71　小児難治性肝疾患の発症機序の解明	笠原　群生

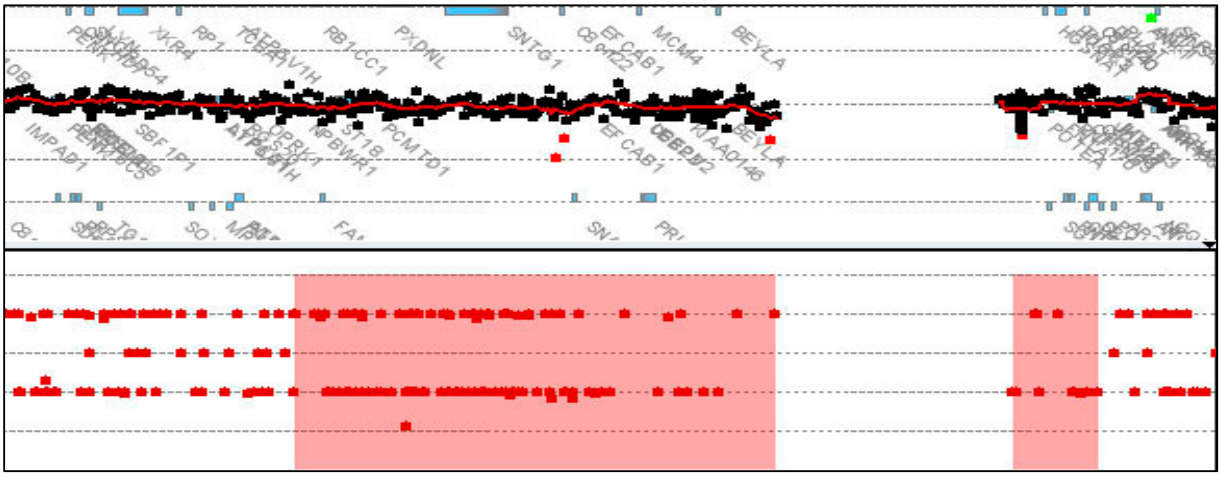
【目的】 本研究の目的は、原因不明の希少難治性疾患である胆道閉鎖症と肝芽腫を有する患者の遺伝学的解析によって、これらの疾患の発症機序を解明することである。本研究では、国立成育医療研究センターで集積された患者の腫瘍組織および血液の解析を行った。

【方法】 下記の 3 項目について研究を実施した。

1. 肝芽腫のエピゲノム解析：肝芽腫 11 例について、摘出腫瘍組織および周辺の正常肝組織から抽出したゲノム DNA のメチル化解析を行った。既知インプリンティング疾患関連 6 座位のメチル化可変領域のメチル化率を算出し、異常メチル化を示す座位を同定した。2. 肝芽腫のゲノム解析：上記の肝芽腫織由来ゲノム DNA を用いてアレイ comparative genomic hybridization（CGH）を行い、ゲノムコピー数異常について検討した。3. 胆道閉鎖症のゲノム解析：胆道閉鎖症 18 例のゲノム DNA を対象に、既知疾患関連遺伝子および候補遺伝子の網羅的シークエンスおよびアレイ CGH 解析を行った。

【結果】 1. 肝芽腫のエピゲノム解析：9 サンプルにおいて、明らかな DNA メチル化異常が同定された。とくに、11 番染色体 H19-DMR の高メチル化と Kv-DMR の低メチル化が多数の患者で認められた。これは、肝芽腫の発症にエピゲノム異常が重要な役割を果たすことを明確とするものである。インプリンティング遺伝子の多くが細胞増殖の制御に関与することから、これらの遺伝子の発現異常が腫瘍の形成に寄与している可能性がある。2. 肝芽腫のゲノム解析：7 サンプルにおいて、染色体の一部もしくは全体を包含するコピー数変化が同定された。コピー数異常は 1 番および 2 番染色体にとくに多く同定された。11 番染色体や 7 番染色体にコピー数異常を呈する症例はなく、上記の DNA メチル化変化を染色体構造異常によって説明することは不可能であった。したがって、肝芽腫腫瘍組織においては何らかの未知の機序でエピジェネティック制御の破綻が生じていることが示唆される。また、今回同定されたゲノムコピー数異常領域には、腫瘍の発生や進展に関与する遺伝子が含まれる可能性がある。現在、これらの点について研究を進めている。3. 胆道閉鎖症のゲノム解析：胆道閉鎖症 18 例のゲノム DNA を対象に、既知疾患関連遺伝子および候補遺伝子の網羅的シークエンスおよびアレイ CGH 解析を行った。18 例中 3 例においてヘテロ接合性もしくは複合ヘテロ接合性 *ARHGEF10* 非同義塩基置換を同定した。また 1 例で 7 番染色体微小欠失と 8 番染色体 loss-of-heterogeneity を同定した（図）。現在これらの疾患との関連について検討している。

