

リキッドバイオプシーを用いた 卵巣癌高危険患者の予測と早期診断法の開発

京都医療センター
産科婦人科 病棟医長 山口 建

(共同研究者)

京都医療センター 臨床研究センター 内分泌代謝高血圧研究部長 浅原 哲子
京都大学大学院 医学研究科医学部 婦人科学産科学 教授 万代 昌紀
京都大学大学院 医学研究科医学部 婦人科学産科学 准教授 馬場 長

はじめに

卵巣癌は婦人科悪性疾患の中で最も予後不良の疾患である。卵巣癌のスクリーニング法は確立されていないため、4割以上がⅢ期以上で診断されることが大きな原因となっている。卵巣癌の中でも明細胞癌は日本人に多く、抗がん剤耐性を示す予後不良の疾患である。卵巣明細胞癌は子宮内膜症から発生することから30-40歳代の生殖年齢や50歳女性に多く、不妊治療など子宮内膜症を経過観察中に卵巣明細胞癌が発生することがあるため、取扱いに難渋する。このように卵巣明細胞癌は早期診断が重要である一方で、子宮内膜症の患者の中で卵巣癌に移行しやすい症例を選別することが子宮内膜症患者の治療を選択する上でも重要である。しかしながら子宮内膜症から卵巣癌を発症しやすい高危険患者を予測する方法は存在しない。

我々は子宮内膜症から発生する卵巣明細胞癌の研究を行ってきた。卵巣明細胞癌の発癌において、子宮内膜症の自由鉄から発生する酸化ストレスが発癌に関わることを明らかにした⁽¹⁾。また網羅的遺伝子解析より、明細胞癌の性質を反映したHNF1Bを含む遺伝子群(OCCC signature)は発癌環境により誘導されることを示した⁽²⁾。網羅的DNAメチル化解析では、HNF1転写経路は全体的にメチル化で制御されることを明らかにした⁽³⁾。OCCC signatureには糖代謝に関わる遺伝子が多く含まれ、明細胞癌では好氣的環境においても嫌氣的解糖系が亢進すること(ワールブルグ効果)で⁽⁴⁾、酸化ストレス耐性・抗がん剤耐性を獲得することを明らかにした⁽⁵⁾。

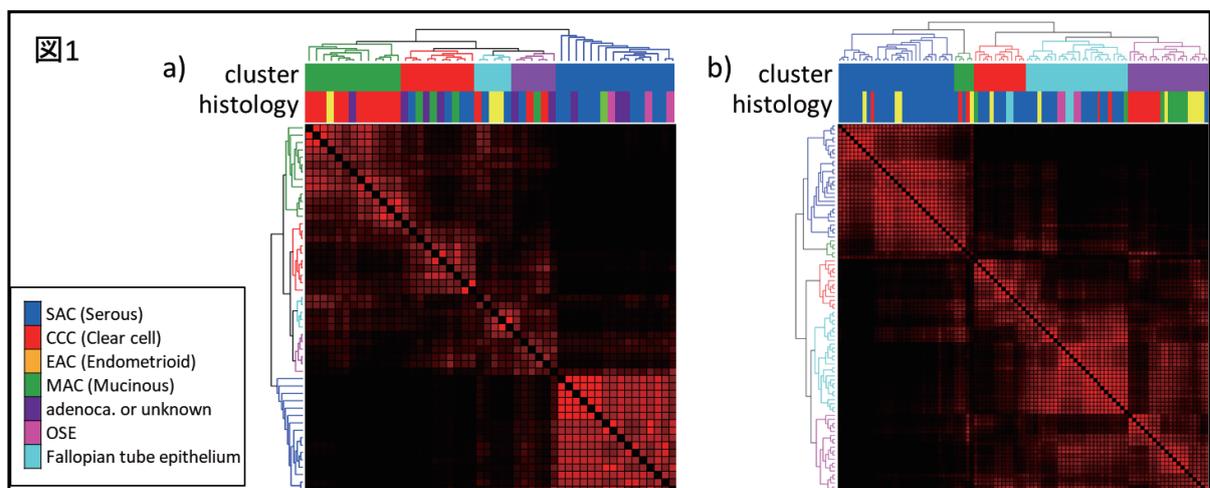
リキッドバイオプシーは腫瘍組織を採取しなくとも血液から腫瘍細胞や腫瘍DNA (cell free DNA: cfDNA) を同定する画期的な技術である。腫瘍組織を採取せずとも、リキッドバイオプシーにより同定された遺伝子異常に沿って適切な分子標的薬の選別が可能となる。リキッドバイオプシーにより抽出されたcfDNAは断片化されていることから、腫瘍組織との相同性が問題となる。ゆえに解析領域が限られているHot spotsがわかっている遺伝子変異や特異的なCpG領域を解析するDNAメチル化が適した解析対象となり得る。卵巣癌は生

