

機関番号：32665

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592092

研究課題名（和文）小児固形腫瘍、特に小児肝癌における腫瘍感受性遺伝子ならびに  
関連因子に関する研究研究課題名（英文）The study of the tumorigenic and tumor related genes for the pediatric  
solid tumors, especially hepatoblastoma

研究代表者

池田 太郎（IKEDA TARO）

日本大学・医学部・助教

研究者番号：00318396

研究成果の概要（和文）：小児固形腫瘍の神経芽腫において、4つの遺伝子（SLC16A、ZNF206、NR4A3、ZAR-1）に腫瘍特異的な DNA メチル化異常を認めた。これらの遺伝子の中で、ZAR-1 遺伝子は、腎芽腫や肝芽腫においても同様の DNA メチル化異常を認めた。神経芽腫では、SLC16A、ZNF206、NR4A3 遺伝子の DNA メチル化は予後と相関していた。ZAR-1 遺伝子に関しては、肝芽腫において DNA メチル化の変化と同様にその発現が亢進していることを確認した。これら 4 つの遺伝子（SLC16A、ZNF206、NR4A3、ZAR-1）における DNA メチル化解析は、診断・治療に有用となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We have identified that at least four (SLC16A, ZNF206, NR4A3, ZAR-1) out of 12 tDMRs showed frequent aberrant methylation in pediatric solid tumors. The methylation of these four genes confers novel candidate pediatric solid tumors-related epigenetic factors. SLC16A, ZNF206, and NR4A3 genes were related to the prognosis in neuroblastoma. Hypermethylation of the ZAR-1 non-promoter is extremely frequent in hepatoblastoma, and ZAR-1 expression plays a tumorigenic role. The pathway of these four genes was different. It could be useful the treatment of children with pediatric solid tumors to analyze the methylation level of four genes (SLC16A, ZNF206, NR4A3, ZAR-1).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：小児外科、移植外科

科研費の分科・細目：外科学系臨床医学・外科学一般

キーワード：小児固形腫瘍、DNA メチル化、癌関連遺伝子、MassARRAY

## 1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに小児悪性固形腫瘍（神経芽腫、腎芽腫、肝芽腫など）において、変異

を主とした遺伝子変化の解析ならびに機能的解析を試みてきた。一方で、ゲノムそのものの変化以外の機序によっても、発現などの

遺伝子の機能は調節を受け、この epigenetic な機序の異常も腫瘍化に関連することが考えられている。一般にゲノム中の CpG ジヌクレオチドの 60-90%がメチル化を受けているが、多くの遺伝子の promoter 領域にある GC の豊富な領域 (CpG アイランド) では脱メチル化状態で遺伝子は発現状態にある。ところが腫瘍細胞では、がん抑制遺伝子の promoter 領域で CpG が高頻度にメチル化されその遺伝子発現が抑えられていることがあり、DNA メチル化やヒストンの修飾異常など epigenetic な異常が、がん抑制遺伝子の不活化をもたらす例として知られている。

一方こうした epigenetic な制御機構は、一旦分化した細胞組織にその性質を維持せしめるに必要な遺伝子発現パターンをもたらすことにも関わっている。この制御下にある遺伝子は組織特異的 (分化特異的) な発現を示すが、その制御に異常を来たせば発現の変化とともに細胞の性質をも変化させ得るという点で、腫瘍関連遺伝子あるいは腫瘍感受性遺伝子としての側面を持つことが考えられる。このことに関し分担研究者の永瀬らは、マウスにおいて組織特異的に DNA メチル化に変化がみられるゲノム領域を検討し、特に精巣においてかかる遺伝子領域を多数発見した。このうちヒトにおいて相同領域が確認されまた組織特異的な発現が見られた 6 領域について、20 例の成人肝癌で検討を行ったところ、4 領域で腫瘍特異的なメチル化変化を認め、実際に新規の癌関連遺伝子である可能性を示す結果を得ている。

