

27 種類の悪性腫瘍を同時に診断・鑑別可能な DNA メチル化パネルの作成に成功

国立大学法人東海国立大学機構名古屋大学大学院医学系研究科消化器外科学の清水大（しみずだい）助教・小寺泰弘教授、東京大学アイソトープ総合センターの谷上賢瑞（たにうえけんずい）特任准教授・秋光信佳（あきみつのぶよし）教授、名古屋大学大学院医学系研究科総合保健学の松井佑介（まついゆうすけ）准教授、東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカル情報生命専攻の波江野洋（はえのひろし）特任准教授、九州大学病院別府病院外科の三森功士（みもりこおし）教授らのグループは、DNA 上のシトシンのうちの約 450,000 ヶ所のメチル化状態を網羅的に解析することにより、27 種類の悪性腫瘍を同時に診断・鑑別可能なメチル化パネル [CACO (Cancer Cell-of-Origin) methylation panel] の作成に成功しました。

DNA メチル化^{※1} は臓器特異性や腫瘍特異性を示すとされています。今回の研究では、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 メチル化部位を統計的に抽出し、診断パネル^{※2} を作成しました。作成したメチル化パネルの診断能は、自施設で入手した検体や別の公共データを用いることで検証しました。その結果、人種・組織検体の保存法・DNA メチル化の検出手法によらず、さらに腫瘍内不均一性^{※3} の影響を受けずに、悪性腫瘍の存在部位診断に用いることができることが示されました。また、血液中の circulating tumor DNA (ctDNA)^{※4} 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ました。さらに、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ました。

本研究の結果から、採血や尿検査などのリキッドバイオプシーを用いて、悪性腫瘍の存在部位を的確に識別可能な検診技術への発展が期待されます。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正確な治療を提供できる可能性が示唆されました。

本研究成果は、国際科学誌「Cancer Gene Therapy」（英国時間 2021 年 11 月 8 日付けの電子版）に掲載されました。

ポイント

- DNA 上のシトシンのうちの約 450,000 ヶ所のメチル化状態を網羅的に統計解析することにより、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、27 種類の悪性腫瘍を同時に診断・鑑別可能なメチル化パネルの作成に成功しました。
- 作成したメチル化パネルは、人種・組織検体の保存法・DNA メチル化の検出手法によらず適応可能です。また、転移巣を用いた解析からも原発臓器が診断可能で、腫瘍内不均一性の影響も受けにくいことが示されました。
- 採血によって得ることができる、circulating tumor DNA (ctDNA) のメチル化情報からも腫瘍の存在する臓器の診断ができる可能性が示されました。
- 原発不明癌の組織を検査することで、原発不明癌の原発臓器を客観的データから正確に推定できる可能性が示されました。

