

膀胱癌における腫瘍内メチル化変動遺伝子と その病理形態学的意義の探索

杏林大学 医学部 病理学教室

林 玲 匡

I 要 旨

本研究は、膀胱癌メチル化プロファイルの腫瘍内不均一性を探索するとともに、腫瘍内メチル化変動遺伝子を同定し、病理形態学的、病理診断学的意義を探索することである。杏林大学病理学教室に保管されている膀胱癌手術症例の系統的なレビューを行い、多彩な組織形態像を呈する 6 症例、44 領域を選択し、マルチサンプリング法による網羅的 DNA メチル化解析を行った。クラスター解析の結果から、一部の症例では DNA メチル化プロファイルに顕著な腫瘍内不均一性が見られ、oncogene のプロモーター領域のメチル化状態の違いや異なる組織形態像が確認された。

II 目 的

本研究の目的は、膀胱癌メチル化プロファイルの腫瘍内不均一性を探索するとともに、腫瘍内メチル化変動遺伝子を同定し、病理形態学的、

病理診断学的意義を探索することである（下図 1 参照）。次世代シーケンサーに代表される解析技術の進歩により、がんの分子遺伝学的知見の蓄積が進み、膀胱癌においても分子情報に基づく新たな分類体系が複数提唱されている¹⁾。これらの層別化が、主として腫瘍（症例）ごとに 1 サンプルの解析からなされ、腫瘍間（症例間）の共通性と不均一性を明らかにしてきた一方で、個々の腫瘍内（症例内）の不均一性については、不明な部分が多かった。近年の複数領域の網羅的解析からは、クローン進展を背景に膀胱癌が徐々に不均一な集団となっていく様子が明らかになりつつある。本研究を行った林らも組織形態像と分子遺伝学的な網羅的解析を統合解析することで、膀胱癌のフェノタイプの不均一性を示すと同時にクローン進展におけるその可塑性を明らかにした²⁾。本研究は、同研究結果を発展させ、メチル化プロファイルの腫瘍内不均一性とその病理組織学的意義を探求するものである。

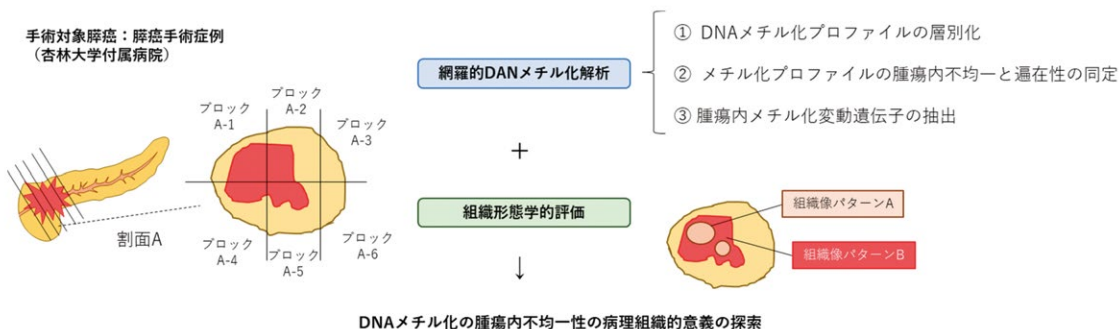


図 1 本研究の目的と方法

III 方 法

1) 解析対象症例

杏林大学病理部で診断をされた膵癌手術症例を対象とした。事前の核酸品質チェックから、ホルマリン注入固定を併用により核酸の保存が良好となった2019年9月1日以降の外科手術症例70例の系統的レビューを行い、①浸潤径が20mmをこえる（本件研究では1つの症例内から複数領域の検体を採取するため）②間質の線維化が軽度であり腫瘍含有率の高い③病理組織学的に多彩な像を示すの3点を満たす症例を選別した。そして、各症例から6-10領域を選定し、本研究の解析対象領域とした。

