

令和 5 年 6 月 25 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18197

研究課題名（和文）子宮体癌患者血液ctDNAを用いたMLH1-高メチル化解析法の確立

研究課題名（英文）Analysis of MLH1-high methylation in ctDNA-liquid biopsy from uterine endometrial cancer

研究代表者

出口 蓉子（Deguchi, Yoko）

和歌山県立医科大学・医学部・准客員研究員

研究者番号：00869612

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）：子宮体癌ではMSI-high症例に対する抗PD-1抗体が承認されているが、腫瘍組織を用いた検査のみになる。腫瘍組織MSI検査の代替として、MLH1のプロモーター領域の高メチル化があり、今回子宮体癌血液中ctDNA-Liquid BiopsyによるMLH1-高メチル化解析法を確立することを目標とした。検体収集は順調であったが、ctDNA-Liquid Biopsyレベル十分な精度で検出する系を確立するのに難渋した。3手法でMLH1-高メチル化をctDNA-Liquid Biopsyから解析検討し、感度および特異度がかなり高い条件での検出が可能となった。今後他癌腫にも応用できると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで解明されていなかった、子宮体癌患者血液ctDNAを用いたMLH1-高メチル化解析法について検討し、有用性を示せた。個別化医療に対しては今後はctDNA-Liquid Biopsyは必須項目となってくることが考えられ、研究成果の学術的意義や社会的意義は高いと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Here, we show the usefulness of liquid biopsy in uterine endometrial cancer.

In this study, we examined the MLH1-high methylation in ctDNA-liquid biopsy from uterine endometrial cancer patients. We established high accuracy degree of the MLH1-high methylation in ctDNA-liquid biopsy. These findings suggest that the characterization of the genetic profiles of independent tumors using liquid biopsy may lead to the development of novel personalized treatment strategies in uterine endometrial cancer.

研究分野：産婦人科

キーワード：リキッドバイオプシー 子宮体癌

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦における子宮体癌の罹患数は年間に約 **15,000** 例、死亡数は年間に約 **2,100** 例と言われているが、罹患数/死亡数ともに年々増加している。子宮体癌の治療は手術療法による摘出が主体となり、完全摘出可能な初期癌の生存率は **90%** 以上と良好であるのに対し、化学療法抵抗性の進行/再発症例や特殊組織型の症例の予後は不良であり、予後改善のためには新規治療戦略の確立が必要である。

肺癌や大腸癌などの悪性腫瘍では患者個々の癌の遺伝子プロファイルに合わせた **Precision medicine** 研究が進められ、多種の分子標的薬が臨床導入されているのに対し、子宮体癌ではマイクロサテライト不安定性陽性 (**MSI-high**) 症例に対する **pembrolizumab** (抗 **PD-1** 抗体) が承認されているのみである。子宮体部類内膜癌では **20~40%** で **MSI-high** をきたしており、大腸癌と並んで **MSI-high** の生じやすい癌種となっている。**MSI-high** を示す子宮体癌では遺伝子変異の総数が多く、ネオアンチゲン数も多くなると考えられ、免疫チェックポイント阻害薬の有効性が期待されるため、子宮体癌の分子生物学特性において **MSI** の有無は重要な因子となりうる。**MSI-high** の要因であるミスマッチ修復 (**MMR**) 遺伝子には **MLH1**, **MSH2**, **MSH6**, **PMS2** などが挙げられ、生殖細胞系列に遺伝子変異が生じる **Lynch** 症候群の **Lynch** 性子宮体癌と、体細胞系列 (ごくまれに生殖細胞系列) の **MLH1** のプロモーター領域の高メチル化による欠失が原因の孤発性 (非 **Lynch** 性) 子宮体癌に分類される。子宮体癌全体の頻度としては **Lynch** 性子宮体癌が **2~5%**、孤発性子宮体癌が **20~45%** と **MLH1**-高メチル化の頻度が高く、特に **MSI-high** 症例の中では **91%** に **MLH1**-高メチル化が認められ、**MLH1**-高メチル化の検出により **MSI-high** 症例の鑑別や、免疫チェックポイント阻害薬の薬剤選択マーカーとして使用できる可能性がある。現在腫瘍組織を用いた **MSI** 検査が保険収載され、腫瘍組織の **MLH1**-高メチル化に関する研究が進められているが、腫瘍組織を用いた遺伝子検査の問題点として、腫瘍細胞含有率や経年劣化により判定不能となる場合や、進行/再発症例で新たに腫瘍組織を採取することが困難な症例では解析できない可能性がある。