検が困難であることからリキッドバイオプシーの良い対象となるが、卵巣癌におけるリキッドバイオプシーは十分に検討されていない。

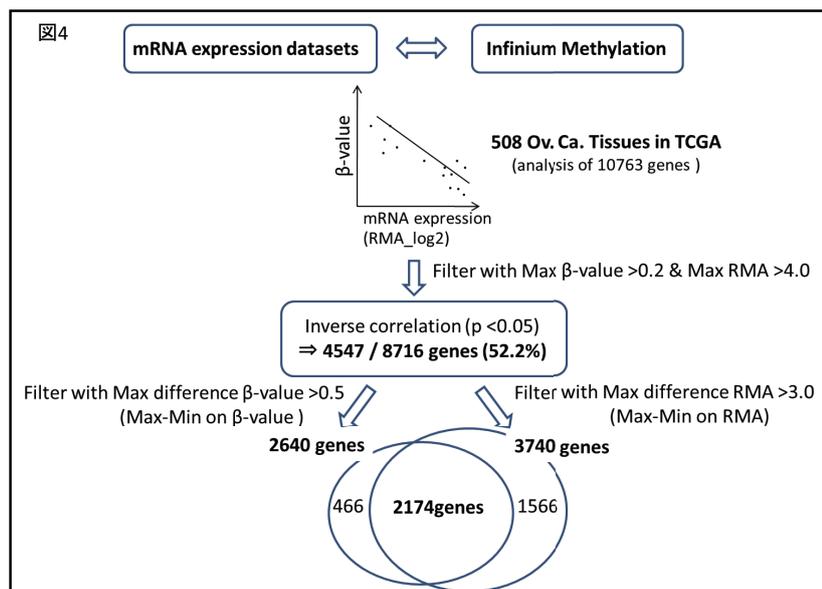
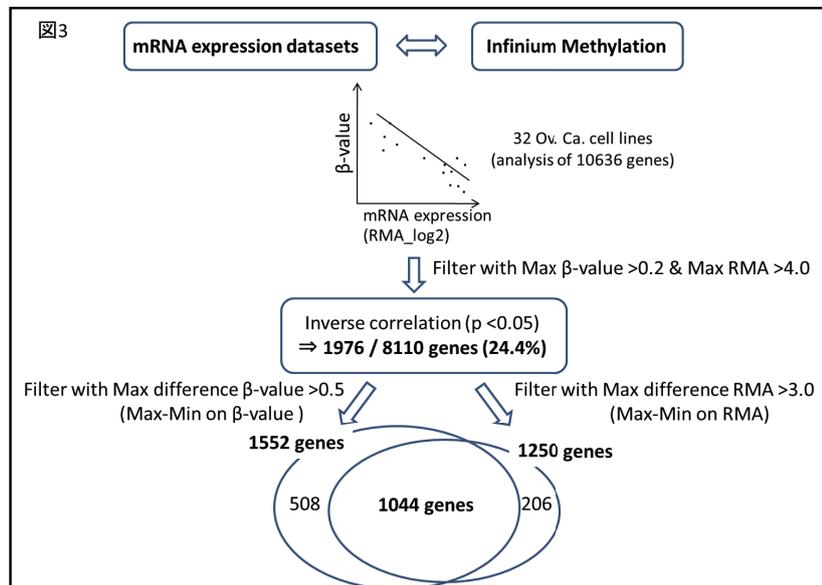
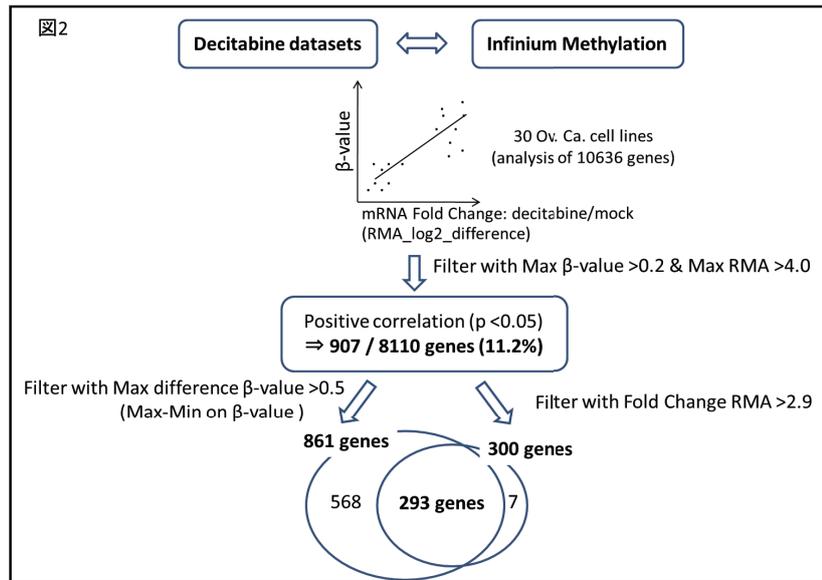
今回、リキッドバイオプシーを用いた卵巣癌高危険患者の予測と早期診断法の開発の進捗状況と、我々が行っている卵巣明細胞癌において明らかになってきたことを提示したい。

