

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24791886

研究課題名(和文) Genetic・Epigenetic解析を統合した肝芽腫予後予測マーカーの確立

研究課題名(英文) Clinical prognostic value of DNA methylation in hepatoblastoma

## 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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：肝芽腫腫瘍検体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例のバイサルファイトパイロシーケ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(OCIAD2, GPR180, PARP6, MST1R)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。多因子解析においてGPR180が独立した予後予測因子として抽出された。

研究成果の概要(英文)：Using genome-wide methylation analysis and bisulfite pyrosequencing with specimens from hepatoblastoma tumors, we detected four novel genes, GPR180, MST1R, OCIAD2 and PARP6, because they likely encode tumor suppressors and their hypermethylation was associated with a poor prognosis. The methylation status of the four genes was also associated with age at diagnosis, and significant association with the presence of metastatic tumors was seen in three of the four genes. Multivariate analysis revealed that the presence of metastatic tumors and GPR180 hypermethylation were independent prognostic factors affecting event-free survival.

研究分野：小児外科

キーワード：肝芽腫 メチル化 予後予測因子

## 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、遠隔転移を有する進行肝芽腫の5年生存率は40%に過ぎない予後不良な小児がんである(Hishiki T, et al. 2011 *Pediatr Surg Int*)。肝芽腫ではカテニンの hot spot 領域の変異が40-60%と高率にみられ(Koch A, et al. 1999 *Cancer Res*)、hallmark とされている。申請者は肝芽腫では 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。それによって癌抑制遺伝子 RASSF1A プロモーター領域の異常メチル化が、独立した予後予測因子となることを見出し、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を明らかにした (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肝芽腫に認められることを証明し (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た。また、SNP arrays による詳細なアレレル解析によって、4q および 16q 欠失が肝芽腫の予後不良と相関することを明らかにした (Arai Y, Honda S, et al. 2010 *Genes Chromosomes Cancer*)。最小共通欠失領域には候補癌抑制遺伝子の存在が示唆され、SNP array によって得られた Loss of heterozygosity (LOH) 領域における癌抑制遺伝子の探求に現在取り組んでいる。

近年癌における genetic 異常および epigenetic 異常の相互の関わりについての新しい知見が、次世代シーケンサーや遺伝子網羅的解析の進歩により多数得られるようになった (Stephen B, et al. 2011 *Nature Rev Genet*)。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る。

## 2. 研究の目的

肝芽腫における epigenetic 異常 (DNA メチル化異常) および genetic 異常 (塩基配列変異・欠失・増幅) を悪性度の異なる組織型との関連性に着目して解析し、肝芽腫の progression に関与する遺伝子異常を明らかにする。組織型に応じた DNA メチル化プロファイルを解析し、特異的にメチル化率の異なる候補癌抑制遺伝子を同定して、SNP array 解析、全 exome 塩基配列解析によって得られる genetic 異常と照合することによって、肝芽腫の強力な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。

## 3. 研究の方法

(1) 肝芽腫腫瘍検体から macrodissection

によって正常肝および胎児型・胎芽型肝芽腫の領域を分けて採取し、それぞれから抽出した DNA の網羅的メチル化解析をおこなった。

(2) 肝腫瘍 cell line (HuH6, HepG2) を脱メチル化処理し、処理前後の細胞より抽出した RNA を用いて網羅的発現アレイ解析をおこなった。

(3) 最終的に絞り込んだ候補癌抑制遺伝子のメチル化率を臨床腫瘍検体で解析し、他の臨床病理学的因子との関連を統計学的に比較検討して予後規定因子として有用な分子マーカーとなりうるかを判定した。

(4) 抽出された遺伝子の細胞株における発現状態を確認し、メチル化と発現との関連について解析した。更には強制発現株およびノックダウン株を作成しがん抑制遺伝子としての機能を *in vitro* 解析にて検証した。

## 4. 研究成果

当初次世代シーケンサーによる Whole-exome sequencing 解析を検討していたが、解析可能な検体数と予算との兼ね合いを考慮し、先行研究 (平成 22~23 年度 研究活動スタート支援 (課題番号 22890008)) で得られた知見を発展させるために網羅的 DNA メチル化解析結果を主体とし、詳細に検討することで肝芽腫の強力な予後予測因子となる分子マーカーを確立する方針とした。更には新たに抽出された候補遺伝子について *in vitro* 解析 (細胞増殖能・遊走能・浸潤能につき overexpression 株を作成して評価) を追加することでがん抑制遺伝子としての機能を証明することとした。

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 (Fig.1)、臨床腫瘍検体 74 例のバイサルファイトパイロシーケ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 (OCIAD2, GPR180, PARP6, MST1R) を同定し (Fig.2)、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。多因子解析において GPR180 が独立した予後予測因子として抽出された (Table)。

細胞機能解析において OCIAD2 が高メチル化と発現が逆相関しており、更には増殖能には影響を与えないが、遊走および浸潤能において有意に抑制性にはたらくことが示された。また PARP6 においても同様のメチル化による発現低下が確認され、がん抑制遺伝子としての機能を持つことが示された。その他の遺伝子においては細胞株の調整が困難であり、最終的な機能同定にまでは至らなかった。

本研究期間全体を通じて実施した研究成果を *Cancer Science* 誌に投稿しアクセプトされた。

Fig.1

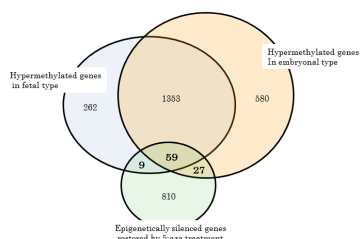


Fig. 1

Fig.2

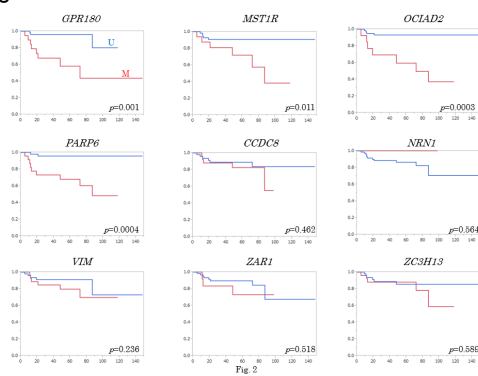


Fig. 2

Table.

Gene name: factor	p-value	Hazard Ratio (95%CI)
GPR180: methylation level $\geq$ 2.6 %	0.0224	3.714 (1.200-12.993)
MST1R: methylation level $\geq$ 20.5 %	0.6050	1.311 (0.461-3.710)
OCIAD2: methylation level $\geq$ 34.3 %	0.4534	0.588 (0.142-2.331)
PARP6: methylation level $\geq$ 8.0 %	0.2589	2.018 (0.588-6.701)
Age at diagnosis: > 1y	0.7378	0.756 (0.106-3.580)
Metastatic disease: Present	0.0099	5.040 (1.478-18.103)

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.* 2016 Mar 16. doi: 10.1111/cas.12928. [Epub ahead of print] (査読有)

[学会発表](計 3件)

1. 2015.10.29 The 53rd Annual Meeting of Japan Society of Clinical Oncology, Kyoto International Conference Center, Grand Prince Hotel Kyoto (京都市)

Translational implication of four aberrantly methylated genes in hepatoblastoma.

Honda S, Minato M, Miyagi H, Hiyama E, Taketomi A.

2. 2015.10.8-10 第74回日本癌学会学術総会、名古屋国際会議場(名古屋市) 肝芽腫における癌抑制遺伝子 OCIAD2 の DNA メチル化による発現制御とその機能 湊雅嗣、本多昌平、鈴木拓、檜山英三、武富紹信

3. 2015.4.16-18. 第115回日本外科学会定期学術集会、名古屋国際会議場(名古屋市) OCIAD2 の高メチル化は肝芽腫の予後不良因子である 湊雅嗣、本多昌平、岡田忠雄、檜山英三、鈴木拓、武富紹信

[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・北海道大学病院・助教

研究者番号：90588089

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし