

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07222

研究課題名（和文）膵癌リキッドバイオプシに向けたDNAメチル化マーカーの創出

研究課題名（英文）Construction of DNA Methylation Markers for liquid biopsy of Pancreatic Cancer.

研究代表者

横山 勢也（Yokoyama, Seiya）

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：20569941

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：従来のメチル化特異的電気泳動法のボトルネックを解消するため、NGSを用いたバイサルファイトアンプリコンシーケンス（BSAS）パネルを開発。これにより、FFPE、LBC、凍結検体でのDNAメチル化解析が可能となり、膵臓癌の悪性度予測に有効であることが示された。さらに、MUC1プロモーター領域のメチル化解析は、膵胆道癌の予後指標として有用であることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来のメチル化特異的電気泳動法のボトルネックを解消するため、NGSを用いたバイサルファイトアンプリコンシーケンス（BSAS）パネルを開発しました。これにより、FFPE、LBC、凍結検体でのDNAメチル化解析が可能となり、膵臓癌の悪性度予測に有効であることが示されました。MUC1プロモーター領域のメチル化解析が、膵胆道癌の予後指標として有用であることも確認されました。この研究は、膵臓癌の早期診断と治療戦略に革新をもたらし、社会的意義として、患者の生存率向上と治療コストの削減に貢献する可能性があります。

研究成果の概要（英文）：To overcome the bottlenecks of traditional methylation-specific electrophoresis, we developed a bisulfite amplicon sequencing (BSAS) panel using NGS. This panel enabled DNA methylation analysis in FFPE, LBC, and frozen samples, proving effective for predicting pancreatic cancer malignancy. Additionally, methylation analysis of the MUC1 promoter region was confirmed to be a useful prognostic indicator for pancreaticobiliary cancers.

研究分野：分子生物学

キーワード：膵臓癌 胆管癌 DNAメチル化 バイオマーカー 予後予測 機械学習

## 1. 研究当初の背景

本邦における癌死は年間 37 万人を超えており、死因の第 1 位である。また、がんの罹患数も年々増加しており、癌による死亡を減少させることは医療における喫緊の課題である。膵癌罹患数は 39,800 人であり、全癌における割合は約 4% と第 7 位の希少性の高い癌である。5 年相対生存率も膵癌は 7.7% と極めて低く、難治性癌の代表といえる。しかも、死亡率が減少する徴候は認められず、膵癌の予後を改善させるための具体策を見出せずにいる。近年、膵臓癌を含む種々の癌において、糖タンパク質であるムチン分子ファミリーの異常発現が確認され、増殖・浸潤転移・抗癌剤耐性・免疫機構回避など癌進展の各プロセスにおいて、癌の悪性化に関与することが報告されている。当研究室では、早くからムチンに注目して研究を進め、膵腫瘍の生物学的悪性度と一連のムチン抗原発現について詳細な分析を行い、ムチン発現と悪性度との関連、プロモーターのメチル化によるこれらムチンの発現制御を世界に先駆けて報告してきた。

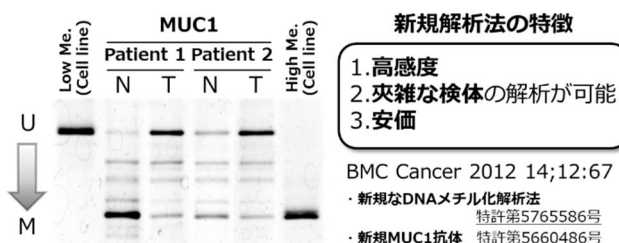
### ～これまでの研究結果～

従来の方法では解析不可能な多様性の高い臨床検体においても DNA のメチル化解析が可能な新規高感度メチル化解析法（特許第 5765586 号）である、メチル化特異的電気泳動（MSE）法の開発を行い報告している（図 1-1）。

