

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K16250

研究課題名（和文）CDDP耐性肝芽腫におけるメチル化異常の解明と新規治療法の探求

研究課題名（英文）Methylation analyses related to CDDP-resistant hepatoblastoma

研究代表者

荒 桃子（Ara, Momoko）

北海道大学・大学病院・医員

研究者番号：30741219

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：肝芽腫はDNAメチル化異常が発癌、進展および悪性化における主要な調節機構になっている。これは予後不良なシスプラチン（CDDP）耐性への関与にも想定され、本研究は肝芽腫におけるCDDP耐性に関与するエピゲノム異常、遺伝子発現異常を解析し、分子マーカーの確立、新たな治療ターゲットを模索することとした。メチル化ビーズアレイとマイクロアレイの結果より、CSF3RをCDDP抵抗性に最も関連する遺伝子として選定した。術前CDDP感受性患者38例に対して施行したパイロシークエンシングにおけるCSF3Rのメチル化率と再発率の解析をおこない、高メチル化群は低メチル化群に比較し有意に高い再発率を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝芽腫にとって最も重要な抗がん剤であるシスプラチン（CDDP）に対する耐性機序にエピゲノム異常が関わっていると想定し、その候補遺伝子の1つとしてCSF3Rを同定した。CSF3Rの高メチル化は肝芽腫の予後と相関し、予後予測因子として有用である。本研究においてその他の直接的なCDDP耐性に寄与する新たな遺伝子の探索には至らなかったが、エピゲノム処理を施した細胞株実験から一部の癌遺伝子の発現変化がみられており、今後肝芽腫に対してエピゲノム異常を治療ターゲットとする新たな取り組みにつながる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Aberrant DNA methylation is a major regulatory mechanism in carcinogenesis, progression and malignant transformation of hepatoblastoma. This is also assumed to be involved in cisplatin (CDDP) resistance with poor prognosis, and this study analyzed epigenomic aberrations involved in CDDP resistance in hepatoblastoma in order to establish molecular markers and new therapeutic targets. Based on the results of methylation bead array and microarray analyses, CSF3R was selected as one of the key genes associated with CDDP resistance. We analyzed the CSF3R methylation rate using bisulfite pyrosequencing in 38 preoperative CDDP-sensitive tumors, and the hypermethylation group showed a significantly higher recurrence rate than the low methylation group.

研究分野：小児外科

キーワード：肝芽腫 メチル化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝芽腫は小児の代表的な肝悪性腫瘍であり、切除不能進行肝芽腫の5年生存率は40%に過ぎない予後不良な小児がんである。申請者はDNAメチル化異常が肝芽腫の発生・進展に重要な役割を担っていると考え、その臨床病理学的因子との関わりについて研究を進めてきた。

肝芽腫は胎児肝の発生過程におけるエピゲノム異常、特にDNAメチル化異常が発癌、進展および悪性化における主要な調節機構になっている。これは予後不良なシスプラチン(CDDP)耐性への関与にも想定され、本研究はCDDP耐性に関与するDNAメチル化異常を同定し、発現制御された遺伝子の機能解析をすることで、肝芽腫の新たなバイオマーカーの確立やCDDP耐性の解除、新規治療のターゲットの模索を行うことを目的としている。まず、肝芽腫の切除検体を用いて、ビーズアレイによるゲノムワイドなメチル化解析を行う。次に肝芽腫細胞株のHepG2, HuH6を用いてCDDP耐性株を作成し、mRNAを用いた発現アレイを施行する。これらの結果を掛け合わせ、CDDP耐性関連のメチル化異常、遺伝子の同定を行う。同定したCDDP耐性関連遺伝子に関して、*in vitro*で遺伝子操作を行い、CDDP耐性能や各機能評価を行い、新規治療の開発につなげていく。

2. 研究の目的

肝芽腫は胎児肝の発生過程におけるエピゲノム異常、特にDNAメチル化異常が発癌、進展および悪性化における主要な調節機構になっている。これは予後不良なCDDP耐性への関与にも想定され、本研究は肝芽腫におけるCDDP耐性に関与するエピゲノム異常、遺伝子発現異常を解析し、分子マーカーの確立、耐性の解除・新たな治療ターゲットを模索することである。

