

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K07781

研究課題名(和文)肝細胞癌との共通メカニズムに基づく肝芽腫の新規分子診断・治療開発

研究課題名(英文)Molecular analyses of hepatoblastoma based on common mechanism with hepatocellular carcinoma

研究代表者

本多 昌平 (Honda, Shohei)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：90588089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：肝芽腫研究を進展させるために肝細胞癌のうちHCC/stemlike subtypeを解析対象に加えた。研究の成果：当施設において切除されたHCC/stemlike subtype症例として4症例を抽出し、miRNA発現プロファイリングを施行した。肝芽腫特異的なクラスター遺伝子の高発現は明らかではなく、HCCに特異的な発現異常との差異は不明瞭であった。新規肝芽腫60症例分のDNAを用いて、4つの遺伝子(RASSF1A, PARP6, MST1R, OCIAD2)につき、バイサルファイトパイロシークエンシング解析によるメチル化解析をおこない、いずれも予後不良と相関することが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝芽腫は稀少癌であり解析対象とする検体を十分に得られないことから、これまでの肝芽腫研究を更に進展させるために肝細胞癌のうち若年性のHCC/stemlike-subtypeを解析対象とし、肝発生過程からの逸脱と正常肝細胞からの脱分化に働く共通分子メカニズム同定に着目した。これまでの進めてきたDNAメチル化解析によるエピゲノム異常が肝芽腫の予後予測因子として有用であることを、新規検体を用いて再検証することができた。これまでに蓄積してきた抗がん剤耐性機構に関わる細胞実験と本研究結果とを統合し、新知見を得られるよう新たに研究を進展していく所存である。

研究成果の概要(英文)：We added HCC/stemlike subtype of hepatocellular carcinoma as analysis targets in order to develop hepatoblastoma research. Results: (1) We selected 4 cases of resected HCC/stemlike subtype and performed miRNA expression profiling. High expression of hepatoblastoma-specific cluster genes was not apparent, and the difference from HCC-specific aberrant expression was unclear. (2) Methylation analysis using bisulfite pyrosequencing was performed for four genes (RASSF1A, PARP6, MST1R, OCIAD2) in tumor samples extracted from 60 new cases of hepatoblastoma, and the methylation status in all of the genes were found to be correlated with poor prognosis.

