

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09128

研究課題名（和文）下垂体腺腫における血中cfDNAのエピジェネティクス解析と臨床応用

研究課題名（英文）Epigenetic Analysis of Blood cfDNA in Pituitary Adenomas and Clinical Applications

研究代表者

空閑 太亮（Daisuke, Kuga）

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：40759932

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：下垂体腺腫は、pasireotideなど新規薬剤の出現により従来の手術療法に加え、多様な治療が可能となりつつあるが、診断や疾患の進行を確認するためのバイオマーカーは未だ存在しない。本研究では下垂体腺腫患者の血液を用いて、腫瘍由来のゲノムDNAのメチル化プロファイルを行い、それに基づいて各組織型の判別や腫瘍増殖能に関わる新規バイオマーカーを同定する。さらに得られたメチル化プロファイルと様々な臨床データを統合することにより、下垂体腺腫に対する治療への反応性や腫瘍増殖能の予測などを可能とする革新的な統合診断システムの構築を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

下垂体腺腫については、ここ数年、国外で網羅的な大規模遺伝子解析研究の報告が見られるようになってきたが、特にエピジェネティクス解析についてはその他のがん腫と比較するとかなり遅れているのが現状である。悪性腫瘍だけでなく、無症候性下垂体腺腫の長期経過や手術適応については、昨今大きなトピックスとなっている。経過の長い良性腫瘍においても、非侵襲的なliquid biopsyの持つ役割は非常に大きいと考えらる。

研究成果の概要（英文）：Pituitary adenomas, with the advent of new drugs such as pasireotide, are now being treated with a variety of therapies in addition to traditional surgical methods. However, there are still no biomarkers available for diagnosis or monitoring disease progression. In this study, we aim to perform methylation profiling of tumor-derived genomic DNA using blood samples from patients with pituitary adenomas. Based on these profiles, we will identify novel biomarkers related to the classification of each tissue type and tumor proliferative capacity. Furthermore, by integrating the obtained methylation profiles with various clinical data, we aim to develop an innovative integrated diagnostic system that can predict treatment responses and tumor proliferative capacity in pituitary adenomas.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：脳腫瘍

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

下垂体腺腫は良性腫瘍であるが、海綿静脈洞内への浸潤により全摘出が困難なことも少なくなく、残存腫瘍に対して長期間の経過観察が必要となることがある。また、一部の組織型 (Silent corticotroph, Sparsely granulated somatotroph など) は aggressive type とされ、早期に再発する傾向があることが知られている。しかし、これらの腫瘍の増殖能や浸潤能は MRI を主とした画像検査で予測することはできず、その同定には手術検体採取後の病理検査が必要となる。また、近年、機能性下垂体腺腫については、pasireotide などの有効な新規薬剤が出現したことで、外科的摘出を基本としてきた今までの治療指針から多様化しつつある。これらのことから、腫瘍増大の可能性や薬物治療への感受性を手術を行うことなく事前に予測できれば、下垂体腺腫の診療に非常に有用な手段となると考えられる。そのため、腫瘍の診断から臨床経過予測まで可能とするようなバイオマーカーの存在が期待されている。

近年の下垂体腺腫における大規模 whole genome sequencing の結果から、下垂体腺腫では染色体の腕単位でのコピー数異常は見られるものの、遺伝子変異の頻度は多くなく、いわゆるバイオマーカーの候補となりうる driver mutation は存在しない可能性が報告されている (Wenya LB et al. Clin Cancer Res 2018, Caimari F et al. Clin Cancer Res. 2016)。一方で、腫瘍発生や浸潤/増殖に関わる遺伝子発現を制御するエピジェネティクス機構に注目が集まりつつある。2017年に発表された新たな WHO 分類では、下垂体腺腫は生物学的な特徴を重視し下垂体特異的な転写因子の特徴を使った cell lineage に即した分類となったが、DNA メチル化プロファイルによるサブクラス分類は、この新分類に類似した結果となった (Matthew PS et al. Clin Cancer Res 2018)。また、複数の遺伝子のメチル化パターンが、腫瘍の浸潤能や増殖能と関連しているとの報告も相次いでいる (Gu Y et al. J Neurooncol. 2016, Ling C et al. PLoS One 2014)。さらに Somatotroph adenoma ではソマトスタチン受容体 5 (SSTR5) 遺伝子のプロモーター領域の低メチル化による同遺伝子の高発現が示されており (Matthew PS et al. Clin Cancer Res 2018)、下垂体腺腫のメチル化パターン解析は SSTR5 に親和性の高い Pasireotide の有効性の予測にも役立つと思われる。