他方、肝芽腫を主とした小児肝癌には、 $\beta$ -カテニン、APC、Axin、PP2A などの遺伝子変化の解析等から、腫瘍発生に関わる背景において成人肝癌と共通する部分もあることが考えられる。また、精巣で見られたような組織特異性を示すメチル化領域が肝臓において

も存在することを予備的実験により得ている。こうした知見と背景から今回、肝芽腫を主とした小児肝癌を中心に、新規腫瘍感受性遺伝子の候補と考えられる組織特異的に DNA メチル化が変化する領域について、手術摘出腫瘍並びに細胞株を用いてその小児固形腫瘍への関与を明らかにする研究を企画した。

## 2. 研究の目的

本研究では以下の検討し、内容を明らかにすることを目的とする。

(1) マウスにおいて精巣特異的に DNA メチル化の変化を示した領域のうち未だ詳細を検討していないものについて、ヒトにおける相同領域ならびにそのメチル化にリンクして発現が制御される遺伝子、すなわち腫瘍感受性遺伝子の候補となるものを明らかにする。また、予備実験で肝臓特異的に同様な変化を示した領域についても検討を進め順次ヒト相同領域ならびに遺伝子を明らかにする。

(2) 肝臓についてはマウスの肝腫瘍モデルの使用も可能であるので、直接腫瘍特異的にメチル化を示す領域についての検出を行い、これにおいてもヒトにおける相同 DNA 領域や遺伝子を明らかにする。

(3) ヒト相同領域が明らかとなった腫瘍感受性遺伝子候補に対し、肝芽腫を主とした小児肝癌の臨床検体ならびに細胞株において、実際に腫瘍特異的なメチル化変化が見られるか否かを明らかにする。

(4) 小児固形腫瘍では ONTOGENY の観点から、肝芽腫、腎芽腫、神経芽腫、膝芽腫などの腫瘍発生に共通した因子に関わる可能性があるため、肝芽腫以外の腫瘍についても同様の検討を行う。

(5) さらに腫瘍特異的なメチル化変化を示した DNA 領域にリンクした遺伝子でその発現が腫瘍細胞株において亢進しているものを選択する。選択した遺伝子と細胞株において、

siRNA 法ならびにPI ポリアミド法を用いて当該遺伝子の発現抑制を *in vitro* の系で行う。細胞増殖に対する抑制効果を検討し、将来の分子標的治療の候補となり得るか否かを明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) マウスにおいて組織特異的メチル化変化を来した領域のヒト相同部位ならびに腫瘍感受性遺伝子候補の同定

研究の背景に記述した様に、マウスの種々の組織間での比較を行うことにより、組織特異的にメチル化状態の変化を来している領域 (genome を Not1-Pst1-Pvu11 により処理した DNA フラグメントとして解析) が数多く (約 150) 検出されている。特に精巣において特異的に変化しているものの数が多く約 80 箇所に及ぶ。我々は、各領域について塩基配列を決定後、UCSC Genome Browser on Human (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) を利用して対応するヒト相同領域を確認決定するとともに、この領域のメチル化の状態に応じて組織特異的に発現が規定されている遺伝子 (腫瘍感受性遺伝子の候補) を同定してきた (DDX4, DACT1, ZNF324USP49 など)。しかし未だかかる検討を行っていない領域が多く残っており、これらに対して同様にヒト相同領域の決定と、また対応する腫瘍感受性遺伝子の候補の同定とを継続する。

(2) 小児固形腫瘍において臨床検体、細胞株でのメチル化解析

生検あるいは根治手術時に採取された小児固形腫瘍ならびに同時に採取された非腫瘍部の組織を対象に、上記 (1) の作業で同定されたヒト相同領域や対応する腫瘍感受性遺伝子候補に関するメチル化解析を行う。腫瘍特異的にメチル化の変化が生じている場合、その DNA 領域や遺伝子候補は小児固形

