



Title	Extensive methylation analysis of circulating tumor DNA in plasma of patients with gastric cancer
Author(s)	永野, 慎之介
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/105721
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	永野 慎之介
論文題名 Title	Extensive methylation analysis of circulating tumor DNA in plasma of patients with gastric cancer (胃癌患者血漿中の循環腫瘍DNAにおけるメチル化解析)
論文内容の要旨 〔目 的(Objective)〕 胃癌において特異的かつ高感度なバイオマーカーは未だ確立されていない。近年、末梢血中に存在する腫瘍由来DNA (circulating tumor DNA: ctDNA) が各癌腫で注目されており、我々もこれまでに変異解析を用いた胃癌患者の病勢評価におけるctDNA検出の有用性を報告してきた。しかし、胃癌ではTP53をはじめとする特定の癌関連遺伝子の変異検出率が低いため、遺伝子変異に基づくctDNA解析は感度に限界がある。そこで我々は、ctDNAのメチル化に着目し、その検出がリキッドバイオブシーにおける感度向上につながると考えた。本研究では、胃癌切除標本の癌部・非癌部組織および胃癌患者の血漿を用いて、広範なCpG部位を網羅する次世代シーケンサー (NGS) 解析を行い、ctDNAのメチル化レベルが病勢を的確に反映し得る高感度な血中バイオマーカーとなるかどうか検討した。 〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕 本研究のメチル化解析には、QIAseq Targeted DNA Panels (QIAGEN) を用いたターゲットバイサルファイトシーケンスを採用した。抽出したDNAをEPITECT Fast Bisulfite Sequencing Conversion Kit (QIAGEN) を用いてバイサルファイト処理し、メチル化解析を行った。その後、MiSeq System (Illumina) によりシーケンスを実施した。各CpGサイトにおけるDNAメチル化率は、当該部位でメチル化が認められたリード数を、そのコンテキストに一致するリード数で割ったβ値として算出し、各遺伝子のβ値は含まれるCpGサイトの平均値とした。 解析対象としたのは、大腸癌を中心とした悪性腫瘍におけるメチル化が報告されている63遺伝子であり、まずThe Cancer Genome Atlas (TCGA) データベースを用いて胃癌におけるメチル化レベルを測定した。TCGAデータベースより、Illumina Human Methylation 27/450 プラットフォームにより測定された 63遺伝子の胃癌部および非癌部のβ値を抽出し、解析を行った。その結果、44遺伝子が非癌部と比較して癌部で有意に高いβ値を示し、高メチル化されていることが確認されたため、以後はこれら44遺伝子を解析することにした。 次に、胃癌術後再発患者10例を対象に、GeneRead DNA FFPE Kit (QIAGEN)を用いて、切除標本から癌部および非癌部のDNAを抽出し、44遺伝子のメチル化解析を行った。癌部/非癌部のβ値の比(T/N)を用いたクラスタリング解析の結果、4つの主要クラスター (A、B、C、D) が生成され、その中でもクラスターAを構成しているSPG20, FBN1, SDC2, TFPI2, SEPT9の5遺伝子はT/Nの平均値が最も高値であったため (A : 3.424, B : 1.693, C : 1.827, D : 1.120)、これら5遺伝子を胃癌患者末梢血を用いたリキッドバイオブシーの候補遺伝子と考えた。 そこで、術後再発・増悪の経過をたどった16例を対象に、病勢増悪時に採取した血漿からApostle MiniMax High Efficiency cfDNA Isolation Kit (Beckman Coulter) を使用してDNA抽出を行い、NGS解析を行った。上記5遺伝子のメチル化レベルをもとにクラスタリング解析を行うと、高メチル化クラスター(平均β値:0.2159)と低メチル化クラスター(平均β値:0.0418)に二分され、高メチル化症例では低メチル化症例に比べて全生存期間が有意に不良であった (log-rank P=0.009)。一方で、同時期に測定した血中のCEAまたはCA19-9の高値群と低値群の全生存期間を比較した場合には、両群間に有意差は認めなかった (log-rank P=0.208)。 最後に、cStage III胃癌に対して切除後に再発した1症例において複数時点での血漿を採取して解析したところ、CEAやCA19-9が経過を通じて基準値内に留まったのに対し、5遺伝子の平均メチル化レベルは治療前に最も高値を示し、術前化学療法および手術により減少、その後再発時に再上昇する経過を示した。この結果から、これら5遺伝子のctDNAメチル化レベルが腫瘍の病勢を反映している可能性が示唆された。 〔総 括(Conclusion)〕 本研究では、胃癌患者を対象に血漿中ctDNAのメチル化レベルを測定したところ、5つの遺伝子 (SPG20, FBN1, SDC2, TFPI2, SEPT9) の血漿中メチル化レベルが、再発胃癌患者における腫瘍病勢や予後を反映することを明らかにした。これら5遺伝子の血漿ctDNAメチル化解析は、胃癌に対する新たなリキッドバイオブシーとして有用である可能性が示唆された。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 永野 慎之介			
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	大阪大学教授	土岐 祐一郎 署名
	副 査	大阪大学教授	山内 浩文 署名
	副 査	大阪大学教授	谷内田 真一 署名

論文審査の結果の要旨

本研究では、胃癌患者を対象に血漿中循環腫瘍DNAのメチル化解析を行い、リキッドバイオプシーにおける新規バイオマーカーとしての有用性を評価した研究である。まずTCGAデータセットでメチル化と悪性腫瘍に関連のある遺伝子の胃癌におけるメチル化状況を確認し、癌部で有意に高メチル化である44遺伝子を同定した。さらに再発胃癌で化学療法を受けた16例を対象に、腫瘍部・非腫瘍部および血漿のメチル化解析を次世代シーケンサを用いて行い、SPG20、FBN1、SDC2、TFPI2、SEPT9の5遺伝子が腫瘍部で特に高メチル化されていることを同定した。血漿解析では、これら5遺伝子の血中高メチル化群は低メチル化群に比べ全生存率が有意に不良であることを示し、経時的採血を行った症例では、血漿中のメチル化レベルが腫瘍病勢と密接に推移した。以上より、5遺伝子の血漿ctDNAメチル化は、胃癌における予後・病勢評価のバイオマーカーとなり得ることが示唆され、今後新たな血漿バイオマーカーとしてなる可能性を示した。よって、本研究は学位の授与に値すると思う。