

令和 2 年 7 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K19957

研究課題名(和文) DNAメチル化不均一性の超高感度検出による大腸癌予後及び治療効果予測

研究課題名(英文) Prediction of outcomes and response to treatments with an ultrasensitive method for assessing intratumor epigenetic heterogeneity in colorectal cancer

研究代表者

杉本 起一 (Sugimoto, Kiichi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：30407275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌86例を対象とし、血漿中の遊離DNAにおけるp14遺伝子のメチル化レベルを測定し、臨床病理学的因子との関連性について検討した。血漿中の遊離DNAメチル化レベルの測定には術直前に採取した血漿2mlを用い、定量的メチル化特異的PCR(qPCR)で測定した。単変量解析では、静脈侵襲を認める症例の方が認めない症例よりもRMVが有意に高かった($p=0.009$)。また、肺転移を認める症例ではメチル化レベルが有意に高値であった($p=0.007$)。その他の臨床病理学的因子との関連は認めなかった。本検討により血漿中遊離DNAにおけるp14遺伝子のメチル化レベルと肺転移との相関の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は、癌患者の血漿DNAメチル化を解析し、予後予測因子としての意義を探求し確立することである。DNAメチル化は、癌の発生や進行に重要な役割を果たし、これまで多くの遺伝子のDNAメチル化が同定されてきた。さらに近年では、癌組織におけるDNAメチル化の不均一性も指摘され、その不均一性と、同じ癌腫における異なる悪性度や、治療抵抗性における多様性との関連が示唆されている。本研究は、大腸癌のDNAメチル化の解析を行うことで、血漿のDNAメチル化の程度が予後に与える影響を明らかにした重要性の高い研究である。

研究成果の概要(英文)：Eighty-six patients, who had undergone resection of adenocarcinoma of the colon and rectum, were enrolled in this study. The patient backgrounds, clinicopathological factors and gene promoter methylation status were analyzed. Quantitative methylation-specific PCR (qMSP) was performed using the bisulfite-modified DNA for p14 gene promoter methylation. In univariate analysis, the patients with venous invasion had significantly higher RMVs of p14 gene compared with those without ($p=0.009$). Similarly, the patients with lung metastases had significantly higher RMVs of p14 gene compared with those without lung metastases ($p=0.007$). There were no significant correlations between RMVs of p14 and other clinicopathological factors. Our current study demonstrated the correlations between the promoter methylation status of p14 tumor suppressor genes in cell-free DNA from plasma and hematogeneous metastasis, especially lung metastasis.

研究分野：エビジェネティクス

キーワード：大腸癌 DNAメチル化 p14 リキッドバイオプシー 予後予測因子 エビジェネティクス 循環血漿DNA

1. 研究開始当初の背景

DNA メチル化は、生命の発生や分化に必須であるエピジェネティクスにおける代表的な事象の一つであるが、癌においても、その発生や進行に深く関わっている。これまでも、ほとんどの癌腫において、非常に多くの遺伝子の DNA メチル化が同定されており、早期発見、予後予測因子、ひいては抗癌剤や放射線への感受性予測因子としての有用性が報告されている (Dawson MA, et al. *Cell*. 2012; 150: 12-27.)。さらに、近年では、同一個体の癌組織における病理学的因子の不均一性 (Heterogeneity) と同様に、DNA メチル化の不均一性 (Heterogeneity) も指摘され、その不均一性と、同じ癌腫における悪性度や治療抵抗性における多様性との関連性が示唆されている (Feinberg AP, et al. *Nat. Rev. Genet.* 2006; 7: 21-33., Easwaran H, et al. *Mol. Cell*. 2014; 54: 716-27.)。したがって、この DNA メチル化の不均一性は、例え同じ癌腫であっても早期発見や予後予測、治療方針決定等の臨床応用を複雑にする原因と考えられる (Bedard PL, et al. *Nature*. 2013; 501: 355-64., Turner NC, et al. *Lancet Oncol.* 2012; 13: e178-e185.)。そのため、DNA メチル化の不均一性を正確に評価することが、今後の更なる臨床応用を可能とする上で重要である (Brown R, et al. *Nat. Rev. Cancer*. 2014; 14: 747-53.)。

