

## 論文内容の要旨

### **Methylation status and long-fragment cell-free DNA are prognostic biomarkers for gastric cancer**

cell-free DNA のメチル化レベルと long-fragment 濃度は

胃癌の予後予測因子である

日本医科大学大学院医学研究科 消化器外科学分野

大学院生 高 和英

(Online First (web 掲載): 2021 年 2 月 28 日)

**【背景と目的】**

血中には細胞外に逸脱した cell-free DNA (cfDNA) が存在する。cfDNA のうち、がん特有の変異を有するものは Circulating tumor DNA (ctDNA) と呼ばれる。cfDNA、ctDNA は半減期が短いため、術後に ctDNA が同定されれば体内に腫瘍細胞が遺残している可能性が高いことが示唆され、Minimal Residual Disease (MRD) と呼ばれ、MRD 陽性例は陰性例と比較して再発率が高い。MRD は主に大腸癌でその有用性が報告されているが、胃癌組織の多くではがん特有の遺伝子変異が認められないため、ctDNA を用いた MRD 同定法を利用しにくい。

cfDNA は、アポトーシスをおこした細胞に由来する短い short fragment cfDNA (<150 bp) とネクローシスをおこした細胞に由来する長い long fragment cfDNA (lcfDNA, > 150 bp) が存在する。lcfDNA は健常者では少量のみ認めるが、担癌患者では壊死した腫瘍細胞由来の lcfDNA の濃度が高い。LINE1 は、ヒトゲノムの約 17% を構成し、そのメチル化レベルの低下は多くの悪性腫瘍組織で報告されている。腫瘍細胞が崩壊すればメチル化レベルが低下した LINE1 は血液中に放出される。本研究では胃癌患者を対象として、手術前後の血中 LINE-1 メチル化レベルの低下および lcfDNA 量の増加が予後予測因子となるか検証した。

**【方法】**

2016 年 10 月から 2018 年 3 月までに当院で治療された 99 人の胃癌患者 (90 人が根治切除) を対象とし、治療前後の LINE1 のメチル化レベルと lcfDNA 濃度を測定した。対照として良性疾患の 8 人で同様の測定を行った。術前の採血は手術当日、術後の採血は手術 1 か月後に行った。化学療法を受けた患者では化学療法開始前に採血を行った。lcfDNA の測定には quantitative PCR を、LINE1 メチル化レベルの測定にはメチル化制限酵素を用いた PCR である HELP (HpaII tiny fragment Enrichment by Ligation-mediated PCR) 法を用いた。

**【結果】**

胃癌患者の LINE-1 メチル化レベルは良性疾患患者よりも有意に低く ( $P = 0.006$ )、胃癌患者と良性疾患患者を区別する ROC 曲線の AUC は 0.81 であった (95% 信頼区間 [CI] : 0.71–0.92;  $P < 0.001$ )。Stage I 胃癌患者のメチル化レベルは良性疾患患者より有意に低かった ( $P = 0.005$ )。

低メチル化レベル群は高メチル化レベル群より予後不良であった (log-rank 検定  $P = 0.006$ )。根治手術を受けた 90 人の患者で、手術前のメチル化レベルが低い患者の RFS と OS は、メチル化レベルが高い患者よりも悪い傾向にあった (log-rank 検定  $P = 0.08$  および  $P = 0.11$ 、Cox 回帰分析  $P = 0.09$  および  $P = 0.07$ )。術前 lcfDNA 高値群の RFS と OS は、低値群よりも悪い傾向が見られた。

術後 lcfDNA 高値群の RFS および OS は、低濃度群よりも有意に悪かった (log-rank 検定  $P = 0.009$  および  $P = 0.04$ 、Cox 回帰分析  $P = 0.04$ 、 $P = 0.09$ ) が、術後のメチル化レベルは、PFS、OS に影響を与えなかった。再発患者において、再発時のメチル化レベルは術前よりも有意に低く ( $P < 0.01$ )、再発時の lcfDNA 濃度は術後よりも術前よりも有意に高かった ( $P < 0.01$ )。

#### 【考察】

血中 LINE1 の低メチル化は胃癌と胃良性疾患との鑑別に有用であった。Stage I 胃癌のメチル化レベルが良性疾患より低値であり、胃癌のスクリーニングに利用できる可能性がある。また、胃癌患者の中で治療前 LINE1 のメチル化レベル低下例は予後不良であり、予後予測に有用と考えられた。一方で、術後 LINE1 のメチル化レベルの低下は予後予測に有用ではなかった。

lcfDNA 高値例では腫瘍細胞が数多く存在することが示唆されるが、術前 lcfDNA 濃度は予後と相関しなかった。一方術後 lcfDNA 高値例では再発率が高く、MRD を反映している可能性が高いことが示唆された。

再発患者において、再発時のメチル化レベルは術前よりも有意に低く、再発時の lcfDNA 濃度は術後よりも術前よりも有意に高いという興味深い現象が観察されたが、小数例での検討であり、その意義については今後の検討が必要である。

#### 【結論】

胃癌患者において、術前血中 LINE-1 メチル化レベル低下例と術後血中 lcfDNA 高値例の予後は不良である。