

令和 2 年 7 月 13 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07153

研究課題名(和文) 高感度域でも良好な定量性を示し、普及しやすいメチル化DNA解析法の開発

研究課題名(英文) Development for highly sensitive and quantitative methods with a facile, fast and low-cost protocol.

研究代表者

野村 幸男 (NOMURA, Sachio)

公益財団法人がん研究会・経営本部 調達・社会連携部・総合職

研究者番号：70714773

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：DNAメチル化異常ががん化に関わる遺伝子やリキッドバイオプシーで有用な遺伝子領域を試験的なターゲットとして、非常に高感度で定量的なDNA解析法を開発した。本法は一般的なリアルタイムPCR機器と市販の一般的な試薬にて実現した。そのため一般に普及するにあたり非常に有利な方法である。感度は非メチル化DNA中のメチル化DNA、もしくはメチル化DNA中の非メチル化DNAについて双方とも0.001%レベルの感度まで良好な定量性を示した。これにより例えば正常DNAが大量に混在していても非常に微量のがん由来DNAを経時的に定量解析することが可能となる。本法はリキッドバイオプシーバイオプシーに応用可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNAメチル化異常について、簡便迅速安価で定量的超高感度解析する技術を開発できたことで、がんの初期段階での検出と経時的追跡・解析を安価に実施できる可能性が高まった。これは従来の方法では正常細胞由来DNAに妨害されて偽陰性の可能性が高かったもので、かつ特殊な解析機器を用いなくてはできなかったものである。本研究の成果は、これまで困難であった正常細胞由来DNAが大量に存在している検体に対して、経時的にがん由来のDNA異常を解析可能とし、がんの早期発見と診断について普及的検査に道を開くものとなる。

研究成果の概要(英文)：This research accomplished ultra-high sensitive quantitative DNA analysis technology development using popular genetic equipment and commercial reagents. Target DNA regions were MLH1 and BRCA1 promoter regions which are famous for carcinogenesis, and SEPT9 promoter region that is used in the liquid biopsy kit for colorectal cancer. The developed technique is facile, rapid, low-cost, quantitative and ultra-high sensitive. The sensitivity was achieved 0.001% level with over 0.9 of coefficient of determination. The sensitivity was achieved for both methylated DNA in unmethylated DNA or unmethylated DNA in methylated DNA. We applied this technology to colorectal liquid biopsy to calculate the copy number of cancer cell derived circulating tumor DNA (ctDNA) in ml of plasma. This suggests this technique could be used for quantification of aberrant DNA methylations overtime like tumor markers.

研究分野：がん関連遺伝子の分子生物学的解析とその臨床的応用

キーワード：DNAメチル化 定量的超高感度解析 大腸がん リキッドバイオプシー

## 1. 研究開始当初の背景

がん細胞と正常細胞の相違に基づいてがんの早期発見、診断、再発モニタリングを行うにあたり、それらの遺伝子変異やエピゲノム変異を用いることができる。ただしより正確な診断のためには、定性的な解析手法より定量的な解析手法を用いて繰り返しの検査で数値の変動を追える手法が望ましく、特に腫瘍マーカーのような経時的な数値変動の追跡が重要な検査においては必須となる。前者の遺伝子変異は患者のがん組織毎に遺伝子や変異位置、変異の種類が多岐にわたり、同じ組織内でも Heterogeneity により複雑性が増す。そのため多くの患者検体について特定の種類の遺伝子変異に絞って解析系を作成することは困難であり、検体毎に NGS のような網羅的な遺伝子解析を行う必要がある。そして、正常組織に対してがん組織が少ない場合には正確なデータを得ることが困難であり、一般的な NGS では 5%以下の頻度の変異について信頼性のあるデータを得ることは困難であるため、分子バーコードを使用した方法など、複雑で高コストの手法が必要となる。遺伝子変異に対してエピゲノム変異については、その塩基レベルの相違は CpG サイトのシトシンに限られることや、ゲノム上の位置も癌腫によって特異性のある遺伝子領域の知見が蓄積されてきており、小数の遺伝子ターゲットで多数の患者を対象にした検査系の構築に適している。ただし、前述のように正常細胞が大量に混在する検体のがん特異的な解析が困難であることは同様であり、基礎研究成果を臨床現場に橋渡しするためには精度の高い定量的検査を簡便・安価・迅速に行える技術が求められている。

