



報道機関各位

DNA メチル化キャプチャ法を用いた DNA メチル化関連解析により
腎細胞がんに関連する新規 DNA メチル化バイオマーカー候補を発見

2022 年 5 月 18 日

岩手医科大学いわて東北メディカル・メガバンク機構

慶應義塾大学医学部

国立がん研究センター

【発表のポイント】

- 岩手医科大学いわて東北メディカル・メガバンク機構（IMM）は、慶應義塾大学医学部および国立がん研究センターとの共同研究において、淡明細胞型腎細胞がん（*clear cell renal cell carcinoma* : ccRCC）*1 に対する新規の血液 DNA メチル化*2 バイオマーカー*3 の探索を行いました。
- ccRCC 患者の血液由来 DNA は国立がん研究センター受診者の方々から提供いただき、その対照群（コントロール群）を東北メディカル・メガバンク（TMM）計画*4 地域住民コホート研究*5 参加者から選定し、DNA メチル化キャプチャ法*6 による DNA メチル化解析を行いました。
- 対照群に比べ、ccRCC 群では染色体 5 番に位置する *PCBD2/MTND4P12* 遺伝子上の 6 ヶ所の CpG 部位*7 が有意に低メチル化状態にあることを明らかにしました。
- 当該 6 ヶ所の CpG 部位が ccRCC の診断のバイオマーカーとして有用であるかを調べたところ、有用性の指標である AUC-ROC 値（Area under the receiver operating characteristic curve）*8 が、探索段階で 0.922、検証段階で 0.871 と、非常に高い値を示しました。
- 今回同定された ccRCC 関連 DNA メチル化バイオマーカー候補について、今後、ccRCC の進行度との相関を詳細に解析することで、新たな診断法や治療薬の開発につながることを期待されます。

【概要】

岩手医科大学いわて東北メディカル・メガバンク機構（IMM）生体情報解析部門の大桃秀樹 特任准教授、同部門部門長の清水厚志 教授、慶應義塾大学医学部病理学教室の金井弥栄 教授、同教室の新井恵史 准教授、国立がん研究センター中央病

院 藤元博行 副院長、同病院遺伝子診療部門 吉田輝彦 部門長らの研究グループは、主要な腎細胞がんである淡明細胞型腎細胞がん (ccRCC) 患者 50 名と対照群 50 名の全血由来 DNA における DNA メチル化解析を行い、ccRCC に関連して DNA メチル化状態が変化する CpG 部位を探索したところ、染色体 5 番の *PCBD2/MTND4P12* 遺伝子上に位置する 6 ヶ所の CpG 部位が ccRCC の新規 DNA メチル化バイオマーカーとなり得ることを発見しました。

さらに、別の独立した ccRCC 患者 48 名と対照群 48 名において、本バイオマーカーの有用性を検証したところ、ccRCC に対する DNA メチル化マーカーとして十分な有用性があることが示されました。本研究成果は、国際科学雑誌 *Epigenetics Communications* 誌に 2022 年 5 月 2 日付 (オンライン公開) で掲載されました (<https://epicom.biomedcentral.com/articles/10.1186/s43682-022-00009-7>)。

【研究背景】

腎細胞がん (*renal cell carcinoma* : RCC) は、腎臓の実質に悪性細胞が発生したもので、全がんの 4%、腎臓がんの 80% を占めています。早期 RCC の 5 年生存率は約 93% ですが、転移性 RCC 患者の 5 年生存率は 12% に留まることから早期発見が重要です。しかしながら、RCC 発症初期には大きな症状はなく、健康診断や高血圧、糖尿病、肥満など他の病気の検査で偶然に発見されることが多い特徴をもつことから早期発見は難しいとされています。RCC の 70% 以上は淡明細胞型腎細胞がん (ccRCC) に分類されます。そのため、ccRCC を早期に診断する有効なバイオマーカーも見つけることができれば、多くの RCC 患者を早期に発見、治療することにつながることを期待されます。

