

DNA メチル化プロファイルによる 前立腺癌特異的なバイオマーカー候補の探索

村田 翔平

杏林大学医学部病理学教室

目的

前立腺癌は、国内で毎年約10万人が新たに診断される、男性の罹患数が最も多いがんであり、今後もその罹患数は増加が見込まれている。血清PSA検査は広く普及しているが、PSA値は前立腺肥大症や前立腺炎によっても上昇するなど、偽陽性が問題となる。前立腺癌診療のさらなる進展には、初期段階の前立腺癌を正確に検出できる特異度の高いバイオマーカーが必要不可欠である。

前立腺組織にみられるさまざまな病変のうち、High-grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN) と呼ばれる異型上皮は、前がん病変とされる。前立腺癌は、他の多くの固形癌と比べて体細胞点変異負荷が比較的低い一方、*TMPRSS2::ERG*融合をはじめとする遺伝子融合、コピー数異常およびゲノム構造異常をしばしば示す。いっぽう、DNAメチル化の異常については、*GSTPI*プロモーター領域のメチル化が正常上皮からHGPIN、前立腺癌へと段階的に拡大することが示されている [Gupta et al. *Cancer Prev Res.* 2023] が、組織学的に同定された非腫瘍性前立腺上皮、HGPINおよび前立腺癌の三者を同一の解析系で比較し、病変の進展に伴って変化するCpG部位を網羅的に検討した研究は限られている。以上より、本研究においては、正常、HGPIN、および前立腺癌で異なるメチル化パターンを示すCpGサイトを同定することを目的とした。

材料と方法

杏林大学医学部付属病院で病理診断に供された前立腺全摘術検体のうち2例を選択し、正常、HGPIN、腺癌領域を同定した。診療に供されたホルマリン固定パラフィン包埋材料 (FFPE) の残余検体から、分取し、DNAをQiagen DNeasy Blood & Tissue Kit [Qiagen, Hilden, Germany] を用いて抽出した。Qubit [Thermo Fisher

表1 サンプル採取の方法とDNA収量。ダイセクション法に対しメス法では有意に高いDNA収量が得られた (メス法平均43.7 ng/ml vs. ダイセクション法平均6.9 ng/ml。p<0.001, 対応のあるt検定)

DNA濃度 (ng/ μ l)	スライドガラス上 ダイセクション	メス法
M0338	<1	31.8
M0341	7.48	46.4
M0342	8.18	41.6
M0343	8.8	54.8

Scientific, MA, USA] によりDNA濃度を測定した。

抽出されたDNAは、バイサルファイト処理の後、Illumina社のEPICアレイ およびiScan System [Illumina Infinium Methylation EPIC BeadChip, Illumina, San Diego, USA] によりDNAメチル化シグナルを取得した。

結果

FFPE切片上の目的とする領域を選択するために、一般的な方法に則って、スライドガラス上の組織を爪楊枝などの鋭利な道具でダイセクションしたものの、DNAメチル化アレイ解析に十分なDNA量は得られなかった。そこでパラフィンブロック上にメスで切り込みを入れて薄切することで、十分量のDNAを採取した (表1)。

DNAメチル化分類の次元削減法は脳腫瘍診断で臨床応用されている。tSNEと呼ばれるDNAメチル化アレイデータの次元削減法を用いた解析により、脳腫瘍を分類することが可能である。EPICアレイに搭載された約93万のプロープのうち、腺癌、HGPIN、正常部分で差のある上位1000個のプロープを用いてtSNEによる検討を行った。症例1と症例2で、腺癌、HGPIN、正常部分が一つのクラスタとなった (図1)。正常、HGPIN、および腺癌の差よ

