

令和 4 年 5 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16868

研究課題名（和文）cfDNAを用いた大腸癌特異的メチル化マーカーによる大腸癌存在診断法の開発

研究課題名（英文）Diagnosis of colorectal cancer using cfDNA by specific methylation marker

研究代表者

清水 大（SHIMIZU, Dai）

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50723037

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）：大規模公共データを用いて27種類の臓器由来悪性腫瘍に特徴的なDNAメチル化部位を抽出し、DNAメチル化診断パネルを作成した。パネルの診断能は、自施設の大腸癌・胃癌・乳癌の組織検体や、別の公共データベースから得られた腫瘍組織のデータを用いて検証した。結果、人種・検体保存法・DNAメチル化の検出手法によらず、さらに腫瘍内不均一性の影響を受けずに、27種の悪性腫瘍の診断に用いることができることが示された。また、ctDNAのメチル化状態からも、どの臓器由来の悪性腫瘍が存在するかを診断できる可能性が示された。さらには、原発不明癌症例の血液検体からも原発臓器を同定できる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果を発展させることにより、1回の採血や尿検査などのリキッドバイオプシー検査を用いることで、最大27種類の悪性腫瘍の存在を的確に識別可能な検診技術への発展が期待される。単回検査で多癌種の診断が可能となれば、受診負担軽減から検診受診率が向上し、健康予後の改善が期待できる。また、原発不明癌の正確な原発巣診断に活用できる可能性があり、原発不明癌に対してより客観的な原発巣診断ツールとして用いることができ、より適した治療を提供できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We established the Cancer Cell-of-Origin (CACO) methylation panel using the methylation data of the 28 types of cancer in The Cancer Genome Atlas (7950 patients and 707 normal controls) as well as healthy whole blood samples (95 subjects). We showed that the CACO methylation panel had high diagnostic potential with high sensitivity and specificity in the discovery (maximum AUC = 0.998) and validation (maximum AUC = 1.000) cohorts. Moreover, we confirmed that the CACO methylation panel could identify the cancer cell type of origin using the methylation profile from liquid as well as tissue biopsy, including primary, metastatic, and multiregional cancer samples and cancer of unknown primary, independent of the methylation analysis platform and specimen preparation method. Together, the CACO methylation panel can be a powerful tool for the classification and diagnosis of cancer.

研究分野：消化器外科学

キーワード：大腸癌 メチル化 cfDNA

1. 研究開始当初の背景

ctDNA 解析では、癌の体細胞変異・コピー数異常・メチル化異常を検出することが可能である。ctDNA 解析の主流は体細胞変異解析である。しかし体細胞変異は症例間の不均一性が高い。そこで我々は、包括的な存在診断ツールとして DNA メチル化に着目した。ctDNA を用いた 5 遺伝子の特定部位のメチル化解析で、進行再発大腸癌の存在診断で約 80%の感度を達成したとの報告がある (Barault L. *Gut*. 2017)。しかし、Barault らは健常者と比較した大腸癌での異常メチル化を検出対象としたのみであり、他癌腫を鑑別した真に大腸癌特異的なメチル化情報を用いていない。癌腫特異的なメチル化情報を抽出しようとする報告は過去に存在するが、比較癌腫数は最大で 13 種類である (Witte T. *Genome Med*. 2014)。さらに、網羅的に抽出した真に大腸癌特異的なメチル化情報を liquid biopsy に応用した報告はない。

申請時に代表者の所属していた九州大学別府病院外科教室は、これまでに大腸癌の進化と不均一性に着目した研究を行ってきた。2016 年には、進行大腸癌の腫瘍内不均一性とシミュレーションを用いた進化モデルを報告した (Uchi R. *PLoS Genet*. 2016)。2018 年には、大腸粘膜内癌でも腫瘍内不均一性が高いことを明らかにし、先行の進行大腸癌の腫瘍内不均一性と併せ、新たな大腸がん進化モデルを提唱した (Saito T. *Nat Commun*. 2018)。また ctDNA 研究においては、食道扁平上皮癌術後サーベイランスにおいて、変異遺伝子パネルを用いた再発早期診断の有用性を報告した (Ueda M. *Oncotarget*. 2016)。これらの実績から、大腸癌の不均一性を克服しうる、ctDNA を用いた大腸癌の早期診断法の開発を着想した。本研究はこれまでの九州大学別府病院外科教室の知識と技術を生かし、さらに発展させるものである。