## 2. 研究の目的

基礎研究にて蓄積されているがん特異的な DNA メチル化異常に関する知見を一般の研究者や臨床家、検査センターにより臨床応用可能とするため、検体に正常細胞由来 DNA が大量に混在していても簡便・安価・迅速、かつ超高感度で定量的な解析技術の開発。特に近年臨床応用が期待されているリキッドバイオプシーへの応用を目的とするため、正常細胞由来 DNA が大量に混在する検体を想定し、がん細胞由来 DNA が 1%以下の混在率の超高感度定量的解析を一般に普及している機器と試薬で行えるようにする。そして当該技術のリキッドバイオプシーでの実証を行う。

## 3. 研究の方法

解析技法のベースは簡便・迅速で安価な方法で知られる MS-HRM (Methylation Sensitive High Resolution Melting) であり、当該手法に主に以下の工夫を加えることで目的を実現した。DNA メチル化検出用と非メチル化検出用のプライマーを混在させた Competitive PCR 化。非メチル化 DNA アレルとそれぞれのアレルの分離能を向上させるため、メチル化 DNA 由来 PCR 産物をさらに高  $T_m$  となるようメチル化 DNA 検出用プライマーに GC リッチタグ (High- $T_m$  Tag) の付加。極低混在率のアレル側の感度と定量性の向上のため、Competitive PCR のプライマー比の最適化。

Target 領域は、がん化に寄与していることで有名な *MLH1* promoter 領域と *BRCA1* の Promoter

領域とし、技術開発を行った。目的とする感度 1%以下をはるかに上回る 0.001%において、合成オリゴスタンダード (STD) を用いて決定係数 0.9 以上の定量性を示す解析系を作成し、HiQASP (Highly Quantitative Allele Specific PCR) と名付けた。本手法を臨床検体にて検証するため、大腸がんのリキッドバイオプシーを順天堂大学医学部附属病院において臨床研究を実施(受付番号 18-153)。目的とする遺伝子は大腸がんにて DNA メチル化異常を高頻度に生じることが知られており、FDA 認可のキットが市販されている *SEPT9* 遺伝子領域とした。新たに *SEPT9* の HiQASP を構築し、0.0005%の感度において定量性を持つことを確認した。5 検体の手術前採血の末梢血検体を定法にて調整したリキッドバイオプシー由来 Bisulfite DNA を、HiQASP に供した。

STD はバイサルト変換後の塩基配列であり、合成オリゴメーカーに依頼するが、メチル化 DNA 用と非メチル化 DNA では別々のメーカーに依頼することが望ましいこと、その STD を増幅し得るプライマーは STD 合成後少なくとも数週間は同じメーカーに発注せず(メーカーの施設内の合成ラインに増幅可能な鋳型となる STD が残存するため、鋳型を入れなくとも目的の増幅産物を生じるプライマーが納品される可能性が高い)、可能であれば STD 合成前に依頼するか、STD のメーカーとは別のメーカーに依頼する。

複数の遺伝子領域を含んだ STD には Artificial Gene もしくは GeneBlock 等の合成遺伝子作成サービスを利用した。例えば *MLH1* と *BRCA1* のプロモーター配列を含んだ非メチル化配列用 (All Cytosine->Thymine) には Eurofin 社、メチル化配列用 (CpG サイトのみ残して Cytosine->Thymine) には GenScript 社に依頼した。また、*SEPT9* の非メチル化用配列には GenScript 社の GenParts を、メチル化用配列には IDT 社の gBlock を使用した。バイサルト変換前の各 DNA 配列のゲノム座標は以下に示す。

*MLH1*: hg19, chr3:37,034,700-37,034,861

*BRCA1*: hg19, chr17:41,277,337-41,277,493

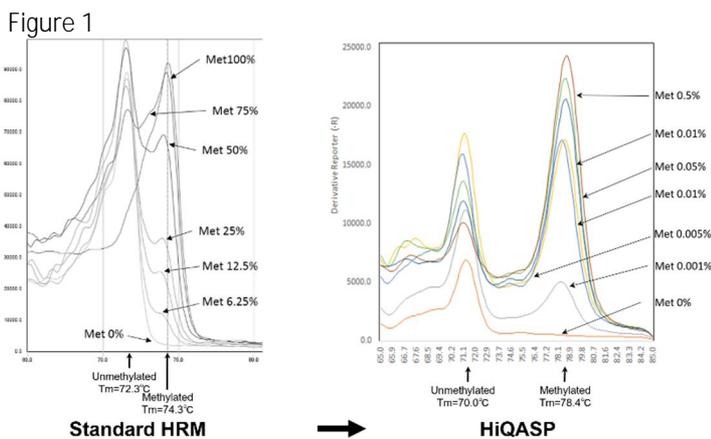
*SEPT9*: hg19, chr17:75,369,536-75,369,699

