

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08328

研究課題名(和文) 消化器がん化学療法における新規バイオマーカーとしてのDNAメチル化の探索的研究

研究課題名(英文) Exploratory analysis of DNA methylation as a novel biomarker in gastrointestinal cancer chemotherapy

研究代表者

前田 修 (Maeda, Osamu)

名古屋大学・医学部附属病院・病院准教授

研究者番号：20378053

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)：化学療法を受ける食道がんおよび胃がんの腫瘍検体からDNAおよびRNAを抽出し、血液検体からは腫瘍由来循環DNAを抽出した。遺伝子変異、遺伝子発現、DNAメチル化の網羅的解析を行った。抗がん薬耐性細胞株でDNAメチル化に変化が見られた185遺伝子について、シスプラチンとフルオロウラシルを含む化学療法前後の血液由来のctDNAのメチル化レベルは、SPTSSBは化学療法後に上昇し、CD81およびFASTKは低下し、その変化は抗がん薬耐性細胞株でみられた変化と合致した。抗がん薬耐性に関わるDNAメチル化レベルの変化がctDNAにおいても検出できる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

化学療法施行中に繰り返し腫瘍組織を採取することは一般的には多くないが、食道がんや胃がんは、がん薬物療法の経過中に、原発巣の縮小効果判定のために消化管内視鏡検査と生検を行い、繰り返し腫瘍組織を採取することがある。腫瘍検体と血液から得られる腫瘍由来のctDNAを用いて、がん薬物療法の効果とctDNAのメチル化の関連を評価した。腫瘍とctDNAのメチル化、さらに薬剤感受性の関連を解析することによって、より低侵襲の最適ながん薬物療法の選択法を開発できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：DNA and RNA were extracted from tumor samples from esophageal and gastric cancers undergoing chemotherapy, and tumor-derived circulating DNA was extracted from blood samples. Comprehensive analysis of gene mutation, gene expression, and DNA methylation was performed. Methylation levels of blood-derived ctDNA before and after chemotherapy with cisplatin and fluorouracil for 185 genes whose DNA methylation was altered in the anti-cancer drug-resistant cell lines, SPTSSB increased and CD81 and FASTK decreased after chemotherapy, which were consistent with the changes seen in the anti-cancer drug-resistant cell lines. The changes were consistent with those seen in anticancer drug-resistant cell lines. The results suggest that changes in DNA methylation levels associated with anticancer drug resistance may also be detectable in ctDNA.

研究分野：がん薬物療法

キーワード：DNAメチル化 循環腫瘍DNA 食道癌 胃癌 がん化学療法

## 1. 研究開始当初の背景

上部消化管がん（胃がんおよび食道がん）の薬物療法には、フッ化ピリミジン、白金製の剤、およびタキサン系などの細胞障害性抗がん薬が用いられる。分子標的薬として胃がんについては抗 HER2 抗体薬、血管新生阻害薬が実臨床に導入されている。さらに、胃がんに対しては免疫チェックポイント阻害薬（immune-checkpoint inhibitor, ICI）である抗 PD-1 抗体薬が保険承認された。これらの薬剤の治療効果を予測できる新たなバイオマーカーが必要とされている。

塩基配列の変化を伴わない遺伝子変化（エピジェネティック変化）の主要なもののひとつである DNA メチル化は、遺伝子機能調節と密接に関係し、腫瘍発生および増殖に重要な役割を果たしている。米国の大型ゲノムプロジェクトである The Cancer Genome Atlas (TCGA) における腫瘍のサブタイプ分類においても DNA メチル化が重要な因子となっている（Nature 541(7636):169-175, 2017, Nature 541(7636):169-175, 2017）。DNA メチル化はがん薬物療法の効果予測マーカーとしての報告があり、ICI の効果予測としても DNA メチル化が有望であることを示唆する報告（Xue G et al. Front Genet 2019）があるに過ぎない。

## 2. 研究の目的

これらの一連の薬物療法の有用性を判断するために、ある一時点での画像診断による効果判定のみではなく、治療の全経過を通じてベネフィットがあるかどうかを評価できる方法あるいは効果を予測する方法が必要と考えられる。そのためにはバイオマーカーを診断時や治療開始前のみでなく、治療開始後の経過中に繰り返し評価することが必要と考えられる。

腫瘍および血中循環腫瘍 DNA（circulating tumor DNA, ctDNA）の DNA メチル化プロファイルを含むバイオマーカーを化学療法施行前および治療経過中に繰り返し解析することにより、薬剤の感受性や耐性を早期に予測し、化学療法の治療選択の個別化が可能となるのではないかとのことである。臨床的な判断により選択された化学療法レジメンの施行前後の腫瘍および ctDNA の遺伝子変化、および次のレジメン選択後の治療効果を統合的に解析することにより、新規バイオマーカーを見出すとともに、薬剤耐性化機序に関わる分子機構の解明につながる知見を得ることを目指す。

## 3. 研究の方法

化学療法を受ける食道がんおよび胃がん患者から同意を得て、診療上必要な内視鏡検査を施行する際に、同時に研究用の生検検体を採取した。また、診療上必要な採血を行う際に同時に研究用の採血を行った。腫瘍検体から DNA および RNA を抽出し、血液検体からは腫瘍由来循環 DNA を抽出した。一部の症例では臨床経過に伴い、複数回の内視鏡検査が施行され、その際に臨床経過による腫瘍由来遺伝子の変化を解析するために研究用の生検検体を収集した。

一方で、化学療法の有効性と耐性に関与する可能性のある遺伝子について過去の報告及び公開されているデータベースから、候補となる遺伝子を抽出した。これらの病態と関連が考えられる遺伝子について遺伝子変異、遺伝子発現、DNA メチル化等の解析を行うとともに、次世代シーケンシング及びマイクロアレイを用いた網羅的解析を行った。