2. 研究の目的

本研究の当初の目的は、ctDNA メチル化解析による大腸癌の早期診断である。すでに代表者は、The Cancer Genome Atlas (TCGA) から入手可能な 32 癌腫 9476 検体のメチル化情報を用い、585,577 部位から他癌腫と鑑別しうる大腸癌特異的な異常メチル化部位を 1275 部位抽出しており、大腸癌を独立した cluster として判別するに至っている。さらに liquid biopsy への応用を視野に、健常者全血 95 検体から得られるメチル化情報との比較も行った。また、多くの研究は統計学的有意差のみで癌腫特異的な異常メチル化部位を抽出しているが、さらに実際に ctDNA を用いたメチル化異常の「検出のしやすさ」を考慮した抽出も行う。以上の方法により、大腸癌特異性が高くかつ liquid biopsy として応用性の高い異常メチル化情報を ctDNA 解析に応用し、大腸癌の原発ならびに再発の早期診断を行う。さらに、本研究では血漿検体をすでに有する大腸癌に関して研究を行うが、本手法は大腸癌に限らず他癌腫にも応用可能であり汎用性が高い。本研究の将来的な展望は、各癌腫に特異的なメチル化情報を用いた liquid biopsy による検診であり、検診採血のみで癌腫まで診断できうる手法の開発である。

3. 研究の方法

本研究では、大規模 public database を用い多段階を経て大腸癌特異的な異常メチル化部位の抽出と妥当性の評価を行い、術前血漿検体での感度・特異度、ならびに再発症例の術後経時的血漿検体を用いた再発早期診断への応用性を検討する事で、新たな大腸癌存在診断スクリーニング法を確立する。

◆ **public database** : Illumina HumanMethylation450 で解析された大腸癌を含む 32 癌腫 9476 検体と大腸正常粘膜 45 検体のメチル化アレイ data を TCGA から、健常者全血 95 検体のメチル化アレイ data を NCBI の Gene Expression Omnibus から入手した。それらの data をランダムに 8:2 で Discovery dataset と Validation dataset に分割し、大腸癌特異的なメチル化部位の抽出に用いる。

◆ **癌患者ならびに健常者検体の収集** : 大腸癌患者 62 例の原発巣および大腸正常粘膜、術前後の経時的血漿検体は、連携研究施設である大腸肛門病センター高野病院で採取され、九州大学別府病院外科で凍結保存されている。胃癌・食道癌・乳癌・肺癌・膵臓癌患者の血漿検体を連携研究施設である九州大学病院第一外科および第二外科より収集する。

◆ **大腸癌特異的なメチル化情報の抽出** :

(1) discovery dataset

- ① 32 癌腫中、大腸癌で有意に高メチル化・低メチル化な部位を抽出。
- ② 発癌に関わるメチル化異常に絞るため、大腸癌と大腸正常粘膜間の有意なメチル化変化に限定。
- ③ liquid biopsy に向けて、大腸癌と健常者全血間の有意なメチル化変化に限定。
- ④ 32 癌腫・正常粘膜・健常者全血のメチル化データの分布・平均の差・平均の比を考慮し、「検出のしやすさ」を考慮した絞り込み。