近年、癌の早期診断や病態のモニタリングの手段として、血液や尿などの体液中に存在する腫瘍由来の遊離核酸 (cell-free DNA) を用いた liquid biopsy が注目されている。脳組織には脳血液関門が存在するため、一般的に脳腫瘍においては血液を用いた liquid biopsy は困難とされているが、下垂体には発生学上脳血液関門が存在せず、下垂体腫瘍由来の遊離核酸は末梢血中へとそのまま放出されることとなる。事実、下垂体腺腫患者の血液中からバイオマーカー候補として、いくつかの microRNA や long non-coding RNA がすでに同定されている (Zhang Y et al. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2019, Xiong Y et al. Transl Res. 2020)。

本研究では cell free DNA のエピジェネティクス解析という全く新たなアプローチを用いて下垂体腺腫の総合的診断システムの確立を目指す。下垂体腺腫特異的な DNA メチル化領域を同定することで、非侵襲的なリアルタイムモニタリングにも応用が可能であり、革新的なバイオマーカーとしても機能することが期待される。

2. 研究の目的

本研究では、下垂体腺腫患者の血中 cell free DNA の網羅的メチル化解析を行い、腫瘍の増殖や浸潤、薬剤感受性に関わる未知のエピゲノム機構の解明を行う。さらには上記で得られたデータを様々な臨床データと統合することで、臨床経過を予測するバイオマーカーの確立を目指す。liquid biopsy 検体を用いたエピジェネティクス解析の報告はまだほとんどなく、特に下垂体腺腫については皆無である。申請者らは、ごく少量の DNA から有用なメチロームデータを取得することに成功しており (Sci. Rep. 2020) 本研究でもこの手法を用いることで、世界に先駆けて下垂体腺腫の診断 / 経過予測を行うためのバイオマーカーの同定を目指す。さらには本手法はその他の頭蓋内腫瘍についても応用可能であり、今後の脳腫瘍診療において新たな方向性を示すことに繋がる可能性を秘めた研究となる。

3. 研究の方法

本研究の最終的な目的は、上記背景および研究成果をもとに、下垂体腺腫患者における新たなバイオマーカーに基づく診断 / 治療への臨床応用にある。研究期間内には以下を明らかにする。下垂体患者の血中 cell free DNA を用いた網羅的メチル化プロファイルを基に、腫瘍の分化過程や増殖能に関わる DNA 領域を同定する。同定した DNA 領域に対してメチル化特異的 PCR プライマー・プローブを複数設計し、手術前後や薬物治療前後などの臨床経過の様々な時点での推移を明らかにする。上記で得られたメチル化 DNA に関するデータ、臨床経過に関わるデータ (画像データや電子カルテなど) を統合し、新たな診断 / 治療アルゴリズムを作成する。

下垂体腺腫患者血中 cell free DNA を用いた網羅的メチル化解析

下垂体腺腫各組織型 (Gonadotroph adenoma, Somatotroph adenoma, Lactotroph adenoma, Thyrotroph adenoma, Corticotroph adenoma, null cell adenoma) において患者血液から cell free DNA を抽出する。コントロールとしては正常血液を用いる。網羅的メチル化解析については、申請者らが過去に行ってきた PBAT 法 (Nucleic Acids Res. 2019) を用いてライブラリを作成する。

下垂体腺腫における各組織型のメチル化パターンの比較と特異領域の抽出

得られたメチロームデータを用いてコントロール群との比較を行う。また、組織型間についても比較を行う。解析には Metilene などのメチル化解析ツールを用いて腫瘍特異的なメチル化パターンあるいは組織特異的なメチル化パターンの抽出を行い、関連する遺伝子領域を抽出する。同定された、DNA 領域についてはメチル化特異的 PCR プライマーを設計し validation を行う。