2) 網羅的DNAメチル化解析

上記のごとく選定した解析対象領域のFFPEサンプルからDNAを抽出し（下記結果のごとく抽出条件の最適化を行った）、Infinium MethylationEPIC BeadChip kit (Illumina社)を用いて網羅的DNAメチル化解析を行った。各サンプルについてアレイデータ全体のquality checkを行った後、各プローブのDNAメチル化をベータ値で評価した。そして、非翻訳遺伝子を含む各遺伝子のプロモーター領域の変動上位5000部位を用いてDNAプロファイルの層別化を行った。この際、クラスター解析では距離をcorrelation、方法をcompleteとしてデンドログラムを作成した。ここで用いた遺伝子群をメチル化変動遺伝子（群）とし、特にがん関連の翻訳遺伝子に注目して以降の解析を行った。なお、ベータ値算出以降の統計解析はR (version 4.1.3)を用いて行った。

IV 結 果

1) 解析対象症例の選定

2019年9月1日以降、2021年4月1日までの症例を系統的にレビューし、すべてのスライド

を再検鏡した。そして本研究の解析対象となる6症例、44サンプル（各症例より6-10領域を抽出）を選定した。

2) DNA抽出条件の最適化

上記のごとく選出したサンプルを用いて、マクロダイセクション法を用いて通常の方法でDNAを抽出した図2（次項）左のごとく小断片化したDNAの多く混在した低濃度（低収容量）のDNAとなった。そのため、抽出条件を見直し、脱パラフィンを行うタイミングやマクロダイセクションの方法などを改定、DNAの抽出方法全体を本研究用に最適化した。その結果、図2右のごとく非断片化DNAを含む高濃度（高収容量）のDNAを得ることに成功した。

3) DNAメチル化プロファイルの腫瘍内不均一性と組織形態像の変化

前述（方法）のごとくDNAのメチル化プロファイルを層別化した結果、図3aのように腫瘍内不均一性の目立つ症例（Case 1～Case 4）と腫瘍内不均一性に乏しい症例（Case 5、Case 6）があることがわかった。

4) DNAメチル化変動遺伝子と組織形態像の変化

DNAメチル化変動遺伝子として、約1300の翻訳遺伝子を同定した。このうち約30個は主要ながん遺伝子ないしがん抑制遺伝子として知られているものであった。本研究では、膵癌における主要ながん抑制遺伝子である遺伝子Xに今回注目した。遺伝子Xの本コホートにおける変動を調べたところ、特にCase 3、Case 4でその腫瘍内変動が顕著であった（図3b）。このうち、Case 4においてベータ値の高いsample 1と低いsample 3は図3cのごとくかなり異なる組織形態像を示していることが分かった。また、Case 3においても遺伝子Xのベータ値の高いsample 1と低いsample 6では異なる形態像を示すことが確認された。

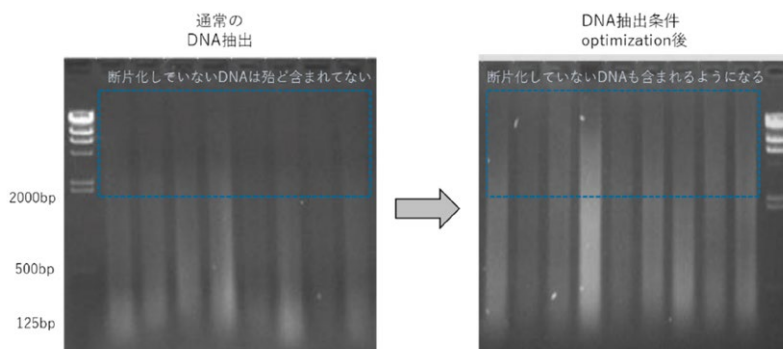


図 2 FFPE検体からのDNA抽出条件のoptimization (同一症例 8 サンプルから)

