

脳腫瘍のDNAメチル化分類における ナノポアシーケンスの臨床応用

里見 介史

杏林大学医学部病理学教室

背景

中枢神経系腫瘍は、もともと予後不良の腫瘍の一つであり、正確な病理分類・診断が診療のために必須である。より正確な病理診断を実現するために、形態学的な病理組織学的所見と遺伝子異常の統合診断が採用されており、2021年に出版された世界保健機関 (World Health Organization, WHO) 脳腫瘍分類第5版 (WHO CNS5)¹⁾では、ゲノムワイドDNAメチローム解析も診断手法のひとつとなっている。ゲノムワイドDNAメチローム解析のためには、Illumina Infinium Methylation EPIC BeadChip array (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA; EPICアレイ)が事実上の解析手法の一つとして広く用いられており、ドイツがんセンター (Deutsches Krebsforschungszentrum, DKFZ) が提供するウェブツール (DKFZ classifier) にアップロードすることでDNAメチル化分類が得られる²⁾。しかし、コストや解析期間から、その臨床応用には制約がある。

ロングリード解析技術として知られるナノポアシーケンスは極めて長いDNA配列 (理論的な限界長はない) を解読できるだけでなく、5-メチルシトシン (5mC) の電気信号をナノポアセンサーで解読することで、同時にDNAメチル化が判定できる。ナノポアシーケンスは大規模な実験室が不要な卓上装置で、1検体から解析が可能であり、2-3日で結果が得られる。また、1検体あたりのコストは数万円程度である。

本研究では、脳腫瘍のDNAメチル化分類の有用性を明らかにするとともに、ナノポアシーケンスによるDNAメチル化分類が臨床実装可能か検証した。

方法

杏林大学医学部付属病院において外科的に切除された原発性脳腫瘍の臨床検体を用いて、DNAメチル化アレイ

(Infinium Methylation EPIC BeadChip [EPIC, Illumina, San Diego, CA, USA]) とナノポアシーケンス [R9.4.1 flow cell FLO-MIN106D, Oxford Nanopore Technologies, UK] によるゲノムワイドDNAメチル化プロファイルの比較、検討を行った。症例は、IDH変異乏突起膠腫 (M0080) とびまん性正中膠腫、H3K27異状 (M0082) およびIDH野生型膠芽腫 (M0047) を用いた。

結果

IDH変異乏突起膠腫 (M0080) とびまん性正中膠腫、H3K27異状 (M0082) の二例について、凍結検体から抽出したDNAを用いて、EPICアレイによる解析を行った。得られたデータをDKFZ classifierにアップロードしたところ、両者は正確に判定された (図1)。

一方、IDH野生型膠芽腫 (M0047) のゲノムワイドDNAメチローム解析を行ったところ、DKFZ classifierではいずれのDNAメチル化分類にも合致せず、形態一遺伝子統合診断結果と矛盾が生じた。そこで、2801例のリファレンスとなる公開データとともに、非線形次元削減法であるt-distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE) でDNAメチロームを可視化したところ、IDH野生型膠芽腫のクラスターの近傍に位置し、統合診断を補助できた (図2)³⁾。

なお、DKFZ classifierは肉腫でもDNAメチル化分類が可能である。稀な肉腫である、pulmonary inflammatory leiomyosarcomaについて解析をしたところ、DKFZ classifierのリファレンスに入っていない腫瘍型であり、炎症細胞浸潤も目立つことから、間違った腫瘍型が推定された。そこで、1077例のリファレンスとともにt-SNEで可視化したところ、いずれの既知の腫瘍型とも異なることが確認され、炎症細胞の分画化でも推定結果が間違っていたことが確認された⁴⁾。

次に、ナノポアシーケンスの性能の検証のために、

図 1

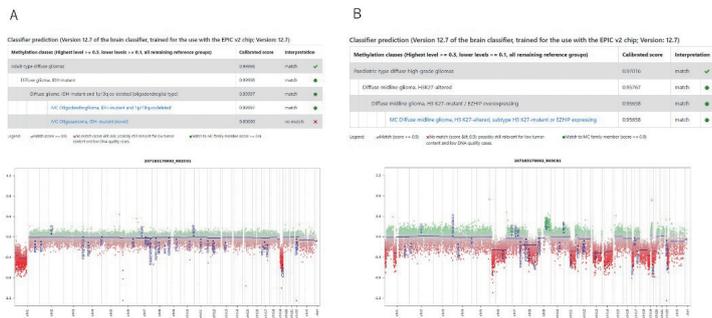


図 1 DNAメチル化アレイデータによるDNAメチル化分類

ドイツがんセンターの提供するウェブツールにデータをアップロードしたところ、いずれの症例(A: M0080, B: M0082)も正確に判定された。M0080では、特徴的な染色体異常である1pと19qの共欠失も確認された。

図 2

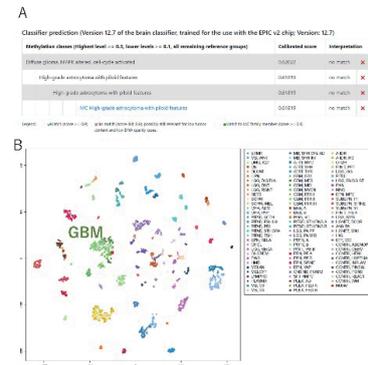


図 2 次元削減法によるDNAメチロームの可視化
IDH野生型膠芽腫症例は、DKFZ classifierでは、いずれの腫瘍型にも合致しなかった(A)。t-distributed stochastic neighbor embeddingでDNAメチロームを可視化したところ、IDH野生型膠芽腫のクラスターの近傍にプロットされ、次元削減法が統合診断に寄与した(B)。

図 3

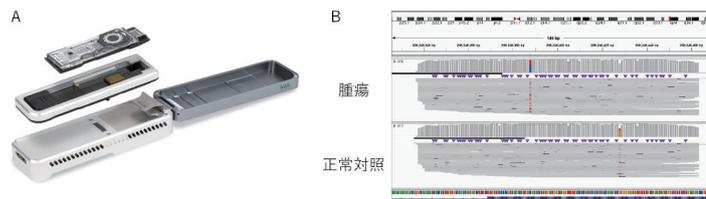


図 3 ナノポアシーケンスによる変異解析

ナノポアシーケンサー本体はUSBにより電子計算機と接続し、卓上で解析可能な機器である(A)。PCRによって増幅した産物をシーケンスしたところ、脳腫瘍で最も頻度の高い塩基置換のひとつであるIDH1 R132Hを検出できた。本変異の検出のために要した時間は、24時間以内であった。

PCRによる増幅産物をシーケンスした。DNA抽出後、2日後に十分なリード深度をもって変異解析が可能であった(図3)。そのうえで、EPICアレイ解析に供した凍結検体から抽出したDNA(M0080, M0082)でシーケンスしたところ、DNA配列結果を得ることはできたものの、十分なリード深度を確保することができず、DNAメチル化状態の判定も困難であった。要因として、検体から抽出したDNA量の不足や、前処理方法のほか、解析時間の最適化ができていなかったことが挙げられた。

結論

DNAメチル化分類は臨床上、有用な統合診断手法であり、特に次元削減によるDNAメチロームの可視化は臨床応用可能と考えられた。ナノポアシーケンスによるDNAメチル化分類の臨床実装にあたっては、十分な質と量の臨床検体の確保やライブラリ調整の手順の最適化によるシーケンス深度の確保が必要であり、今後の基礎検討課題が明らかにされた。

謝辞

本研究をご支援いただきました医学部若手支援研究費お

よび関係各位に厚く御礼申し上げます。また、日頃より研究活動に加えて教育、診療を支えて下さっている病理学教室の皆さまに感謝申し上げます。

文献

- 1) WHO classification of tumours, central nervous system tumours, 5th edition, Volume 6. WHO Classification of Tumors Editorial Board. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2021.
- 2) Capper D, Jones DTW, Sill M, Hovestadt V, Schrimpf D, Sturm D, et al. DNA methylation-based classification of central nervous system tumours. *Nature* 2018; 555: 469-74.
- 3) Satomi K, Saito K, Shimoyamada H, Onizuka H, Shibayama T et al. The role of nonlinear dimension reduction of genome-wide DNA methylome in integrated diagnosis: A case study of glioblastoma, IDH-wildtype. *Pathol Int.* 2023; 73: 523-6.
- 4) Shibayama T, Satomi K, Tanaka R, Yoshida A, Nagahama K, Hayashi A et al. Pulmonary inflammatory leiomyosarcoma represents a potential diagnostic pitfall of DNA methylation-based classification of sarcomas: a case report. *BMC Pulm Med.* 2023; 23: 324.