

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07771

研究課題名（和文）DNAメチル化を標的とするリキッドバイオプシーを用いた膵癌診断技術の開発

研究課題名（英文）Development of diagnostic technique of pancreatic cancer by using liquid biopsy targeted DNA methylation markers

研究代表者

顧 兆悌（Gu, Zhaodi）

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：40451520

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）：本研究では、我々が独自に開発した高メチル化遺伝子探索法MeTAにより膵癌特異的に高率にメチル化され、転写抑制される6遺伝子のDNAメチル化を標的とするリキッドバイオプシーの技術開発を検討した。膵癌を含めた膵疾患患者の血漿2 mLから得られたcfDNA量は平均17.4 ngであり、高分子のバンドラダーを検出できなかった。現時点でのDNAメチル化の検出は難しいが、血漿サンプリング法やメチル化DNA濃縮法などの検討が必要である。一方、MeTAで同定されたLHX6遺伝子の解析から高メチル化による転写抑制は膵癌細胞の増殖に重要な役割を果たすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MeTAにより同定された膵癌特異的メチル化遺伝子LHX6が膵癌の増殖に関係することから、膵癌の診断、治療のターゲットになる可能性もあり、さらなる検討が必要である。また、本研究から膵疾患患者の血漿から得られるcfDNA量、品質では、現状でDNAメチル化解析に用いることは困難であることがわかった。DNAメチル化を用いたリキッドバイオプシーは、膵癌の早期診断に重要であることから、膵疾患のcfDNAの量、質をカバーする新たな方法を見つけ出す必要がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined the development of a liquid biopsy technique targeting DNA methylation of six genes that are hypermethylated and transcriptionally repressed in pancreatic cancer by MeTA, our proprietary hypermethylated gene search method. The amount of cfDNA obtained from 2 mL of plasma from patients with pancreatic diseases including pancreatic cancer averaged 17.4 ng, and higher molecular weight band ladders were not detected. Although DNA methylation is difficult to detect at this time, methods of sampling plasma and methylated DNA enrichment need to be investigated. On the other hand, analysis of LHX6 gene identified by MeTA revealed that transcriptional repression by hypermethylation plays an important role in pancreatic cancer cell growth.

研究分野：分子病理学

キーワード：癌 ゲノム 遺伝子 膵癌 DNAメチル化 リキッドバイオプシー デジタルPCR qMSP

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

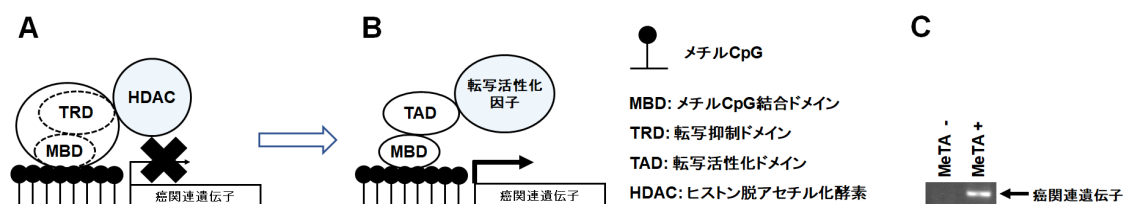
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵癌は近年、増加傾向にあり、2016年の部位別死亡数は肺癌、大腸癌、胃癌に次いで第4位である(国立がん研究センターがん情報サービス「がん登録・統計」)。膵癌は主に膵管上皮に発生し、膵上皮内腫瘍性病変(PanIN)と呼ばれる前癌病変からいくつかの遺伝子異常を経て形成される。早期は無症状で、症状が出た時にはすでに癌が進行していることが多い。5年生存率は10%未満と他の癌と比べ著しく低く、最も治療困難な癌の一つである。しかしながら、膵癌は最初の突然変異から転移を経て癌による死まで約17年を要する(Yachida S et al. Nature 467: 1114-1117, 2010)。したがって、早期発見の方法が見つければ多くの膵癌患者の命を救うことができる。診断には、現在、エコー、CT、MRIなどの画像診断やCEA、CA19-9などの腫瘍マーカー、血清アミラーゼなどの膵酵素を測定する血液検査があるが、特異性、検出感が低く、早期診断には適していない。