これまでにゲノムワイド関連解析 (Genome-wide association study: GWAS) ^{*9} やメタアナリシス ^{*10} によって、RCC 発症に関わる遺伝子が複数同定されていますが、遺伝的背景で説明できる RCC は 3~5% と言われています。一方、実際の RCC の発症は、喫煙、飲酒、肥満などの非遺伝的要因 (環境要因) に起因して 50 歳以降に発症することが多いとされています。近年、非遺伝的要因 (環境要因) により DNA のメチル化状態が変化し、それに伴い遺伝子発現も変化することで疾患発症につながっていることが明らかになっており、DNA メチル化は新規バイオマーカーとして期待されています。

そこで本研究では、ccRCC 患者群およびその患者群と性別・年齢をマッチングさせた健常対照者群の全血由来 DNA を用いて、ターゲットバイサルファイトシーケンス法 (Targeted-bisulfite sequencing; TB-seq) ^{*11} による DNA メチル化解析を行い、エピゲノムワイド関連解析 (Epigenome-wide association study ; EWAS) ^{*12} によって ccRCC に関連する DNA メチル化バイオマーカーを探索しました。

【研究成果】

本研究グループは、国立がん研究センターバイオバンク*13の50名のccRCC患者(ccRCC群)および、ccRCC患者と性別・年齢をマッチングさせたTMM計画地域住民コホート研究参加者50名(対照群)の全血由来DNAを用いて、TB-SeqによるDNAメチル化解析およびEWASを行いました(探索実験)。その結果、5番染色体のPCBD2(pterin-4 alpha-carbinolamine dehydratase 2)遺伝子とMTND4P12(mitochondrially encoded NADH: ubiquinone oxidoreductase core subunit 4 pseudogene 12)遺伝子上に位置する6ヶ所のCpG部位において、ccRCC群で有意に10%以上低メチル化していることが明らかになりました($p < 1.59 \times 10^{-8}$ 、図1A-G)。

次に、その得られた結果が正しいかを検証するため、先のccRCC群や対照群とは別のccRCC患者と対照群をそれぞれ48名ずつ同センターバイオバンクと、TMM計画地域住民コホート研究参加者から全血由来DNAを準備し、TB-SeqおよびEWASを行いました(検証実験)。その結果、同様にPCBD2遺伝子およびMTND4P12遺伝子上に位置するCpG部位のDNAメチル化レベルが、ccRCC群において対照群と比べて有意に10%以上低下していました($p < 3.42 \times 10^{-8}$)。

さらに、PCBD2/MTND4P12遺伝子上の6ヶ所のCpG部位がccRCCのバイオマーカーとして有用であるかを調べるために、臨床検査やバイオマーカーの有用性を検討する手法であるROC曲線による解析を行いました。その結果、6ヶ所のCpG部位の個々のDNAメチル化レベルよりも、6ヶ所のDNAメチル化レベルの合計を用いた方がccRCCのバイオマーカーとしての有用性が高いことが示されました(表1)。その有用性を示すAUC-ROC値(Area under the receiver operating curve)は、探索実験ではAUC-ROC = 0.922(図2A)、検証実験でAUC-ROC = 0.871(図2B)と共に高い有用性が示されました。

以上の結果から、PCBD2/MTND4P12遺伝子上の6ヶ所のCpG部位のDNAメチル化レベルの合計は、ccRCCに対する新規DNAメチル化バイオマーカーとして利用できる可能性が示唆されました。

【まとめと展望】

本研究は、DNAメチル化キャプチャ法を用いたDNAメチル化関連解析により、ccRCCに対する血液由来DNAに基づいた新規DNAメチル化バイオマーカー候補を同定しました。

今後は、本研究で同定したccRCCに対するDNAメチル化バイオマーカーが臨床応用できるよう、TMM計画で進めている前向きコホート研究の参加者などを対象として、未病または発症早期のccRCCを検出可能か、また腎摘手術後の予後マーカーとしても利用可能かなど調べたいと考えています。さらに、本研究は日本人を対象とした研究成果であるため、他の民族においても有用であるか検証が期待されます。