腫瘍の成立、維持に関連している可能性が高いと判断される。

(3) メチル化解析の方法 - 精密質量解析を応用したメチル化 DNA の定量的解析法

上記 (1) において、組織特異的にメチル化変化を来す多数の DNA 領域に対し、ヒトにおける相同領域や腫瘍感受性遺伝子の候補を決定した後、これらについてやはり多数の臨床腫瘍検体や非腫瘍組織、また腫瘍細胞株に対してメチル化解析を行う必要がある。そこでより効率的に解析を進めるために、一度に複数のメチル化部位 (CpG サイト) を複数のサンプルについて解析可能な新規のメチル化解析システム (MassARRAY<sup>®</sup> EpiTYPER™: SEQUENOM 社) を使用する。このシステムは、検討対象とするメチル化領域をバイサルファイト処理後 PCR 増幅したものを試料とし、精度良く CpG サイトのメチル化、非メチル化を区別するとともにそれぞれの検出感度も高い。このため定量的メチル化解析が可能で、他の方法に比べ効率良くかつ正確にメチル化の有無が判定される。

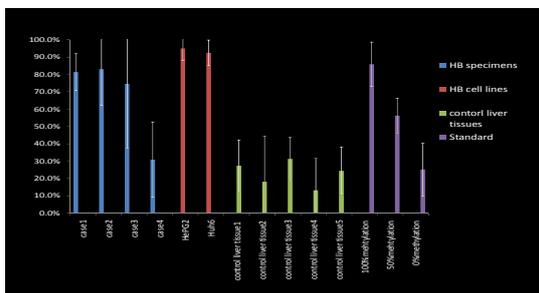
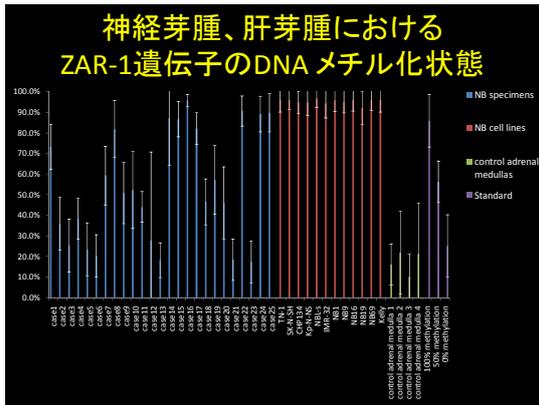
(4) 腫瘍特異的なメチル化変化に対応した遺伝子発現の変化の確認

上記 (3) の解析において腫瘍特異的なメチル化変化が確認された DNA 領域については、さらにそれに対応した遺伝子発現の変化が腫瘍特異的に起こっていることを、臨床検体において検討し確認する。この際には、DNA 領域ごとに適切な TaqMan プライマーを設計し、realtimeRT-PCR による定量的な発現解析を行う。

### 4. 研究成果

(1) マウスの組織および腫瘍特異的 DNA メチル化領域のヒト相同領域から神経芽腫において 4 遺伝子 (SLC16A5、ZNF206、NR4A3、ZAR-1)、肝芽腫、腎芽腫におい