胆道閉鎖症で同定された loss-of-heterogeneity



71. 小児難治性肝疾患の発症機序の解明

笠原　群生

国立成育医療研究センター 臓器移植センター 移植外科

Key words：遺伝子解析，エピゲノム，肝芽腫，ゲノム，胆道閉鎖症

緒　言

本研究の目的は、肝芽腫もしくは胆道閉鎖症を有する患者の臨床的および遺伝学的解析によって、これらの疾患の発症機序を解明することである。肝芽腫は、小児腫瘍の中で悪性度が高く臨床的に重要な疾患であるが、その発症機序は未解明である。なお肝芽腫は、インプリンティング疾患である Beckwith-Wiedeman 症候群（BWS）にしばしば合併することが知られている。われわれは近年、BWS 以外のインプリンティング疾患である 14 番染色体片親性ダイソミー症候群患者においても肝芽腫の合併が多いことを見出した［1］。この成績は、肝芽腫の発症にゲノム DNA メチル化異常が関与する可能性を示唆する。しかし、肝芽腫のメチル化異常を検討した研究はこれまでごく少数である。また、胆道閉鎖症は治療がきわめて困難な疾患であり、小児期に肝移植の対象となる疾患の代表である。本症の発症には、遺伝学的要因、ウイルス感染、自己免疫などさまざまな因子が関与すると推測のもとに研究がなされたが、確実なエビデンスは得られていない。

国立成育医療研究センターは、胆道閉鎖症と肝芽腫を含む小児肝疾患の外科的治療における世界有数の施設である。また、当センター研究所は小児ゲノム・エピゲノム解析における中核施設であり、次世代シークエンサーを含む最先端技術を用いた遺伝子解析がルーチンに行われている［2］。本研究では、これらの利点を生かして多数の患者の腫瘍組織および血液の網羅的遺伝学的解析を行った。本研究によって、疾患発症に関与する可能性がある遺伝学的異常が明らかとなった。

方　法

1. 倫理基盤

本研究は、国立成育医療研究センター倫理審査委員会の承認を受けて行った。全研究対象者の両親からインフォームドコンセントを得た。

2. 肝芽腫のエピゲノム解析

肝芽腫 11 例について、摘出腫瘍組織および周辺の正常肝組織から抽出したゲノム DNA のメチル化解析を行った。11 例の組織型は、6 例（症例 1～3、6、8、9）が combined fetal and embryonal type、残りの 5 例が mixed epithelial and mesenchymal type であった。パイロシークエンサー（Qiagen 社）を用いて、既知インプリンティング疾患関連 6 座位のメチル化可変領域（DMR）のメチル化率を算出した。正常肝組織におけるメチル化率の最小値および最大値±5%を超えるものをそれぞれ低メチル化と高メチル化とし、これらが各 DNR に含まれる半数以上の CpG サイトにおいて認められる場合を異常メチル化と判定した。

3. 肝芽腫のゲノム解析

上記の肝芽腫織由来ゲノム DNA を用いて、Comparative genomic hybridization（CGH）+ Singe nucleotide polymorphism（SNP）－アレイ（Agilent technology 社）によるゲノムワイドコピー数解析を行い、染色体構造異常の有無について検討した。

4. 胆道閉鎖症のゲノム解析

胆道閉鎖症小児 18 例の末梢血由来 DNA を対象に、疾患関連遺伝子および候補遺伝子計 90 のシークエンス解析を

行った。Haloplex target enrichment （Agilent technology 社）を用いて各遺伝子の翻訳領域およびスプライスサイトを増幅し、次世代シークエンサー（Ilumina 社）で塩基配列を決定した。独自に開発したパイプラインを用いて、一般集団におけるアリル頻度が 0.5%以下、かつ、アミノ酸変化を伴う塩基置換を抽出した。次いで、同定された塩基置換の病的意義の有無を Polyphen-2 や MutationTester などの *in silico* 解析で検討し、良性多型を除外した。さらに、合併症を認める症例を対象としてアレイ CGH によるゲノム解析を行い、コピー数異常と loss-of-heterogeneity（LOH）について検討した。