近年、採取した血液中の循環腫瘍DNAを用い、癌種に特異的なドライバー遺伝子(癌遺伝子、癌抑制遺伝子)変異を次世代シーケンサーで解析するリキッドバイオプシーが注目されている。この方法は、少量の血液採取で診断が可能な非侵襲的方法であり、それぞれの癌種の腫瘍形成に重要なドライバー遺伝子変異を検出するため高い特異性が得られる。リキッドバイオプシーを用いた非転移性の原発臓器に限局する膵癌の検出感度は2014年の報告(Bettegowda C et al. Sci Transl Med 6: 224ra24, 2014)では40%を越える程度であったが、2018年には蛋白マーカーとドライバー遺伝子のゲノム領域を解析することによって70%以上の感度で検出可能になった(Cohen et al. Science 359: 926-930, 2018)。検出感をさらに向上させ、臨床応用に持っていくためには、DNAメチル化、miRNAなど他の検出ツールの併用が必須となる。この中でもDNAメチル化異常は癌細胞に多数見られ、突然変異検出と異なり1遺伝子あたり基本的に1箇所、PCR等の方法で簡便にメチル化状態を検出できる点が大きなメリットである。

図1. MeTAの概要図



我々はこれまでDNAメチル化情報を下流のエフェクターに伝え、癌関連遺伝子の転写抑制へと導くメチルCpG結合ドメイン(MBD)蛋白の解析に従事した(図1A)。この研究から我々は、一般的なDNAメチル化阻害剤を用いる方法とは全く異なる高メチル化遺伝子探索法MeTA(Methyl-CpG targeted transcriptional activation)法を開発した。MeTA法では、細胞にMBDと転写活性化ドメイン(TAD)の融合遺伝子を導入し、メチル化プロモーターに転写活性化因子をリクルートすることによりメチル化遺伝子を再活性化する(図1B&C)。MeTA法は、DNAメチル化阻害剤とは異なるメカニズムでメチル化遺伝子を再活性化するため、新たなメチル化遺伝子の発見に繋がる可能性を持つ。我々は、12種の膵癌細胞株および正常膵管上皮細胞株にMeTA法を適用し、膵癌細胞株で共通に再活性化される6種の高メチル化遺伝子(NEFL、NEFM、NEFH、NPTX2、LHX6、IRX4)を同定した。

2. 研究の目的

本研究では、まず、(1)MeTA法により膵癌で高度にメチル化し、転写抑制される遺伝子として同定されたLHX6遺伝子について膵癌におけるDNAメチル化および発現低下による細胞増殖への影響を解析する。次に、(2)LHX6遺伝子を含むMeTA法で選択された6種の高メチル化遺伝子(NEFL、NEFM、NEFH、NPTX2、LHX6、IRX4)の膵癌におけるDNAメチル化を標的とするリキッドバイオプシーを技術開発し、早期診断への可能性や予後との関連を調べることを目的とする。

3. 研究の方法

(1)膵癌におけるLHX6遺伝子のDNAメチル化および細胞増殖への影響

12種の膵癌細胞株と正常膵管上皮細胞株HPDEでのLHX6 mRNAレベルを調べるため、各細胞株からtotal RNAを調製しqRT-PCRを実施した。また、これらの細胞株におけるLHX6プロモーター領域のDNAメチル化状態は、ゲノムDNAを用いたバイサルファイトシーケンスおよびメチル化特異的PCR(MSP)によって解析した。さらに細胞株での結果を検証するため、2005年1月~2009年9月に東北大学病院での手術時に得られた膵癌28症例の腫瘍部、正常部からのゲノムDNAを用い、MSPによるメチル化解析を行った。MSPの産物は、4%アガロースゲル電気泳動し、メチル化、非メチル化のバンド強度をImageJソフトウェア(National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA)で定量化した。正常部に比べ腫瘍部でメチル化と非メチル化の比が

