

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07989

研究課題名（和文）DNA脱メチル化剤治療効果判定の高感度リキッドバイオプシーの開発

研究課題名（英文）Development of a novel liquid biopsy to monitor DNA demethylation

研究代表者

竹島 秀幸（Takeshima, Hideyuki）

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号：40432497

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）：本研究では、『がん細胞内でメチル化されているゲノム領域（即ち、ヌクレオソームを形成している領域）は、血中遊離DNAとして安定に存在する』ことに着目して、脱メチル化をモニターする新規リキッドバイオプシーの開発を目的とした。胃がん細胞において高度にメチル化されており、脱メチル化剤治療後にメチル化レベルが大きく低下する遺伝子を959個同定した。これらのうち46個の遺伝子においてmRNA発現の回復が認められた。これらの遺伝子は、血中遊離DNAを用いた脱メチル化のモニターに応用できる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、脱メチル化剤治療の固形がんへの応用に向けた臨床試験が精力的に展開されている。本研究で得られた候補遺伝子は、固形がんにおける脱メチル化剤治療の効果モニターに応用できる可能性がある。このようなバイオマーカーを用いた脱メチル化の高感度なリキッドバイオプシーの確立は、固形がんに対する脱メチル化剤治療の臨床導入を加速すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to develop a novel liquid biopsy to monitor DNA demethylation after the treatment with a DNA demethylating drug by focusing on the fact that heavily methylated genomic regions in cancer cells could be secreted as cell-free DNA. 959 genes heavily methylated in gastric cancer cells were demethylated 40% or more by the treatment with a DNA demethylating drug. Among these genes, 46 genes were re-expressed. These genes are considered to be useful for monitoring of demethylation using cfDNA.

研究分野：がんエピジェネティクス

キーワード：エピジェネティクス リキッドバイオプシー がん治療

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### 1) 胃がんなどの慢性炎症関連がんでは、DNA メチル化異常が発がんの原因となる

慢性炎症への曝露は、DNA 異常高メチル化を強力に誘発する。DNA メチル化異常は、ヌクレオソーム (DNA がヒストンタンパク質に巻き付いたもの) を形成する (Lin et al., Cancer Cell, 12, 432-444, 2007) ことで、がん抑制遺伝子を不活化する。研究代表者は、胃がんでは既知のがん関連遺伝子の突然変異が存在しない症例も多く存在することを見出しており、そのようながんの発生にはメチル化異常が深く関与することを見出している。

#### 2) 固形がんにおける脱メチル化の高感度なりキッドバイオプシーは確立していない

DNA メチル化異常を標的とした脱メチル化剤治療は、既に血液腫瘍に対して臨床導入されている。脱メチル化剤は、一般的な細胞障害性抗がん剤とは異なり、最大耐容量 (maximum tolerated dose, MTD) ではなく最大生物学的効果用量 (脱メチル化を最も強く誘導) を用いることで高い治療効果が得られる (Tsai et al., Cancer Cell, 21, 430-46, 2012)。また、慢性炎症関連がんに対しても脱メチル化剤治療が有効であることが前臨床研究及び第I相試験により示されている (Zouridis et al., Sci Transl Med, 156ra140, 2012; Schneider et al., Clin Cancer Res, 23, 2673-2680, 2017)。従って、脱メチル化の高感度なりキッドバイオプシーが確立されれば、固形がんに対する脱メチル化剤治療の臨床導入が加速すると考えられる。

#### 3) 血中遊離 DNA を用いたがん組織の脱メチル化モニターには新規手法の開発が必要

がん組織における脱メチル化を低侵襲な方法でモニターするためには、血中遊離 DNA (治療により死滅したがん細胞由来の DNA) の利用が適している。しかしながら、1) 血中遊離 DNA は得られる量が極めて少ない。2) 直接的な DNA メチル化解析にはバイサルファイト処理 (メチル化状態の違いを塩基配列の違いに変換する化学処理) が必要であり、このバイサルファイト処理は DNA 分解を伴う (約 1/10 程度になる)。従って、血中遊離 DNA を用いて脱メチル化をモニターするためには、バイサルファイト処理を伴わない新規手法の開発が必要である。

### 2. 研究の目的

『がん細胞内でメチル化されているゲノム領域 (即ち、ヌクレオソームを形成している領域) は、血中遊離 DNA として安定に存在する』ことに着目し、血中遊離 DNA 中に存在する特定ゲノム領域 (マーカー遺伝子) の量を測定することでバイサルファイト処理を伴わずがん細胞内の脱メチル化をモニターする新規なりキッドバイオプシーを開発する。