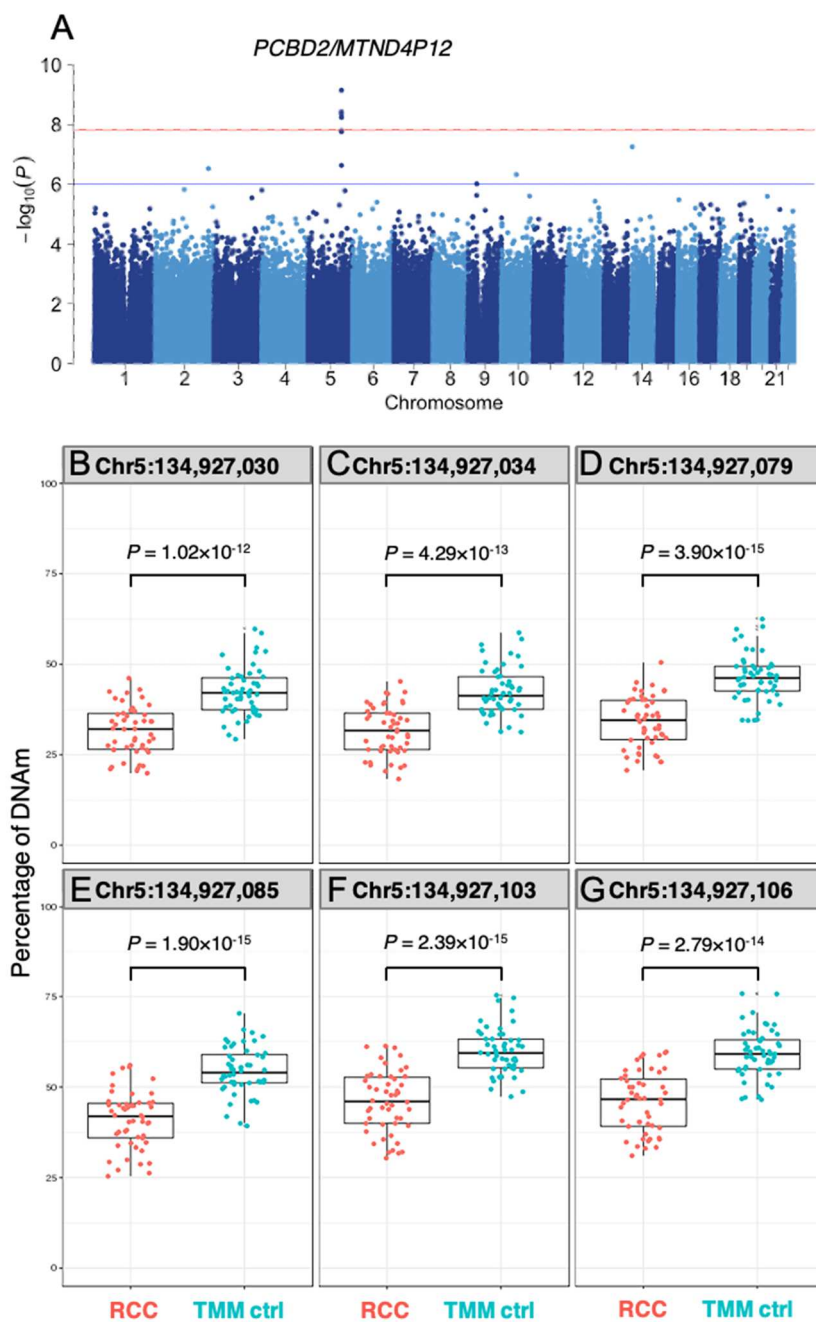


図1. 探索実験における ccRCC に対する EWAS 結果に基づく Manhattan プロット*¹⁴A) および DNA メチル化レベルに基づく Jitter プロット*¹⁵ (B-G)

