

研究報告書
令和2年度：A課題

2022年5月21日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田 知光 殿

研究施設 慶應義塾大学医学部病理学教室

住所 東京都新宿区信濃町 35

研究者氏名 藏本 純子

(研究課題)

日米における非アルコール性脂肪性肝炎のゲノム網羅的DNAメチル化解析

令和3年4月1日付助成金交付のあった標記A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。

1. 研究成果

- (1) 米国ユタ大学のアーカイブ FFPE 組織検体の研究使用権限の取得
ユタ大学のアーカイブ FFPE 組織検体の研究利用権限を取得する為に、ユタ大学主催の CITI training を受講した。
- (2) 本研究の倫理申請の承認
慶應義塾大学医学部倫理委員会に本研究についての倫理申請を行い、倫理委員会の承認を得た(承認番号：20200332)。
- (3) 検体輸送許可書 (Material Transfer Agreement:MTA) の締結
米国ユタ大学よりアーカイブ FFPE 組織検体の供与を受ける為に、慶應義塾大学医学部と米国ユタ大学医学部間で、検体輸送許可書 (MTA) を締結した。
- (4) 対象症例の選別およびメチローム解析
すでに先行研究 (Kuramoto J et al. Carcinogenesis 38:261-270, 2017) で、日本人の NASH 症例 91 例と NASH 由来肝細胞がん症例 22 例、正常肝組織として大腸がん肝転移症例 36 例の非がん肝組織を得ており、凍結組織切片からフェノール・クロロホルム法と透析により DNA を抽出し、Infinium Methylation 450 BeadChip (Illumina 社) を用いてメチロームデータを取得している。さらに、本研究で日本人の NASH 由来肝細胞がん症例を新た

に追加し、同様に Infinium 解析を行い in silico 解析パイプラインを改訂した。

一方で、米国ユタ大学より供与を受けた NASH 症例 FFPE 組織検体から肝組織を、NASH 由来肝細胞がん症例の FFPE 組織検体からがん・非がん肝組織を、スクレイパーでそれぞれ掻き出して、GeneRead DNA FFPE Kit (QIAGEN 社)を用いて genomic DNA を抽出した。FFPE 組織より抽出された DNA は分解されているため、バイサルファイト変換後、Infinium HD FFPE Restore Kit (Illumina 社)を用いて DNA を増幅可能な状態まで修復した。メチローム解析には Infinium Methylation450 BeadChip (Illumina 社)を用いた。

(5) NASH 特異的 DNA メチル化プロファイルの人種間比較

正常肝組織に比して米国人の NASH 組織検体で有意に DNA メチル化率の変化を示す CpG 部位は、Bonferroni 補正後も 3,232 存在した。次に、3,232CpG 部位を用いて主成分分析をおこなったところ、正常肝組織、日本人の NASH 組織、米国人の NASH 組織はそれぞれ別の領域に描出された。さらに、日本人の NASH 組織と米国人の NASH 組織を比較すると、DNA メチル化率が有意に異なる CpG 部位が Bonferroni 補正後も 1,672CpG 部位存在した。1,672CpG 部位について、日本人の NASH 組織検体と米国人の NASH 組織検体を見分ける為の受信者動作特性曲線解析をおこなったところ、曲線下面積が 0.95 より大きいプローブが 1,576CpG 部位と多数存在した。以上の結果から、日本人と米国人とは異なる NASH 特異的 DNA メチル化異常を示していることが明らかとなった。

2. 今後の研究計画

今後、米国ユタ大学より追加検体として NASH 症例、NASH 由来肝細胞がん症例の FFPE 組織検体の供与を受ける予定であり、1.(4)に記載の抽出方法にて genomic DNA を抽出しメチロームデータを取得する。追加検体を加えた後、改めて日米のメチロームデータを主成分分析ならびに階層的クラスタリング等に供し、NASH 検体の DNA メチル化プロファイルに、人種に基づく差異があるかを検討する。さらに、日本人の NASH 組織検体に特異的な DNA メチル化異常を示す CpG 部位と、米国人の NASH 組織検体に特異的な DNA メチル化異常を示す CpG 部位をそれぞれ同定する。各症例の詳細臨床情報を収集し、あるいは日米の遺伝子多型に関するデータベースを参照することで、それぞれに特異的な DNA メチル化プロファイルを誘導する日米の環境要因ならびに遺伝素因の差異を同定し、NASH 由来肝細胞がん発生機序の理解を進める。他方では、人種間に共通の DNA メチル化異常が発現異常に帰結し、NASH 由来肝がん発生に寄与する遺伝子を同定し、当該遺伝子の機能解析を、ヒト肝細胞がん株、不死化肝細胞株を使用しておこなう。NASH 由来肝がんの理解を深めると共に、当該遺伝子を創薬標的候補として同定する。さらに、創薬標的候補遺伝子の DNA メチル化率に適切な診断閾値を設定することで、DNA メチル化率評価によるコンパニオン診断マーカー開発をも目指す。