

令和元年6月11日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15740

研究課題名(和文)肝芽腫局所進展に関わるドライバーエピゲノム変異の解明

研究課題名(英文) Epigenetic aberrations associated with evolution of hepatoblastoma

研究代表者

砂原 正男 (Sunahara, Masao)

北海道大学・医学研究院・客員研究員

研究者番号：80750314

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：肝芽腫は胎児肝の発生過程におけるepigenetic異常が発癌および進展に大きく関わっている。DNAメチル化異常およびヒストン修飾異常そしてmicroRNA発現から肝芽腫における局所進展にはたらくepigenetic異常を解明し、肝芽腫の新規分子生物学的マーカーを確立し、成長発達そして妊孕性を考慮すべき小児の肝芽腫症例に対して過不足のない個別化治療を開発することを本研究の目的とした。本研究によって肝芽腫の組織型(特に原発巣から転移巣へと進展する過程における)に特異的な遺伝子異常を解析し、肝芽腫の進展に関わる新規分子マーカーを確立する上で有益な知見を多く得ることが可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝芽腫の進展におけるepigenetic異常を、DNAメチル化異常およびmiRNA異常を照らし合わせることによって解明した。本研究によって得られる新規分子マーカーが臨床応用されることによって、手術治療では改善できない予後不良な進行肝芽腫症例の治療成績向上につながることを期待され、肝芽腫患者への恩恵は多大なものと考えられる。今後得られた成果を実臨床に活かせる様に更なる症例での検討を続けていく所存です。

研究成果の概要(英文)：Epigenetic dysregulation is one of the potential mechanisms associated with pathogenesis of hepatoblastoma(HB). In this study, we aimed to identify mRNA and miRNA profiles in lung metastatic tumors, primary tumors (fetal and embryonal subtypes) and nontumorous surrounding livers, which were obtained from formalin-fixed, paraffin-embedded specimens to establish molecular markers for the diagnostic and prognostic use in clinical setting. By examining miRNA and small nucleolar RNAs expressions through GeneChip®; miRNA4.0 Array assay, we found that HB shows distinct miRNA profiles related to tumor types, which could lead to new approaches to treatment and prognosis in progressive HB patients. Learning more about the effects of those epigenetic dysregulations could overcome barriers to innovating better therapeutic strategies to improve clinical outcomes of progressive HB

研究分野：外科

キーワード：肝芽腫 DNAメチル化 miRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 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。当研究グループにおいて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。

近年 Whole-exome sequencing 解析の報告が増え、肝芽腫においてもその報告がなされた (Jia D. 2014 Hepatology)。その報告からは成人がん に比して他の小児がんと同様に塩基配列変異の頻度は非常に少ないことが分かった (Parsons DW. 2011 Science; Zhang J. 2012 Nature)。一方で、エピゲノム異常に関しても網羅的解析が進歩し新しい知見が多数得られるようになった (Plass C. 2013 Nat Rev Genet)。特に細胞リプログラミング技術によって細胞初期化と癌発生に共通する分子機序としてエピゲノム異常は大きくクローズアップされており (Semi K. 2014 Int J Cancer)、肝癌幹細胞においてもメチル化異常の主要な関連が知られている (Raggi C. 2014 Hepatology)。以上の背景から胎児肝を発生母地とする肝芽腫においては、塩基配列異常よりもエピゲノム異常がその発癌および進展に強く関わっていると考えられる。そこで肝芽腫の発生・進展を説明する上でDNAメチル化異常およびヒストン修飾異常そしてmicroRNA発現から肝芽腫における局所進展にはたらくエピゲノム異常を統合的に解明し、肝芽腫の新規分子生物学的マーカーを確立し、成長発達そして妊孕性を考慮すべき小児の肝芽腫症例に対して過不足のない個別化治療を開発することを目的とした。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で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

DNAメチル化異常およびヒストン修飾異常そしてmicroRNA発現から肝芽腫における増悪性化(局所進展)にはたらくエピゲノム異常を解明し、肝芽腫の新規分子生物学的マーカーを確立し、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

主要血管への浸潤のため肝切除の対象とならずに一次的肝移植術をおこなった肝芽腫症例から、(1)正常肝、(2)原発巣のうち viable な箇所、(3)血管浸潤部より microdissection によって個別に抽出した核酸を用いて、DNAメチル化プロファイル、ヒストンコード、およびmicroRNA・mRNA発現プロファイルをゲノムワイドに解析する。DNAメチル化異常およびヒストン修飾異常そしてmicroRNA発現から肝芽腫における局所進展にはたらくエピゲノム異常を解明し、肝芽腫の新規分子生物学的マーカーを確立する。