並行して電子カルテから化学療法の腫瘍縮小効果および副作用等の臨床情報を収集して、経時的な遺伝子変化との関連の解析を行った。さらに、胃癌培養細胞株 AGS のシスプラチンおよびフルオロウラシルの耐性株について、シスプラチンおよびフルオロウラシルの耐性株に関わる DNA メチル化の変化をメチル化アレイで網羅的に解析した。

## 4. 研究成果

抗がん薬耐性細胞株で DNA メチル化に変化が見られた 185 遺伝子について、腫瘍と ctDNA のメチル化レベルの相関は、R2 が 0.48~0.71 とばらつきがあった（図 1A, B）。シスプラチンとフルオロウラシルを含む化学療法前後の血液由来の ctDNA のメチル化レベルは、*SPTSSB* は化学療法後に上昇し、*CD81* および *FASTK* は低下し、その変化は抗がん薬耐性細胞株でみられた変化と合致した（表 1）。抗がん薬耐性に関わる DNA メチル化レベルの変化が ctDNA においても検出できる可能性が示唆された。

これらの遺伝子は腫瘍増殖や薬剤感受性と関連する可能性がある。*SPTSSB* は卵巣がんのシスプラチン感受性との関連の報告があり（Liu J et al. Transl Oncol. 2023;37:101762.）、*CD81* は腫瘍の増殖と転移に寄与し（Vences-Catalán F et al. Biochem Soc Trans. 2017;45(2):531-53）、*FASTK* は腫瘍の浸潤や薬剤耐性との関連が報告されている（Ramasubramanian A et al. Bioinformatics. 2022 Mar 31;18(3):206-21）。

図1.A, B: 腫瘍 DNA と ctDNA のメチル化レベルの相関

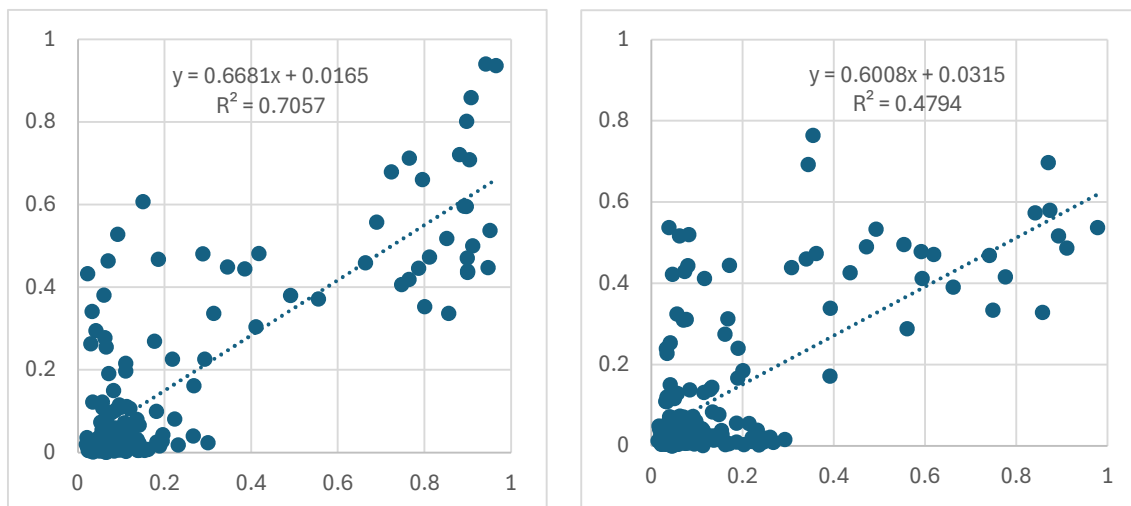


表1. 薬剤耐性細胞株と ctDNA のメチル化レベルの比較

	細胞株メチル化				ctDNAメチル化			
	細胞株	5FU耐性細胞株	CDDP耐性細胞株	5FU耐性メチル化の差	CDDP耐性メチル化の差	化学療法前	化学療法後	メチル化の差
<b>SPTSSB</b>	0.005	0.553	0.301	<b>0.548</b>	<b>0.296</b>	0.226	0.500	<b>0.274</b>
<b>CD81</b>	0.697	0.480	0.444	<b>-0.217</b>	<b>-0.253</b>	0.301	0.038	<b>-0.263</b>
<b>FASTK</b>	0.758	0.491	0.150	<b>-0.267</b>	<b>-0.608</b>	0.888	0.339	<b>-0.549</b>

化学療法施行中に繰り返し腫瘍組織を採取することは一般的には多くないが、食道がんや胃がんは、がん薬物療法の経過中に、原発巣の縮小効果判定のために消化管内視鏡検査と生検を行い、繰り返し腫瘍組織を採取することがある。腫瘍検体と血液から得られる腫瘍由来の ctDNA を用いて、がん薬物療法の効果と ctDNA のメチル化の関連を評価した。腫瘍と ctDNA のメチル化、さらに薬剤感受性の関連を解析することによって、より低侵襲の最適ながん薬物療法の選択法を開発でき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
研究分担者	近藤 豊  (Kondo Yutaka)  (00419897)	名古屋大学・医学系研究科・教授   (13901)	
研究分担者	安藤 雄一  (Ando Yuichi)  (10360083)	名古屋大学・医学部附属病院・教授   (13901)	
研究分担者	藤城 光弘  (Fujishiro Mitsuhiro)  (70396745)	名古屋大学・医学系研究科・教授   (13901)	削除：2021年9月16日
研究分担者	古川 和宏  (Furukawa Kazuhiro)  (70624310)	名古屋大学・医学系研究科・講師   (13901)	

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