結　果

1. 肝芽腫のエピゲノム解析

肝芽腫組織 11 サンプル中 9 サンプルにおいて、明らかな DNA メチル化異常が同定された（図 1）。複数例に共通する変化として、11 番染色体 H19-DMR の高メチル化（7 例）と Kv-DMR の低メチル化（5 例）が認められた。4 例では、複数の染色体上の DMR にメチル化異常が同定された。14 番染色体 IG-DMR については、高メチル化例と低メチル化例が存在した。

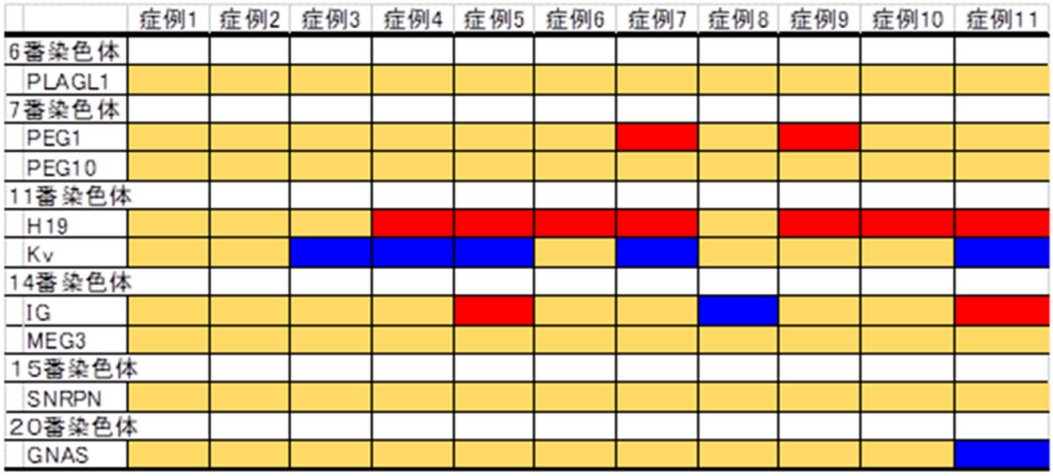


図 1. 肝芽腫 11 例の DNA メチル化解析

9 か所のメチル化可変領域の結果を示す。黄色は正常メチル化領域、赤は高メチル化領域（メチル化率が正常肝組織の最大値より 5%以上高い DMR が全 DMA の半数以上を占める領域）、青は低メチル化領域（メチル化率が正常肝組織の最大値より 5%以上低い DMR が全 DMA の半数以上を占める領域）を表している。

2. 肝芽腫のゲノム解析

肝芽腫組織 11 サンプル中 7 サンプルにおいて、染色体の一部もしくは全体を包含するコピー数変化が同定された（表 1）。コピー数異常は 1 番および 2 番染色体にとくに多く同定され、欠失に比べて重複が高頻度であった。11 番染色体や 7 番染色体上の DMR 領域を包含するコピー数異常を呈する症例はなく、上記の DNA メチル化変化を染色体構造異常によって説明することは不可能であった。多くの座位にメチル化異常を示す症例ではゲノムコピー数異常の頻度が高かったが、メチル化異常陰性の症例 1 においても 4 つの染色体のゲノム構造異常が同定された。さらに、ゲノムコピー数変化とエピゲノム変化と患者の組織型との間に関連は認められなかった。

表 1. 肝芽腫 11 例のゲノムコピー数解析

	ゲノム変化	組織型
症例1	1,4欠失、2,5重複	FE
症例5	1,2重複	EM
症例6	1,2,6,17重複、9欠失	FE
症例7	1,8,12,20重複	EM
症例9	1,2,7,20重複	FE
症例10	1,2,5,8,16,20,22重複	EM
症例11	8,20重複、14,21欠失	EM

7 例において染色体重複もしくは欠失が同定された。

FE: combined fetal and embryonal type、

EM: mixed epithelial and mesenchymal type.