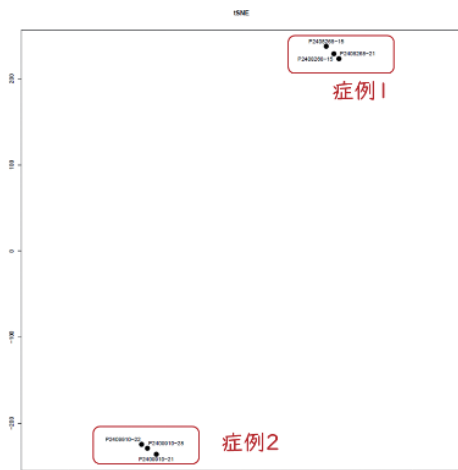


図1 tSNE。対象領域による差よりも、個人差のほうが大きいと考えられた。

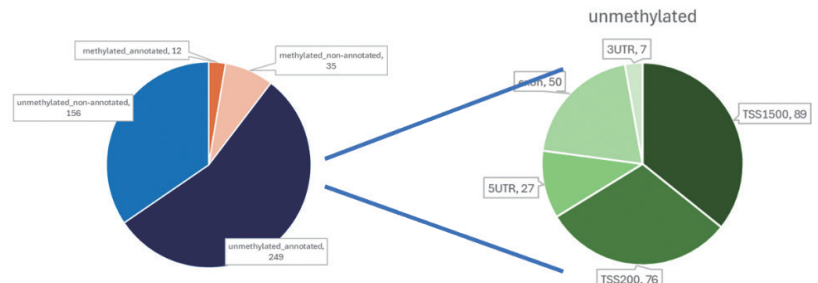


図2 ロジット変換を経て修正F検定を行い、249個のプロープに着目した。

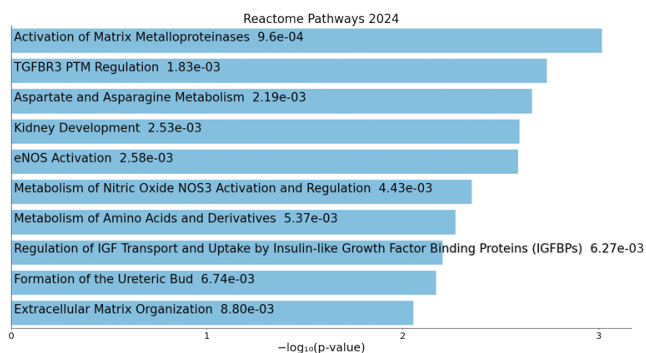


図3 Reactome Pathways 2024, Enricher. TSS1500とTSS200に相当する118個に絞りパスウェイ解析を行った。

term	p-value	q-value
Activation of Matrix Metalloproteinases	0.00096	0.186804
TGFBR3 PTM Regulation	0.001833	0.186804
Aspartate and Asparagine Metabolism	0.002192	0.186804
Kidney Development	0.002526	0.186804
eNOS Activation	0.00258	0.186804
Metabolism of Nitric Oxide NOS3 Activation and Regulation	0.00443	0.267275
Metabolism of Amino Acids and Derivatives	0.005371	0.270937
Regulation of IGF Transport and Uptake by Insulin-like Growth Factor Binding Proteins (IGFBPs)	0.006273	0.270937
Formation of the Ureteric Bud	0.006736	0.270937
Extracellular Matrix Organization	0.008801	0.314042

図4 マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)経路が上位にランキングされた。

りも個人差の方が大きく、次元削減では病変の分離は困難と考えられた。

メチル化状態は各プロープごとに β 値(0~1)で表されるが、計算上の制約が大きいため、M値($-\infty \sim \infty$)にロジット変換し、経験ベイズによる修正t統計量を算出して修正F検定を行い、 $P < 0.01$ となるプロープを選択した。485個のプロープが選択され、正常→HGPIN→腺癌と比較すると、メチル化されるプロープは47個、脱メチル化されるプロープは405個あった。遺伝子座情報を含む脱メチル化プロープ249個に着目した(図2)。

これら249個のプロープのうち、さらにTSS1500とTSS200に相当する118個に絞りパスウェイ解析を行った(Reactome Pathways 2024, Enricher)ところ(図3)、有意差第一位はマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)経路であった(図4)。間質細胞の増生や上皮間葉転換のほか、細胞の増殖、分化、血管新生、アポトーシスが前立腺癌の初期段階での発生に関与している可能性が示唆された。

考察

組織標本の狙った領域よりDNAを採取するにはスライドガラス上の組織をダイセクションする方法がしばしばとられるが、今回の検討ではパラフィンブロックにメスを入れる独自の工夫を必要とした。前立腺組織では正常、HGPIN、前立腺癌(腺房細胞癌)のいずれにおいても、立体構造上、空隙を多く有していると考えられ、また間質も多く含まれていることから、通常の方法では十分なDNA収量を確保できなかった可能性がある。tSNEでは病変よりも症例ごとの違いが強く反映された可能性があることとあわせ、前立腺癌のDNAメチル解析には臓器の特性を考慮した個別の工夫が必要と考えられた。

一方で、ロジット変換を介した修正F検定により、有意差を示すプロープの選択とパスウェイ解析が可能となった。MMP関連経路は多くの癌において、組織リモデリング・細胞外基質分解・浸潤・炎症など多面的に発がんやがんの成長・進展に関与するとされる。今回得られた結果は

正常→HGPIN→腺癌と、発がんの各段階に伴ってMMP経路に含まれる遺伝子のプロモーター領域が脱メチル化されていると解釈可能であり、前立腺癌の発生の初期段階に

おいて、同経路の遺伝子発現が亢進している可能性がある。以上の一連の変化は新規バイオマーカー候補となり得ると考える。