使用したキットについて、血漿からの cfDNA 抽出には QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen) cfDNA 定量には QuantiFluor® dsDNA System (Promega)、バイサルファイト変換には EZ DNA Methylation-Lightning kit (Zymo Research)、PCR には TaKaRa EpiTaq™ HS (TAKARA Bio) と EvaGreen (Biotium)、サーマルサイクラーには QuantStudio3 (Thermo Fisher) を使用した。

#### 4. 研究成果

科研費申請時の *MLH1* promoter 領域を HRM 解析した図が Figure 1 の Standard HRM で、 $T_m$  差が約 2、メチル化アレルの検出感度が 1~5%程度に対し、非メチル化アレル検出用プライマーセット (FRU) 対メチル化アレル検出用プライマーセット (FRM) =1:3 の HiQASP では  $T_m$  差が約 7.5、メチル化アレルの検出感度 0.001%程度と、検出感度に、約千倍の向上をもたらした (Figure 1 HiQASP)。なお、プライマーセットを 1 セット追加する以外に、HRM と HiQASP のアッセイ工程に大きな変化はなく、HRM と同等の簡便さと迅速性で実施可能であった。

なお、FRU と FRM の Competitive PCR における FRM 側の Forward プライマーに High-Tm Tag を付加して非メチルアレル PCR 産物とメチル化アレルの PCR 産物間の Tm 差を拡大し微小ピークの検出感度を向上させることが可能であるが、Figure 2 が High-Tm Tag の Tm 差拡大効果を示した一例である。市販の非メチル化ヒトゲノム DNA コントロールとして Episcopy unmethylated DNA と methylated DNA を等量混在させて鑄型とし、FRU:FRM のプライマー比を 1:1 にて HiQASP を実施した。High-Tm Tag の差長に応じて非メチルアレルとメチルアレルのピーク分離が向上するが、長すぎる場合には PCR 不良を生じるため 15 塩基前後を採用した。検出感度を測定するため、



MLH1 と BRCA1 の Bisulfite converted 配列の STD 用に非メチル化アレル用とメチル化アレル用の合成オリゴをそれぞれ別会社へ合成依頼し、目的の割合で混合した STD を使用して HiQASP の感度を測定した。

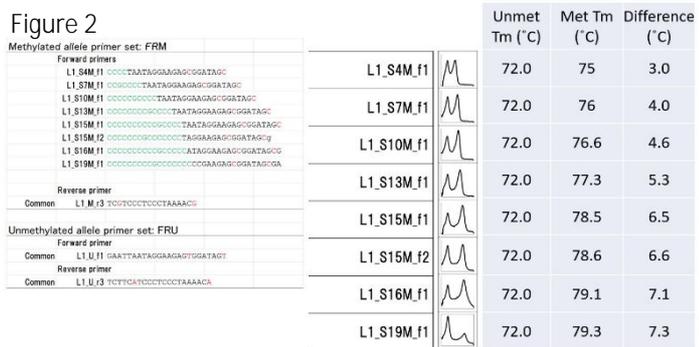
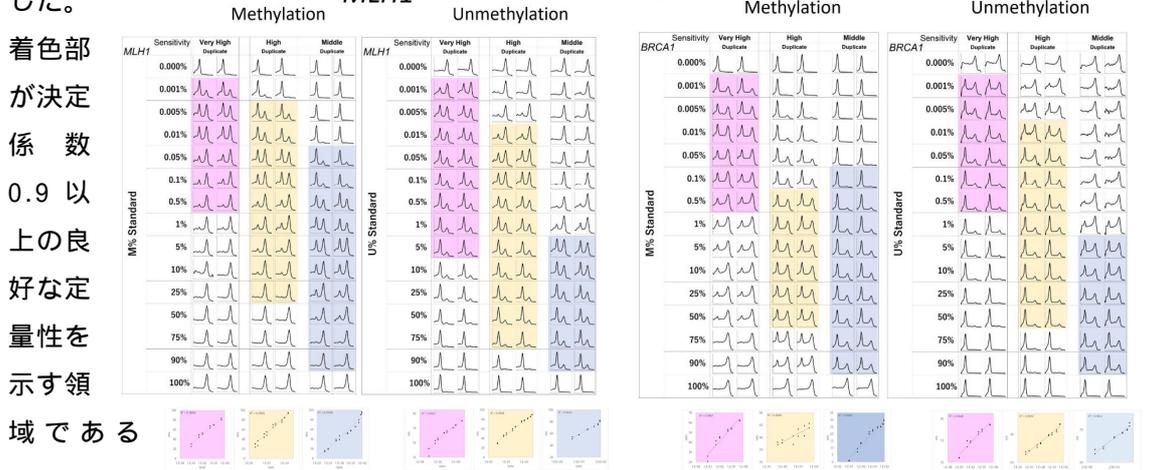