4. 研究成果

(1) 肝芽腫増悪性化に関わる miRNA 発現異常解析

microRNA発現異常から肝芽腫における進展にはたらくエピゲノム異常を解明し、肝芽腫の新規分子生物学的マーカーを確立することをおこなった。正常肝、原発巣のうち fetal 成分および embryonal 成分、肺転移巣に分けてmiRNAを抽出し、miRNA発現プロファイリングを施行した。一次的肝移植術をおこなった肝芽腫症例から macrodissection によって原発巣のうち viable な異なる組織型由来のサンプルを抽出可能であったが、血管浸潤部に特異的な切片を得ることが出来ず、代わりに遠隔転移巣を解析対象として加えることとした。総検体数44サンプルにおけるGeneChip miRNA4.0 Array解析において、肺転移巣に関連するmiRNA発現異常を4遺伝子抽出した。また各群におけるmiRNA発現プロファイルをクラスタリング解析によって比較すると、正常肝において比較的低発現であるmiRNAが原発巣・肺転移巣においては高発現を示すmiRNA遺伝子が多数存在することがわかった。本研究成果をもとに、先行研究においてCDDP抵抗性に着目して解析したDNAメチル化情報と照合し、DNAメチル化異常がmiRNA発現制御に関わる関連について目下解析中である。本研究によって肝芽腫の組織型(特に原発巣から転移巣へと進展する過程における)に特異的な遺伝子異常を解析することができた。生(なま)検体を処理する関係でヒストンコードの解析は行えなかったが、新規分子マーカーを確立する上で有益な知見を多く得ることが可能であった。

(2) シスプラチン(CDDP)耐性に関わる DNAメチル化異常の関与

本研究の更なる目的である治療ターゲットとなりうるメチル化異常を同定する上で、肝芽腫治療のキードラッグであるCDDP抵抗性に関わるエピゲノム異常を解明することを取り組む方針とした。肝芽腫切除症例を、術前化学療法にCRまたはPRであった6例をCDDP感受性群、SDまたはPDであった5例をCDDP抵抗性群と群別化し、切除検体よりDNAを抽出し網羅的メチル化ビーズアレイ解析を行った。また、肝芽腫細胞株であるHepG2を用いて、断続的な暴露によりCDDP耐性株を作成し、野生株とともに発現アレイ解析を行った。この結果、耐性群で有意に高メチル化を認めたのは2509 probes(1179 genes)であり、部位別ではTSS200-1500:333 genes、1stExon:167 genes、body:716 genes、3'UTR:86 genes、5'UTR:191 genes(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たのは1467 probes(709 genes)であり、部位別ではTSS200-150:105 genes、1stExon:67 genes、body:527 genes、3'UTR:

49 genes、5' UTR : 77 genes (それぞれ重複あり)であった。さらに、申請者らが作成した CDDP 耐性 HepG2 で、非耐性に比し有意に低発現していたものは 1272 genes であり、有意に高発現していたものは 1571 genes であった(Agilent Human gene expression microarray 8×60K を施行した)。これらの 2 実験系のデータを組み合わせ、メチル化異常部位と発現の関係を考慮し CDDP 耐性に関与する遺伝子のメチル化異常を抽出できる。現段階では 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ている。今後はさらに gene body のメチル化異常などの新たな切り口から候補遺伝子の抽出を検討している。更には HepG2 の発現アレイとの結果で得られた候補遺伝子に関して、遺伝子操作を行い CDDP 耐性能の確認や細胞機能評価を進行中である。

5 . 主な発表論文等

〔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 7 件)

1. 本多昌平, 宮城久之, 湊 雅嗣, 荒 桃子, 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 microRNA 発現異常に関わる DNA メチル化異常 第 118 回日本外科学会定期学術集会 2018 年(東京)
2. 本多昌平, 宮城久之, 湊 雅嗣, 荒 桃子, 藤好 直, 北河徳彦, 田中祐吉, 田中水緒, 新開真人, 檜山英三, 武富紹信. 肝芽腫エピゲノム異常解析による個別化治療を目指した分子マーカーの確立 第 55 回日本小児外科学会学術集会 2018 年(新潟市)
3. Honda S, Hiyama E, Fujiyoshi S, Minato M, Hishiki T, Watanabe K, Ida K, Hoshino K, Iehara T, Aoki Y, Kazama T, Kihira K, Takama Y, Taguchi T, Fujimura J, Matsumoto K, Mori M, Yano M, Yokoi A, Tanaka Y, Fuji H, Miyazaki O, Yoshimura K, Takimoto T, Taketomi A. Molecular study in JPLT studies. SIOPEL meeting 2018 年(広島市、日本)
4. 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(仙台市)
5. 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(横浜市)
6. 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(福岡市、日本)

〔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:
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:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：本多 昌平

ローマ字氏名：HONDA Shohei

所属研究機関名：北海道大学

部局名：大学病院

職名：講師

研究者番号（8桁）：90588089

研究分担者氏名：宮城 久之

ローマ字氏名：MIYAGI Hisayuki

所属研究機関名：旭川医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：50596442

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。