	染色体番号	Position	AUC-ROC	95% CI
探索実験	5	134,927,030	0.877	0.812–0.942
	5	134,927,034	0.880	0.817–0.944
	5	134,927,079	0.907	0.850–0.964
	5	134,927,085	0.909	0.851–0.967
	5	134,927,103	0.908	0.852–0.964
	5	134,927,106	0.894	0.836–0.953
	5	6 CpGの合計	0.922	0.871–0.973
検証実験	5	134,927,030	0.834	0.753–0.915
	5	134,927,034	0.849	0.771–0.926
	5	134,927,079	0.850	0.776–0.925
	5	134,927,085	0.847	0.768–0.925
	5	134,927,103	0.855	0.775–0.934
	5	134,927,106	0.856	0.778–0.934
	5	6 CpGの合計	0.871	0.800–0.941

AUC-ROC, area under the receiver operating curve; 95% CI, 95% 信頼区間

表 1. AUC-ROC 解析の結果

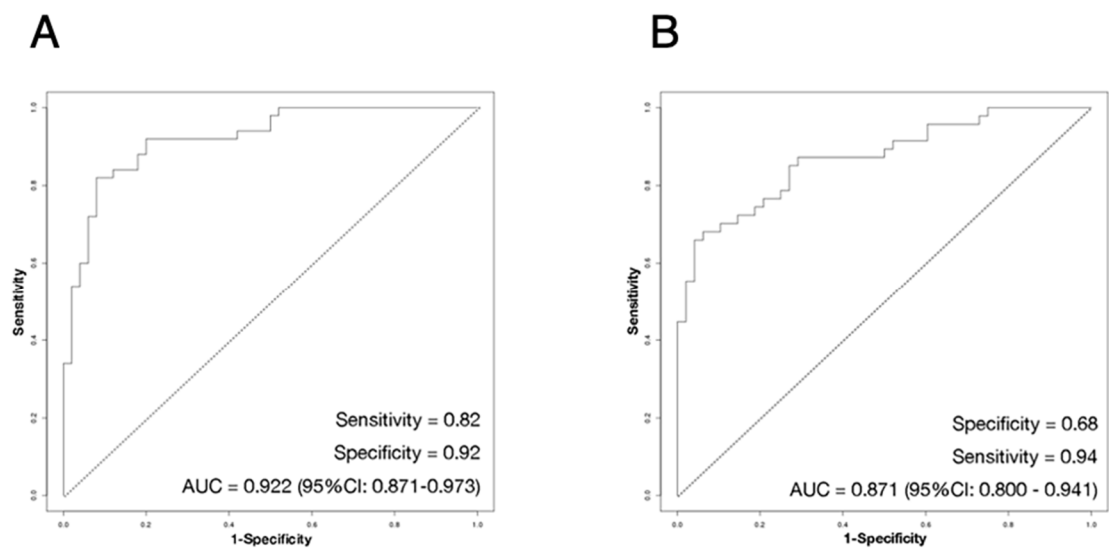


図 2. *PCBD2/MTND4P12* 遺伝子上の 6 ヶ所の CpG 部位の DNA メチル化レベルの合計に基づく AUC-ROC 解析の結果 (CpG 探索実験 (A)、検証実験 (B))

【謝辞】

本研究は、日本医療研究開発機構（AMED）の支援を受けて実施しました。本研究の実施にあたり、岩手医科大学は慶應義塾大学と研究開発契約を締結しており、また、本研究における慶應義塾大学の別研究開発契約先である国立がん研究センターの協力を得ております。

【用語解説】

* 1 淡明細胞型腎細胞がん (*clear cell renal cell carcinoma ; ccRCC*) :

成人で最も一般的なタイプの腎がんで、腎がん患者の 70%が ccRCC に分類されると言われています。ccRCC は、病理所見において透明な腫瘍細胞が多くみられることが特徴です。

* 2 DNA メチル化 :

DNA を構成する塩基 A（アデニン）、C（シトシン）、G（グアニン）、T（チミン）のうち、主に C と G が並ぶ部位（CpG）の C にメチル基（-CH₃）が付くことをいいます。発生時期の細胞の種類決定や遺伝子発現の制御などに関与しており、生活習慣や環境化学物質の曝露などによって後天的に変化します。