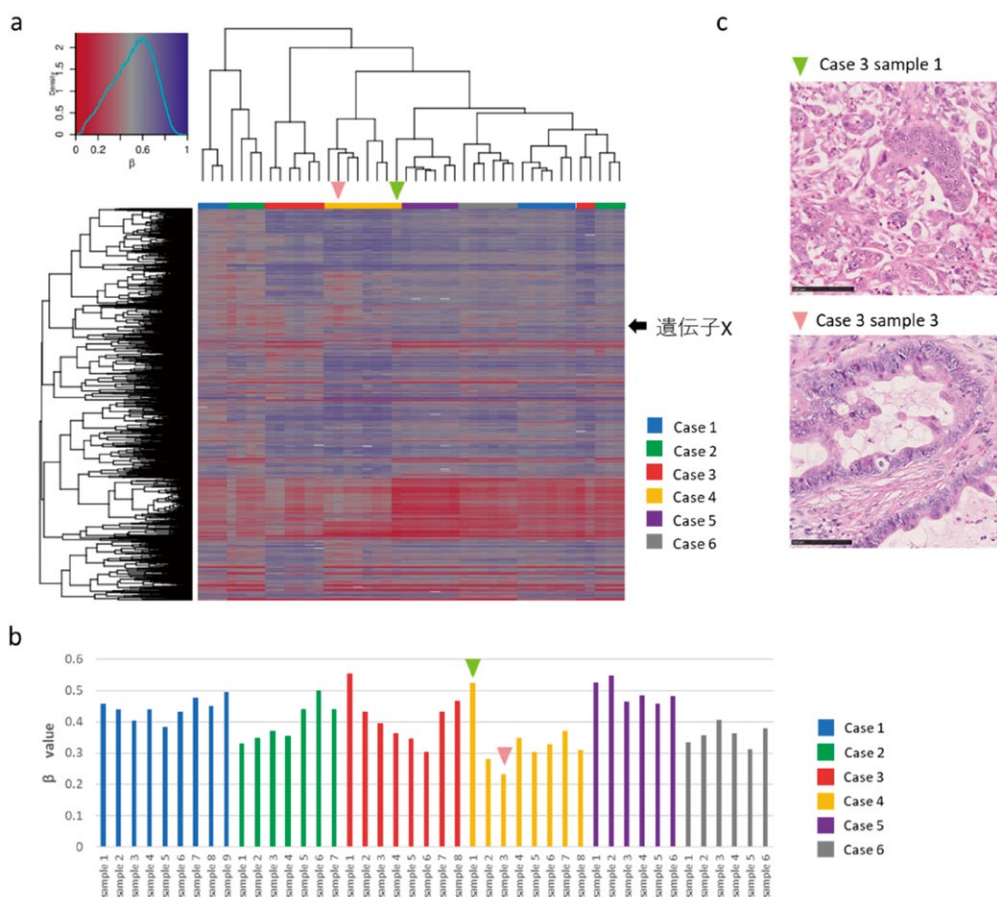


図 3 膵癌におけるDNAメチル化プロファイルの腫瘍内不均一性とメチル化変動遺伝子

- (a) クラスタリング結果とヒートマップおよび今回注目している遺伝子X。Case 1～Case 4ではメチル化プロファイルの不均一性が見られる。黄緑色▽ (Case 4 sample 1) と桃色▽ (Case 4 Sample 3) は (a)～(c)で共通である。
- (b) 遺伝子Xプロモータ領域の腫瘍内不均一性。Case 4のsample 1とsample 3で異なるベータ値を示している。
- (c) 腫瘍内組織形態像の不均一性。Case 4のsample 1とsample 3の組織形態像。Sample 1が腺腔形成の不明瞭な低分化成分なのに対して、sample 3は腺管形成のある中～高分化成分である。スケールバーは100umに相当する。

V 考 査

膵癌においては、分子遺伝学的に種々の程度に腫瘍内不均一性が見られることが報告されているが、本研究でもメチル化プロファイルの不均一性が見られることが示され、またメチル化プロファイルの変化に伴った組織形態像の異同も観察された。今回注目している遺伝子 X は膵癌の主要な oncogene であり、形態学的変化も来し得る遺伝子であることから、現在遺伝子 X のメチル化の変化が組織像の変化に着目して解析を進めている。

参考文献

- 1) Cancer Genome Atlas Research Network. Electronic address, andrew.aguirre@dfci.harvard.edu & Cancer Genome Atlas Research, N. Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* **32**, 185-203 e13 (2017).
- 2) Hayashi, A. *et al.* A unifying paradigm for transcriptional heterogeneity and squamous features in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat. Cancer* **1**, 59-74 (2020).