3. 研究の方法

- (1) 先行研究からCDDP耐性に関わる遺伝子異常の抽出：網羅的解析データ・既知の報告より
- (2) 肝芽腫CDDP耐性株を用いた遺伝子異常の抽出：HepG2, HuH6の耐性株作成
- (3) 低メチル化と高発現遺伝子を掛け合わせ、CDDP耐性遺伝子の同定：統合解析
- (4) パイロシーケンサーによる臨床サンプルを用いた解析

4. 研究成果

(1) CDDP耐性に関わる遺伝子異常の抽出

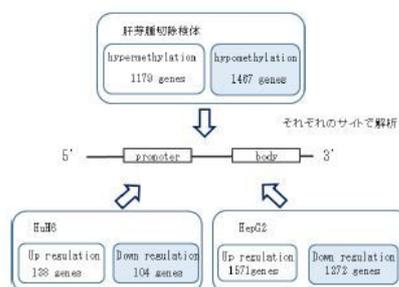
日本小児肝がんスタディーグループ(JPLT)および神奈川県立こども医療センターより供与された肝芽腫の切除検体に当院での切除症例を加えた検体を対象とし、11症例のInfinium HumanMethylation450 BeadsChipを用いた網羅的メチル化解析を施行した。この11症例はCDDP耐性症例5例、感受性症例6例を含み、この結果、耐性群で有意に高メチル化を認められたのは2509probes(1179genes)であり、部位別ではTSS200-1500:333genes、1stExon:167genes、body:716genes、3'UTR:86genes、5'UTR:191genes(それぞれ重複あり)であった。また、耐性群で有意に低メチル化を認められたのは1467probes(709genes)であり、部位別ではTSS200-150:105genes、1stExon:67genes、body:527genes、3'UTR:49genes、5'UTR:77genes(それぞれ重複あり)であった。

(2) 肝芽腫CDDP耐性株を用いた遺伝子異常の抽出

申請者が作成したCDDP耐性HepG2, HuH6で、非耐性に比し有意に低発現していた遺伝子はそれぞれ1272genes、104genesであり、有意に高発現していたものは1571genes、138genesであった(Agilent Human gene expression microarray 8×60K, 4×44K)。

(3) 低メチル化と高発現遺伝子を掛け合わせ、CDDP耐性遺伝子の同定

TSS周囲の高メチル化と低発現、また低メチル化と高発現遺伝子を掛け合わせ、16のCDDP耐性抑制遺伝子、12の耐性遺伝子の候補を抽出した。



(4) パイロシーケンサーによる臨床サンプルを用いた解析

肝芽腫腫瘍検体43例を対象とし、バイサルファイトパイロシーケンシング法によりCSF3Rのメチル化率を測定した。術前CDDP感受性患者38例の検査結果より、高メチル化群と低メチル化群に群別化し、再発曲線を比較した。教師なし階層的クラスター解析およびPCAでは、そのメ

チル化傾向により、患者群を Group1 と Group2 に群別化した(図 1)。CDDP 感受性患者のメチル化傾向は類似していたが、そこから逸脱するに従い CDDP 抵抗性を獲得し、悪性度が上昇する傾向がみられた。また、Group1 は Group2 に比較し、全生存率と無再発生存率はともに有意に悪かった。(図 2)

