

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10915

研究課題名(和文) 肝芽腫の発生・進展過程におけるDNAメチル化異常の解明

研究課題名(英文) Epigenetic analyses to establish a molecular-genetic marker for treatment outcome in hepatoblastomas

研究代表者

本多 昌平 (Honda, Shohei)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：90588089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：肝芽腫11症例の検体に対してメチル化ビーズアレイ解析をおこなった。更には、肝芽腫細胞株よりシスプラチン(CDDP)耐性細胞株を作成し、耐性獲得前後のmRNA発現アレイ解析をおこなった。これらを掛け合わせ、CDDP抵抗性関連遺伝子の候補となりうる5遺伝子を抽出した。この5遺伝子に対し、55例の患者検体を用いてパイサルファイトパイロシークエンス解析をおこない、3遺伝子において高メチル化群では予後が有意に低下していた。

今後これまでに集積した肝芽腫特異的な分子プロファイルを統合解析することで、肝芽腫の予後予測マーカーおよび新規治療法の確立につながると考えている。

研究成果の概要(英文)：We first performed genome-wide methylation profiling in a total of 11 samples. We identified 15,102 probes which were significantly hypermethylated in chemo-resistant group. We next obtained resistant HuH6 cells by repeated cisplatin (CDDP) treatments and detected 119 genes which were significantly downregulated in the resistant cells. Using Venn diagram, we selected 5 candidate methylated genes associated with chemoresistance. Therefore, we next performed methylation analysis of the 5 selected genes in 55 HB tumor specimens. Event free survival curves classified by the methylation status and Kaplan-Meier analysis showed that tumors in which three genes were methylated were significantly associated with poorer prognosis. We expect that these biomarkers may be used to stratify the hepatoblastoma patients efficiently, and develop better therapeutic strategies.

研究分野：小児外科

キーワード：肝芽腫 DNAメチル化 エピゲノム異常 予後予測マーカー

## 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。

科研費(若手B(2012-2014):研究代表者 本多)に基づく研究として、肝芽腫FFPE切片を用いたメチル化ビーズアレイ解析および肝芽腫細胞株の脱メチル化処理前後の発現アレイ解析から95個の候補がん抑制遺伝子を抽出し、臨床腫瘍検体74例のマイクロシークエンシング解析をおこなった。その結果、新規がん抑制遺伝子として4遺伝子を同定し、いずれの遺伝子も高メチル化が予後不良因子となることを見出した。更には肝芽腫のシスプラチン耐性機序に関わるDNAメチル化異常を解明する目的で、化学療法感受性の6検体と抵抗性の5検体を用いてメチル化ビーズアレイ解析を施行し、感受性群と比較して抵抗性群で有意に高メチル化している遺伝子を4,631個同定した。肝芽腫の薬剤耐性、つまりは治療効果判定に関わるDNAメチル化異常を同定することが可能と考え解析を継続した。

胎児期肝臓が発生源となる肝芽腫では正常肝発生過程の破綻にDNAメチル化異常が大きな要因となっており、更にはこれまでの研究成果からその進展にも重要な働きを担っていると考えられる。肝芽腫は発生数が少なく解析可能な検体数に限りがあることから、これまでに得られた研究成果を活用しながら、新しい手法による詳細かつ網羅的な解析を積み重ねることが、更なる肝芽腫研究の発展につながると考えられた。

## 2. 研究の目的

同一患者から採取された肝芽腫検体パラフィン包埋(FFPE)切片から、正常肝組織、原発巣(胎児型、胎芽型、未分化小細胞型、大索状型)、転移巣よりmicrodissectionによって核酸(DNA, RNA)を分別回収し、メチル化ビーズアレイ解析およびmRNA発現アレイ解析をおこなう。正常肝 原発巣(各組織型同士を比較) 転移巣へと癌化・進展するにつれて、DNAメチル化プロファイルおよびmRNA発現プロファイルがどのように変化するかを各患者間で解析する。DNAメチル化異常(高/低)と発現レベル(減/増)に相関がみられる遺伝子を抽出し、これまでの研究にて同定した進展に関わるメチル化異常および現在解析中のシスプラチン耐性に関わるメチル化異常との照合、選別をおこなう。肝芽腫細胞株(HuH6, HepG2)よりシスプラチン耐性細胞株を作成し、DNMT1阻害剤を用いて脱メチル化処理前後のmRNA発現アレイ解析をおこない、候補遺伝子の絞り込みに利用する。最終的にドライバーエピゲノム異常として

絞られた候補遺伝子のDNAメチル化率を多数例の臨床検体において解析し、臨床病理学的因子との関連について検討する。これまでに報告がされていない新規候補がん抑制遺伝子に関しては、in vitro解析によってがん抑制遺伝子としての機能を評価する。以上から、肝芽腫の予後予測因子として臨床応用されうる分子マーカーを確立し、更には治療ターゲットとなりうるメチル化異常を同定し個別化治療に寄与することが最終目的である。

## 3. 研究の方法

(1) 同一患者から採取された肝芽腫検体パラフィン包埋(FFPE)切片から、正常肝組織、原発巣、転移巣よりそれぞれmicrodissectionによって核酸(DNA, RNA)を分別回収し、メチル化ビーズアレイ解析およびmRNA発現アレイ解析をおこなう。

