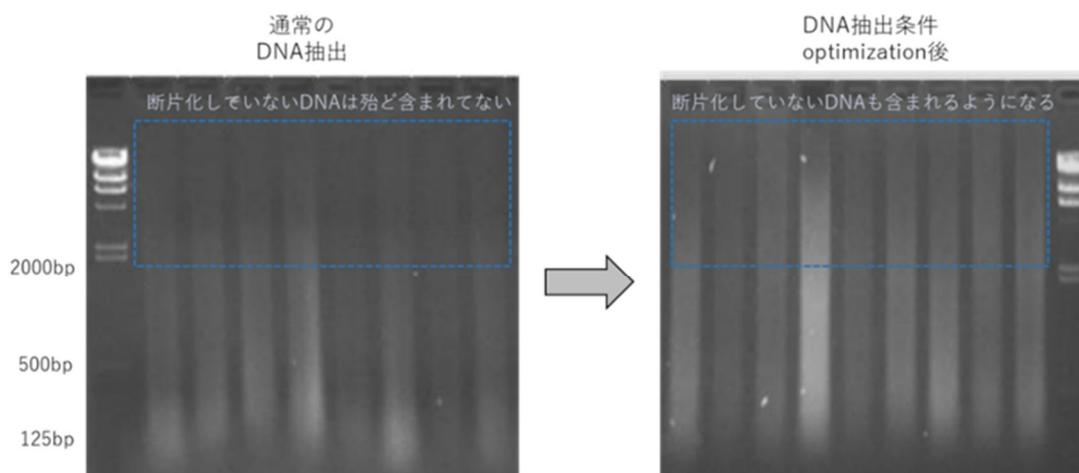


図1 FFPE検体からのDNA抽出条件のoptimization (同一症例8サンプルから)

3) 網羅的 DNA メチル化解析

最適化後の抽出条件で得られた DNA 8 サンプル (1 症例) から、Infinium MethylationEPIC BeadChip kit を用いて網羅的 DNA メチル化解析を行った。その結果、各サンプルとも概ね安定したシグナル値を示しており、M value を用いた主成分分析より図 2 のごとく腫瘍内のメチル化プロファイルの不均一性が見られた。残り 7 症例についても、Infinium MethylationEPIC BeadChip kit を用いて高品質なデータの取得に成功しており、現在は 8 症例から得られたデータをまとめ、統合的な解析を行うとともに、メチル化変動遺伝子に注目した解析も行っている。

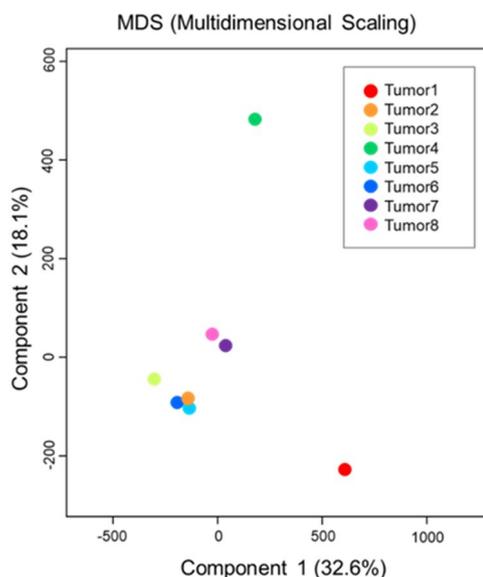


図 2 腫瘍内でのメチル化プロファイルの不均一性 (同一症例8サンプルの結果)

2. メモリアル・スロンケタリングがんセンターでの結果

1) 癌の進化系統樹の作成

終末期膀胱癌患者から採取された凍結組織検体 8 症例 50 サンプルを用いて網羅的な体細胞変異解析 (全エクソン解析、全ゲノム解析) を行った。網羅的体細胞変異解析の結果から、treeomics

(JG Reiter et al., Nature Commun, 2017) を用いて進化系統樹 (図 3) を作成し、ドライバー遺伝子を同定した。また、進化系統樹から同定された体細胞遺伝子変異をクローナルな変異とサブクローナルな変異に分類した。