2倍以上の場合、腫瘍特異的メチル化があると定義した。

膵癌細胞株で *LHX6* 発現回復による細胞増殖能の変化を見るため、*LHX6* 発現がまったく見られない PK-1、PK-9 膵癌細胞株に Tet リプレッサー (TetR) 発現コンストラクトを導入後、*LHX6* 遺伝子を Tet オペレーター (TetO₂) 下流に挿入した DNA コンストラクトを導入し、テトラサイクリン (tet) 投与により *LHX6* 蛋白を発現誘導する細胞株を作製した。これらの細胞株にテトラサイクリンを投与し、*LHX6* を発現誘導した時の細胞増殖能をアラマブルーアッセイで検討した。一方、*LHX6* を発現する PCI-35、MIA PaCa-2 膵癌細胞株で *LHX6* を siRNA でノックダウンし、同じく細胞増殖能の変化を観察した。

また、*LHX6* 下流遺伝子を探索するため、*LHX6* 発現の有無による遺伝子発現の変化をマイクロアレイで解析した。PK-1、PK-9 の *LHX6* 発現誘導細胞株のテトラサイクリン投与前後の細胞から total RNA を調製し、ラベル化 cRNA のマイクロアレイスライドへのハイブリダイゼーションにより *LHX6* の下流に位置する遺伝子を網羅的に探索した。癌細胞の特性に影響を及ぼすと考えられる重要な遺伝子に関しては、*LHX6* 発現との相関を調べるため、qRT-PCR 法により RNA レベルでの解析をおこなった。これらの解析により *LHX6* がどのような細胞内経路で機能しているのか検討した。

(2) 6種の高メチル化遺伝子を用いたリキッドバイオプシー

膵疾患患者 50 症例 (膵管腺癌 (PDAC) : 37、膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN) : 9、慢性膵炎 (CP) : 4) の血漿 2 mL から QIAGEN 社の QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit を用いて cfDNA (cell-free DNA) を抽出した。このうち 28 症例 (PDAC: 22、IPMN: 4、CP: 2) についてはバイサルファイト処理までおこなった。パイロットスタディとして 2020 年に採取した膵疾患 10 症例 (PDAC: 7、IPMN: 2、CP: 1) について Qubit Fluorometer で cfDNA 量を測定し、パイオアナライザーで cfDNA の品質について検討した。

4. 研究成果

(1) 膵癌における *LHX6* 遺伝子の DNA メチル化および細胞増殖への影響

6 遺伝子の中で転写因子として機能する *LHX6* の膵癌における DNA メチル化状態、膵腫瘍形成における役割を解析した。*LHX6* は、膵癌細胞株では主にプロモーター領域の高度メチル化 (58%, 7/12、図 2A)、ヒストン脱アセチル化により 83% (10/12) で発現低下 (図 2B) し、膵癌原発巣では 57% (16/28) で膵癌特異的に DNA メチル化していた (図 3)。

膵癌細胞株で *LHX6* 発現による細胞増殖能の変化を見るため、*LHX6* 発現がまったく見られない 2 つの膵癌細胞株 (PK-1 および PK-9) を用い、テトラサイクリン投与により *LHX6* 蛋白を発現誘導する細胞株を作製し、細胞増殖能をアラマブルーアッセイで検討した。その結果、PK-1、PK-9 膵癌細胞株は、*LHX6* 発現誘導により細胞増殖が著しく阻害されるという結果を得た (図 4A)。一方、*LHX6* 高発現の PCI-35 膵癌細胞株で siRNA を用い、*LHX6* をノックダウンすると細胞増殖が亢進した (図 4B)。

