

主論文の要旨

**A simple and robust methylation test for risk
stratification of patients with juvenile
myelomonocytic leukemia**

〔 若年性骨髄単球性白血病患者のリスク層別化のための
シンプルで堅牢なメチル化テスト 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
発育・加齢医学講座 小児科学分野

(指導：高橋 義行 教授)

北澤 宏展

【緒言】

エピゲノムの乱れは、がん細胞に共通して見られる現象です。代表的なエピゲノムの乱れの一つである DNA メチル化パターンの変化は、DNA メチル化アレイ分析を用いて正確に評価することができます。異常な DNA メチル化パターンの中には、腫瘍化を促進する特定の遺伝子変異と関連するものがあり、疾患の進行を示すバイオマーカーとして利用できる可能性があります。

若年性骨髄単球性白血病(JMML)は、乳児期および幼児期に発症するまれな白血病であり、骨髄単球の過剰な増殖と顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子に対する過敏性が特徴です。JMML 患者は、DNA メチル化の状態により、予後の異なる高メチル化(HM)、中間メチル化(IM)、低メチル化(LM)の 3 つのグループに分類されます。2021 年に我々を含む 3 か国の国際共同研究により、代表的なメチル化アレイである Infinium Human Methylation 450K BeadChip(450K; Illumina, San Diego, CA)を用いた DNA メチル化の国際分類法(Clin Cancer Res. 2021;27(1):158-168)が発表されましたが、メチル化アレイによる解析は高価であり、実際に臨床試験に利用するには困難を伴います。そのため、メチル化プロファイリングを臨床的な意思決定プロセスや今後の臨床試験に取り入れるためには、検査費用が安価で、かつ検体処理が簡便でありながら堅牢な結果が得られる DNA メチル化解析法が必要です。

【方法】

Digital Restriction Enzyme Analysis of Methylation(DREAM)法は、次世代シーケンサーを用いて、ゲノム上の数万の CpG サイトにおける DNA メチル化を定量的にマッピングする手法です。同じ CCCGGG 配列を認識しますが、CpG メチル化に対する感度や切断パターンが異なる制限酵素 *Sma*I と *Xma*I を用いてゲノム DNA を順次消化して得られた、非メチル化 CpG サイトとメチル化 CpG サイトに特異的なシグネチャーを持つ DNA 断片を次世代シーケンサーで解析することで、対象となる各 CpG サイトのメチル化レベルを算出します(図 1)。

本研究では、137 名の患者 [JMML、n=124、ヌーナン症候群関連骨髄増殖性障害(NS/MPD)、n=13] の末梢血または骨髄単核細胞から採取したゲノム DNA を用いて DREAM 法を用いた DNA メチル化解析を実施しました。

【結果】

クラスタリング解析

7,360 個のプロモーター関連 CpG サイトの DREAM メチル化データを用いて、発見コホートの教師なし階層型クラスタリングを行ったところ、既報の 450K クラスタリング結果と 95%の一致率(99 サンプル中 94 サンプル)で、高メチル化(HM_DREAM, n = 35)および低メチル化サブグループ(LM_DREAM, n = 64)が特定されました。国際分類との比較が可能な 98 例のうち、HM(n=30)と LM(n=60)の 90 例は DREAM のクラスタリング結果と 100%の一致を示しました。国際分類で IM 群に分類された 8 例につ

いては、4 例が HM_DREAM 群に、4 例が LM_DREAM 群に分類されました(図 2)。

また、検証コホート(n = 38)に対しても同様に、前述の 7,360 のプロモーター関連 CpG サイトから得られた DREAM データを用いて、教師なしのクラスタリングを行いました。検証コホートの患者もまた、HM_DREAM(n = 18)と LM_DREAM(n = 20 ; 図 2)のサブグループに分類されました。

DREAM クラスタリングのためのサポートベクターマシン分類器構築

サポートベクターマシン(SVM)を用いた機械学習の分類器モデルを構築するために、JMML 関連の HM_DREAM と LM_DREAM のプロファイル間で平均メチル化レベルに明確な差(>0.3)を示した CpG サイト 84 個を選択しました。発見コホートのサンプルをトレーニングデータセット(n=59)とテストデータセット(n=40)に無作為に割り当て、R の e1071 パッケージを使用して最適な分類器が作成されました。SVM を用いて、検証コホートに割り当てられた患者を、高メチル化(HM_SVM ; n=18)または低メチル化(LM_SVM ; n=20)のいずれかに分類したところ、クラスタリング分析の結果と不一致であった症例は、検証コホートの 38 例中 2 例(5%)のみでした。

生存解析

全生存率(overall survival; OS)をカプランマイヤー法で推計しました。発見コホートにおいて、5 年 OS は HM_DREAM 群[41.9%(95%CI : 25.3-57.6%)]が LM_DREAM 群[71.4%(95%CI : 56.2-82.1%)]よりも有意に不良でした($P = 3.45 \times 10^{-3}$)。さらに、検証コホートにおいても、HM_SVM 群の 5 年 OS [26.3%(95% CI: 1.9%-64.0%)]が LM_SVM 群[80.5%(95% CI: 49.1-93.6%)]に比べて有意に不良であることが確認できました($P = 0.024$) (図 3)。

【考察】

DREAM 解析を用いて JMML 患者を HM_DREAM と LM_DREAM のサブグループに分類することで、JMML 患者の予後を予測することに成功しました。また、450K プラットフォームを用いた国際分類との明確な再現性が確認されました。この結果は独立した検証コホートでも再現に成功しています。さらに、臨床検査としての利活用を念頭に、SVM を用いた機械学習による分類器を構築しました。これにより、1 サンプルごとに安定した判定結果を得ることが可能となりました。

【結語】

DREAM 解析は定量的で再現性が高く、サンプルごとに検査を行い、タイムリーに結果を得ることが可能です。DREAM 解析を用いたメチル化検査は、前向きな臨床試験における JMML 患者の層別化に利用可能であり、将来的には臨床的な意思決定プロセスに組み込まれることが期待されます。