結 果

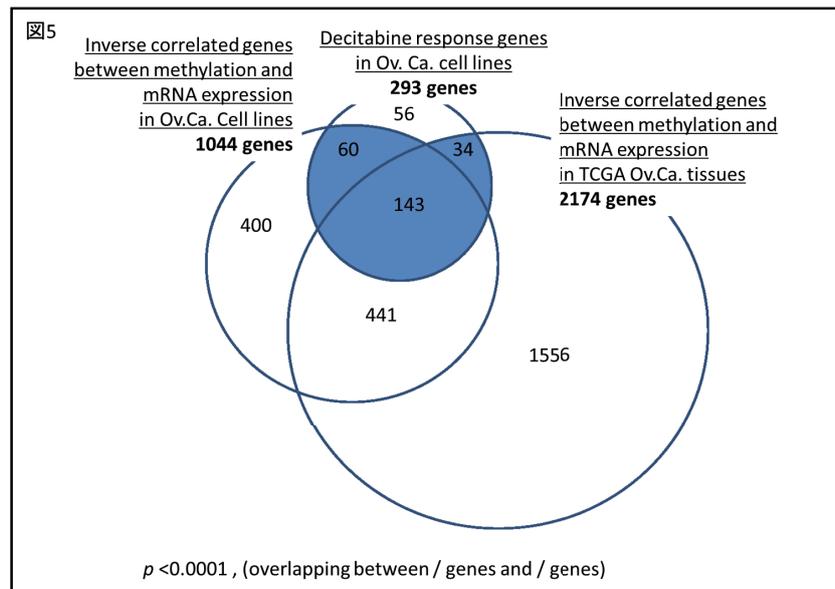
卵巣明細胞癌に特異的なDNAメチル化領域を同定するために、卵巣癌組織85検体、正常卵管・卵巣表層上皮細胞8検体、卵巣癌細胞株46株、正常卵管・卵巣表層上皮細胞株4株を用いて網羅的DNAメチル化解析、網羅的mRNA発現解析を行なった。コンセンサスクラスタリング解析では卵巣癌の組織型によりDNAメチル化プロファイルが異なることが分かった(図1a:細胞株、図1b:臨床検体)。卵巣癌組織、卵巣癌細胞株に共通して明細胞癌が非明細胞癌よりDNAメチル化が20%以上(β 値が0.2以上)高く、p値が0.01以下の遺伝子は25個あった。逆に明細胞癌が非明細胞癌よりも β 値が0.2以上低く、p値が0.01以下の遺伝子は6個あった。また、機能的に重要と思われ、DNAメチル化によって制御されている遺伝子を卵巣癌細胞株を用いて、以下の基準によって抽出した。1) t検定でp値が0.01未満、2) 明細胞癌と非明細胞癌との間で β 値が0.2以上(DNAメチル化が20%以上)異なる、3) 発現マイクロアレイと網羅的DNAメチル化のデータから発現と β 値が有意に逆相関を示す($p < 0.05$)。この解析により、非明細胞癌と比較して明細胞癌において低DNAメチル化により活性化している遺伝子は22遺伝子、逆に高DNAメチル化により抑制されている遺伝子が276遺伝子あった。明細胞癌において低DNAメチル化により活性化している遺伝子は、22遺伝子はHNF1B転写に関わる遺伝子が含まれ、高DNAメチル化により抑制されている遺伝子が276遺伝子はERネットワークに含まれる遺伝子が含まれていた。これらのHNF1B転写ネットワークやERネットワークの遺伝子は、それぞれ協調してDNAの低メチル化、高メチル化が起こっていることが分かった。