DNA メチル化の不均一性を正確に評価する上で、患者血漿から採取した腫瘍由来循環血中 DNA (ctDNA) は 'Liquid biopsy' と呼ばれ、低侵襲かつ原発巣および遠隔巣を含めた患者体内の DNA メチル化の不均一性を包括的に評価する理想的な手段として、近年、徐々に報告されてきている (Shinjo K, et al. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015; doi: 10.1016/j.addr.2015.10.006.)。しかし、血漿中に含まれる ctDNA の量は微量であり、その DNA メチル化不均一性の正確な測定は依然困難である (Ilie M, et al. *Ann. Transl. Med.* 2014; 2: 107.)。

一方、現時点では、DNA メチル化を測定する方法としては、定量的メチル化特異的 PCR (qMSP) が特別な機器を必要とせず、また、低コスト、短時間で多くの検体の解析を行えるため、Gold standard である (Lo YMD, et al. *Cancer Res.* 1999; 59: 3899-903.)。DNA メチル化は、癌の発生や進行に重要な役割を果たし、これまで多くの遺伝子の DNA メチル化が同定されてきた。

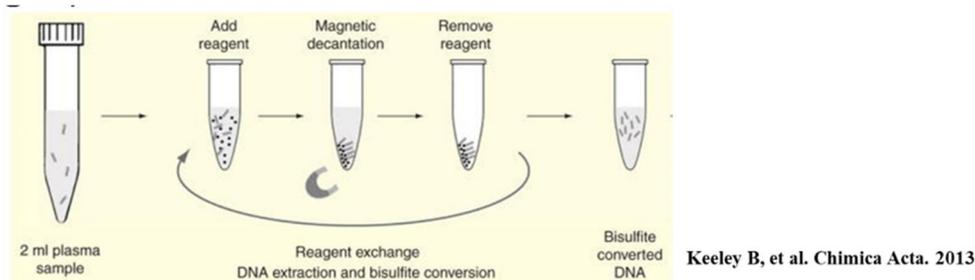
2. 研究の目的

本研究の目的は、癌患者の血漿 DNA メチル化を高感度に解析し、予後予測因子および治療効果予測因子としての意義を探求し確立することである。DNA メチル化は、癌の発生や進行に重要な役割を果たし、これまで多くの遺伝子の DNA メチル化が同定されてきた。さらに近年では、癌組織における DNA メチル化の不均一性も指摘され、その不均一性と、同じ癌腫における異なる悪性度や、治療抵抗性における多様性との関連が示唆されている。本研究は、大腸癌患者の血漿 DNA メチル化を高感度に解析し、そのメチル化レベルが予後に与える影響を明らかにし、予後予測因子であることを証明する非常に重要性の高い研究である。

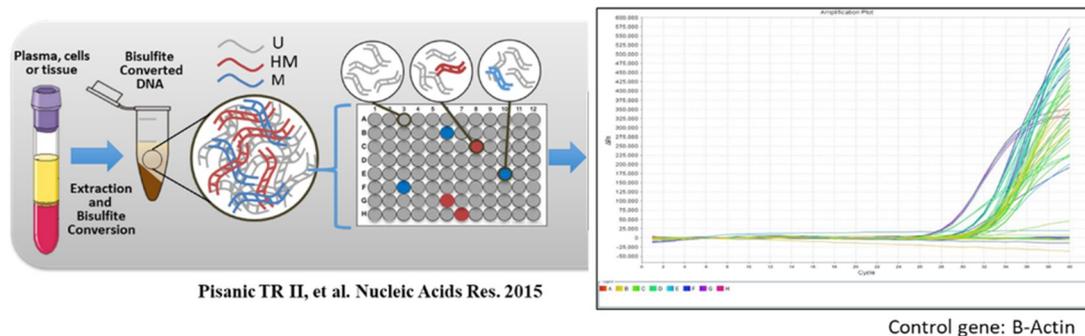
3. 研究の方法

過去 1 年 4 か月間に当科で手術を施行した大腸癌 86 例 (Stage I: 9 例, II: 39 例, III: 18 例, IX: 20 例) を対象とし、血漿中の遊離 DNA における p14 遺伝子のメチル化レベルを測定し、臨床病理学的因子との関連性について検討した。血漿中の遊離 DNA メチル化レベルの測定には術直前に採取した血漿 2ml を用い、DNA を抽出後に bisulfite 処理を行い (Fig. 1)、定量的メチル化特異的 PCR (qPCR) で測定した (Fig. 2)。β-Actin をコントロールとし、各症例における相対的 DNA メチル化レベル (Relative methylation value: RMV) を算出した。重複癌や多発癌、術前治療施行症例は検討から除外した。統計学的有意差検定は単変量解析には Mann-Whitney の U 検定、Spearman の順位相関係数を用い、 $P < 0.05$ を有意差ありと判定した。