* 3 バイオマーカー :

2001 年に Biomarkers Definitions Working Group によって、「通常の生物学的過程、病理学的過程、もしくは治療的介入に対する薬理学的応答の指標として、客観的に測定され評価される特性」と定義されています（*Clin Pharmacol Ther.* 69, 89-95）。今回の研究では「血液検査だけで、がんを早期発見できるバイオマーカー」開発を目指しています。

* 4 東北メディカル・メガバンク（TMM）計画 :

東日本大震災からの復興事業として平成 23 年度から始められ、被災地の健康復興と、個別化予防・医療の実現を目指しています。

IMM と東北大学東北メディカル・メガバンク機構（ToMMo）を実施機関として、東日本大震災被災地の医療の創造的復興および被災者の健康増進に役立てるために、合計 15 万人規模の地域住民コホート調査および三世代コホート調査を平成 25 年より実施し、収集した試料・情報をもとにバイオバンクを整備しています。

東北メディカル・メガバンク計画は、平成 27 年度より、AMED が本計画の研究支援担当機関の役割を果たしています。

* 5 コホート研究 :

ある特定の集団を一定期間にわたって追跡し、生活習慣などの環境要因や遺伝的要因などと疾病発症との関係を解析するための研究。未来に向かって調査を進める研究を前向きコホート研究といいます。

***6 DNA メチル化キャプチャ法：**

解析対象とするターゲットの配列を集め（＝キャプチャ）、その配列の DNA メチル化状態を解析する手法です。ターゲット配列については、試薬メーカーがデザインした既製品試薬が販売されていますが、研究者自身でデザインしメーカーに製造してもらったカスタム品による解析も可能です。本研究では、既製品とカスタム品の両方を使用して解析しました。

***7 CpG 部位：**

C と G の 2 塩基が連続して並ぶ DNA の領域を CpG 部位と呼びます。CpG 部位は DNA のメチル化を受けやすい部位として知られています。

***8 AUC-ROC 値 (Area under the receiver operating characteristic curve)：**

縦軸を真陽性率、横軸を偽陽性率として描かれた ROC 曲線の右下部分の面積を AUC-ROC 値といい、検査の有用性（精度）の指標の一つです。AUC-ROC 値は、最大値は 1 で、一般的に 0.8 以上を示すと有用性（精度）が高いと言われています。

***9 ゲノムワイド関連解析 (Genome-wide association study; GWAS)：**

個人間の形質の違いと遺伝子多型の違いとの関連をゲノム全体に対して統計的に調べる方法です。

***10 メタアナリシス：**

複数の研究結果を統合して統計解析する手法のことで、個々の研究結果よりも信頼性の高い結果を得ることができます。科学的な根拠を示すエビデンスレベルは、最も高く位置付けられている解析手法です。

***11 ターゲットバイサルファイトシーケンス (Targeted-bisulfite sequencing; TB-seq)：**

DNA メチル化解析方法の一つです。全ゲノム中に約 3,200 万ヶ所以上存在する CpG 部位のうち、数十万～数百万カ所を対象に DNA メチル化解析を行うことができる方法です。本研究では、メーカーが開発・販売している試薬と本研究グループが独自に開発した試薬の両方を使用して DNA メチル化解析を行いました。

***12 エピゲノムワイド関連解析 (Epigenome-wide association study ; EWAS)：**

エピゲノムとは、ゲノムに加えられた修飾のことで後天的に変化するもので、DNAメチル化はその1つです。EWASとは、主に疾患や生活習慣と関連してDNAメチル化状態が変化するCpG部位を探索する手法です。これにより、これまでも多くのDNAメチル化バイオマーカーが見つかっています。

* 1 3 国立がん研究センターバイオバンク :