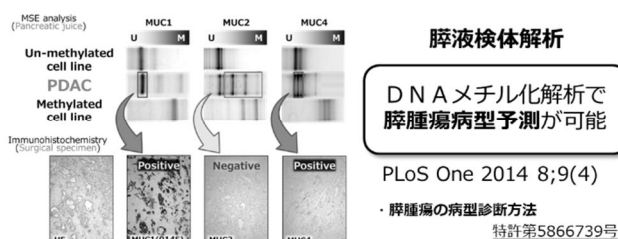
38 例の膵炎・膵癌・膵腫瘍患者より採取した膵液を解析した。予後の悪い膵がんと予後の比較的良好な膵乳頭粘液性腫瘍との間に DNA のメチル化の程度に有意差があることを見出した（図 1-2）。

我々の最新の研究において、手術摘出組織を使用した DNA メチル化解析により、非癌部組織における MUC1・MUC4 遺伝子のプロモーター部の脱メチル化が“している群”は、“していない群”と比較するとハザード比が約 4 倍となっていることを明らかにした。加えて、機械学習分類子は、腫瘍組織だけでなく非腫瘍組織における解析結果でも有意に手術後予後について不良群のスクリーニングが可能であることを報告した（図 1-3）。単変量・多変量解析により、機械学習による予測結果は TNM スコアや年齢、併存疾患、ASA スコアなどの予後因子から独立していることを示した。

### 1. 新規メチル化解析法(MSE法)の開発



### 2. 膵液を利用した膵癌の早期診断法



### 3. 機械学習による手術後予後予測

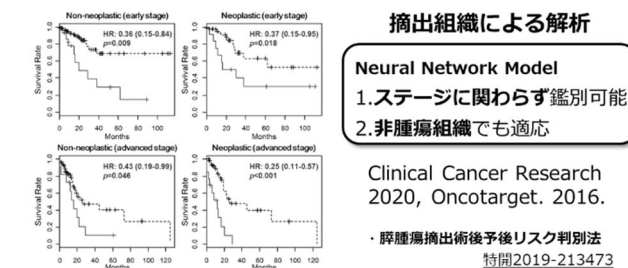


図 1. これまでの研究結果

## 2. 研究の目的

当該プログラムにおいては、膵癌臨床検体（針生検検体・細胞診検体・凍結組織検体・摘出組織検体・FFPE 組織検体・体液検体）において、各ムチン遺伝子を含むがん遺伝子・がん抑制遺伝子の DNA メチル化状況と、その組織における発現との相関を明らかにする。さらに、予後を含む臨床情報を用いて統計的因果分析ならびに高次予測可能機械学習を行うことで摘出術奏功性評価を含めた悪性度予測モデルの構築、ならびにリキッドバイオプシへ向けたバイオマーカー開発の可能性を探索する。

## 3. 研究の方法

これまで我々は、膵癌や膵管内乳頭粘液性腫瘍の生物学的悪性度とムチン分子ファミリー遺伝子におけるメチル化の関連性を明らかにしてきました。そこで、本研究計画では、組織バンクに保存されている各種臨床検体および体液検体における、各ムチン遺伝子を含むがん遺伝子・がん抑制遺伝子を対象とし、新規メチル化解析法（特許第 5765586 号）ならびに次世代シーケンサー（NGS）を用いて高感度に DNA メチル化状況を解析します。さらに、各解析結果を膵癌の術後予後や再発リスク、摘出術の奏功性を計算科学により評価します。

**新規メチル化解析パネルの構築：**DNA 標的領域に 8 つのメチル化可能な CpG 部位がある場合、理論的には 256 種類のメチル化パターンが生成される。しかし、メチル化特異的 PCR 法、マスアレイ法、パイロシークエンシング法などの従来のメチル化解析法では、それぞれのメチル化パターンの存在量を評価することができず、DNA メチル化の多様性が高い臨床サンプルにおいて、DNA メチル化パターンの構成要素を区別することはできない。そこで、次世代シーケンシング（NGS）を利用した新規の DNA メチル化解析パネルの構築した。