Fig.1 DNA extraction and bisulfite conversion



血漿中の遊離 DNA メチル化レベルの測定には血漿 2ml からナノビーズを用いて DNA 抽出した。



Pisanic TR II, et al. Nucleic Acids Res. 2015

Fig.2 Quantitative Methylation-Specific PCR (qMSP)

β -Actin をコントロールとし、定量的メチル化特異的 PCR(qPCR)で測定した。各症例における相対的 DNA メチル化レベル(Relative methylation value : RMV)を算出した。

4. 研究成果

対象群の臨床病理学的背景を **Table 1** に示す。年齢は中央値 71 歳，男性 48 例(55.8%)，女性 38 例(44.2%)であった。占居部位は結腸が 77 例(89.5%)，直腸が 9 例(10.5%)の順に多かった。分化度は，高分化腺癌が 17 例(19.8%)，中分化腺癌が 58 例(67.4%)，低分化腺癌または粘液癌が 11 例(12.8%)であった。深達度は漿膜浸潤(T4 以上)の症例が 11 例(12.8%)，漿膜下層浸潤以下(T3 以下)が 75 例(87.2%)であった。リンパ節転移陽性(N1/N2)は 32 例(37.2%)，陰性(N0)は 54 例(62.8%)であった。Stage は，Stage IV が 20 例(23.3%)であった。

Table 1 Patient Characteristics

	No. of patients (%)
Age	71 years (32 - 88) †
Gender	
Male	48 (55.8%)
Female	38 (44.2%)
Location	
Colon	77 (89.5%)
Rectum	9 (10.5%)
Histological grade	
Well differentiated adenocarcinoma	17 (19.8%)
Moderately differentiated adenocarcinoma	58 (67.4%)
Poorly differentiated adenocarcinoma / Mucinous adenocarcinoma	11 (12.8%)
Invasion depth (T) TNM 8th	
T1	2 (2.3%)
T2	11 (12.8%)
T3	62 (72.1%)
T4a	8 (9.3%)
T4b	3 (3.5%)
Regional lymph node metastasis (N) TNM 8th	
N0	54 (62.8%)
N1	20 (23.3%)
N2	12 (14.0%)
Stage TNM 8th	
I	9 (10.5%)
II	39 (45.3%)
III	18 (20.9%)
IV	20 (23.3%)

† Median (Min. - Max.)

各臨床病理学的因子別に比較した相対的 DNA メチル化レベル(RMV)の結果を **Table 2** に示す。単変量解析では，静脈侵襲を認める症例の方が認めない症例よりも RMV が有意に高かった ($p=0.009$)。一方，年齢(70 歳未満/70 歳以上)，性別，占居部位(結腸/直腸)，分化度(高・中分化/低分化・粘液癌)，深達度(T1-T3/T4)，リンパ管侵襲の有無，リンパ節転移(N0/N1-3)，Stage(I-III/IV)では有意差を認めなかった。Stage 別に見ても，Stage IV で RMV が高い症例が散見されたが，Stage I，II，III と比較して有意差は認めなかった(**Fig.3**)。転移臓器別に RMV を比較した結果を **Fig.4** に示す。肺転移を認める症例では認めない症例よりも RMV が有意に高値であ

った(p=0.007) . 一方, 肝転移(H0/H1-3), 腹膜転移(P0/P1,2), 傍大動脈リンパ節転移の有無では有意差は認められなかった(各々p=0.58, 0.68, 0.22) . また, 術前血清 CEA 値と RMV の相関について検討すると, 両者に相関は認めなかった(R = 0.03, p=0.79) (Fig.5) .

