

# 研究報告書

研究課題：A（一般）

（平成26年度）

平成28年4月30日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 高山昭三 殿

研究施設 名古屋市立大学大学院医学研究科  
遺伝子制御学

住 所 愛知県名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄1

研究者氏名 新城 恵子



（研究課題）

膵臓がんの血中の遊離DNAとエクソソームDNAを用いた高感度DNAメチル化解析法の確立

平成27年2月6日付助成金交付のあった標記指定課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

## 研究目的

膵臓がんの早期発見のためには、早期から検出可能な診断マーカーの開発が必須である。我々はこれまで膵臓がん内視鏡下生検から得た検体を用いて、網羅的DNAメチル化解析を行い膵臓がんの診断マーカーパネルを確立してきた。本研究ではこれらのDNAメチル化マーカーを利用し、実際の膵臓がん患者の血液を用いた高感度診断法の確立と臨床応用への展開を目指す。

## 研究結果

膵臓がん組織のDNAメチル化解析から、これまでに膵臓がん検出DNAメチル化マーカーを確立してきた。本研究では患者血液由来cfDNAのメチル化状態に関して解析を行った。血液に含まれるcfDNAは微量であるため、高感度検出法である次世代シーケンサーを用いたバイサルファイトシーケンス法を用いて解析を行った。図1はマーカー遺伝子の1つのDNAメチル化解析の結果である。膵臓がん組織（FNA）のメチル化状態とcfDNAのメチル化状態の一致率はこの遺伝子では54%であった。

cfDNAのメチル化解析のためには新規の高感度検出法が欠かせないため、DNAメチル化プローブを用いた検出法を開発を試みた。1本鎖DNAとプローブの反応は良好で、メチルDNAと非メチルDNAでの結合の差は図2のように明らかな差を認めた。

図1

Case	FNA	cfDNA
1	M	UM
2	M	M
3	UM	UM
4	M	M
5	M	M
6	M	UM
7	M	UM
8	M	UM
9	M	UM
10	UM	UM
11	M	UM
12	UM	UM
13	UM	UM

しかしながら、2本鎖DNAではプローブ反応の効率が予測以上に悪く、cfDNAサンプルで検証できるレベルまでには改善できなかった。

近年、エクソソーム内にDNAが含まれていることが報告されている。まず細胞株の細胞上清にエクソソームが放出されているか、またDNAが回収できるかを試みた。図3は電顕像である。予測の大きさに近い小胞が細胞上清中に含まれていた。さらにこれからDNAを抽出し、いくつかの遺伝子のDNAメチル化解析を行ったところ、細胞株とほぼ同じDNAメチル化レベルを示した。エクソソーム内のDNAメチル化は腫瘍のDNAメチル化レベルを反映している可能性がある。今後は患者由来血液からエクソソームを抽出し、その解析を試みる予定である。

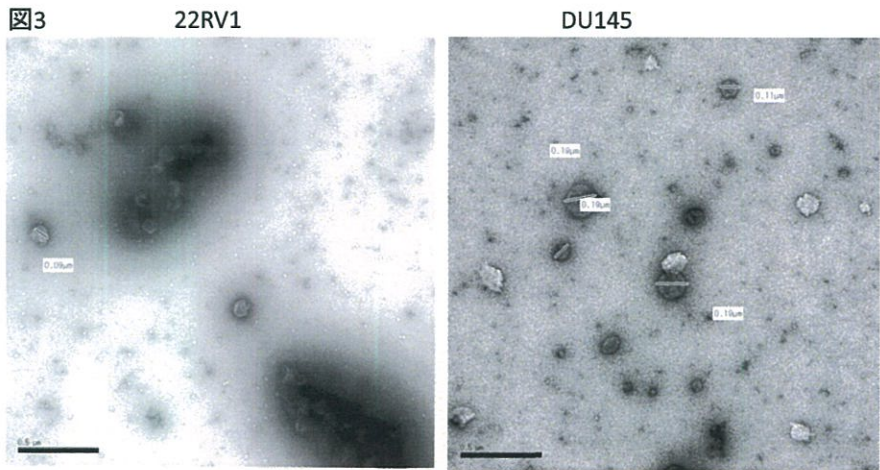
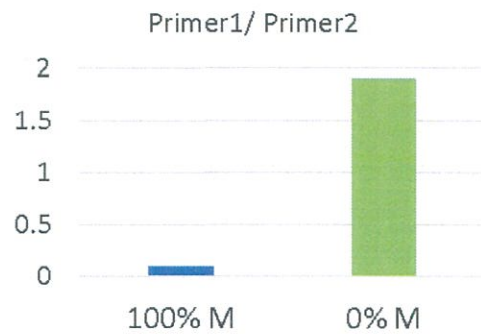


図2 1本鎖DNAの結果



### 考察

血液中に含まれる腫瘍由来の異常メチル化DNAは微量であり、DNAメチル化を利用した血液診断マーカーの確立のためには、高感度のDNAメチル化検出法の開発が必要である。我々はメチル化DNAに特異的に結合するプローブを用いたDNAメチル化検出法の確立を目指し検討を重ねてきたが、プローブの反応および検出法にさらなる工夫が必要であることが明らかとなった。エクソソーム内には細胞由来DNAが含まれていることが明らかとなり、exoDNAはがん細胞由来DNAを濃縮している可能性がある。本年度内には実際の患者血液を用いた検討は行うことができなかったが、今後検討が必要と考える。