研究分野：小児外科

キーワード：肝芽腫 メチル化

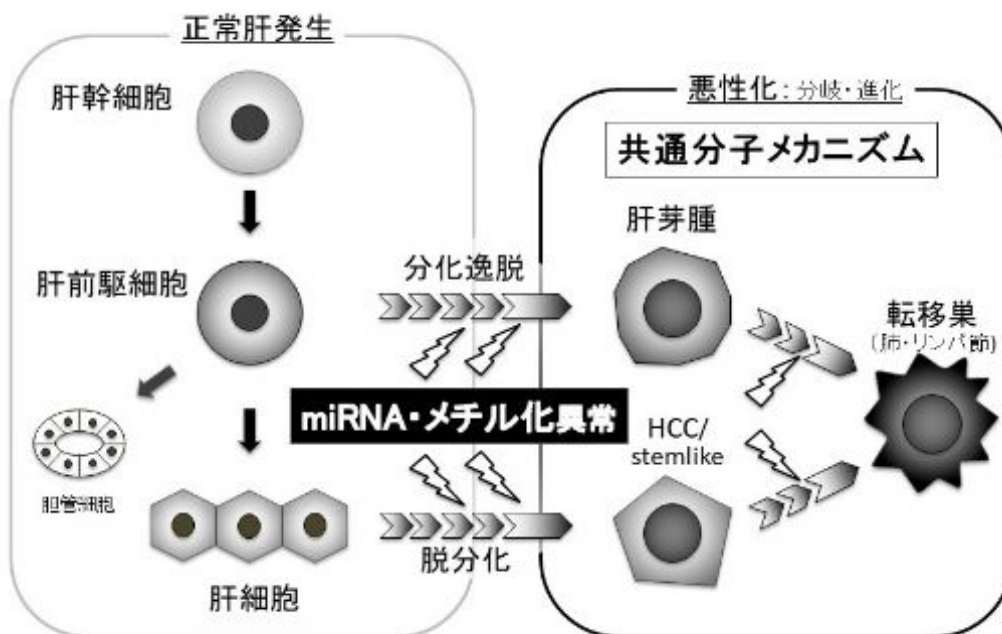
1. 研究開始当初の背景

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。

肝の正常発生過程より逸脱した細胞が発生母地と考えられる肝芽腫においてはその発生・進展にエピゲノム異常が重要な働きを占めている。我々は肝芽腫 miRNA 発現プロファイル解析によって、肺転移を有する進行肝芽腫では14q32インプリンティング領域に位置する遺伝子が多数異常高発現を示しており、これは肝細胞癌(HCC)のうちstem cellの特徴を持つ予後不良なタイプ(HCC/stemlike subtype)にみられる現象と共通した分子機構異常であることを発見した。肝芽腫は稀少癌であり解析対象とする検体を十分に得られないことから、これまでの研究を更に発展させるために症例数の多いHCC/stemlike subtypeを新たに解析対象に加え、肝発生過程からの逸脱と正常肝細胞からの脱分化に働く共通分子メカニズムに着目し、DNAメチル化・miRNA発現異常に基づく分子診断による個別化治療の確立、およびmiRNA発現制御による肝芽腫の進展抑制を目標とした新規治療法の開発を今後の肝芽腫研究の目標とする。

2. 研究の目的

肝芽腫は稀少癌であり解析対象とする検体を十分に得られないことから、これまでの肝芽腫研究を更に発展させるために症例の多いHCC/stemlike subtypeを新たに解析対象に加え、肝発生過程からの逸脱と正常肝細胞からの脱分化に働く共通分子メカニズムに着目し、DNAメチル化・miRNA発現異常に基づく分子診断による個別化治療の確立、およびmiRNA発現制御による肝芽腫の進展抑制を目標とした新規治療法の開発、を肝芽腫研究の目標とした。



3. 研究の方法

- (1) HCC/stemlike subtype 症例の選別・核酸の抽出：当施設においてこれまでに切除された HCC の中から、若年発症/HBV・HCV 感染(-)/転移あり症例に対し免疫染色(AFP, EpCAM, KRT19)をおこない、HCC/stemlike subtype を抽出する。
- (2) 遺伝子プロファイリング：
 - miRNA 発現プロファイル：GeneChip® miRNA4.0 Array (網羅的 miRNA 発現解析)
 - DNA メチル化プロファイル：Infinium HumanMethylation450 BeadChip (網羅的メチル化解析)
- (3) 進行肝芽腫および HCC/stemlike subtype に共通する分子メカニズムの同定：非癌部 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 miRNA 発現プロファイルがどのように変化するかを群間で比較解析する(解析ソフト: Qiugore Omics Explorer を使用)。
- (4) パイロシーケンサーによる予後予測分子マーカーパネルの作成：多数例での新鮮凍結検体