Table 2 Comparisons of p14ARF RMVs according to clinicopathological factors

Clinicopathological factors	Variables	No. of patients	RMV (Median)	p-value
Age	≥ 70	48	0.00085	0.91
	< 70	38	0.00087	
Gender	Male	48	0.00087	0.82
	Female	38	0.00083	
Location	Colon	77	0.00086	0.70
	Rectum	9	0.00204	
Differentiation	Well, Moderate	75	0.00087	0.98
	Poor, Mucinous	11	0.00057	
TNM 8 th T classification	T1-T3	75	0.00087	0.51
	T4	11	0.00050	
Lymphatic invasion	Absent	54	0.00091	0.38
	Present	32	0.00072	
Venous invasion	Absent	54	0.00055	0.009
	Present	32	0.00208	
TNM 8 th N classification	N0	54	0.00083	0.47
	N1-N3	32	0.00102	
Stage	I-III	66	0.00086	0.39
	IV	20	0.00079	

RMV: Relative Methylation Value

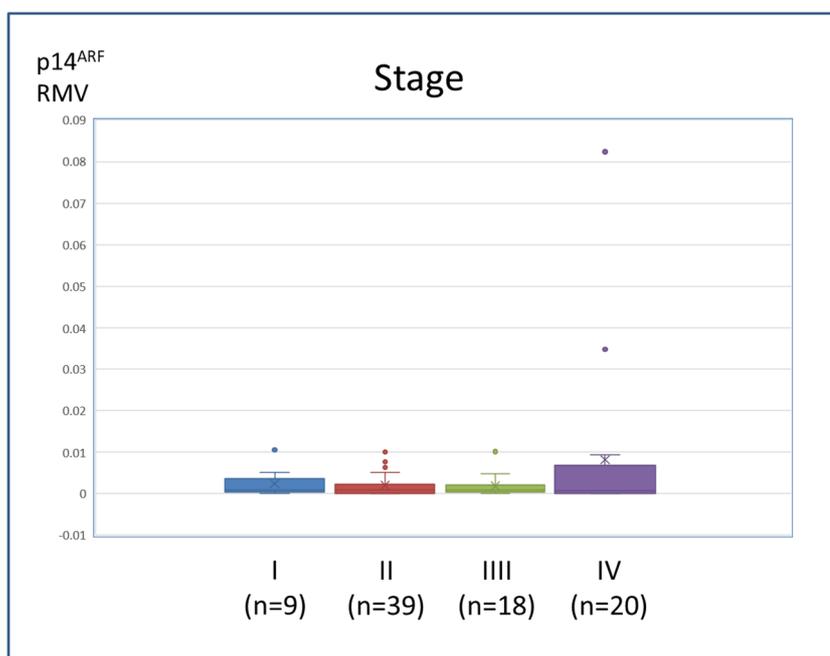


Fig.3 Stage 別の RMV の比較

Stage 別の解析では, Stage IV で RMV が高い症例が散見されたが, Stage I, II, III と比較して有意差は認めなかった.

