

## 血中遊離DNAのエピゲノム異常を利用した膵臓がん 高感度診断法の開発

愛知県がんセンター研究所  
腫瘍病理学部 主任研究員 新城恵子

愛知県がんセンター中央病院  
消化器内科 部長 山雄 健次

愛知県がんセンター研究所  
ゲノム制御研究部 部長 近藤 豊

### <目的>

本研究の目的は、DNA メチル化網羅的解析法を利用し、愛知県がんセンター中央病院で蓄積してきた膵臓がん原発巣および同一患者から得られた血液を用いて、膵臓がんの有効な診断法の開発を試みることである。

### <方法>

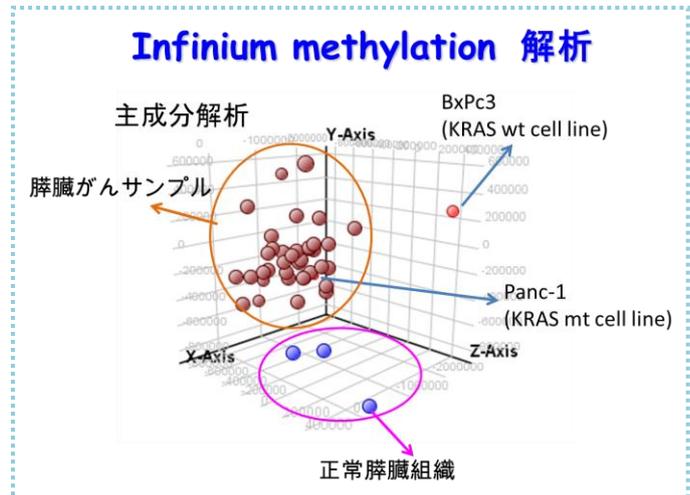
愛知県がんセンター中央病院消化器内科で、様々なステージの膵臓がん症例診断時に施行した fine needle aspiration (内視鏡的超音波ガイド下穿刺吸引生検、FNA) 検体 約 100 例および、同一症例の診断時に採取した血清から得られた DNA を用いてメチル化解析を行う。

### <平成 24 年度の研究成果>

1. 愛知県がんセンター中央病院消化器内科で行われた 103 症例の FNA 検体から DNA、RNA 抽出を行った。得られた DNA は平均 2300ng (300ng~7000ng) でありサンプルによりばらつきがあった。少量の DNA のサンプルであっても、今後遺伝子変異解析などを十分検討可能とするために、得られた DNA を whole genome amplification (WGA) kit を用いて DNA 増幅を行った。WGA 前後の DNA でパイロシークエンサーを用いて KRAS 変異解析を行ない、変異解析を行ったところ、WGA 後 DNA でも KRAS 変異の検出は可能で

あったが、定量は不能であると考えられた。WGA で増幅した DNA を用いて今後 p53、SMAD4 などの膵臓がんで変異の頻度が高い遺伝子の変異解析が可能であると考え。p53 の変異に関しては、現在次世代シーケンサーを用いて解析を進めている。

2. 膵臓がんのゲノムワイドなメチル化プロファイルを検討するため、44万プローブが搭載されているメチル化アレイ解析（イルミナ社 Infinium）を行った。KRAS 遺伝子変異は膵臓がんの約 90% で存在することが報告されているため、FNA 検体にがん部が十分量含まれていると考えられる KRAS 遺伝子変異陽性症例



40 症例を選択し、DNA メチル化解析を行った。主成分解析では膵臓がんは正常膵臓組織とは全く異なるプロファイルを示した。今後アレイプロファイルの詳細に解析し、膵臓がんで高頻度にメチル化する遺伝子を同定し、膵臓がんメチル化マーカー候補遺伝子を選択する予定である。

3. 膵臓がんメチル化マーカー候補遺伝子は、膵臓がん症例の原発巣由来の DNA と血液中遊離 DNA においてメチル化レベルを比較検討する予定である。現在アッセイ系の確立のため、肺がん症例の腫瘍部 DNA と血中遊離 DNA のメチル化の比較検討を行っている。パイロシーケンシング法による解析では血中遊離 DNA での異常 DNA メチル化の検出は不能であったが、定量的 MSP 法で一部の症例において異常 DNA メチル化の検出が可能であった。さらに精度を上げるためデジタル PCR を利用した検出を試みている。

### <考察>

血液中に含まれる腫瘍由来の異常メチル化 DNA は微量であることが考えられ、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、より高感度の DNA メチル化検出法の開発が必要であると考えられた。

今後アレイプロファイルの詳細な解析から膵臓がんで高頻度にメチル化する遺伝子を同定し、血中遊離 DNA とメチル化状態を比較検討したうえで膵臓がんメチル化マーカー候補遺伝子の確立を試みる予定である。