近年のがんゲノム医療において、腫瘍組織の遺伝子解析のみならず、低侵襲的に採取し得る末梢血中腫瘍循環 DNA (**circulating tumor DNA: ctDNA**) の **Liquid Biopsy** による遺伝子解析が注目されている[図 1]。血液中には僅かながら癌細胞からアポトーシス・ネクローシスなど様々な機序で **ctDNA** が末梢血に放出されており、ゲノム解析技術の発展により、血液中のわずかな **ctDNA** から腫瘍の遺伝子変異を検出することが可能となった。侵襲的な処置が必要となる原発巣や転移巣の手術・生検検体に代わり、より簡便で低侵襲に、繰り返し経時的に腫瘍特有の遺伝子異常を解析することが可能となり、子宮体癌の **Precision medicine** 研究を進める上で、腫瘍組織による遺伝子解析だけでなく、**Liquid Biopsy** 研究の導入が求められている。子宮体癌において、これまでに腫瘍組織の **MLH1**-高メチル化と **MSI-high** に関連があることや、腫瘍組織における **MLH1**-高メチル化が無病増悪期間などの患者の予後に関連したという報告がされているが、子宮体癌患者の血液検体を用いた **MLH1**-高メチル化の解析および予後との関連に関する研究結果は現在のところ報告されていない。

本研究課題の核心をなす学術的「問い」として、子宮体癌における①腫瘍組織内の **MSI-High** や **MLH1**-高メチル化は、血液 **ctDNA** の **MLH1**-高メチル化と関連があるか、②血液 **ctDNA** の **MLH1**-高メチル化が予後予測因子として有用性があるか、を挙げ、以下の研究を計画した。

2. 研究の目的

申請書らは婦人科癌における **Liquid biopsy** 研究を以前から開始しており、婦人科癌の **CAPP-seq (cancer personalized profiling by deep sequencing)** を用いた **ctDNA-Liquid biopsy** による網羅的解析の有用性について報告してきた[図 2] (**Iwahashi et al., Sci Rep, 2019 / Iwahashi, et al., Oncol Lett, 2018**)。子宮体癌は他癌種に比べると **Precision medicine** 研究が遅れている領域であり、臨床応用されているコンパニオン診断検査薬は進行/再発症例に対する腫瘍組織を用いた **MSI** 検査のみである。新たな子宮体癌の **Precision medicine** 研究として、これまでの申請書らの研究経験をもとに、子宮体癌における **ctDNA-Liquid biopsy** を用いた遺伝子解析に着目した本研究を計画した。

これまでに、子宮体癌の腫瘍組織を用いて **Methylation Specific PCR** 法 (**MSP** 法) により腫瘍組織中の **MLH1**-高メチル化検出を行い、**MSI-high** との相関関係や予後予測因子の検討についての報告はいくつかある。しかし、腫瘍組織を用いた解析の欠点として、採取からの年数による腫瘍組織の状態に左右される点や、進行/再発症例で腫瘍組織を採取できない場合はリアルタイムな腫瘍特性を解析できない点がある。そこで本研究では、子宮体癌患者血液 **ctDNA-Liquid Biopsy** を用いた **MLH1**-高メチル化検出を行い、腫瘍組織の **MSI-High** や **MLH1**-高メチル化解析とも比較しながら、婦人科癌治療における新規治療バイオマーカーとしての **ctDNA-Liquid Biopsy** による **MLH1**-高メチル化解析法の確立を目的とすることに独創性かつ創造性がある。