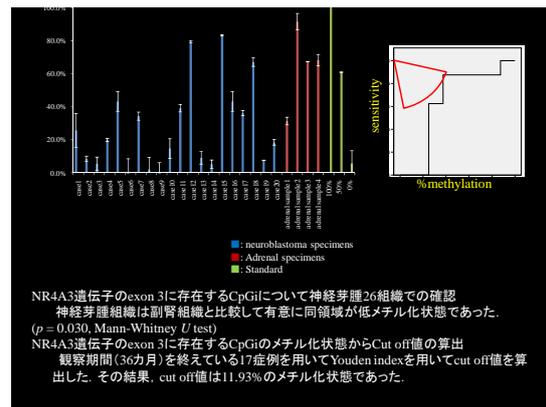
て1遺伝子（ZAR-1）領域内のメチル化異常を確認できた。



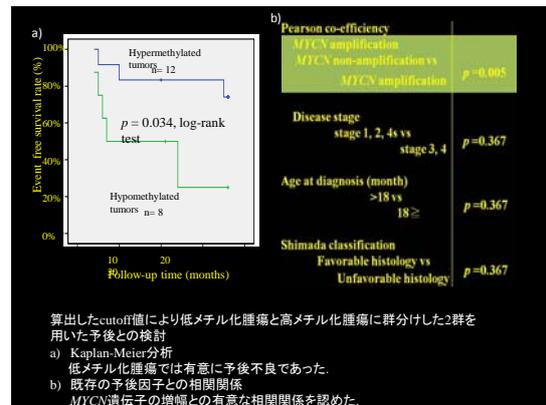
(2) SLC16A5 遺伝子、ZNF206 遺伝子：神経芽腫において SLC16A5 遺伝子に存在する領域の低メチル化が予後不良因子であり、ZNF206 遺伝子に存在する領域の高メチル化が予後良好因子であることが確認できた。さらに腫瘍細胞においていずれの遺伝子も高メチル化状態で発現が低下している傾向にあった。SLC16A5 遺伝子について発現安定株を作製し、腫瘍での機能（細胞増殖能、抗癌薬剤への耐性能、細胞浸潤能）について検討を行った。その結果、SLC16A5 遺伝子の発現による神経芽腫での細胞増殖能、抗癌薬剤への耐性能、細胞浸潤能への関与は認められなかった。現在、神経芽腫における新規予後因子としての両領域の DNA メチル化異常を論文投稿準備中である。

(3) NR4A3 遺伝子：神経芽腫において同遺伝子に存在する DNA のメチル化領域の低メチル化が予後不良因子であること

を確認した。神経芽腫において同領域の低メチル化により転写因子（CTCF）の DNA との結合が可能となることで同遺伝子の発現が抑制されていること、さらにマウス相同領域の高メチル化がマウスの脳組織発達に関与していることが確認できた。現在、同遺伝子の発現安定神経芽腫細胞株が作製できており機能解析を行って論文投稿する予定である。



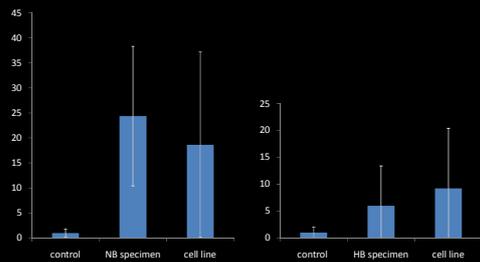
NR4A3 遺伝子の exon 3 に存在する CpG1 について神経芽腫 26 組織での確認  
神経芽腫組織は副腎組織と比較して有意に同領域が低メチル化状態であった。  
( $p = 0.030$ , Mann-Whitney  $U$  test)  
NR4A3 遺伝子の exon 3 に存在する CpG1 のメチル化状態から Cut off 値の算出  
観察期間 (36 カ月) を終えている 17 症例を用いて Youden index を用いて Cut off 値を算出した。その結果、cut off 値は 11.93% のメチル化状態であった。



算出した cutoff 値により低メチル化腫瘍と高メチル化腫瘍に群分けした 2 群を用いた予後の検討  
a) Kaplan-Meier 分析  
低メチル化腫瘍では有意に予後不良であった。  
b) 既存の予後因子との相関関係  
MYCN 遺伝子の増幅との有意な相関関係を認めた。

(4) ZAR-1 遺伝子：肝芽腫、神経芽腫において同遺伝子に存在する DNA メチル化領域が高メチル化であることが確認できた。また高メチル化状態で発現が高い傾向であった。検体数の揃う神経芽腫において予後との関係を検討するも明らかな予後との相関を認めなかった。