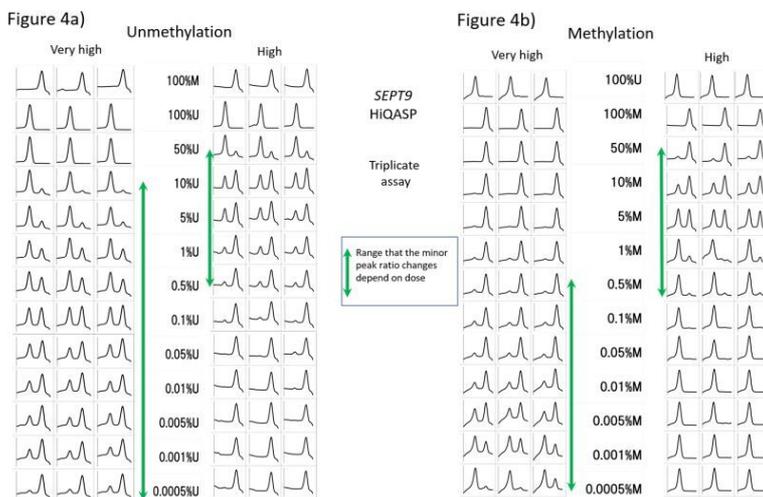
Figure 3 は、両遺伝子領域のメチル化 DNA 測定用 ( "Methylation" ) と非メチル化 DNA 測定用 ( "Unmethylation" ) の HiQASP について各々同じ STD を 2 重測定した well 毎のパネルである。感度は "Very High"、"High" そして "Middle" の 3 段階でプライマー比を至適化して測定した。



着色部  
が決定  
係 数  
0.9 以  
上の良  
好な定  
量性を  
示す領  
域である

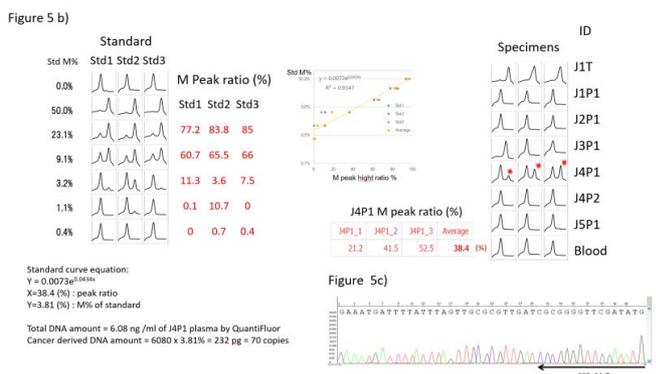
が、両遺伝子の目的感度領域において決定係数 0.9 以上を示し、目的の感度に応じて精度の高いアッセイ系の構築が可能となった。また、プライマー比率を超高感度測定用 (“ Very High ” ) に至適化した場合、両遺伝子の両アレルにおいても 0.001%の混在率を含んで決定係数 0.94 以上の良好な定量性を示し、現時点で報告されている最高感度の DNA メチル化異常に関する定量性遺伝子検査といえる。なお通常の qPCR に比較して特定域の詳細な定量を行えることが HiQASP の利点であるが、逆にダイナミックレンジが比較的狭いことが欠点とも言える。最近、HiQASP に工夫を加えることでダイナミックレンジを飛躍的に拡張することができるデータを得ているので今後詳細な検討を加えて実証したい。