1. 背景

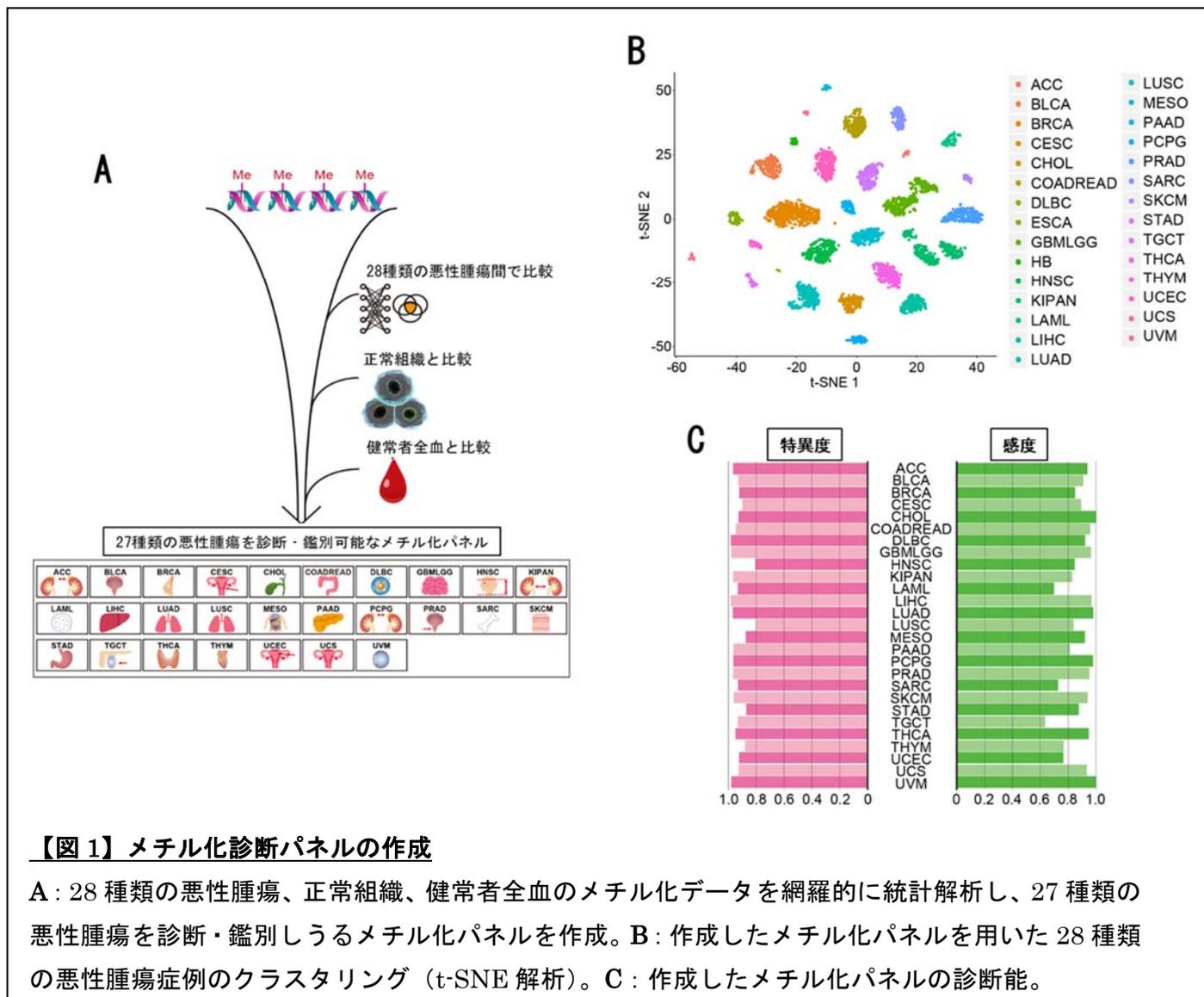
本邦での死亡原因は悪性腫瘍が約 38 万人と最も多く、重大な社会問題の 1 つです。診断機器の進歩や治療法の開発により悪性腫瘍患者の予後は改善されてきていますが、進行悪性腫瘍は根治治療後も高い再発率を有し、転移再発後は根治が困難なことが一般的です。悪性腫瘍による死亡率を減少させるための医療介入として大きく貢献できる最初の機会が二次予防、すなわち早期発見による早期治療介入です。現在、死亡率低下のデータを根拠に行われている対策型検診は、胃がん・大腸がん・肺がん・乳がん・子宮頸がんの 5 つのみですが、それらの検診はそれぞれ別の検査を受ける必要があります。そのため、時間的・経済的・精神的負担が大きくなり、低い検診受診率の原因の 1 つとなっています。それらの問題を解決するためには、診断能が高く、より汎用性の高い悪性腫瘍診断法の開発が不可欠です。

近年、血液中に漏れ出した腫瘍由来の DNA (circulating tumor DNA (ctDNA)) が、悪性腫瘍の検査対象として注目されています。採血という比較的侵襲の少ない検査で調べることができ、悪性腫瘍にしか存在しない遺伝子変異を血液中から検出できれば、悪性腫瘍の存在を証明することができます。しかし、悪性腫瘍で起こる遺伝子変異のほぼ全ては、様々な悪性腫瘍で共通してみられるため、血液中の遺伝子変異を検査することで悪性腫瘍がどこかにあることが分かっても、どの臓器に悪性腫瘍があるかを診断することは困難です。今回研究対象とした DNA メチル化は、悪性腫瘍発生の重要なプロセスの 1 つであり、特定領域のシトシンメチル化状態は臓器特異性や腫瘍特異性があると言われています。そのため、DNA メチル化は遺伝子変異に比べて腫瘍の部位診断に有用であると考えました。多くの悪性腫瘍のメチル化データを網羅的に解析することにより、多くの悪性腫瘍を同時に診断・鑑別可能な技術が開発できると考え、DNA メチル化を用いた悪性腫瘍診断パネルの開発に臨みました。

2. 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ました。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ました (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した (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した (図 1C)。