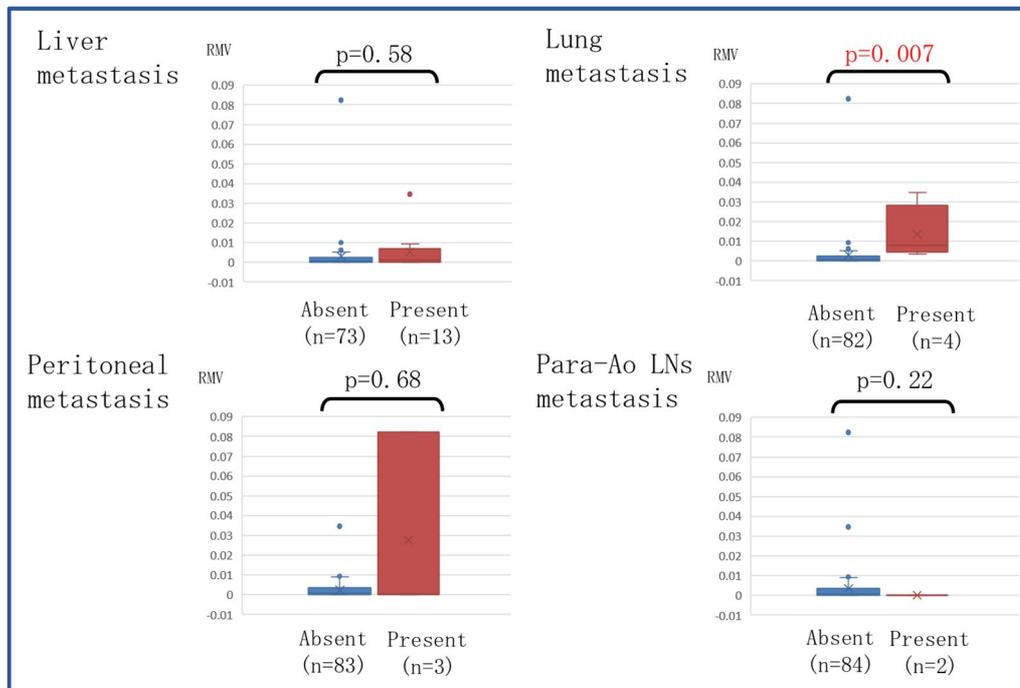


Fig.4 転移臓器別の RMV の比較

肺転移を認める症例では認めない症例よりも RMV が有意に高値であった(p=0.007) . 一方 , 肝転移(H0/H1-3) , 腹膜転移(P0/P1,2) , 傍大動脈リンパ節転移の有無では有意差は認められなかった(各々p=0.58 , 0.68 , 0.22) .

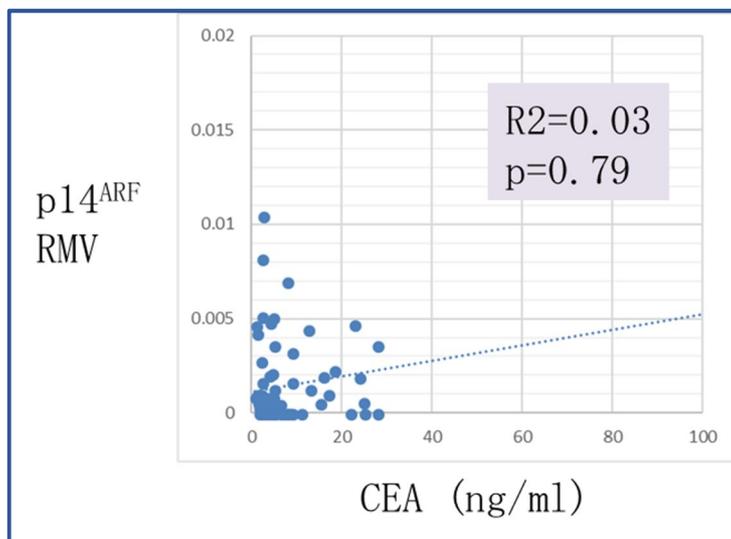


Fig.5 術前血清 CEA 値と RMV の相関

術前血清 CEA 値と RMV の相関について検討すると , 両者に相関は認めなかった(R = 0.03 , p=0.79).

本検討では , 臨床病理学的因子別の解析で , 静脈侵襲を認める症例で血漿中遊離 DNA メチル化レベルが有意に高く , さらに肺転移を認める症例においても有意に高かったことより , 血行性転移 , 特に肺転移との相関の可能性が示唆された . また , 大腸癌における予後予測因子として有用である術前血清 CEA 値と RMV の比較では , 両者に有意な相関を認めなかったことより , 術前血清 CEA 値とは独立した肺転移の予測因子となり得ることが期待されると考えられた . また , 癌組織において p14 遺伝子のメチル化は , Stage などの臨床病理学的因子とは相関を認めない独立した因子であることが報告されているが(Zheng S, et al. Carcinogenesis. 2000; 21: 2057-64.) , 本検討により , 血漿中遊離 DNA におけるメチル化レベルの評価でも , Stage や術前血清 CEA 値とは独立した因子としての有用性が期待できる結果となり , 今後は , 抗癌剤治療中のモニタリングなどへの応用が期待される .

以上より , 今後 , さらに多数例を用いた検証が必要ではあるが , 血漿中遊離 DNA における p14 遺伝子メチル化レベルは肺転移の予測因子として有用である可能性が示唆された .

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 杉本起一
2. 発表標題 大腸癌における血漿中遊離DNAメチル化測定の意義
3. 学会等名 日本消化器外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 杉本起一
2. 発表標題 Circulating Plasma DNA Methylation Status of Tumor Suppressor Genes May be A Biomarker of Lung Metastasis in Colorectal Cancer
3. 学会等名 DDW (国際学会)
4. 発表年 2019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