(2) 組織検体のメチル化データを用いた validation

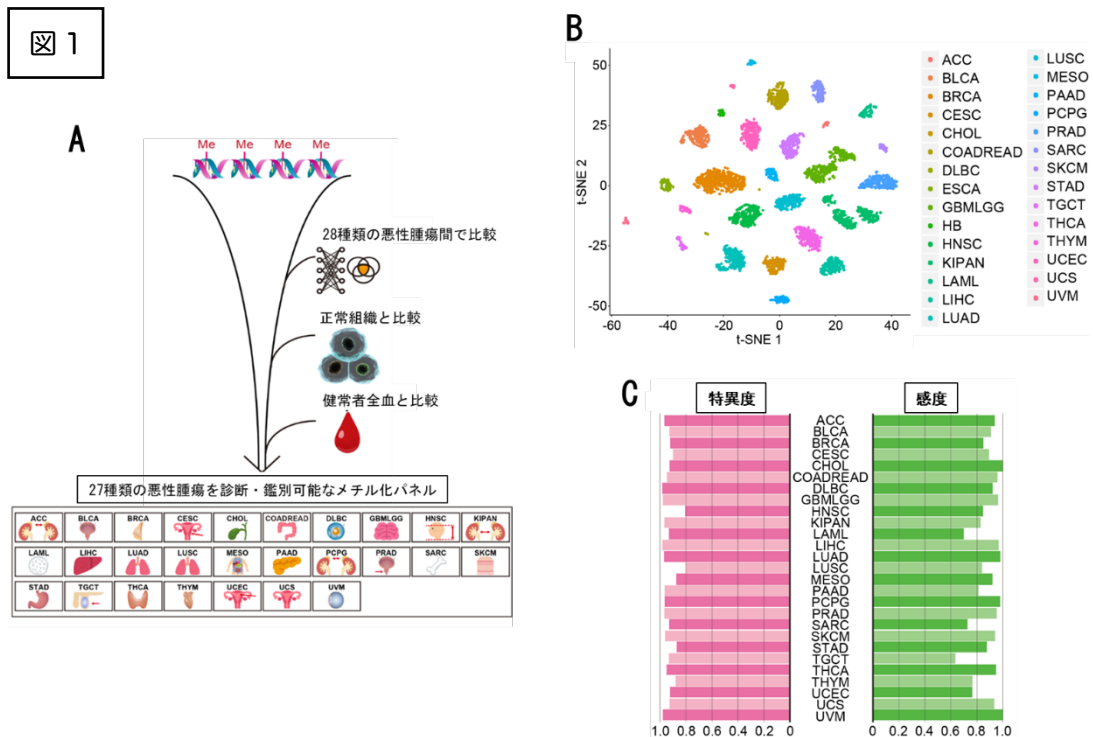
- ① 大腸癌原発巣から抽出した DNA を連携研究施設である九州大学大学院医学研究院医化学分野 (伊藤隆司教授) において、Post-Bisulfite Adaptor Tagging (PBAT) 法を用いた whole genome bisulfite sequencing (WGBS) を行う。
- ② public database から抽出したメチル化情報と PBAT/WGBS で得られたメチル化データを照合し、実際の組織での再現性を確認。

(3) validation dataset

- ① 抽出した大腸癌特異的メチル化部位を用い、大腸癌を鑑別しうるか検証。
 - ② 判別分析などを用い大腸癌を鑑別できる少ないメチル化異常部位の組み合わせを決定。
- ◆ liquid biopsy への応用：上記の過程で決定した大腸癌特異的な異常メチル化部位の組み合わせを用いて、術前での感度・特異度、ならびに再発早期診断への応用性を検討する。大腸癌患者・他癌腫患者・健常者の血漿から ctDNA を抽出し、Genomedia 社に委託し digital PCR によるメチル化検出を行う。