国立がん研究センターバイオバンクは、中央病院（東京都中央区）、東病院（千葉県柏市）を受診された患者さんにご協力いただき、検査に使われた血液や組織、手術などで摘出された組織の残りや診療情報などを保管し、がん研究をはじめとする広い範囲の医学研究に活用する仕組みです。これまで、治療標的となる新たながん遺伝子の発見や阻害剤の特定など、がんの予防・診断・治療に関する数多くの研究が実施され、その論文の61%が国立がん研究センター外部の研究機関との共同研究の成果となっています。

* 1 4 Manhattan プロット :

横軸に染色体1番から染色体順にDNAメチル化部位を、縦軸に関連性の指標を示すP値の $-\log_{10}$ をプロットしています。染色体上のDNAメチル化部位と疾患との関連を俯瞰する表示法です。P値の閾値は赤い線に設定しており、それより上にあるプロットは有意に疾患と関連があると見なします。

* 1 5 Jitter プロット :

当該CpG部位における個人ごとのメチル化レベルをプロットしたグラフです。各図中の四角は箱ひげ図と呼ばれ、四角内のやや太い横線は、各群におけるメチル化レベルの中央値を示しています。

【論文情報】

掲載雑誌 : Epigenetics Communications (オンライン)

論文タイトル (英語) :

Potential DNA methylation biomarkers for the detection of clear cell renal cell carcinoma identified by a whole blood-based epigenome-wide association study

論文タイトル (日本語) :

全血由来DNAにおけるエピゲノム関連解析による淡明細胞型腎細胞がんの検出に有用なDNAメチル化バイオマーカー候補の同定

著者名 (英語) :

Hideki Ohmomo^{1,2}, Shohei Komaki¹, Yoichi Sutoh¹, Tsuyoshi Hachiya^{1,2}, Kanako Ono¹, Eri Arai³, Hiroyuki Fujimoto⁴, Teruhiko Yoshida⁵, Yae Kanai³, Koichi Asahi^{1,6}, Makoto Sasaki^{1,7}, Atsushi Shimizu^{*1,2}

*責任著者

著者名（日本語）：

大桃 秀樹^{1,2}、小巻 翔平¹、須藤 洋一¹、八谷 剛史^{1,2}、小野 加奈子¹、新井恵
吏³、藤元 博行⁴、吉田 輝彦⁵、金井 弥栄³、旭 浩一^{1,6}、佐々木 真理^{1,7}、清
水 厚志^{*1,2}

*責任著者

著者所属：

1. 岩手医科大学 いわて東北メディカル・メガバンク機構
2. 岩手医科大学 医歯薬総合研究所 生体情報解析部門
3. 慶應義塾大学 医学部 病理学教室
4. 国立研究開発法人 国立がん研究センター 中央病院 泌尿器・後腹膜腫瘍科
5. 国立研究開発法人 国立がん研究センター 中央病院 遺伝子診療部門
6. 岩手医科大学 医学部 腎・高血圧内科
7. 岩手医科大学 医歯薬総合研究所 超高磁場 MRI 診断・病態研究部門

DOI : 10.1186/s43682-022-00009-7

【お問い合わせ先】

研究内容に関して

岩手医科大学

いわて東北メディカル・メガバンク機構 生体情報解析部門

部門長 清水 厚志

電話番号：019-651-5111（内線 5473） Eメール：ashimizu[AT]iwate-med.ac.jp

報道に関して

いわて東北メディカル・メガバンク機構 広報・企画部門

部門長 遠藤 龍人

電話番号：019-651-5111（内線 5509） Eメール：megabank[AT]j.iwate-med.ac.jp

慶應義塾大学

信濃町キャンパス総務課

電話番号：03-5363-3611 Eメール：med-koho[AT]adst.keio.ac.jp

国立がん研究センター

企画戦略局 広報企画室

電話番号：03-3542-2511 Eメール：ncc-admin[AT]ncc.go.jp

※ 本リリースは、文部科学記者会、科学記者会、岩手県教育記者クラブ及び、共同プレスリリース機関からの情報配信を希望されたプレス関係者の方に送付しております。