

主論文の要旨

Estimation of the Fraction of Cancer Cells in a Tumor DNA Sample Using DNA Methylation

〔 DNAメチル化を用いた腫瘍DNA検体内のがん細胞含有率の測定 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 機能構築医学専攻
病態外科学講座 腫瘍外科学分野

(指導：榑野 正人 教授)

高橋 崇真

【背景】

腫瘍検体内には、常に正常細胞の混入を認める。もし、腫瘍DNA検体内のがん細胞含有率が前もって測定可能であれば、極端にがん細胞含有率が少ない検体を解析から除外することや、得られた実験データをがん細胞含有率で補正することなどで、より正確なゲノム・エピゲノム解析が可能となる。

腫瘍DNA検体内のがん細胞含有率を測定する方法の一つとして、病理組織学的方法があるが、検体の連続切片を準備する必要がある、病理医の時間を費やす。他には、次世代シーケンサーやSNPマイクロアレイのデータから、がん細胞含有率を算出することも可能であるが、これらの方法には複雑な解析と高いコストを必要とする。従って、腫瘍DNA検体内のがん細胞含有率を測定するためのより簡便な方法の開発は、がん研究において非常に有用となる。

DNAメチル化は安定なエピジェネティック修飾で、多くのがん種で、がん細胞、または正常細胞でのみ、特異的にメチル化されているゲノム領域が存在することが報告されている。そのようなゲノム領域の中で、がん細胞でのみ完全メチル化状態を示し、非がん上皮細胞や間質細胞では完全非メチル化状態を示すものが存在すれば、そのゲノム領域のメチル化レベルは腫瘍DNA検体内のがん細胞の含有率を反映すると考えられる (Figure 1A)。

【目的】

食道扁平上皮がんを例に、DNAメチル化を用いて腫瘍DNA検体内のがん細胞含有率の測定が可能であることを証明する。

【方法と結果】

ゲノム網羅的DNAメチル化解析による食道がん細胞で完全メチル化状態を示すゲノム領域の選出

食道がん細胞で完全メチル化状態、非がん細胞では完全非メチル化状態を示すゲノム領域を選出するために、Infinium HumanMethylation450 BeadChip array によるゲノム網羅的 DNA メチル化解析を、i) 28 の食道がん生検検体、ii) 4 種類の食道がん細胞株 (KYSE30、 KYSE50、 KYSE220、 KYSE270)、iii) 1 人の健常者からの末梢血球、iv) 4 人の健常者からの正常食道粘膜のプール、v) 8 人の食道がん患者からの非がん部食道粘膜のプールを用いて施行した。まず、食道がん細胞株全てで高度にメチル化 (β value > 0.8) され、かつ、末梢血球、正常食道粘膜のプール、非がん部食道粘膜のプールでほとんどメチル化されていない (β value < 0.1) CpG 部位として、2,752CpG 部位を選出した。次に、その 2,752CpG 部位から、28 の食道がん生検検体での高メチル化 (β value > 0.5) の頻度が 50%以上を示す 14CpG 部位 (11ゲノム領域) を選出した (Figure 1B、Table 1)。

11 ゲノム領域のうち、食道がん細胞で高頻度に遺伝子増幅の報告がある *SOX2OT* と、近傍の遺伝子が不明な 3 ゲノム領域を除外した残りの 7 ゲノム領域の中で、DNA

メチル化レベルを測定する Methylation-sensitive High Resolution Melting Analysis (MS-HRMA 法)のためのプライマーが作成可能であった3遺伝子の近傍の3ゲノム領域 (*TFAP2B*, *ARHGEF4*, *RAPGEFL1*) (Figure 1C) を、がん細胞含有率測定 DNA メチル化マーカーの候補とした。

がん細胞含有率測定DNAメチル化マーカーとして3ゲノム領域が使用可能かどうかの検証

3ゲノム領域が食道がん細胞で完全メチル化、非がん細胞で完全非メチル化を示すことを確認するために、食道がん検体8検体からレーザーキャプチャーマイクロダイセクション (LCM) により分離した i) 非がん細胞8検体、ii) 食道がん細胞8検体、iii) LCM 分離前の食道がん8検体について、3ゲノム領域のメチル化レベルを測定した (Figure 2A)。