## 神経芽腫、肝芽腫におけるZAR-1 遺伝子の発現解析



### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Sugito K, Uekusa S, Kawashima H, Furuya T, Ohashi K, Inoue M, Ikeda T, Koshinaga T, Tomita R, Mugishima H, Maebayashi T: The clinical course in pediatric solid tumor patients with focal nodular hyperplasia of the liver. *Int J Clin Oncol*. 2011[Epub ahead of print]. 査読有
- ② Sugito K, Kawashima H, Uekusa S, Inoue M, Ikeda T, Kusafuka T: Mesenchymal hamartoma of the liver originating in the caudate lobe with t(11;19)(q13;q13.4): Report of a case. *Surgery Today* 40: 83-87, 2010. 査読有
- ③ Sugito K, Kusafuka T, Hoshino M, Inoue M, Ikeda T, Hagiwara N, Koshinaga T, Shichino H, Chin M, Mugishima H: Application of Radiofrequency Ablation for Giant Solid Pseudopapillary Tumor of the Pancreas. *Pediatrics International* 52: e29-e31, 2010. 査読有
- ④ 杉藤公信, 齊藤玲奈, 花田 学, 吉澤信輔, 植草省太, 川島弘之, 古屋武史, 大橋研介, 井上幹也, 池田太郎, 越永従道, 草深竹志, 梁 尚弘, 谷ヶ崎 博, 七野浩之, 陳 基明, 麦島秀雄. 完全寛解後に緩徐な血清AFP値の上昇に伴って再発肺転移を認めた肝芽腫の 1 例. *小児がん* 47: 132-136, 2010. 査読有
- ⑤ 杉藤公信, 大橋研介, 吉澤信輔, 植草省太, 川島弘之, 古屋武史, 井上幹也, 池田太郎, 越永従道, 草深竹志, 谷ヶ崎 博, 七野浩之, 陳 基明, 麦島秀雄. 芽腫・膵腺房細胞癌の混合型腫瘍の 1 例. *小児がん* 47: 137-141, 2010. 査読有
- ⑥ Sugito K, Kusafuka T, Kawashima H, Uekusa S, Furuya T, Ohashi K, Inoue M,

Ikeda T, Koshinaga T, Maebayashi T. Usefulness of power Doppler ultrasonography and superparamagnetic iron oxide enhanced magnetic resonance imaging for diagnosis of focal nodular hyperplasia of the liver after treatment of neuroblastoma. *Pediatr Hematol Oncol*. 27:250-6, 2010. 査読有

- ⑦ 川島弘之, 杉藤公信, 吉澤信輔, 植草省太, 古屋武史, 大橋研介, 池田太郎, 越永従道, 草深竹志, 永瀬浩喜: von Hippel Lindau (VHL) 遺伝子の生殖細胞変異を伴った傍神経節腫の 1 例. *日本小児外科学会誌* 46: 777-782, 2010. 査読有
- ⑧ 杉藤公信, 川島弘之, 池田太郎, 越永従道, 草深竹志: 腎腫瘍 (腎芽腫と腎細胞癌). *小児外科* 41:1118-1123, 2009. 査読無

[学会発表] (計 13 件)

- ① 川島弘之, 杉藤公信, 吉澤信輔, 植草省太, 古屋武史, 池田太郎, 越永従道, 永瀬浩喜: 神経芽腫における *NR4A3* 遺伝子の DNA 低メチル化と予後. 第 26 回日本小児がん学会, 大阪, 2010. 12. 18
- ② Uekusa S, Sugito K, Kawashima H, Furuya T, Inoue M, Ikeda T, Koshinaga T, Nagase H: INHIBITION OF MYCN GENE TRANSCRIPTION BY PYRROLE-IMIDAZOLE POLYAMIDE IN NEUROBLASTOMA CELLS. 42th International Society of Paediatric Oncology, Boston, 2010. 10. 23
- ③ Kawashima H, Sugito K, Uekusa S, Furuya T, Muroi S, Igarashi J, Ikeda T, Koshinaga T, Nagase H: EXON5CPG ISLAND HYPOMETHYLATION OF THE ZNF206 GENE, ASSOCIATED WITH NEURONAL DIFFERENTIATION IN MICE AND DEVELOPMENT OF NEUROBLASTOMA IN HUMAN. 42th International Society of Paediatric Oncology, Boston, 2010. 10. 23
- ④ Sugito K, Yoshizawa S, Uekusa S, Kawashima H, Furuya T, Ohashi K, Inoue M, Ikeda T, Koshinaga T, Maebayashi T: FOCAL NODULAR HYPERPLASIA OF THE LIVER IN PEDIATRIC SOLID TUMOR PATIENTS: WHAT ARE THE RISK FACTORS? 42th International Society of Paediatric Oncology, Boston, 2010. 10. 23
- ⑤ 植草省太, 杉藤公信, 吉澤信輔, 川島弘之, 古屋武史, 益子貴行, 大橋研介, 井上幹也, 池田太郎, 越永従道, 永瀬浩喜: *MYCN* 遺伝子を標的としたピロールイミダゾール (PI) ポリアミドによる神経芽腫細胞の抗腫瘍効果の検討. 第 47 回日本小児外科学会総会, 名古屋, 2010. 6. 19

- ⑥ 川島弘之, 杉藤公信, 植草省太, 古屋武史, 池田太郎, 越永従道, 永瀬浩喜: 神経芽腫における*NR4A3* 遺伝子のメチル化解析. 第47回日本小児外科学会総会, 名古屋, 2010. 6. 18
- ⑦ 植草省太, 杉藤公信, 吉澤信輔, 川島弘之, 古屋武史, 益子貴行, 大橋研介, 井上幹也, 池田太郎, 越永従道, 草深竹志, 永瀬浩喜: *MYCN*遺伝子を標的としたピロールイミダゾール (PI) ポリアミドによる神経芽腫細胞の抗腫瘍効果の検討. 第110回日本外科学会総会, 名古屋, 2010. 4. 9
- ⑧ 川島弘之, 杉藤公信, 植草省太, 古屋武史, 池田太郎, 越永従道, 草深竹志, 永瀬浩喜: 神経芽腫における*ZNF206* 遺伝子のメチル化解析. 第110回日本外科学会総会, 名古屋, 2010. 4. 9
- ⑨ 川島弘之, 杉藤公信, 植草省太, 古屋武史, 大橋研介, 池田太郎, 越永従道, 草深竹志, 麦島秀雄, 永瀬浩喜: 神経芽腫における新規予後因子, 癌関連遺伝子の探索. 第25回日本小児がん学会, 千葉, 2009. 11. 27
- ⑩ 植草省太, 杉藤公信, 川島弘之, 吉澤信輔, 古屋武史, 大橋研介, 池田太郎, 越永従道, 草深竹志, 麦島秀雄, 永瀬浩喜: 神経芽腫, 肝芽腫における5D52領域のメチル化異常の検討. 第25回日本小児がん学会, 千葉, 2009. 11. 27
- ⑪ 植草省太, 杉藤公信, 川島弘之, 古屋武史, 草深竹志, 永瀬浩喜: *MYCN*遺伝子を標的としたピロールイミダゾール (PI) ポリアミドによる神経芽腫細胞の抗腫瘍効果の検討. 第13回神経芽腫研究会, 東京, 2009. 8. 22
- ⑫ 川島弘之, 杉藤公信, 植草省太, 池田太郎, 越永従道, 永瀬浩喜: 神経芽腫における*SLC16A5* 遺伝子promoter領域のメチル化の検討. 第46回日本小児外科学会総会, 大阪, 2009. 6. 3
- ⑬ Kawashima H, Sugito K, Uekusa S, Inoue M, Ikeda T, Hagiwara N, Koshinaga T, Kusafuka T, Nagase H: A von Hippel-Lindau gene mutation in pediatric paraganglioma: possible involvement of its disease pathogenesis. 42th Pacific Association of Pediatric Surgeons, Hong Kong, 2009. 5. 14

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

池田 太郎 (IKEDA TARO)  
日本大学・医学部・助教  
研究者番号: 00318396

【H21. 11~H22】

草深 竹志 (KUSAFUKA TAKESHI)  
日本大学・医学部・教授  
研究者番号: 70263267

【H20~H21. 10】

### (2) 研究分担者

杉藤 公信 (SUGITO KIMINOBU)  
日本大学・医学部・助教  
研究者番号: 10328750

永瀬 浩喜 (NAGASE HIROKI)  
日本大学・医学部・客員教授  
研究者番号: 90322073

古屋 武史 (FURUYA TAKESHI)  
日本大学・医学部・専修医  
研究者番号: 20568539

【H21. 11~H22】

### (3) 連携研究者

なし