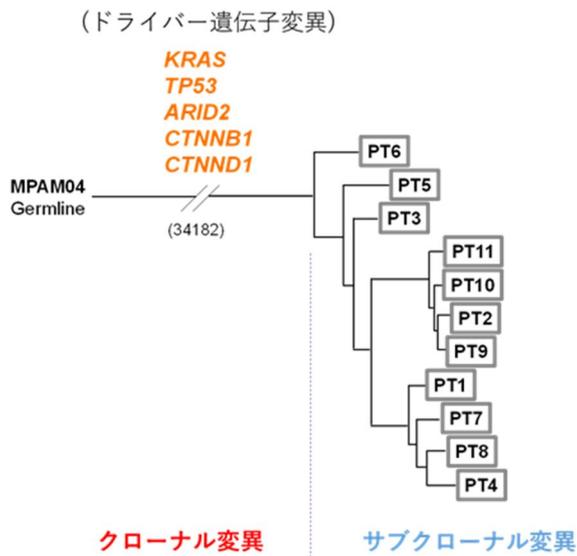


図 3 終末期膵癌における進化系統樹とドライバー遺伝子の同定

2) 網羅的 DNA メチル化解析

8 症例 50 サンプルを用いて網羅的 DNA メチル化解析 (EPIC-seq) を行った。腫瘍横断的にメチル化変動領域上位 5000 領域を用いてクラスタリング解析を行った。その結果、図 4 のように原発、転移や空間的位置に関わらず、同一腫瘍内では比較的類似したメチル化プロファイルを示す結果となった。但し、変動プロモーター領域上位 5000 箇所などでクラスタリングをすると不均一性が見られるようになっており、今後はクラスタリングに用いる領域の検討含めて検討を行う予定である。

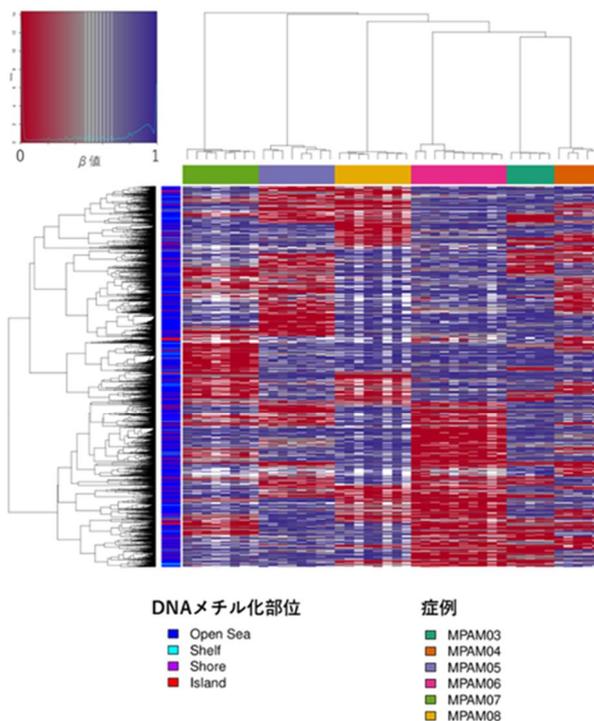


図 4 終末期膵癌における DNA メチル化プロファイルの不均一性と遍在性

5. 本研究の意義付けと今後の展望

本研究はまだ解析途中中であるが、高品質な網羅的 DNA メチル化データの取得に成功しており、

今後高次解析を行うことで膀胱癌における DNA メチル化の不均一性を解明することができると思われる。現時点では、解析対象とする部位の選定によって、不均一性の程度が変化することも示唆されており、解析対象部位をどのように選定するかも重要であると考えられる。また、クローン進展における DNA メチル化の可塑性、腫瘍内メチル化変動遺伝子の意義などについても今後検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Lenkiewicz Elizabeth, Malasi Smriti, Hogenson Tara L., Flores Luis F., Barham Whitney, Phillips William J., Roesler Alexander S., Chambers Kendall R., Rajbhandari Nirakar, Hayashi Akimasa, ..., Fernandez-Zapico Martin E., Barrett Michael T.	4. 巻 80
2. 論文標題 Genomic and Epigenomic Landscaping Defines New Therapeutic Targets for Adenosquamous Carcinoma of the Pancreas	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 4324 ~ 4334
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-20-0078	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hayashi Akimasa, Hong Jungeui, Iacobuzio-Donahue Christine A.	4. 巻 18
2. 論文標題 The pancreatic cancer genome revisited	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology	6. 最初と最後の頁 469 ~ 481
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41575-021-00463-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 林玲匡
2. 発表標題 膵癌の発生・進展過程におけるエピゲノム異常
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林玲匡, Christine A. Iacobuzio-Donahue
2. 発表標題 膵癌の非翻訳領域のクローン進展動態
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林玲匡、Christine A. Iacobuzio-Donahue
2. 発表標題 膵管癌におけるDNAメチル化の腫瘍内不均一性と遍在性
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------