続いて組織型に関わらず卵巣癌においてDNAメチル化によって制御される重要な候補遺伝子を以下の3つのデータ解析から同定した。①卵巣癌細胞株30株を用いて脱メチル化剤であるデシタビン投与による網羅的発現解析と網羅的DNAメチル化解析を用いたデータ(図2)、②卵巣癌細胞株32株を用いて網羅的発現解析と網羅的DNAメチル化解析のデータ(図3)、③卵巣癌検体508組織を用いたTCGAの網羅的発現解析と網羅的DNAメチル化解析のデータ(図4)。①の解析では(図2)、脱メチル化により遺伝子発現が変化する値と β 値とが有意に正の相関をする遺伝子は解析した8,110遺伝子中907遺伝子(11.2%)あった。その中で β 値の差が0.5以上あり、かつFold Changeが2.9以上あるものは293遺伝子あった。②の解析では(図3)、発現と β 値が有意に逆の相関を示したのが8,110遺伝子中1,976遺伝子(24.4%)あった。その中で β 値の差が0.5以上あり、かつ発現のRMA値



が3以上のものが1,044遺伝子あった。③の解析では(図4)、発現と β 値が有意に逆の相関を示したのが8,716遺伝子中4,547遺伝子(52.2%)あった。その中で β 値の差が0.5以上あり、かつ発現のRMA値が3以上のものが2,174遺伝子あった。①、②、③の解析から脱メチル化剤であるデシタビン投与により発現



が上昇し、かつ卵巣癌組織もしくは卵巣癌細胞株においてmRNA発現と β 値が逆相関している遺伝子は237遺伝子あり(図5)、有意に共通している遺伝子が含まれていた($p < 0.0001$)。これを卵巣癌において機能的にDNAメチル化により制御されている重要な遺伝子と考えた。これらをカテゴリー解析すると、形態形成、増殖、代謝、細胞死に関わる遺伝子が多く含まれていることが分かった。237遺伝子を用いてクラスタリングで2群に分けると、この2群の間で細胞増殖の倍加時間が有意に差があった($p < 0.0001$)。