(約 80 例)を対象にバイサルファイトパイロシークエンシング法による DNA メチル化率の測定を行う。

- (5)肝芽腫細胞株を用いた in vitro 解析：遺伝子強制発現およびノックアウトによる細胞浸潤能・増殖能・細胞周期を評価

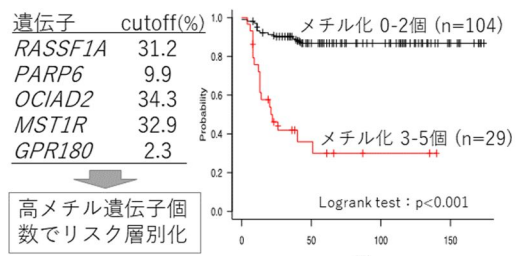
4. 研究成果

(1)進行肝芽腫および HCC/stemlike subtype に共通する分子メカニズムの同定

免染により選別した stemlike subtype 症例として 4 症例の腫瘍部・正常肝部から抽出した RNA を用いて GeneChip miRNA4.0 Array による miRNA 発現プロファイリングを施行した。14q32 インプリンティング領域に位置するクラスター遺伝子の異常高発現は有意な傾向を示しておらず、進行肝芽腫と共通した molecular mechanism の同定には至らなかった。一方で、肝芽腫肝細胞癌の両方の性質を持つ 10 歳男児肝腫瘍症例の網羅的解析(DNA メチル化,mRNA および miRNA 発現)においては、一症例における分岐進化を見る上で興味深い結果が得られた。

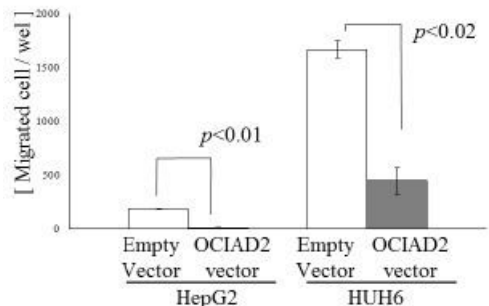
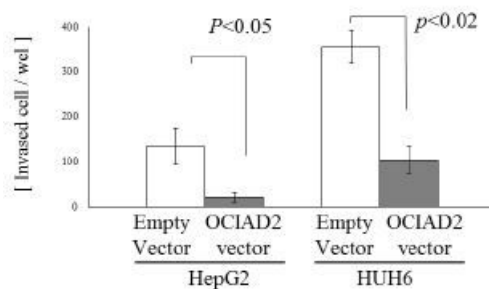
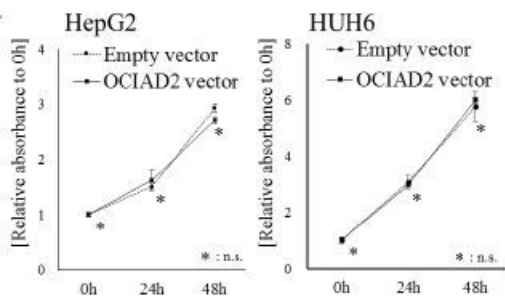
(2)validation cohort を用いた新規予後予測パネルの作成

これまでに予後予測因子として同定した 5 つの遺伝子 (RASSF1A, PARP6, MST1R, OCIAD2, DLX6) につき、バイサルファイトパイロシークエンシング解析による validation をおこなった。既報で解析済みの JPLT2 サンプル (132 サンプル) に加えて、新たに JPLT2 試験より 44 サンプル、JPLT3 試験より 56 サンプルを用いて、5 つのメチル化マーカーについてバイサルファイトパイロシークエンシング法解析によりメチル化解析をおこなった。統合した JPLT2 176 サンプルにおいて、新たに ROC 解析によるカットオフ値の設定をおこない、Kaplan-Meier 解析による Logrank 検定において RASSF1A (OS, $p=1.4E-04$; EFS, $p=1.9E-06$)、PARP6 ($p=5.7E-04$; $p=1.6E-03$)、OCIAD2 ($p=9.4E-05$; $p=1.7E-04$)、MST1R ($p=1.3E-06$; $p=1.2E-04$)、DLX6AS1 ($p=8.0E-04$; $p=7.9E-04$) と有意に予後不良と相関することを確認した。JPLT3 56 サンプルにおいては、パイロシークエンシング解析によるメチル化率と、永江らがメチル化ビーズアレイを用いて解析した $-value$ との相関解析をおこない、5 遺伝子いずれにおいても有意に相関することを確認した。上記メチル化マーカーにつき、ビーズアレイとパイロシークエンスによる統合解析によって臨床応用可能なメチル化遺伝子として有用であることを validation することができた。