非がん細胞8検体では3ゲノム領域とも完全非メチル化状態を示した。食道がん細胞8検体では、3つのゲノム領域のうちの少なくとも一つは、ほぼ完全メチル化状態を示した。完全メチル化状態を示さないゲノム領域は、がん細胞の不均一性のためと考えられた。食道がん細胞の検体で最も高いメチル化レベルを示したゲノム領域は、LCM 分離前の検体でも最も高いメチル化レベルを示していたので、3ゲノム領域の中で、最も高いメチル化レベルが検体の食道がん細胞含有率を最も反映すると考えられた。

メチル化レベルはそのゲノム領域の DNA コピー数異常による影響を受ける。そこで、15の食道がん検体を用いて、3ゲノム領域の DNA コピー数異常を定量的リアルタイム PCR 法によって解析した (Figure 2B)。 *ARHGEF4* では、有意な DNA コピー数の異常を認めなかったが、 *TFAP2B* と、 *RAPGEFL1* では低頻度で DNA コピー数の異常を認めた (*TFAP2B* で 1.64-1.65 倍の増加が3検体、 *RAPGEFL1* で 0.60 倍の減少を1検体)。しかし、たとえ2倍または0.5倍の DNA コピー数異常が存在しても、測定したメチル化レベルと真のがん細胞含有率との誤差は、17.2%未満と計算され、また、DNA コピー数異常の頻度も低いので、DNA コピー数異常ががん細胞含有率の測定に与える影響は少ないと考えられた。

従って、3ゲノム領域 (*TFAP2B*, *ARHGEF4*, *RAPGEFL1*) のメチル化レベルの最大値をがん細胞含有率と定義した。

がん細胞含有率測定DNAメチル化マーカーの正確性の検証

次に、がん細胞測定 DNA メチル化マーカーによって測定した腫瘍 DNA 検体内のがん細胞含有率が、病理組織学的に測定したがん細胞含有率を正確に反映しているかどうかの検証を行った。食道がん20検体で、3ゲノム領域の DNA メチル化レベルにより求めたがん細胞含有率 (Figure 3A) と、病理組織学的に測定したがん細胞含有率とを比較すると、良い相関を認めた ($r=0.85$; $p<0.001$) (Figure 3B)。この結果から、がん細胞測定 DNA メチル化マーカーによってがん細胞含有率が正確に測定可能

であることが確認された。

がん細胞含有率測定DNAメチル化マーカーのDNAメチル化解析への応用

最後に、がん細胞の DNA メチル化解析にがん細胞含有率測定 DNA メチル化マーカーを応用した。食道がん 28 検体の網羅的 DNA メチル化解析で得られた 2 個のがん抑制遺伝子(*MIR34*, *CDO1*)の転写開始点近傍のメチル化レベル (β value) を、がん細胞含有率測定 DNA メチル化マーカーによって測定したがん細胞含有率を用いて次のように補正した[補正 β value = β value / (検体内のがん細胞含有率 (%) / 100)] (Figure 4)。補正メチル化レベルはがん細胞の中で、測定したゲノム領域のメチル化をもつがん細胞の割合を反映していると考えられる。発がんのドライバーとなったがん抑制遺伝子のメチル化は、その結果獲得されたがん細胞の増殖優位性のために全てのがん細胞に存在するはずである。実際、2 個のがん抑制遺伝子は、いくつかの検体では、ほぼ完全メチル化状態(β value ≥ 0.8)を示し、いくつかの検体ではほぼ完全非メチル化状態(β value < 0.2)を示した。これは、がん細胞含有率測定 DNA メチル化マーカーを用いることで、非がん細胞の混入の影響を最小限にすることが可能であることを示している。

【考察】

今回、3 ゲノム領域 (*TFAP2B*, *ARHGEF4*, *RAPGEFL1*) の DNA メチル化レベルを用いて食道がん検体の DNA 中のがん細胞含有率を測定することに成功した。本研究は、DNA メチル化を用いて腫瘍 DNA 検体内のがん細胞含有率を測定した最初の報告である。近年、多くのがん種でがん細胞、非がん細胞で特異的にメチル化されているゲノム領域が存在することが報告されている。従って、食道がん以外の他のがん種でも、がん細胞でのみ高度かつ高頻度にメチル化されている特別なゲノム領域を同定し、その DNA メチル化レベルを測定することで、がん細胞含有率を測定することが可能であると考えられる。

【結論】

DNA メチル化を用いて、腫瘍 DNA 検体内のがん細胞含有率の測定が可能である。