**各種臨床検体における標的遺伝子の DNA メチル化解析と発現比較：**臨床検体に適応可能な悪性度予測モデルを構築するために、各種組織固定による DNA メチル化の影響、手術摘出検体を用いた解析を行った。

## 4. 研究結果

NGS ベース DNA メチル化解析パネルを用いて各種固定を行った（ホルマリン、LBC、凍結）膵癌 EUS-FNA/FNB 検体のメチル化解析を行った。パネル解析の平均リード数は 750 から 13,000 の範囲であり、固定のことなる同一検体間で同程度のリード数を示した。3 つのムチン遺伝子プロモーター領域のメチル化パターンは、FFPE、LBC、凍結検体に有意差はなかった。ECAD を除く SMAD4、MGMT、MSH2 などの他の遺伝子プロモーター領域のメチル化状態も同様の結果を示し、FFPE、LBC、凍結検体の解析間で有意に高い相関を示した。

次に、手術時に摘出した胆管組織検体を用いて、NGS ベース DNA メチル化解析パネルにより MUC1 のメチル化を評価しました。MUC1 プロモーター領域の 4 つのメチル化パターンに基づいた線形多項式関数を用いたシンプルな指数計算を構築した。この指数は、

BTAC および PDAC 侵襲の腫瘍組織において、同じ閾値を使用して予後不良の予測が可能であった。特に、非腫瘍領域でも同じ閾値で予後不良を区別していた。多変量および単変量解析により、この指数はステージや腫瘍サイズから独立した予後因子であることが明らかになった。現在の研究結果を検証するためには、大規模な前向きランダム化試験が必要だが、この指数は膵胆管癌の高リスクを持つ細胞診や液体生検サンプルのスクリーニングに適用できるかもしれません。結論として、胆管組織における MUC1 プロモーター領域のメチル化パターンの多様性の変化は、BTAC および PDAC の予後不良群の予測が可能であった。

## 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 2件）

1. 著者名 Yokoyama Seiya, Iwaya Hiromichi, Akahane Toshiaki, Hamada Taiji, Higashi Michiyo, Hashimoto Shinichi, Tanoue Shiroh, Ohtsuka Takao, Ido Akio, Tanimoto Akihide	4. 巻 50
2. 論文標題 Sequential evaluation of MUC promoter methylation using next generation sequencing based custom made panels in liquid based cytology specimens of pancreatic cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diagnostic Cytopathology	6. 最初と最後の頁 499 ~ 507
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/dc.25022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kirishima Mari, Yokoyama Seiya, Matsuo Kei, Hamada Taiji, Shimokawa Michiko, Akahane Toshiaki, Sugimoto Tomoyuki, Tsurumaru Hirohito, Ishibashi Matsujiro, Mataka Yuko, Ootsuka Takao, Nomoto Mitsuharu, Hayashi Chihiro, Horiguchi Akihiko, Higashi Michiyo, Tanimoto Akihide	4. 巻 22
2. 論文標題 Gallbladder microbiota composition is associated with pancreaticobiliary and gallbladder cancer prognosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12866-022-02557-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 横山 勢也
2. 発表標題 DNAメチル化解析による胆管癌術後予後予測手法の構築
3. 学会等名 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Seiya Yokoyama
2. 発表標題 Construction of prognosis prediction method for after surgery of Cholangiocarcinoma using aberrant methylation status
3. 学会等名 16th Mucins in Health and Disease（国際学会）
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
研究分担者	谷本 昭英 (Tanimoto Akihide)  (10217151)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授  (17701)	
研究分担者	濱田 大治 (Hamada Daiji)  (30771480)	鹿児島大学・医歯学域医学系・助教  (17701)	
研究分担者	東 美智代 (Higashi Michiyo)  (60315405)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・准教授  (17701)	
研究分担者	杉本 知之 (Sugimoto Tomoyuki)  (70324829)	滋賀大学・データサイエンス学部・教授  (14201)	
研究分担者	赤羽 俊章 (Akahane Toshiaki)  (70754480)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任研究員  (17701)	

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
---------	---------