(3)肝芽腫細胞株を用いた in vitro 解析

予後に関連する DNA メチル化異常のうち OCIAD2 に着目して肝芽腫細胞株 (HepG2, HUH6) を用いた in vitro 解析をおこなった。どちらの細胞株においても OCIAD2 の強制発現株において細胞分裂能・浸潤能・遊走能の抑制が認められ、がん抑制遺伝子としての遺伝子機能が証明された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 本多 昌平, 荒 桃子, 武富 紹信	4. 巻 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 Honda S, Chatterjee A, Leichter AL, Miyagi H, Minato M, Fujiyoshi S, Ara M, Kitagawa N, Tanaka M, Tanaka Y, Shinkai M, Hatanaka KC, Taketomi A, Eccles MR.	4. 巻 10
2. 論文標題 A MicroRNA Cluster in the DLK1-DIO3 Imprinted Region on Chromosome 14q32.2 Is Dysregulated in Metastatic Hepatoblastomas.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Oncol.	6. 最初と最後の頁 e513601
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fonc.2020.513601	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 該当する

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 -

1. 著者名 Hiyama Eiso, Hishiki Tomoro, Watanabe Kenichiro, Ida Kohmei, Ueda Yuka, Kurihara Sho, Yano Michihiro, Hoshino Ken, Yokoi Akiko, Takama Yuichi, Nogami Yuki, Taguchi Tomoaki, Mori Makiko, Kihira Kentaro, Miyazaki Osamu, Fuji Hiroshi, Honda Shohei, et al	4. 巻 38
2. 論文標題 Outcome and Late Complications of Hepatoblastomas Treated Using the Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor 2 Protocol	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 2488 ~ 2498
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1200/JCO.19.01067	査読の有無 有
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 Minato M., Honda S., Miyagi H., Taketomi A	4. 巻 21
2. 論文標題 Functional analysis of OCIAD2 in hepatoblastoma.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genet. Mol. Res.	6. 最初と最後の頁 -
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 有
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 Kondo Takafumi, Honda Shohei, Suzuki Hiromu, Ito Yoichi M., Kawakita Issei, Okumura Kazuyoshi, Ara Momoko, Minato Masashi, Kitagawa Norihiko, Tanaka Yukichi, Tanaka Mio, Shinkai Masato, Hishiki Tomoro, Watanabe Kenichiro, Ida Kohmei, Takatori Atsushi, Hiyama Eiso, Taketomi Akinobu	4. 巻 172
2. 論文標題 A novel risk stratification model based on the Children's Hepatic Tumours International Collaboration-Hepatoblastoma Stratification and deoxyribonucleic acid methylation analysis for hepatoblastoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 European Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 311 ~ 322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejca.2022.06.013	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1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

1. 発表者名 本多 昌平, 藤好 直, 荒 桃子, 湊 雅嗣, 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 肝芽腫エピゲノム異常が転移・抗癌剤耐性に及ぼす影響 個別化診断を目指して
3. 学会等名 第56回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shohei Honda, Sunao Fujiyoshi, Momoko Ara, Kazuyoshi Okumura, Takafumi Kondo, Akinobu Taketomi
2. 発表標題 Dysregulation of small non-coding RNAs at the DLK1-DI03 imprinted locus in primary and metastatic hepatoblastoma tumors
3. 学会等名 第78回日本癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Honda S, Hiyama E, Fujiyoshi S, ほか22名
2. 発表標題 Molecular study in JPLT studies
3. 学会等名 国際小児肝癌会議2018 (SIOPEL Meeting 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018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
研究分担者	北河 徳彦 (Kitagawa Norihiko) (00585135)	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 (82729)	
研究分担者	鈴木 拓 (Suzuki Hiromu) (20381254)	札幌医科大学・医学部・教授 (20101)	
研究分担者	荒 桃子 (Ara Momoko) (30741219)	北海道大学・大学病院・医員 (10101)	
研究分担者	田中 祐吉 (Tanaka Yuukichi) (50420691)	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・医師 (82729)	
研究分担者	宮城 久之 (Miyagi Hisayuki) (50596442)	旭川医科大学・医学部・講師 (10107)	

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
---------	---------