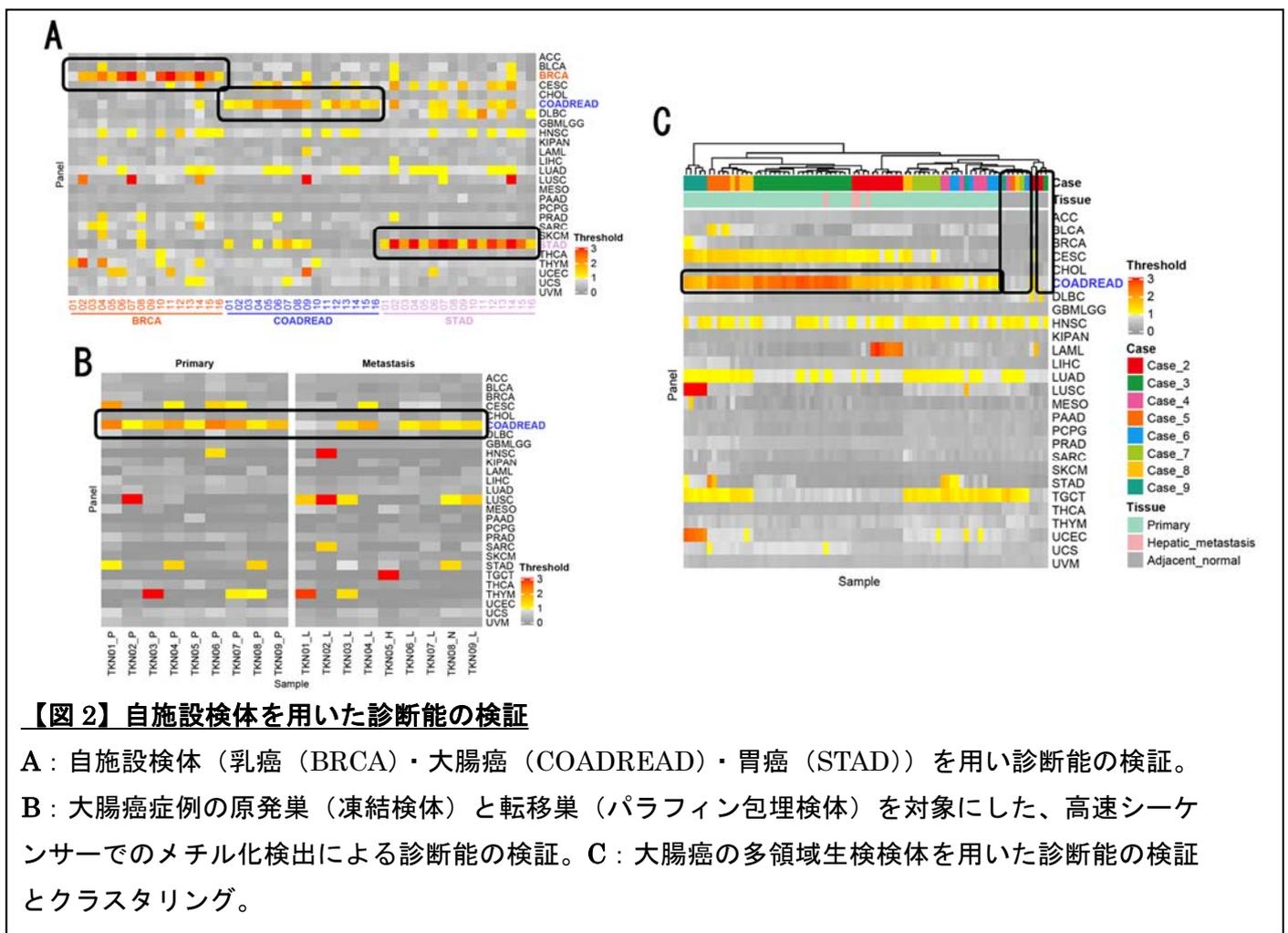


【図 1】メチル化診断パネルの作成

A: 28 種類の悪性腫瘍、正常組織、健常者全血のメチル化データを網羅的に統計解析し、27 種類の悪性腫瘍を診断・鑑別するメチル化パネルを作成。B: 作成したメチル化パネルを用いた 28 種類の悪性腫瘍症例のクラスタリング (t-SNE 解析)。C: 作成したメチル化パネルの診断能。