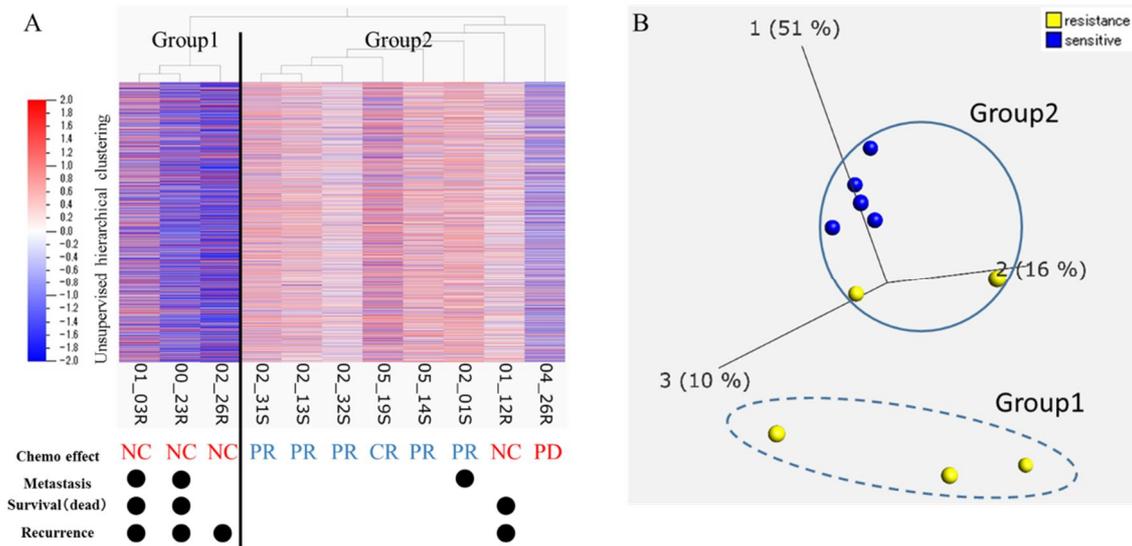


図 1. マイクロアレイデータによる網羅的 DNA メチル化解析

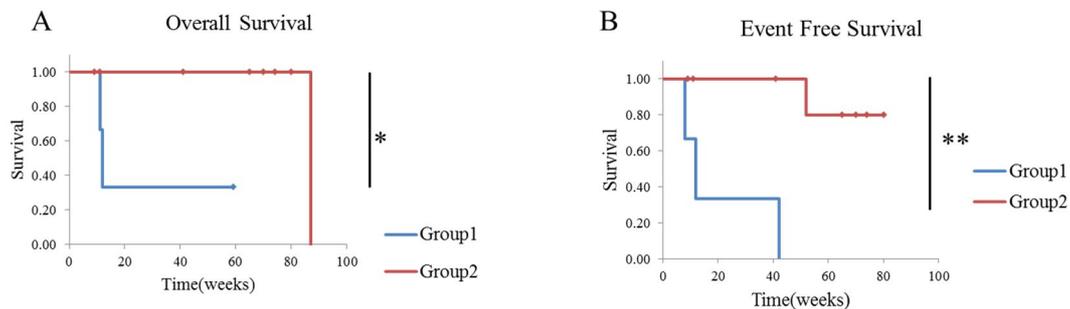


図 2. Group1 と Group2 における OS、FFS の比較

メチル化ビーズアレイとマイクロアレイの結果より、CSF3R を CDDP 抵抗性に最も関連する遺伝子として選定した。術前 CDDP 感受性患者 38 例に対して施行したパイロシーケンシングにおける CSF3R のメチル化率と再発率の解析を行った。ROC 解析で算出された高メチルまたは低メチル化の threshold は 56.47%であった。また各メチル化率と再発率の関連の分布より、メチル化率 54%以上で高い再発率を認めた。故に、高メチル化、低メチル化のカットオフ値を 54%に設定し、38 例を群別化した。高メチル化群は 4 症例、低メチル化群は 34 症例であった。高メチル化群では有意に女性患者が多く、低メチル化群では PRETEXT 分類で高ステージ患者が多い傾向であった。パイロシーケンシングのデータを用いて、CSF3R 高メチル化群(4 例)、低メチル化群(34 例)、CDDP 抵抗性群(5 例)に群別化し再発曲線を比較した(図 3)。1 年後の再発率は、高メチル化群、低メチル化群、CDDP 抵抗性群でそれぞれ 75%、20%および 80%であった。高メチル化群は低メチル化群に比較し有意に高い再発率を示した。また高メチル化群と CDDP 抵抗性群は類似した再発曲線を呈した。