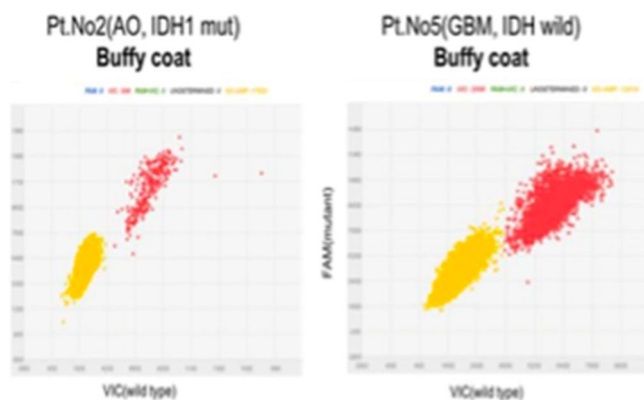
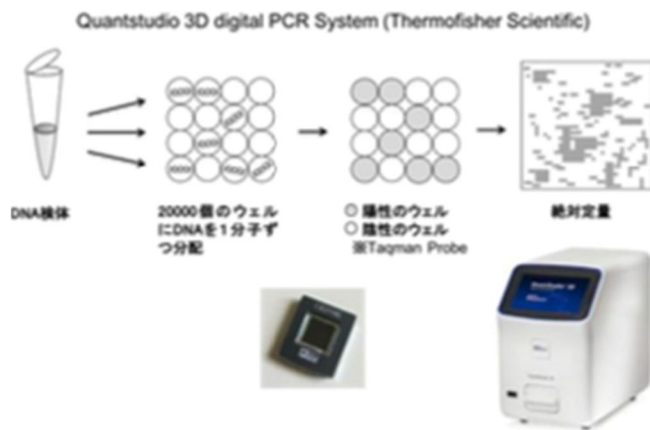
トランスクリプトームとの統合解析

同一患者の凍結腫瘍検体から total RNA を抽出し、RNA sequencing を行う。上記で得られた DNA メチル化と遺伝子発現の関連を検証する。

4. 研究成果

まず、腫瘍サンプルの解析に先駆けて血液中のバイオマーカーの同定が可能であるかの基礎実験を行った。下垂体腺腫の血液サンプルが当初では少なかったため、代替と

して代表的な脳腫瘍である神経膠腫患者から得た血液サンプルを用いて実験方法の確認を行った。高感度のデジタル PCR 法 を用いることで、脳腫瘍患者の髄液中より腫瘍特異的遺伝子の検出が可能であった。



次に垂体腺腫凍結標本を用いてメチローム解析を行った。解析により転写因子の発現により、腫瘍がクラスタリングされることが確認できた。これらのメチローム解析結果と血中 cell free DNA 解析結果とを統合して新たなバイオマーカーの探索に努める。今後は引き続き、本実験を遂行していく。具体的には下垂体腺腫患者の各組織型の臨床サンプルより分泌形 DNA を抽出する。さらに各腫瘍型における分泌形 DNA 発現プロファイルの比較により腫瘍型特異的な分泌形 DNA を同定する。これらの分泌形 DNA については、サンプル数を増やしデジタル PCR 法を用いて validation を行っていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 Otsuji Ryosuke, Fujioka Yutaka, Hata Nobuhiro, Kuga Daisuke, Hatae Ryusuke, Sangatsuda Yuhei, Nakamizo Akira, Mizoguchi Masahiro, Yoshimoto Koji	4. 巻 16
2. 論文標題 Liquid Biopsy for Glioma Using Cell-Free DNA in Cerebrospinal Fluid	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1009 ~ 1009
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers16051009	査読の有無 無
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0件

〔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	三月田 祐平 (Sangatsuda Yuhei) (00848640)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	
研究分担者	秦 暢宏 (Hata Nobuhiro) (10596034)	大分大学・大学病院・准教授 (17102)	
研究分担者	溝口 昌弘 (Mizoguchi Masahiro) (50380621)	九州大学・医学研究院・共同研究員 (17102)	

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