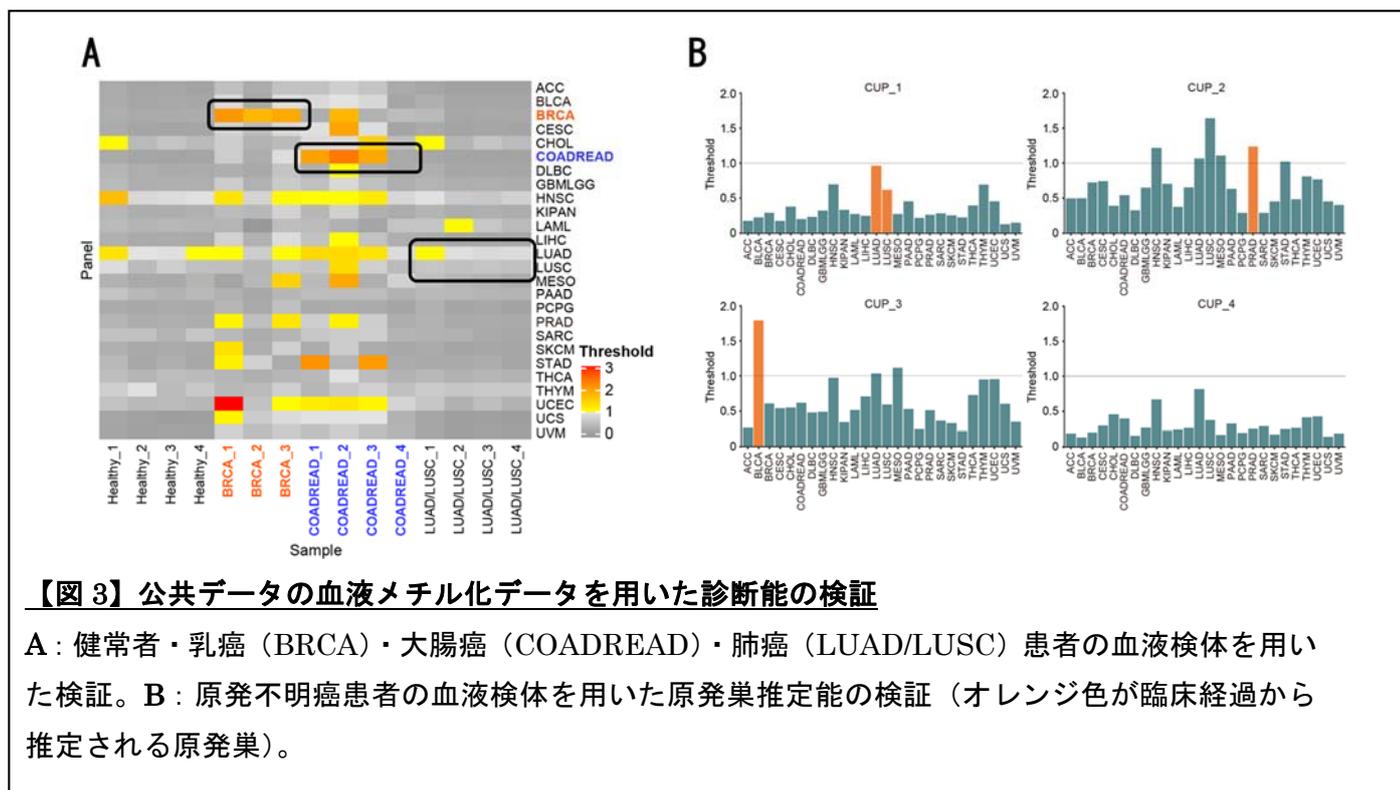
自施設で入手した検体を用いて、作成したメチル化パネルの診断能を検証しました。まず、乳癌 (BRCA)・大腸癌 (COADREAD)・胃癌 (STAD) の凍結組織検体を対象に、DNA メチル化アレイ検査^{※5}を用いて DNA メチル化状態を調べメチル化パネルに当てはめたところ、ほぼすべての検体で該当する悪性腫瘍として診断可能でした (図 2A)。メチル化パネルの作成に使用した公共データベースは、主に欧米人のデータで構成されています。一方、検証に用いた自施設での検体は日本人検体であるため、作成したメチル化パネルは人種によらず使用可能であることが示唆されました。

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いました。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^{※6}により DNA メチル化を検出しました。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、転移巣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ました（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ました。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して診断され、正常組織は大腸癌組織とは完全に区別されました。さらに症例ごとの検体は、まとめてクラスタリングされました（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ました。