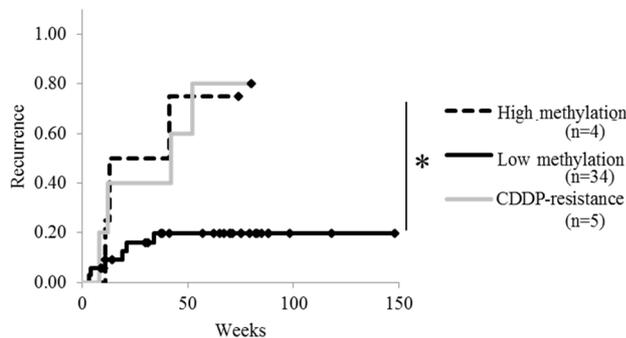


図 3. 各群における再発曲線

CDDP 抵抗性肝芽腫において CSF3R は CDDP 環境下で発現上昇するか動的な変化を調べるため、CDDP 環境下に置く前後で各細胞株より RNA とタンパクを抽出し、qPCR とウェスタンブロッティング法により CSF3R の発現を評価した(図 4)。mRNA レベルでは、CDDP 処理した HuH6 抵抗性株 (HuH6CR/CDDP) は有意に発現上昇し、タンパクレベルでも上昇する傾向であった。一方、CDDP 処理したのちの HuH6WT (HuH6WT/CDDP) では、CSF3R の発現が有意に減少し、タンパクレベルでも同様の傾向であった。結果として、CDDP 処理した後は、HuH6WT に比較し HuH6CR の CSF3R 発現が有意に上昇した。

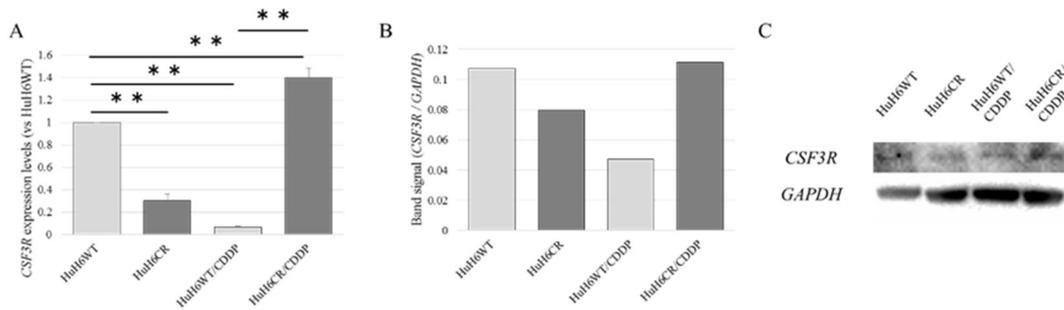


図 4. CDDP 暴露前後での HuH6WT と HuH6CR の CSF3R 発現変動

更には、エピゲノム調節薬(BRD4 阻害剤(JQ1))による細胞株への作用を解析することで本研究で目的としている肝芽腫に対する新たな治療ターゲットの模索に繋がると考え、並行しておこなった。直接的な CDDP 耐性に寄与する新たな遺伝子の探索には至らなかったが、JQ1 処理により細胞株の表現型が変化し、一部の癌遺伝子の発現変化がみられており、エピゲノム異常を治療ターゲットとする新たな取り組みにつながる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 本多 昌平, 荒 桃子, 武富 紹信	4. 巻 別冊肝・胆道系症候群II
2. 論文標題 【肝・胆道系症候群(第3版)-その他の肝・胆道系疾患を含めて-肝臓編(下)】肝腫瘍 肝芽腫	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本臨床(0047-1852)別冊	6. 最初と最後の頁 178-182
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujiyoshi S, Honda S, Minato M, Ara M, Suzuki H, Hiyama E, Taketomi A.	4. 巻 50
2. 論文標題 Hypermethylation of CSF3R is a novel cisplatin resistance marker and predictor of response to postoperative chemotherapy in hepatoblastoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatol Res.	6. 最初と最後の頁 598-606
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13479	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 本多 昌平, 近藤 享史, 荒 桃子, 鈴木 拓, 北河徳彦, 田中祐吉, 田中水緒, 新開真人, 檜山英三, 武富紹信
2. 発表標題 臨床応用を目指したDNAメチル化解析に基づく肝芽腫予後層別化の検討
3. 学会等名 第63回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 近藤 享史, 本多 昌平, 鈴木 拓, 河北一誠, 荒桃子, 北河徳彦, 田中祐吉, 田中水緒, 新開真人, 檜山英三, 武富紹信
2. 発表標題 肝芽腫CHIC分類とDNAメチル化解析の統合による新規リスク分類
3. 学会等名 第32回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本多 昌平, 荒 桃子, 奥村 一慶, 近藤 享史, 武富 紹信
2. 発表標題 自施設における肝芽腫12症例の臨床病理学的検討
3. 学会等名 第57回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤好 直, 本多 昌平, 湊 雅嗣, 荒 桃子, 河北 一誠, 小林 希, 武富 紹信
2. 発表標題 CDDP耐性肝芽腫細胞株におけるGlucose trans-porterの発現異常
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関