### 3. 研究の方法

#### がん細胞株からの疑似的血中遊離 DNA 調製方法の確立

DNA 脱メチル化剤 (デシタピン) 処理した胃がん細胞株 3 種類程度から抽出した細胞核を、最適化した条件でマイクロコッカールヌクレアーゼ (ヌクレオソームを形成している DNA は消化しないが、形成していない裸の DNA は消化する) 処理し、ヌクレオソームを単離する。ここで得られた DNA は、疑似的な血中遊離 DNA であると考えられる。

#### 高感度バイオマーカーの確立

脱メチル化剤処理前後の胃がん細胞株におけるメチル化状態を Infinium MethylationEPIC array により、遺伝子発現状態を SurePrint G3 Human GE array により網羅的に解析、1) 脱メチル化剤処理によるメチル化レベル低下の程度が大きい遺伝子を同定、次に、2) 脱メチル化による遺伝子発現再活性化の程度が大きい遺伝子 20 個程度に絞る。さらに、3) 脱メチル化によりヌクレオソーム構造が消失する遺伝子を 5 個程度同定する。

同定した遺伝子について、脱メチル化剤処理前後のがん細胞株から調製した疑似的血中遊離 DNA を鋳型とした定量的 PCR を行う。脱メチル化剤処理後に、検出される DNA 量 (コピー数) が最も減少する遺伝子を、脱メチル化モニターのマーカー遺伝子とする。

#### がん患者血中遊離 DNA を用いた、がん組織での DNA メチル化予測

脱メチル化モニターのマーカー遺伝子が、がん組織においてメチル化されている患者、及び、されていない患者それぞれ 30 症例程度について、血中遊離 DNA を調製する。定量的 PCR を行うことで、1) がん組織においてマーカー遺伝子がメチル化されている患者では、血中遊離 DNA においてマーカー遺伝子が検出されること、2) メチル化されていない患者では、血中遊離 DNA においてマーカー遺伝子が検出されないことを解明する。その際に、血中遊離 DNA 中のがん関連遺伝子の突然変異頻度を測定することで、がん細胞由来の血中遊離 DNA の割合を算出、解析結果の補正に用いる。

### 4. 研究成果

#### 【平成 30 年度】

がん細胞株からの疑似的血中遊離 DNA 調製方法の確立を行った。脱メチル化剤(デシタピン)で処理した胃がん細胞株(44As3、GC2)及び、大腸がん細胞株(RKO)から抽出した細胞核を、マイクロコッカルヌクレアーゼ処理し、ヌクレオソームを単離した(疑似的な血中遊離 DNA)。得られた DNA の長さを解析した結果、ヌクレオソーム単位の長さの遊離 DNA 断片が得られることを確認した。次に、脱メチル化モニターのマーカー遺伝子を単離するために、脱メチル化剤処理前後の胃がん細胞株 44As3 におけるメチル化状態、及び、遺伝子発現状態をゲノム網羅的に解析した。その結果、処理前は高度にメチル化されており、脱メチル化剤処理によりメチル化レベルが 40%以上低下した遺伝子を 959 個同定した。また、それらの遺伝子のうち 46 個の遺伝子で発現回復が認められることを明らかにした。

#### 【令和元年度】

がん細胞由来の血中遊離 DNA が多く含まれると考えられる肝転移のある Stage 4 の大腸がん患者 20 症例について、がん組織サンプル(原発巣)、非がん組織、血漿サンプルを集積した。集積した血漿サンプルから血中遊離 DNA を抽出・精製した。次に、がん細胞由来の血中遊離 DNA の割合を調べるために、がん組織に存在する突然変異を 409 個のがん関連遺伝子について調べた。その結果、各症例において APC 遺伝子(アレル頻度; 10.2-81.4%)、TP53 遺伝子(アレル頻度; 47.6-76.4%)、KRAS 遺伝子(アレル頻度; 43.6-61.8%)などの突然変異が検出された。20 症例のうち 4 症例について、血中遊離 DNA における変異アレル頻度を、各症例のがん組織における変異アレル頻度が最も高かった遺伝子について解析した。その結果、4 症例のうち 1 症例において、がん細胞由来の血中遊離 DNA が 10%程度存在することが分かった。

#### 【令和 2 年度】

がん細胞由来の血中遊離 DNA が 10%程度存在することが確認できた症例について、血中遊離 DNA がゲノム上のどの領域に由来するかを次世代シーケンサーを用いて解析した。その結果、解析対象とした異常 DNA メチル化の標的となり得る CpG 部位 857,212 ヶ所のうち 172,253 ヶ所(20.1%)が深度 100 以上で血中遊離 DNA として検出された。また、同一患者由来のがん組織、及び、非がん組織の DNA メチル化状態を解析した。その結果、15,487 ヶ所の CpG 部位が、がん組織特異的に異常メチル化されていることが分かった。現在、この血中遊離 DNA として放出されたゲノム領域が、がん組織特異的に高度にメチル化されているゲノム領域とどれくらい一致しているかを調べるために、データの統合解析を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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