大腸がんのリキッドバイオプシーに本法を適用し、臨床検体において検証するため、大腸がんのリキッドバイオプシーにおける DNA メチル化解析として FDA で認可されている SEPT9 遺伝子について HiQASP を構築し、SEPT9 の STD を 3 重測定にて実施した。その結果、メチル化アレル、非メチル化アレル共に、



0.0005%においても定量性を示すアッセイが構築可能であった。そのアッセイ系を手術前の大腸がん患者 5 症例の血漿検体において SEPT9 の DNA メチル化定量を行った。

検査工程は Figure 5a に示すようにシンプルであり、市販のキットのマニュアル以外の特別なものはなく、最後の HiQASP の Running time は 45 分であり、その後の定量計算はエクセルにて行った。Stage4 の症例 J4、1 症例が陽性であり、メチル化アレルのピーク比は平均 38.4%であった。STD の検量線  $Y = 0.0073e^{0.0434x}$  より検体中の DNA メチル化比率は 3.8%と計算された。SEPT9 DNA のメチル化はがん特異的であるため、血漿中の総 DNA の定量値 = 6.08 ng/ml of plasma より、J4 症例の血漿 1 ml あたりのがん細胞由来 DNA は 70 コピーと算出可能であった。



なお、本症例の高 Tm ピークを示す PCR 産物について Forward primer によるダイレクトシーケンスを行い、Figure 5c で示されるよう、CpG サイトが DNA メチル化された結果の配列であることを確認した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Sato K, Koyasu M, Nomura S, Sato Y, Kita M, Ashihara Y, Adachi Y, Ohno S, Iwase T, Kitagawa D, Nakashima E, Yoshida R, Miki Y, Arai M.	4. 巻 108
2. 論文標題 Mutation status of RAD51C, PALB2 and BRIP1 in 100 Japanese familial breast cancer cases without BRCA1 and BRCA2 mutations.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 2287-2294
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1111/cas.13350. Epub 2017 Sep 18.	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 Taki K, Sato Y, Nomura S, Ashihara Y, Kita M, Tajima I, Sugano K, Arai M.	4. 巻 15
2. 論文標題 Mutation analysis of MUTYH in Japanese colorectal adenomatous polyposis patients.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Fam Cancer	6. 最初と最後の頁 261-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1007/s10689-015-9857-1.	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 Urakami S, Inoshita N, Oka S, Miyama Y, Nomura S, Arai M, Sakaguchi K, Kurosawa K, Okaneya T.	4. 巻 25
2. 論文標題 Clinicopathological characteristics of patients with upper urinary tract urothelial cancer with loss of immunohistochemical expression of the DNA mismatch repair proteins in universal screening.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Urol.	6. 最初と最後の頁 151-156
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1111/iju.13481. Epub 2017 Nov 22.	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 Sachio Nomura, Toshiyuki Kobayashi, Kiichi Sugimoto, Masami Arai, Hiroataka Momose, Kazuhiro Sakamoto, Thomas R. Pisanic II, Okio Hino.
2. 発表標題 A novel method for highly sensitive, facile and inexpensive quantitative assessment of aberrant DNA methylation in liquid biopsies.
3. 学会等名 The 111th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research: AACR 2020 Virtual Meeting II（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野村幸男、 樋野興夫、 新井正美
2. 発表標題 Highly Sensitive DNA Methylation Analysis of MLH1 and BRCA1
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 特許権	発明者 野村幸男、新井正美	権利者 公益財団法人がん研究会
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-539642	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	新井 正美  (ARAI Masami)  (20232027)	公益財団法人がん研究会・有明病院 遺伝子診療部・部長   (72602)	
研究分担者	石塚 直樹  (ISHIZUKA Naoki)  (50392395)	公益財団法人がん研究会・有明病院 臨床試験部・副部長   (72602)	
研究分担者	樋野 興夫  (HINO Okio)  (90127910)	順天堂大学・医学部・客員教授   (32620)	
研究分担者	小林 敏之  (KOBAYASHI Toshiyuki)  (40260070)	順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授   (32620)	