(2) 肝芽腫細胞株よりシスプラチン耐性細胞株を作成し、DNMT1阻害剤を用いて脱メチル化処理前後のmRNA発現アレイ解析をおこなう。これまでの研究にて同定した進展に関わるメチル化異常およびシスプラチン耐性に関わるメチル化異常との照合、選別をおこなう。臨床腫瘍検体を用いて絞り込んだ候補がん抑制遺伝子のメチル化率を測定する。

(3) DNAメチル化率と臨床病理学的因子との関連を解析し、肝芽腫の予後予測因子として臨床応用されうる分子マーカーを確立する。免疫染色による蛋白発現解析、および新規候補がん抑制遺伝子の機能評価をin vitro解析にて行う。

## 4. 研究成果

肝芽腫7症例のパラフィン包埋(FFPE)切片から、正常肝組織、原発巣、転移巣よりそれぞれmacrodissectionによってDNAを分別回収し、メチル化ビーズアレイ解析をおこなった。正常肝に比べ原発巣において有意に高メチル化を示すプローブが多いのに対し、原発巣に比べ転移巣においては有意に低メチル化を示すプローブが多いことが分かった。

更には、肝芽腫細胞株(HuH6)よりシスプラチン耐性細胞株を作成し、耐性獲得前後のmRNA発現アレイ解析をおこなった。それによって有意に発現が減少した遺伝子を104個同定した。これらを掛け合わせ、CDDP抵抗性関連遺伝子の候補となりうる5遺伝子を抽出した。この5遺伝子に対し、33例の患者検体を用いてバイサルファイトマイクロシークエンシング解析をおこない、CDDP感受性群に対し抵抗性群で有意に高メチル化を示したのは1遺伝子のみであったが、残りの4遺伝子中3遺伝子で、正常部と比較し癌部で有意に高メチル化を認め、またメチル化別で群別化すると、高メチル化群ではOSやEFSが有意に低下していた。

更に、FFPEサンプルからの核酸抽出による核酸のqualityを考慮して、平行しておこな

った miRNA 発現アレイ解析データを上記メチル化ビーズアレイ解析結果と統合解析することによって、miRNA 発現異常をもたらす DNA メチル化異常の関りについて検討をおこなった。ヒト miRNA 6631 個のうち、799 個に各組織間で異なる発現異常を認めた(発現差(絶対値)2 倍以上かつ ANOVA p-value < 0.05)。メチル化ビーズアレイ解析との統合解析によって、正常肝と比較して高メチル化(差分値 > 0.2)が発現低下に相関する miRNA を 8 個、低メチル化が発現上昇に相関する miRNA を 10 個同定した。転移巣と正常肝との二群間において高発現を示した miRNA は 417 個、低発現は 198 個認められ、組織間比較で最も miRNA 発現プロフィールが異なっていた。肺転移巣において特異的に発現上昇する miRNA が 4 個抽出され、そのうちの 1 つは低メチル化と相関しており、転移へと進展する分子機構としてメチル化異常によって発現制御を受ける miRNA の関わりが示唆された。

今後これまでに集積した肝芽腫特異的な分子プロファイルを統合解析することによって、肝芽腫の予後予測マーカーや新規治療法の確立につながると考えている。

#### 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 1 件)

Honda S, Minato M, Suzuki H, Fujiyoshi M, Miyagi H, Haruta M, Kaneko Y, Hatanaka KC, Hiyama E, Kamijo T, Okada T, Taketomi A. Clinical prognostic value of DNA methylation in hepatoblastoma: Four novel tumor suppressor candidates. *Cancer Sci*. 107(6):812-9, 2016. (査読有)

[学会発表](計 4 件)

本多昌平, 湊雅嗣, 宮城久之, 藤好直, 北河徳彦, 田中祐吉, 田中水緒, 新開真人, 武富紹信 肝芽腫の分岐進化に関わる microRNA 発現異常. 第 54 回日本小児外科学会定期学術集会、2017 年、仙台国際センター(宮城県仙台市)

本多昌平, 湊雅嗣, 宮城久之, 藤好直, 檜山英三, 新開真人, 北河徳彦, 新開真人, 田中水緒, 田中祐吉, 武富紹信 がんににおける個別化医療を目指した分子マーカーの確立: 肝芽腫エピゲノム異常解析. 第 117 回日本外科学会定期学術集会、2017 年、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Honda S, Minato M, Miyagi H, Hiyama E, Taketomi A. Aberrant DNA methylation related to chemoresistance in hepatoblastomas. The 24th Congress of the Asian Association of Pediatric Surgeons. 2016 年、ヒルトン福岡シーホーク(福岡

県福岡市)

本多昌平, 湊雅嗣, 宮城久之, 檜山英三, 武富紹信. 肝芽腫の化学療法抵抗性に関わる DNA メチル化異常解析. 第 57 回日本小児血液がん学会学術集会、2015 年、甲府富士屋ホテル・常磐ホテル(山梨県甲府市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

本多 昌平 (HONDA SHOHEI)  
北海道大学・大学病院・助教  
研究者番号: 90588089

(2) 研究分担者

北河 徳彦 (KITAGAWA NORIHIKO)  
地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立こども医療センター(臨床研究所)・臨床研究所・医長  
研究者番号: 00585135

田中 祐吉 (TANAKA YUKICHI)  
地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立こども医療センター(臨床研究所)・臨床研究所・臨床研究所長  
研究者番号: 50420691

武富 紹信 (TAKETOMI AKINOBU)  
北海道大学・医学研究院・教授  
研究者番号: 70363364

宮城 久之 (MIYAGI HISAYUKI)

北海道大学・医学研究院・特任助教  
研究者番号：50596442

(3)連携研究者  
なし