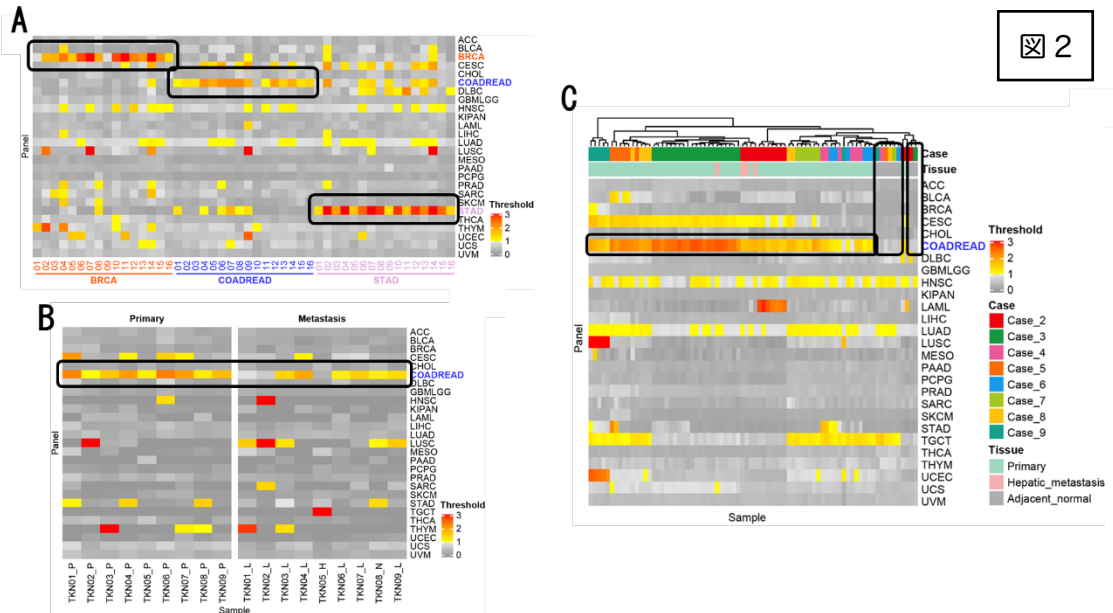
4. 研究成果

公共データベースに登録されている 28 種類の悪性腫瘍の合計 7950 症例から得られた、約 450,000 ヶ所の DNA メチル化データを比較解析することで、27 種類の悪性腫瘍それぞれで特徴的にメチル化されているシトシンを抽出した。また、悪性腫瘍に特徴的な異常メチル化に絞るために 707 症例の正常組織 DNA メチル化データと比較、さらに、採血での診断に用いるために健常者 95 例の全血 DNA メチル化データと比較して、最終的に 2,572 ヶ所の DNA メチル化部位を解析するメチル化パネルを作成した (図 1A)。作成したメチル化パネルは、癌組織に特徴的な DNA メチル化部位を抽出できなかった 1 つの悪性腫瘍を含む 28 種類の悪性腫瘍を明確にクラスタリングして区別することが可能であった (図 1B)。さらに 27 種類の悪性腫瘍に関して、症例分布を β 分布による確率密度曲線に落とし込み、擬陽性と偽陰性が最小となる DNA メチル化値をその悪性腫瘍存在診断の閾値として設定したところ、高い感度と特異度をもって 27 種類の悪性腫瘍を診断可能であった (図 1C)。

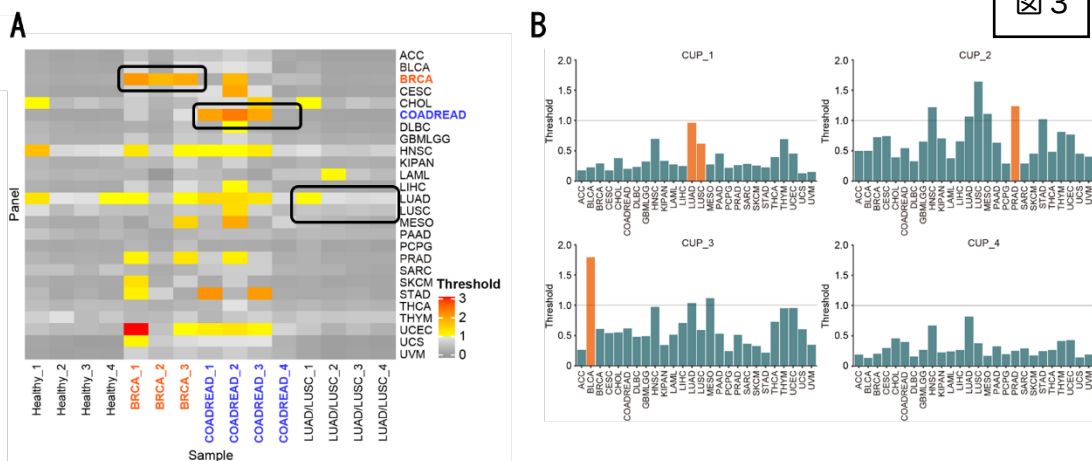


入手した検体を用いて、作成したメチル化パネルの診断能を検証した。まず、乳癌 (BRCA)・大腸癌 (COADREAD)・胃癌 (STAD) の凍結組織検体を対象に、DNA メチル化アレイ検査を用いて DNA メチル化状態を調べメチル化パネルに当てはめたところ、ほぼすべての検体で該当する悪性腫瘍として診断可能であった (図 2A)。メチル化パネルの作成に使用した公共データベースは、主に欧米人のデータで構成されており、一方で、検証に用いた検体は日本人検体であるため、作成したメチル化パネルは人種によらず使用可能であることが示唆された。次に、大腸癌 (COADREAD) 症例の原発巣組織と転移巣組織を用いた検討を行った。原発巣は凍結組織検体、転移巣は常温で保存されたパラフィン包埋検体を用い、高速シーケンサーにより DNA メチル化を検出した。その結果、転移巣ではやや精度が落ちるものの、ほとんどの検体を大腸癌として診断可能であり、組織検体の保存法や DNA メチル化検出手法によらずにメチル化パネルが適応可能であり、転移