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ました。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した（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ます。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ました。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ました（図 3B）。ctDNA のメチル化検出技術の開発に依存するところではありますが、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ました。



3. 今後の展開

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ました。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ります。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します。さらに、尿は血液から作られるため、尿中にも ctDNA が含まれることが分かっています。このこと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しています。

また、希少癌の 1 つである原発不明癌は、原発巣が同定できない転移性悪性腫瘍です。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ます。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ます。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ます。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きます。

4. 用語説明

※1 DNA メチル化：DNA を構成するアデニン・グアニン・シトシン・チミンの一つにメチル基を付加する反応で、その多くはシトシン残基で生じます。DNA 上の遺伝子の特定領域がメチル化されることにより、当該領域の遺伝子発現が変化し、細胞の機能に変化をもたらします。

※2 パネル（パネル検査）：検査技術の進歩により、同時に多くの遺伝子情報を検査できるようになりました。正確に疾患の特徴をとらえて、精度の高い診断をするために、遺伝子情報など多数の検査項目を一度の検査で同時に調べることをパネル検査と言います。

※3 腫瘍内不均一性：悪性腫瘍は遺伝子変異などが蓄積して発生しますが、1つの腫瘍の中に遺伝子変異の異なる細胞が混在していることを腫瘍内不均一性と言います。

※4 ctDNA：腫瘍細胞から放出されたり、腫瘍細胞が崩壊することで、腫瘍由来の DNA が血液をはじめとする体液中に漏れ出たものを ctDNA と言います。

※5 メチル化アレイ検査：アレイとは配列や整列を意味します。メチル化アレイ検査とは、DNA を用いて分子生物学的に重要と思われるメチル化部位を網羅的に検査して、ゲノムのメチル化状態を評価する検査です。

※6 高速シーケンサー：DNA や RNA などの情報（塩基配列）を多量に高速で解析することのできる機器です。

5. 発表雑誌

掲雑誌名：Cancer Gene Therapy

論文タイトル：Pan-cancer Methylome Analysis for Cancer Diagnosis and Classification of Cancer Cell of Origin

著者：Dai Shimizu^{1,2}, Kenzui Taniue^{3,4}, Yusuke Matsui⁵, Hiroshi Haeno⁶, Hiromitsu Araki⁷, Fumihito Miura⁷, Mitsuko Fukunaga⁸, Kenji Shiraishi⁹, Yuji Miyamoto¹⁰, Seiichi Tsukamoto^{3,4}, Aya Komine^{3,4}, Yuta Kobayashi^{2,11}, Akihiro Kitagawa^{2,11}, Yukihiro Yoshikawa^{2,11}, Kuniaki Sato^{2,12}, Tomoko Saito^{2,13}, Shuhei Ito², Takaaki Masuda², Atsushi Niida¹⁴, Makoto Suzuki⁹, Hideo Baba¹⁰, Takashi Ito⁷, Nobuyoshi Akimitsu³, Yasuhiro Kodera¹, Koshi Mimori²

所属：¹Department of Gastroenterological Surgery (Surgery II), Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan.

²Department of Surgery, Kyushu University Beppu Hospital, Beppu, Japan.

³Isotope Science Center, The University of Tokyo, Tokyo, Japan.

⁴Genomedia Inc., Tokyo, Japan.

⁵Biomedical and Health Informatics Unit, Department of Integrated Health Science, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan.

⁶Department of Computational Biology and Medical Sciences, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, Chiba, Japan.

⁷Department of Biochemistry, Kyushu University Graduate School of Medical Sciences, Fukuoka, Japan.

⁸Coloproctology Center Takano Hospital, Kumamoto, Japan.

⁹Department of Thoracic Surgery, Kumamoto University Hospital, Kumamoto, Japan.

¹⁰Department of Gastroenterological Surgery, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University, Kumamoto, Japan.

¹¹Department of Gastroenterological Surgery, Graduate School of Medicine, Osaka University, Osaka, Japan.

¹²Department of Head and Neck Surgery, National Hospital Organization Kyushu Cancer Center, Fukuoka, Japan.

¹³Department of Gastroenterology, Faculty of Medicine, Oita University, Yufu, Japan.

¹⁴Human Genome Center, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Tokyo, Japan.

DOI : 10.1038/s41417-021-00401-w

English ver.

https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_E/research/pdf/Can_Gen_The_211108en.pdf