

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890008

研究課題名（和文）進行肝芽腫の DNA メチル化解析による予後予測分子マーカーの確立

研究課題名（英文）DNA methylation analyses to predict the treatment outcome of advanced hepatoblastoma patients.

研究代表者

本多 昌平 (HONDA SHOHEI)

北海道大学・北海道大学病院・医員

研究者番号：90588089

研究成果の概要（和文）：本研究は、進行肝芽腫の治療効果および予後を規定する分子マーカーを DNA メチル化異常の観点から探求するために、遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化解析をおこない、進行肝芽腫において特異的にメチル化率の高い候補癌抑制遺伝子を同定することによって肝芽腫の予後予測因子となる分子マーカーを確立することを目的とした。SNP アレイ解析により得られた最少欠失領域に位置する候補癌抑制遺伝子のメチル化解析をおこない、肝芽腫細胞株に高メチル化を認めしたが、pilot study として解析した肝芽腫腫瘍検体においては明らかなメチル化異常を認めなかった。

研究成果の概要（英文）：To establish novel prognostic markers for advanced hepatoblastoma patients, we examined the methylation status of candidate tumor suppressor genes located in the shortest overlap region of deletion found in hepatoblastoma tumors detected by SNPs array analysis. Hypermethylation of a candidate gene was found in hepatoblastoma cell lines, although hepatoblastoma tumor samples did not show any aberration of the methylation status.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,230,000	369,000	1,599,000
2011 年度	1,130,000	339,000	1,469,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,360,000	708,000	3,068,000

研究分野：小児外科

科研費の分科・細目：小児外科学

キーワード：肝芽腫・DNA メチル化異常・予後予測分子マーカー

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、近年術前化学療法と手術療法の組み合わせにより予後は改善してきたが、今なお遠隔転移を有する進行肝芽腫の 2 年生存率は 35%に過ぎない。肝芽腫では β カテニンの hot spot 領域の変異が 40-60%と高率にみられる

が (Koch A, et al. 1999 Cancer Res)、その他の欠失や点突然変異などの genetic 異常が少ないとされる。一方で癌抑制遺伝子である RASSF1A プロモーター領域の異常メチル化が肝芽腫の独立した予後予測因子となり、治療方針決定のための分子マーカーとして有用であることが明らかにされ (Honda S, et al. 2008 Int J Cancer)、更には CASP8・SOCS1

などの癌抑制遺伝子の他に、11p15 に位置する IGF2/H19 インプリンティング領域の異常メチル化が高頻度に肝芽腫に認められるなど(Honda S, et al. 2008 Br J Cancer)、DNAメチル化異常と肝芽腫との密接な関わり合いが裏付けられている。われわれは肝芽腫では epigenetic 異常、特に DNA メチル化異常が発生・進展に重要な役割を占めていると考え、その臨床病理学的因子との関わりについて解析を進めてきた。

2. 研究の目的

本研究は、進行肝芽腫の治療効果および予後を規定する分子マーカーを DNA メチル化異常の観点から探求するために、遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化解析をおこない、進行肝芽腫において特異的にメチル化率の高い候補癌抑制遺伝子を同定することによって肝芽腫の予後予測因子となる分子マーカーを確立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十分活用することが、更なる研究の発展につながる可能性が高い。進行肝芽腫の治療成績を向上するためには、抗癌剤に対する効果予測や予後予測因子として有用な分子マーカーを確立し、より個々に適した治療方針の選択が必要である。特に、完全切除が可能であったにも関わらず再発する悪性度の高い症例や、既に遠隔転移があり現状の化学療法プロトコールに抵抗性を示しうる症例を前もって予測できれば、より強力な治療計画を立てることによってそれらの進行を回避できる可能性が生まれる。

3. 研究の方法

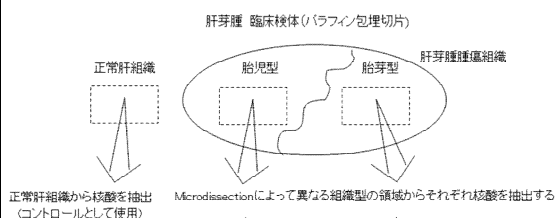
北海道大学病院にておこなわれた肝芽腫手術症例の臨床病理学的背景および治療効果・予後を調査した。病理組織診断を見なおし、いずれの症例においてもパラフィン包埋切片からの再切り出しが可能であることを確認した。

肝芽腫は病理組織学的に異なる胎児型と胎芽型がしばしば同一腫瘍内に混在し、胎芽型では有意に悪性度が高い(Haas JE, et al. 1989 Cancer)ことに着目し、胎芽型肝芽腫と胎児型肝芽腫を macrodissection によって分別して、それぞれから得られた DNA をもちいて遺伝子プロモーター領域のメチル化解析

をおこなう方針とした。(Fig.1)