さらに、本研究により **ctDNA-Liquid Biopsy** による **MLH1-高メチル化** 解析法が確立されれば、子宮体癌のみならず大腸癌などの **MSI-high** 関連癌においても応用し簡便かつ低侵襲に解析することが可能となり、発展性がある。

3. 研究の方法

(1) 検体のサンプリング

本研究に関して和歌山県立医科大学及び近畿大学医学部の倫理委員会の承認を得ており、子宮体癌症例の検体採取を開始している。個別にインフォームドコンセントを行い、文書にて本研究に同意を得られた症例を対象とする。血液検体は **ctDNA** の品質を保つために **cell-free DNA collection tubes** を用い採取する。腫瘍組織は、手術で得られた標本の一部を研究用腫瘍組織検体として採取する。子宮体癌 **100** 症例の血液と腫瘍組織検体を解析対象とする [図 3]。

(2) 腫瘍組織検体を用いた **MMR** 蛋白の発現解析

腫瘍組織を用い子宮体癌の **MMR** 蛋白 (**MLH1**, **MSH2**, **MSH6**, **PMS2**) の発現について免疫組織化学染色を行い解析し、全てが正常に発現している **MMR** 正常 (**pMMR**) 群と、1 つでも発現が欠失している **MMR** 欠損 (**dMMR**) 群に分類した。

(3) 腫瘍組織検体を用いた **MSI** 解析

腫瘍組織検体から **DNA** 抽出を行い、**National Cancer Institute** より推奨されている 5 種類の **MSI** マーカー (**BAT 26**, **NR 21**, **BAT 25**, **MONO 27**, **NR 24**) を使用し、**ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)** を用いて解析を行い、陽性が 2 つ以上を **MSI-high** 群、陽性が 1 つで **MSI-low** 群、5 つのマーカーすべて陽性でない場合は **MSI-stable** 群と分類する。

(4) 血液からの **ctDNA-Liquid Biopsy** を用いた **MLH1-高メチル化** 解析

血液検体より **ctDNA** を抽出し、**EpiScope MSP Kit (Takara Bio)** を用いてバイサルファイト処理を行う。メチル化 **DNA** と非メチル化 **DNA** のプライマーを作成し、**StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)** でメチル化解析を行い、電気泳動でも増幅の確認を行う。

(5) 腫瘍組織の **MSI-high/dMMR** と血液検体の **MLH1-高メチル化** の頻度と臨床データとの関係

子宮体癌全体における腫瘍組織の **MSI-high/dMMR** と血液検体の **MLH1-高メチル化** の頻度を算出する。さらに、臨床病理学的特徴(年齢、手術進行期分類、組織分化度、組織型、筋層浸潤、頸部間質浸潤、脈管侵襲など)との関連について、後方視的検討を行う。

(6) 腫瘍組織の **MSI-high** と血液検体の **MLH1-高メチル化** の相関と臨床データとの関係

血液検体の **MLH1-高メチル化** と腫瘍組織からの **MSI-high** との相関について検討を行い、子宮体癌において血液検体からの **MLH1-高メチル化** 検出が腫瘍組織の **MSI-high** 検出の代替となるかを検討する。さらに血液検体の **MLH1-高メチル化** 群と非メチル化群の 2 群間で、治療の奏効率、無増悪期間についても **log rank** 検定を用いて **Kaplan-Meier** 法で解析し、血液検体の **MLH1-高メチル化** が治療感受性などの予後予測バイオマーカーになるか検討する。

バイサルファイト処理前	オリジナル配列	5'- CCTCGTAGTGGCGCCTGACGTGCGCTTCGCGGGTAGCTACGATGAGGCGGCGACAGACCA -3'
バイサルファイト処理後	メチル化アレル	5'- TTTTCGTAGTGGCGTTTGACGTGCGCTTCGCGGGTAGTTCGATGAGGCGGCGATAGATTA -3'
	非メチル化アレル	5'- TTTTCGTAGTGGTGTGTTGATGTTGTGTTTGTGGGTAGTTATGATGAGGTGGTATAGATTA -3'
バイサルファイト処理前	オリジナル配列	5'- GGCACAGGGCCCATCGCCCTCGGAGGCTCCACCACCAATAACGCTGGGTCCACTCGG -3'
バイサルファイト処理後	メチル化アレル	5'- GGTATAGGGTTTTATCGTTTTTCGGAGGTTTTATTATAAATAACGTTGGGTTTATTCGG -3'
	非メチル化アレル	5'- GGTATAGGGTTTTATGTTTTTGGAGGTTTTATTATAAATAATGTTGGGTTTATTTGG -3'
バイサルファイト処理前	オリジナル配列	5'- GCGGAAAACCTAGAGCCTCGTGGACTTCCATCTTGCTCTTTTGGGCGTCATCCACATTC -3'
バイサルファイト処理後	メチル化アレル	5'- GTCGGAAAATTAGAGTTTCGTGGATTTTTATTTTGTGTTTTTGGGCGTATTATATATTT -3'
	非メチル化アレル	5'- GTTGGAAAATTAGAGTTTGTGATTTTTATTTTGTGTTTTTGGGTTGTTATTATATATTT -3'
バイサルファイト処理前	オリジナル配列	5'- TCGGGAGGCCACAAGAGCAGGGCCAACGTTAGAAAGGCCCAAGGGGAGAGGAGGAGCC -3'
バイサルファイト処理後	メチル化アレル	5'- TCGGGAGGTTAATAAGAGTAGGGTTAACGTTAGAAAGGTCGTAAGGGGAGAGGAGGAGTT -3'
	非メチル化アレル	5'- TGTGGAGGTTAATAAGAGTAGGGTTAATGTTAGAAAGGTTGTAAGGGGAGAGGAGGAGTT -3'

「|」配列に連いのない位置、「:」脱アミノ化によりCに変換されたCの位置、「+」 CpGジメチル化の位置

図 バィサルファイト配列

4. 研究成果

バイサルファイト法により、**MLH1**-高メチル化コントロール細胞を標品として、**ddPCR** による高感度な **MLH1**-高メチル化を検討した。3 手法で検討し、検討法及び **PCR** 条件は守秘とするが、最も感度及び特異度の高い手法を確立した（図）。

子宮体癌病理組織を用いた免疫化学組織染色で **MMR** 蛋白 (**MLH1** **MSH2** **MSH6** **PMS2**) の発現を評価することができた。絞り込んだ **MLH1** 陰性の症例の組織を用い、**DNA** を抽出し、上記の **ddPCR** 法で解析することができた。同症例の血漿からの **ctDNA** 抽出は終了しており、今後は **ctDNA** を上記の **ddPCR** 法で解析を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 Noguchi Tomoko, Iwahashi Naoyuki, Sakai Kazuko, Matsuda Kaho, Matsukawa Hitomi, Toujima Saori, Nishio Kazuto, Ino Kazuhiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Comprehensive Gene Mutation Profiling of Circulating Tumor DNA in Ovarian Cancer: Its Pathological and Prognostic Impact	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 3382 ~ 3382
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers12113382	査読の有無 無
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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Tomoko Noguchi, Naoyuki Iwahashi, Kaho Matsuda, Hitomi Matsukawa, Yasushi Mabuchi, Shigetaka Yagi, Kazuhiko Ino
2. 発表標題 Utility of profiling somatic mutation in circulating tumor DNA and blood tumor mutation burden detected by liquid biopsy in ovarian cancer.
3. 学会等名 第72回 日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野口 智子、岩橋 尚幸、馬淵 泰士、八木 重孝、南 佐和子、坂井 和子、西尾 和人、井籠 一彦
2. 発表標題 卵巣癌における血中腫瘍細胞由来DNAの網羅的遺伝子変異解析とbTMB測定の有用性
3. 学会等名 第62回 日本婦人科腫瘍学会学術講演会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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