図2. 膵癌細胞株における *LHX6* のメチル化と発現解析

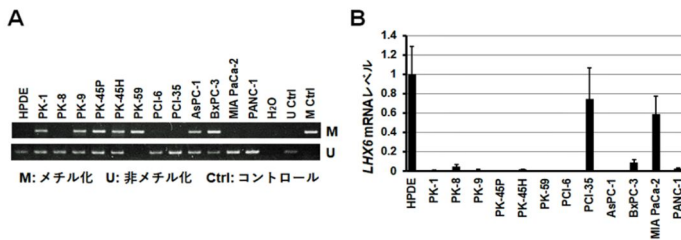


図3. 膵癌原発巣における *LHX6* のメチル化解析

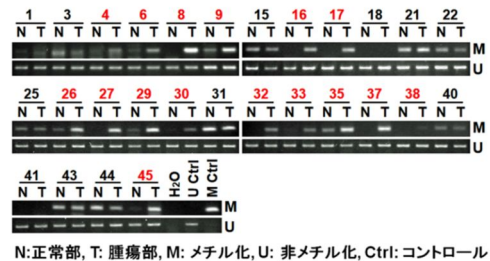
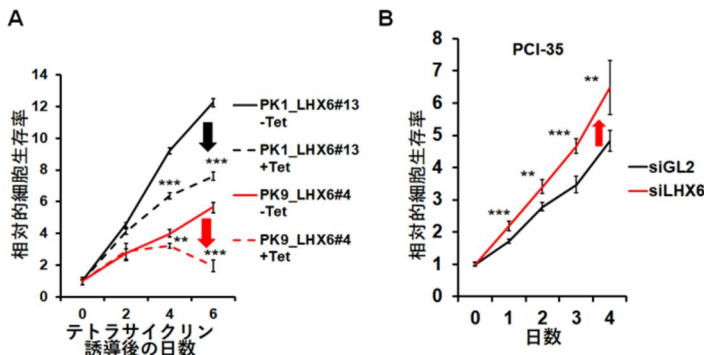


図4. *LHX6* 発現と膵癌細胞増殖能の関係



(A) PK1_LHX6#13、PK9_LHX6#4は、テトラサイクリン投与により *LHX6* を発現誘導する細胞株、
(B) siGL2はコントロール siRNA トランスフェクション、** P < 0.01、*** P < 0.001

膵癌で高率に転写抑制され (図 5)、癌抑制活性をもつことが知られている。これらの結果は、

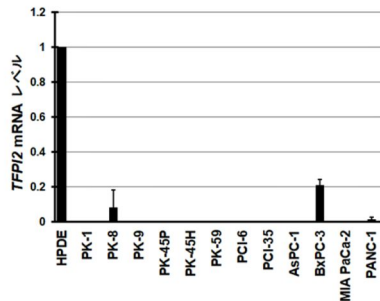
LHX6 は転写因子として機能することが予想されたため、*LHX6* 発現の有無による遺伝子発現の変化をマイクロアレイで解析し下流に位置する遺伝子を網羅的に探索した。2 種の膵癌細胞株、PK-1、PK-9 の *LHX6* 発現誘導細胞株のテトラサイクリン投与前後の細胞から RNA を調製し、ラベル化 cRNA のマイクロアレイスライドへのハイブリダイゼーションをおこなった。その結果、*TFPI2*、*DKK4* 遺伝子など癌抑制活性を有する複数の遺伝子が *LHX6* 発現に伴い PK1、PK9 両細胞株で発現上昇することを見出した (表 1)。この中で *TFPI2* 遺伝子は、

LHX6高メチル化による転写抑制は膵腫瘍形成に重要な役割を果たすことを示唆した。

表1. LHX6誘導によって顕著に発現変化した遺伝子

遺伝子名	PK1_LHX6 #13			PK9_LHX6 #4		
	-Tet	+Tet	発現比	-Tet	+Tet	発現比
発現上昇した遺伝子						
RGN	3.9	26.2	10.0	9.2	564.0	61.2
TFPI2	7.9	23.3	2.9	3.6	80.6	22.5
TMEM51-AS1	10.8	72.3	2.8	5.2	52.0	10.6
RASGRF2	9.9	122.1	12.3	8.6	91.4	10.6
TRIM36	3.4	42.1	12.4	7.7	44.7	5.8
DKK4	59.6	349.5	5.9	56.3	311.6	5.5
LAMB4	4.8	20.5	4.2	3.9	15.5	3.9
OLFM1	4.1	45.8	11.2	5.9	21.4	3.6
発現低下した遺伝子						
ARNT2	45.8	17.3	0.2	16.3	3.8	0.2
MBD2	10.8	4.3	0.4	22.4	5.4	0.2
IGFL2	31.5	15.6	0.5	47.3	8.4	0.2
CRIM1	6.5	3.2	0.2	34.2	4.5	0.1