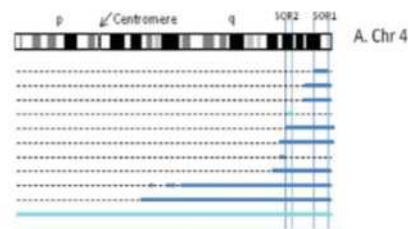
これまでの研究では様々な組織が混在した肝芽腫腫瘍組織から一様に核酸抽出し解析しているため、同じ正常(胎児)肝細胞から異なる生物学的特性(組織型、悪性度)を有する癌に至る過程が、特異的な癌抑制遺伝子の DNA メチル化異常に依存しているかを解明できないでいた。肝芽腫の組織型と DNA メチル化異常との相関に関する研究はこれまでになく、本研究の意義・目的である肝芽腫予後予測分子マーカーの確立に貢献しうる重要な過程と位置づけた。

Fig. 1



肝芽腫の SNP arrays による解析で予後不良と相関することを明らかにした 4q (Fig. 2) および 16q 欠失領域は、11pUPD(Uniparental disomy)領域とともに、LOH(Loss of heterozygosity)の観点から候補癌抑制遺伝子の存在が示唆される (Arai Y, Honda S, et al. Genes Chromosomes Cancer. 2010)。LOH 領域における最小共通欠失領域に位置する候補癌抑制遺伝子につき Methylation-specific PCR 法(MSP)をもちいてメチル化解析をおこなった。

Fig. 2



4. 研究成果

(1) DNA 抽出、Bisulfite 処理

肝芽腫瘍検体 9 例

- ・胎児型 5 例
- ・胎児+胎芽型 4 例

胎児+胎芽型の 4 例においては、いずれも FFPE 切片から macrodissection によって胎児型成分と胎芽型成分とにわけて DNA 抽出を行った。またいずれの検体においても、正常肝成分を抽出し、control として使用した。

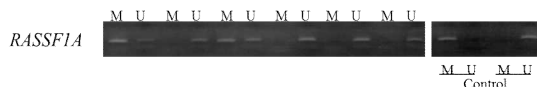
抽出した DNA の状態を確認するために、0.5% アガロースゲルを用いて電気泳動をおこない断片化の有無を確認した。また *GAPDH* PCR にて併せて確認した。

抽出した DNA 1 μ g を QIAGEN EpiTect キットを用いて Bisulfite 処理をおこなった。*PEG3* 遺伝子の CpG island に関わらない領域で特異的プライマーを設計し、PCR 反応をおこない Bisulfite 処理が確実に行われていることを確認した。

(2) *RASSF1A* MSP 解析

予後予測分子マーカーとして既知の *RASSF1A* について、MSP の条件設定を兼ね解析を行った。(Fig. 3)

Fig. 3



組織型にわけて DNA を抽出し MSP によって解析したが、*RASSF1A* 高メチル化と組織型との間に、有意な相関を認めなかった。

(3) 候補癌抑制遺伝子の選出

SNP arrays による解析で得られた 4q および 16q の最少欠失領域より下記の候補癌抑制遺伝子を解析対象として選出した。(Arai Y, Honda S, et al. Genes Chromosomes Cancer. 2010)

4q34.3-q35.2 領域

NM_002199.3 IRF2
interferon regulatory factor 2

NM_004346.3 CASP3
caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase

NM_024629.3 MLF1IP
MLF1 interacting protein

NM_031953.2 SNX25
sorting nexin 25

NM_005958.3 MTNR1A
melatonin receptor 1A

NM_004477.2 FRG1
FSHD region gene 1

16q23.1-qter 領域

NM_016373.2 WWOX
WW domain containing oxidoreductase

NM_004933.2 CDH15
cadherin 15, type 1, M-cadherin (myotubule)

NM_144601.3 CMTM3
CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 3

(4) MSP 条件設定

MSP プライマーを論文および MethPrimer を用いて設定し、PCR 条件設定を行った。その際 CpGgenomeTM Universal Methylated DNA (Chemicon International, Temecula, CA) および normal lymphocyte DNA をそれぞれ methylated および unmethylated templates として使用した。

肝芽腫細胞株として HepG2、HuH6 を同時に解析し、positive control として使用できるかを確認した。

(5) 候補癌抑制遺伝子の MSP 解析

4q 欠失領域に位置する *IRF2*、*CASP3*、*MTNR1A*、および 16q 欠失領域における *WWOX* に関し、

腫瘍検体 9 例につき MSP 解析をおこなった。その他の 5 つの遺伝子については、MSP 条件設定の段階でアニーリング温度、サイクル数など色々調整したが、negative control が検出される、バンドが出ないなどのため MSP 条件が確立されず、改めてプライマー設定をおこない現在条件設定を再試行中である。

MTNR1A において HepG2 に高メチル化を認めしたが、肝芽腫腫瘍検体においては高メチル化を認めなかった。

IRF2, *CASP3*, *WWOX* においては、細胞株および肝芽腫腫瘍検体いずれもメチル化を認めなかった。

今後残りの候補癌抑制遺伝子について MSP 解析を進め、肝芽腫腫瘍検体において高メチル化を認められればリアルタイム PCR を用いたメチル化率の測定をおこない、臨床病理学的因子との関わりについて検討をおこなう方針である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし