

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791888

研究課題名(和文) Wntシグナルとテロメラーゼからみた小児肝腫瘍の分子標的の探索

研究課題名(英文) Molecular targeting in Wnt signal pathway and telomerase for childhood liver tumors

研究代表者

上田 祐華 (Ueda, Yuka)

広島大学・病院・医科診療医

研究者番号：70624641

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：肝芽腫213例の検討では、 β -カテニン(CTNNB1)のエクソン3領域の欠失は107例(50.2%)に、点突然変異は56例(23.2%)に見られた。腫瘍のテロメラーゼ活性が50RTA以上、TERT発現が100以上は有意に予後不良で、これらと結合するBRG1発現は、RTA、TERTの活性化と相関した。マイクロアレイや免疫組織染色でWntシグナル下流のMYC、MDR-1、CyclinD1、Survivin発現はRTA、TERTの活性化に有意に相関した。選別された分子標的のsiRNAを肝芽腫細胞株に導入すると増殖が抑制され、分子標的候補は、肝芽腫のオーダーメイド療法に有用と考えられた。

研究成果の概要(英文)：In beta-catenin gene (CTNNB1), deletion and mutation of exon 3 region was detected 107 (50.2%) and 56 (23.2%) of 213 hepatoblastoma cases. The cases whose tumors had high telomerase activity (> 50 RTA) and high TERT expression (> 100) showed poor prognosis. The expression levels of BRG1 were significantly correlated with those of RTA and TERT but not with CTNNB aberrations. The expression levels of the Wnt downstream genes including MYC, MDR-1, CyclinD1, and Survivin were also significantly correlated with those of RTA and TERT. Induced treatment of siRNA against these selected genes into hepatoblastoma cell lines showed growth inhibition. These candidates are considered to be useful for order-made therapy in advanced hepatoblastoma.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科学

キーワード：癌 遺伝子 シグナル伝達 マイクロアレイ トランスレショナルリサーチ

1. 研究開始当初の背景

肝芽腫は小児の肝悪性腫瘍の中では最も多く、本邦では、日本小児肝癌スタディグループ(JPLT)の共通の治療ガイドラインにて、治療的研究が行われてきた。その結果、肝芽腫全体の3年生存率が約70%となり、肝3区域までに限局する腫瘍(標準リスク群)では90%近くの生存率が得られ、術前・術後化学療法の有効性が明らかとなり、予後良好例では治療軽減の方向に進んでいる。一方、AFP低値例、肝全区域を占める腫瘍や遠隔転移例の予後は未だに不良で、悪性度の高い腫瘍が存在していることも事実であるが、悪性度を反映した有用な生物学的指標がないのも現状である。教室ではβ-カテニン遺伝子の活性化変異が高率に認められること、テロメラーゼ活性が腫瘍の悪性度に相関している可能性を報告してきた。こうした中で近年、テロメラーゼの逆転写酵素の触媒部分である TERT が BRG1(Brahma-related gene 1, 遺伝子名 SMARCA4)蛋白を介してβ-カテニンに作用し、Wnt シグナルを活性化していることが報告された。そこで、肝芽腫検体では、TERT 発現が80%以上に見出され、とくにβ-カテニン変異のない腫瘍で発現し、TERT が Wnt シグナル活性化に関与している可能性が考えられ、本研究を施行した。

2. 研究の目的

小児特有の肝芽腫は、本邦並びに欧米の臨床試験によって化学療法の有効性が示され、現在、予後良好な標準リスク群と転移や進展例などの予後不良な高リスク群に分類されるようになった。リスクを規定している生物学的因子としてテロメラーゼ活性について報告してきたが、近年、Wnt/β-catenin シグナルとの関連が示された。そこで、日本小児肝癌スタディグループ(JPLT)および当科で保存された検体を用いた検討から、標準リスク群と高リスク群でのこれらの活性化を検索する。さらに、活性化されている高リスク群では、腫瘍進展あるいは転移能を規定する分子標的を見出し、新たな臨床試験の分子標的薬導入の基礎データとすることを目的とした。

3. 研究の方法

JPLT の中央病理診断にて肝芽腫と診断された213例余肝細胞癌20例を対象として、以下の検討を行った。

1) カテニン(CTNNB1)異常: 本症で高頻度に見られるβ-カテニン異常について、エクソン3を含む領域の欠失をPCR解析で検討し、欠失の検出できない例はエクソン3のシーケンズ解析で検討した。また、これらの活性化変異によって蓄積するβ-カテニンを免疫組織化学染色にて検討した。

2) テロメラーゼと TRET 解析: 腫瘍の

テロメラーゼ活性を TRAP (telomeric repeat amplification protocol)にて検討し、定量化するために内部標準を用いた定量PCR法を応用した方法で検討し、RTA(Relative telomerase activity)にて評価した。また、その活性部位である TERT(telomerase reverse transcriptase)の発現、さらにこの両者と結合する BRG1 の発現レベルを定量 RT-PCR 法にて検討した。

3) カテニン/Wnt シグナル伝達系の解析: Wnt シグナル下流遺伝子である MYC, MDR-1, CyclinD1, Survivin, MMP7, Axin2 などの下流遺伝子の発現を RT-PCR および免疫組織染色にて解析した。

4) 臨床病理分類、リスク分類との関連: 中央病理診断部門病理分類と上記の1-3結果を比較した。臨床的なりリスク分類、各症例の臨床経過から、病期、予後と副作用、晩期合併症を抽出し、その要因を検索するとともに、遺伝子変化、遺伝子発現から、これらの因子でリスクの層別化が可能であるかの判定を試みた。

5) 網羅的遺伝子解析: すでに JPLT で解析されているマイクロアレイ(Affymetrix SNP6.0 と U133 または Gene アレイ)で解析済み網羅的遺伝子変異と遺伝子発現のデータとを RTA, TERT の活性化および CTNNB1 異常との関連を検討した。を用いた遺伝子変異と遺伝子発現の網羅的解析のデータから、1-3の因子と関連のある遺伝子群を抽出する。この遺伝子抽出は、専用の解析ソフトを用いて解析し、さらに、抽出されて遺伝子はパスウェイ解析を行い、リスクに関連しているパスウェイから、診断や予後予測に有用な分子標的とともに、治療の標的となりうる分子標的を抽出する。

4. 研究成果

1) カテニン(CTNNB1)異常: β-カテニン(CTNNB1)異常で、エクソン3を含む欠失を107例(50.2%)に、エクソン3の点突然変異は56例(23.2%)に見られた。

β-カテニンの免疫組織染色では、欠失、変異のある症例では、核内に蓄積されていることが確認された。

2) テロメラーゼと TRET 解析: 腫瘍のテロメラーゼ活性である RTA(relative telomerase activity)が50以上のものまた、その活性部位である TERT(telomerase reverse transcriptase)発現が100以上の腫瘍の症例は有意に予後不良であった。また、CTNNB1 が Wild type の腫瘍は RTA, TERT の活性化していた。さらにこの両者を結合する BRG1 の発現レベルは、RTA, TERT の活性化レベルと有意に相関した。

3) カテニン/Wnt シグナル伝達系解析: Wnt シグナル下流遺伝子である MYC, MDR-1, CyclinD1, Survivin, MMP7, Axin2 発現を RT-PCR および免疫組織染色

にて解析した。その結果、*CTNNB1* 異常の有無とこれらの遺伝子発現レベルには相関はなく、*RTA*, *TERT* の活性化に有意に関連していた。

4) 臨床病理分類、リスク分類との関連：上記の結果を病理分類、臨床的なリスク分類と比較すると、病理では胎芽型、リスクでは転移例で *RTA*, *TERT* の活性化が有意に高かった。*RTA*, *TERT* の発現レベルは、肝芽腫の転移例、さらに血管浸潤の有無と相関しており、これらの因子は肝芽腫の進展や転移能に係っており、有用な予後関連因子である可能性が示唆された。

5) 網羅的遺伝子解析：マイクロアレイ (Affymetrix SNP6.0 と U133 または Gene アレイ) で解析済み網羅的遺伝子変異と遺伝子発現のデータとを *RTA*, *TERT* の活性化および *CTNNB1* 異常との関連を検討した。スニップアレイ (Affymetrix SNP6.0) では、染色体 1 番 2 番の増減が頻度高く見いだされたが、遺伝子変異としては、*CTNNB1* の欠失、変異以外に頻度の高い以上は見出せなかった。一方、遺伝子発現解析では、Wnt シグナル下流遺伝子の活性化がみられ、特に *MYC*, *MDR-1*, *CyclinD1*, *Survivin* が抽出された。これらとは別に、*CTNNB1* 次世代シーケンサーにて小児肝細胞癌では、Affymetrix SNP6.0 にて、染色体 1 番 2 番の増減に加えて、4 番 7 番 11 番 17 番の欠失がかなりの頻度で見いだされ、肝芽腫とはゲノム異常が明らかに異なっており、別のシグナルの関与が示唆された。選別された分子標的に対し、その siRNA を肝芽腫細胞株 (HepG2、並びに JHB1,2,3) に導入すると増殖が抑制され、有用な分子標的候補で、今後の肝芽腫のオーダーメイド療法に有用と考えられた。

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 6 件)

1. Kojima M, Ueda Y, et al, Detection of MYCN amplification using blood plasma: noninvasive therapy evaluation and prediction of prognosis in neuroblastoma, *Pediatric Surgery International*, 29, 査読有, 2013, pp1139-1145, doi: 10.1007/s00383-013-3374-9
2. Hiyama E, Ueda Y, et al, A cisplatin plus pirarubicin-based JPLT2 chemotherapy for hepatoblastoma: experience and future of the Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor (JPLT), *Pediatric Surgery International*, 29, 査読有, 2013, pp1071-1075, doi: 10.1007/s00383-013-3399-0

3. 鬼武 美幸, 上田 祐華, 他, 外傷性脾損傷後に発症した鼠径ヘルニアの 1 例, *小児外科*, 45, 査読有, 2013, pp1260-1262, doi: なし
4. 上田 祐華, 他, 小腸腸間膜裂孔ヘルニアにより非特異的な新生児イレウスを呈した極低出生体重児の 1 例, *日本小児外科学会雑誌*. 48, 査読無, 2012, 937-943, doi: なし
5. 大津 一弘, 上田 祐華, 他, 3D-CT 検査で頸部気管食道瘻が術前診断された Gross D 型食道閉鎖症の 1 例, *日本小児外科学会雑誌*, 48, 査読無, 2012, 840-843, doi: なし
6. Ogura T, Ueda Y, et al. Clinical feature of anaplastic lymphoma kinase-mutated neuroblastoma. *J Pediatr Surg*, 47, 査読有, 2012, 1789-1796, doi: 10.1016/j.jpedsurg.2012.05.007.

〔学会発表〕(計 20 件)

1. 小倉 薫, 上田 祐華, 他, Wilms 腫瘍を合併した縦隔奇形腫の 1 例, 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会, 2013 年 11 月 29 日~2013 年 12 月 01 日, ヒルトン福岡シーホーク (福岡市中央区)
2. 斎藤 聡志, 上田 祐華, 他, 腹腔内 Desmoplastic small round cell tumor の 1 小児例, 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会, 2013 年 11 月 29 日~2013 年 12 月 01 日, ヒルトン福岡シーホーク (福岡市中央区)
3. 江藤 昌平, 上田 祐華, 他, 高用量シスプラチン療法後に腫瘍全摘を行った門脈浸潤を伴う肝芽腫の一例, 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会, 2013 年 11 月 29 日~2013 年 12 月 01 日, ヒルトン福岡シーホーク (福岡市中央区)
4. 鬼武 美幸, 上田 祐華, 他, 外傷性脾損傷後に発症した鼠径ヘルニアの 1 例, 第 29 回日本小児外科学会秋季シンポジウム, 2013 年 10 月 26 日~2013 年 10 月 26 日, 一橋大学一橋講堂 (東京都千代田区)
5. 栗原 将, 上田 祐華, 他, 肺転移巣手術のタイミングに苦慮した高リスク肝芽腫の一例, 第 2 回せとうち小児がんセミナー, 2013 年 10 月 05 日~2013 年 10 月 05 日, ホテルグランヴィア岡山 (岡山市北区)
6. Hiyama E, Ueda Y, et al, FURTHER STUDY: IDENTIFICATION OF NEW CANDIDATE GENES IN PROGRESSION OF HEPATOBLASTOMA USING GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDY, 45th Congress of the International Society of Pediatric Oncology, 2013 年 09 月 25 日~2013 年

- 09月28日, Hong Kong Convention and Exhibition Centre(中国 香港)
7. Hiyama E, Ueda Y, et al, Survival, surgical respectability, and late effects in the hepatoblastoma patients treated by cisplatin plus pirarubicin(CITA) chemotherapy. (Abstract 10038), ASCO Annual '13 Meeting, 2013年05月31日~2013年06月04日, McComick Place (アメリカ シカゴ)
 8. 小倉 薫, 上田 祐華, 他, 術後に心不全の改善を認めた静脈管開存症の1例, 第50回日本小児外科学会学術集会, 2013年05月30日~2013年06月01日, 京王プラザホテル(東京都新宿区)
 9. 檜山 英三, 上田 祐華, 他, 血中 DNA を用いた神経芽腫の分子診断: 予後予測と治療効果判定, 第50回日本小児外科学会学術集会, 2013年05月30日~2013年06月01日, 京王プラザホテル(東京都新宿区)
 10. 小倉 薫, 上田 祐華, 他, 2度の再発を来した脂肪芽腫の1例, 第54回中国四国小児がん研究会, 2013年05月11日~2013年05月11日, 岩国医療センター(山口県岩国市)
 11. Hiyama E, Ueda Y, et al, Wnt Signaling and telomerase activation in hepatoblastoma, AACR Annual Meeting 2013, 2013年04月06日~2013年04月10日, Walter E. Washington Convention Center (アメリカ ワシントン)
 12. 小倉 薫, 上田 祐華, 他, オプソクロームス・ミオクロームス症候群を合併した神経芽細胞腫の1例, 第54回日本小児血液・がん学会学術集会, 2012年11月30日, 横浜市
 13. 鬼武 美幸, 上田 祐華, 他, 臍 solid pseudopapillary tumor の一例第54回日本小児血液・がん学会学術集会, 2012年11月30日横浜市
 14. 上田 祐華, 肝芽腫における Wnt シグナル伝達とテロメラーゼの活性, 第54回日本小児血液・がん学会学術集会, 2012年11月30日, 横浜市.
 15. Kawashima M, Ueda Y, et al. ALK activating infant neuroblastoma cases including mass-screening detected cases. SIOP2012. 2012年10月06日. ロンドン, イギリス.
 16. Ueda Y, et al. Mechanism of Wnt signal pathway activation in hepatoblastoma. SIOP2012. 2012年10月06日. ロンドン, イギリス.
 17. Hiyama E, Ueda Y, et al. Identification of new candidate biomarkers in progression of neuroblastoma cells using differential transcriptome and proteome analysis. ANR2012. 2012年06月20日. Tronto, Canada.
 18. Hiyama E, Ueda Y, et al. Next-generation sequencing: Integrated exome analysis in human multiple neuroblastoma. ANR2012. 2012年06月19日. Tronto, Canada.
 19. Hiyama E, Ueda Y, et al. Cisplatin plus pirarubicin based chemotherapy for hepatoblastoma: Experience and future in Japanese study group for pediatric liver tumor (JPLT). The 7th SIOP Asia Congress. 2012年04月22日. Yogyakarta, Indonesia.
 20. 河島 茉澄, 上田 祐華, 他. DSRCT の1例. 第53回中国四国小児がん研究会. 2012年04月21日. 徳島市.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 祐華 (UEDA YUKA)
 広島大学・病院・医科診療医
 研究者番号: 70624641