図5. 膵癌細胞株におけるTFPI2発現レベル



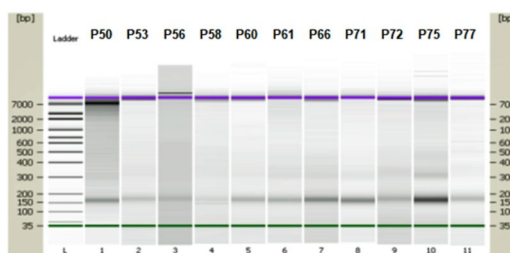
(2) 6種の高メチル化遺伝子を用いたリキッドバイオプシー

リキッドバイオプシーの解析手段としてデジタル PCR 法を採用することにし、6 遺伝子の定量メチル化特異的 PCR (qMSP) に必要なプライマー、Taqman プローブの設計をおこなった。まず、膵疾患 10 症例 (PDAC: 7、IPMN: 2、CP: 1) の患者血漿 2 mL から QIAGEN 社の QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit を用いて cfDNA を抽出し、DNA 量、品質について検討した。その結果、血漿 2 mL から得られた cfDNA 量は平均 17.4 ng (8.7~38.3 ng) であった (表 2)。また、P77 症例 (IPMN) を加えたバイオアナライザーによる品質チェックの結果、162~173 bp の単一バンドが主に観察され、ダイマー、トリマーなどより高分子のバンドラダーは少なかった (図 6)。同時に解析していた前立腺疾患患者の血漿 1 mL から得られた cfDNA 量は、平均 43.8 ng (15.3~212 ng) であり、バイオアナライザーによる品質チェックでも 162~173 bp のバンドだけでなく、ダイマー、トリマーなどより高分子のバンドがはっきりと確認でき、膵疾患の cfDNA パターンとは大きな違いがあった。さらにバイサルファイト処理をおこない、内在性コントロールである アクチンプロモーター領域、膵癌で高メチル化が知られる PCDH10 プロモーター領域、6 遺伝子のうち最も臨床検体でメチル化頻度が高かった NEFM プロモーター領域の qMSP をおこなった。PCDH10、NEFM の PCR 産物は全く見られず、アクチンについても CT 値は 34~undetermined であった (表 2)。これらは、膵疾患患者の血漿から得られた cfDNA 量、品質があまりよくないことを反映していると考えられた。Whole genome amplification による DNA 増幅や nested PCR による検出も試みたが、膵疾患 cfDNA を用いたメチル化 DNA の検出はできなかった。今後、血漿サンプリング法や cfDNA からのメチル化 DNA 濃縮法などをさらに検討する必要があると考えられた。

表2. 膵疾患血漿2 mLから得られたcfDNA量

サンプル番号	膵疾患名	cfDNA量 (ng)	βアクチン qMSP CT値
P50	IPMN	38.3	34.2
P53	PDAC	14.6	36.6
P56	IPMN	14.9	36.4
P58	PDAC	8.7	38.7
P60	PDAC	11.4	38
P61	PDAC	14.1	36.7
P66	PDAC	13	undetermined
P71	PDAC	16.9	37.1
P72	CP	12.5	undetermined
P75	PDAC	29.4	34.4

図6. 膵疾患cfDNAのバイオアナライザーによる解析



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 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kanchan Chakma, Zhaodi Gu, Yakefujiang Abudurexiti, Tatsuo Hata, Fuyuhiko Motoi, Michiaki Unno, Akira Hori, Shinichi Fukushige	4. 巻 111
2. 論文標題 Epigenetic inactivation of IRX4 is responsible for acceleration of cell growth in human pancreatic cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4594-4604
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14644	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 該当する

1. 著者名 Yakefujiang Abudurexiti, Zhaodi Gu, Kanchan Chakma, Tatsuo Hata, Fuyuhiko Motoi, Michiaki Unno, Akira Horii, Shinichi Fukushige	4. 巻 526
2. 論文標題 Methylation-mediated Silencing of the LIM Homeobox 6 (LHX6) Gene Promotes Cell Proliferation in Human Pancreatic Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 626-632
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.03.120	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 ヤクブアブドゥリシディ、堀井明、元井冬彦、海野倫明、福重真一
2. 発表標題 LHX6はエピジェネティックに不活性化される膵癌の癌抑制遺伝子候補である
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
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
研究分担者	元井 冬彦 (Motoi Fuyuhiko) (30343057)	山形大学・医学部・教授 (11501)	

6. 研究組織（つづき）

	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	畠 達夫 (Hata Tatsuo) (30806237)	東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師 (11301)	
研究分担者	福重 真一 (Fukushige Shinichi) (90192723)	東北大学・医学系研究科・特任教授 (11301)	

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			
バングラデシュ	University of Chittagong			