

## 総括研究報告書

1. 研究開発課題名：末梢血細胞の DNA メチル化指標を用いた新規発がんリスク診断法の開発
2. 研究開発代表者：慶應義塾大学・医学部・専任講師 新井恵吏
3. 研究開発の成果

本研究の大きな目標は、個人の環境暴露による発がんリスクを、末梢血細胞を用いたスクリーニングで評価し、発がんリスクに応じたテーラーメイドのがん検診プランを設計することによる、がんの個別化予防医療の実現である。DNA メチル化異常は、発がん要因への曝露や遷延する炎症によって生じ、ヒト諸臓器に前がん状態を形成し、発がんリスク指標となることが知られている。本研究では、局所の組織に DNA メチル化異常をもたらす発がん因子が、血中に入って末梢血細胞にも同様の DNA メチル化異常を生じさせ、末梢血細胞を用いた発がんリスク評価指標となり得ることを示すことを目指した。

先行研究において取得済みの、多段階発がんの諸過程にある肺組織の Infinium HumanMethylation27 BeadChip データのバイオインフォマティクス解析を行った。Welch T 検定で、肺腺がん症例より得られた前がん段階にある肺組織において正常肺組織に比して DNA メチル化率が有意に変化する 3778 プローブ (うち DNA メチル化亢進 1526 プローブ、DNA メチル化減弱 2252 プローブ) を抽出した。同様に、Jonckheere-Terpstra 検定で、正常肺組織から肺腺がん症例より得られた前がん段階にある肺組織、その肺に生じたがんと連続的に DNA メチル化率が変化する 12368 プローブ (DNA メチル化亢進 6460 プローブ、DNA メチル化減弱 5908 プローブ) を抽出した。両者に共通する 1928 プローブ (DNA メチル化亢進 484 プローブ、DNA メチル化減弱 1444 プローブ) を、発がんリスク指標となる候補 CpG 部位として同定した。

肺腺がん症例ならびに対照症例の血球由来 DNA 入手までの間に、先行研究で収集された腺がん症例ならびに対照症例、計 419 例の Infinium HumanMethylation450 BeadChip を用いた血球由来 DNA のメチロームデータの解析により、喫煙がもたらす末梢血細胞の DNA メチル化プロファイルへの影響を検討した。非喫煙・過去喫煙・現在喫煙のカテゴリーならびに pack-year (一日の喫煙量×喫煙年数) による重回帰解析を行った。いずれも有意な DNA メチル化の変化を示すとして多数のプローブが抽出され、前者のカテゴリーによる解析において、p 値の最も小さいプローブでは  $1 \times 10^{-61}$  を下回っていた。小さい p 値を持つプローブの一部は、染色体上の特定の部位に集中していた。また、Infinium HumanMethylation450 BeadChip では同一の遺伝子上に複数の一塩基解像度のプローブを有しているが、有意な DNA メチル化の変化を示すプローブが複数同定される遺伝子が存在していた。そのような遺伝子の一部は化学物質の代謝に関係する遺伝子であった。以上より、①喫煙等の発がん要因曝露状態と相関する血球 DNA メチル化指標があること、②発がん要因曝露の指標はサロゲートマーカーで構わないが、その DNA メチル化の変化が遺伝子発現に帰結して発がんの分子異常を説明できる可能性も残されていることがわかった。

上記で抽出した、末梢血細胞において喫煙状態と相関する DNA メチル化の変化が、肺組織にも観察されるか検討を行ったが、Infinium HumanMethylation27 にも共通して搭載されている上位 2 プローブにおける予備検討では、正常肺と前がん状態にある肺組織、前がん状態にある肺組織における喫煙の程度のいずれの解析においても、有意な DNA メチル化の差違はみられなかった。但し、先行研究で既に報告した、喫煙や炎症の程度を反映し、その肺に生じるがんの悪性度を規定する非がん肺の DNA メチル化プロファイルのクラスターと一致していた。肺がんの最大の発がん要因は喫煙であるが、一方で発がん要因の全てではないことから、DNA メチル化診断指標を策定する際には、喫煙を含む複数の発がん要因への曝露を考慮すべきと考えられた。