また、現在卵巣癌の患者の手術前の血液検体、手術組織を回収保存中である。一部血液検体を用いてcfDNA抽出を試みた。卵巣癌IV期の患者血漿1mlから22.43ng/ μ l、卵巣癌I期の患者血漿500 μ lから23.75ng/ μ l、子宮内膜症患者の血漿1mlから7.75ng/ μ l、健康人の血漿800 μ lから1.03ng/ μ lのDNAを抽出した。

考 察

今回の研究により卵巣明細胞癌に特異的なDNAメチル化を同定した。卵巣明細胞癌ではHNF1Bが高発現し^(2, 6)、臨床においても診断マーカーとして用いられているが、HNF1BのみならずHNF1B転写に関わる遺伝子が協調して低メチル化により活性化されていることが分かった。また、卵巣明細胞癌ではER発現が抑制されていることが知られているが⁽⁷⁾、本研究により、ERのみならずERネットワークに属する遺伝子が協調して高メチル化により抑制されていることが分かった。

卵巣癌においてDNAメチル化のより制御される重要な候補遺伝子は237遺伝子同定された。これらの遺伝子は形態形成、増殖、代謝、細胞死に関わる遺伝子が多く含まれており、腫瘍の形成に関わると考えられる。細胞増殖の倍加時間とも関連していることはこの結果を示唆する。

また、今回プレリミナリーな検討ではあるが、卵巣癌患者、子宮内膜症患者、健常人と考えられる人からcfDNAの抽出を試みた。卵巣癌患者からは、より多くのcfDNAを抽出することができたが、これは既報と同様の結果であった。また、健常人よりも子宮内膜症患者、子宮内膜症患者よりも卵巣癌患者の方がcfDNAは、より多く抽出されており、今後の解析に期待が持てる。しかし、すでにリキッドバイオプシーを展開しているGuardant Health社の報告によると、cfDNAの中で腫瘍由来である割合は中央値0.4% (0.03-97%) と言われており、解析に十分なcfDNAを抽出したとは言い難い。回収方法の改善、より卵巣癌や子宮内膜症に特異的で検出感度の高いDNAメチル化遺伝子を同定することが今後の課題である。

要 約

卵巣癌において組織型によりDNAメチル化プロファイルは異なる。卵巣癌においてDNAメチル化は腫瘍形成に関わる可能性がある。健常人、子宮内膜症、卵巣癌を区別するためのリキッドバイオプシーは回収方法や検出感度が高い遺伝子を同定する必要がある。

文 献

1. Yamaguchi, K., *et al.* Contents of endometriotic cysts, especially the high concentration of free iron, are a possible cause of carcinogenesis in the cysts through the iron-induced persistent oxidative stress. *Clin Cancer Res* **14**, 32–40 (2008) .
2. Yamaguchi, K., *et al.* Identification of an ovarian clear cell carcinoma gene signature that reflects inherent disease biology and the carcinogenic processes. *Oncogene* **29**, 1741–1752 (2010) .
3. Yamaguchi, K., *et al.* Epigenetic and genetic dispositions of ovarian carcinomas. *Oncoscience* **1**, 574–579 (2014) .
4. Okamoto, T., *et al.* Hepatocyte nuclear factor-1 β (HNF-1 β) promotes glucose uptake and glycolytic activity in ovarian clear cell carcinoma. *Mol Carcinog* **54**, 35–49 (2015) .
5. Amano, Y., *et al.* Metabolic alterations caused by HNF1 β expression in ovarian clear cell carcinoma contribute to cell survival. *Oncotarget* **6**, 26002–26017 (2015) .
6. Tsuchiya, A., *et al.* Expression profiling in ovarian clear cell carcinoma: identification of hepatocyte nuclear factor-1 beta as a molecular marker and a possible molecular target for therapy of ovarian clear cell carcinoma. *Am J Pathol* **163**, 2503–2512 (2003) .
7. Akahane, T., *et al.* Disappearance of steroid hormone dependency during malignant transformation of ovarian clear cell cancer. *Int J Gynecol Pathol* **24**, 369–376 (2005) .