巢を用いた解析でも原発臓器を識別可能であることが示された (図 2B)。最後に、大腸癌 (COADREAD) 患者 8 症例において、同一症例の同時複数箇所から検体を採取した凍結組織検体 (多領域生検検体) を対象に、DNA メチル化アレイ検査を用いて DNA メチル化状態を調べ、メチル化パネルを適応した。その結果、ほぼすべての症例において、大腸癌組織は大腸がんと診断され、正常組織は大腸癌組織とは完全に区別された。さらに症例ごとの検体は、まとめてクラスタリングされた (図 2C)。この結果から、作成したメチル化パネルの診断能は腫瘍内不均一性の影響を受けにくいことが示された。



公共データベースから悪性腫瘍患者の血液検体メチル化データを入手し、作成したメチル化パネルが ctDNA を対象とした採血検査に応用可能か検証した。健常者・乳癌 (BRCA)・大腸癌 (COADREAD)・肺癌 (LUAD/LUSC) 患者の血液検体を用いた検証では、健常者での擬陽性率はわずか 3.7%であり、乳癌 (BRCA)・大腸癌 (COADREAD) はほとんどの症例で該当する悪性腫瘍として診断可能であった (図 3A)。一方、肺癌症例の血液検体では、血液中に含まれる ctDNA の量が少ないことが原因で肺癌として検出することが難しく、今後の ctDNA メチル化解析技術の開発が期待される。最後に、原発不明癌患者の血液データを対象に、メチル化診断パネルにより原発巣推定が可能であるか検証した。その結果、メチル化診断パネルを用いた原発巣推定は、臨床経過から予想された原発巣と概ね一致した (図 3B)。作成したメチル化パネルは、血液検体を用いた悪性腫瘍の部位特定や原発不明癌を対象とした原発巣の推定に有用である可能性が示された。



今回の研究では、DNA メチル化パネルを開発し、主に腫瘍組織のデータを用いることで 27 種類の悪性腫瘍を鑑別・診断できることが示された。将来的に、ctDNA のメチル化解析技術の開発が進めば、より高い精度で血液検査による診断に応用できるようになる。1 回の採血で最大 27 種類の悪性腫瘍が診断できる検診技術の開発を目指す。さらに、この技術を尿検査に応用することで、尿の郵送だけでできる悪性腫瘍検診技術の開発を目標とする。また、希少癌の 1 つである原発不明癌の治療は、転移パターン・腫瘍マーカー・免疫染色などの状況証拠から原発臓器を推

定して行われている。今回の研究で、転移巣のサンプルから原発臓器を診断可能なことが示されたため、メチル化パネルは原発不明癌の原発巣の推定に役に立つと考えられる。DNAメチル化という客観的なデータに基づき、より高い精度で原発巣を診断できれば、より適切で効果的な治療を提供する事ができ、原発不明癌患者の予後改善が期待できる。今後は、原発不明癌のサンプルを研究対象とすることで、その精度の検証を行っていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Shimizu Dai, Taniue Kenzui, Shiraiishi Kenji, Miyamoto Yuji, Tsukamoto Seiichi, Komine Aya, Kobayashi Yuta, Kitagawa Akihiro, Yoshikawa Yukihiro, Sato Kuniaki, Saito Tomoko, Ito Shuhei, Masuda Takaaki, Niida Atsushi, Suzuki Makoto, Baba Hideo, Ito Takashi, Akimitsu Nobuyoshi, Kodera Yasuhiro, Mimori Koshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Pan-cancer methylome analysis for cancer diagnosis and classification of cancer cell of origin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Gene Therapy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41417-021-00401-w	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 -

〔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
---------	---------