3. 胆道閉鎖症のゲノム解析

18 例中 3 例においてヘテロ接合性もしくは複合ヘテロ接合性 *ARHGEF10* 非同義塩基置換を同定した。*ARHGEF10* は、過去の研究で胆道閉鎖症患者の肝組織において低メチル化を示すことが見いだされている遺伝子である［3］。ゲノムコピー数解析では、1 例で 7 番染色体の約 2 Mb 領域のヘテロ接合性欠失が同定された（図 2）。さらに 8 番染色体の約 10 Mb 領域で LOH が同定された。これらの欠失/LOH 領域には既知胆道閉鎖症原因遺伝子は存在していなかった。他に明らかに疾患に関与すると推測される遺伝子異常は同定されなかった。

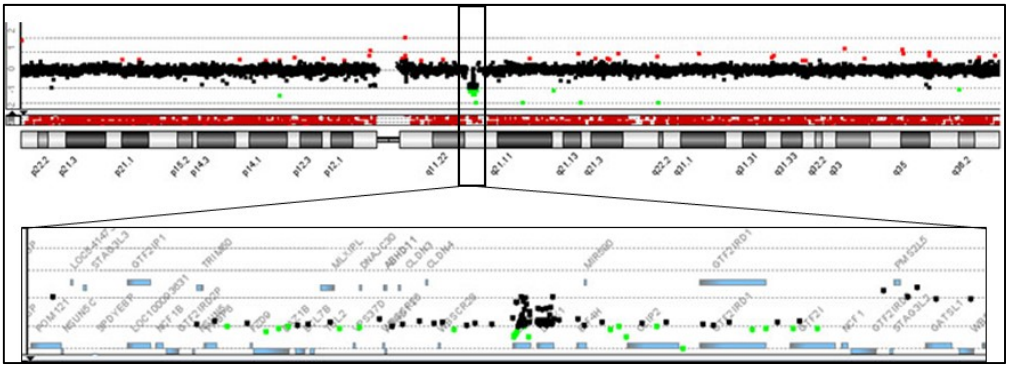


図 2. 胆道閉鎖症患者で同定された 7 番染色体微細欠失

考　察

本研究によって、肝芽腫で高頻度に DNA メチル化異常が生じていることが明らかとなった。これは、肝芽腫がしばしばインプリンティング疾患に合併するという過去の報告と一致する。とくに 11p15 領域の DMR がメチル化変化に対する脆弱性を有することが見いだされた。H19-DMR の高メチル化は細胞増殖を促すことによって腫瘍の進展に寄与している可能性がある。なお、ゲノムコピー数解析によって多彩なゲノム再構成が同定されたが、11p15 および他の DMR を包含する異常はなかった。さらに、他のゲノム異常と DNA メチル化変化の間に関連が認められなかった。また、特定の組織型が DNA メチル化に関与する可能性も否定された。これらの結果から、肝芽腫腫瘍組織においては何らかの未知の機序でエピジェネティック制御の破綻が生じていると推測される。現在われわれは、腫瘍組織のゲノムワイドメチル化解析を計画している。これによってメチル化異常に対する脆弱性を規定するゲノム因子が解明される可能性がある。また今後、肝芽腫に高頻度に生じるゲノムコピー数異常領域について詳細に検討にすることで、腫瘍の発生や進展に関与する遺伝子が同定されると期待される。とくに重複領域には oncogene が含まれている可能性がある。これらは、肝芽腫発症メカニズムの解明につながる。肝芽腫は、成人のガンと異なる遺伝的背景を有する疾患であり、本

症の発症機序の解明は胎児由来腫瘍全般の理解に貢献する。

胆道閉鎖症のシークエンス解析では、3 例においてきわめてまれな *ARHGEF10* 塩基置換が同定された。過去の研究において、この遺伝子のメチル化変化がモデル動物における胆道閉鎖症の発症に関与する可能性が見いだされている［3］。今回同定された塩基置換の病原性について、両親の解析や立体構造解析などによって検証を行う計画である。さらに本研究では、7 番染色体の欠失と 8 番染色体の LOH が胆道閉鎖症患者で初めて同定された。今後、この領域に位置する遺伝子の解析により、新規疾患責任遺伝子が同定される可能性がある。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、国立成育医療研究センター臓器移植センターの阪本靖介と分子内分泌研究部の深見真紀である。

文　献

1） Kagami M, Kurosawa K, Miyazaki O, Ishino F, Matsuoka K, Ogata T. Comprehensive clinical studies in 34 patients with molecularly defined UPD(14)pat and related conditions (Kagami-Ogata syndrome). Eur J Hum Genet. 2015 Nov;23(11):1488-98. Epub 2015 Feb 18. DOI: 10.1038/ejhg.2015.13.

2） Fukami M, Miyado M. Next generation sequencing and array-based comparative genomic hybridization for molecular diagnosis of pediatric endocrine disorders. Ann Pediatr Endocrinol Metab. 2017 22(2): 90-94. DOI:10.6065/apem.2017.22.2.90.

3） Cofer ZC, Cui S, EauClaire SF, Kim C, Tobias JW, Hakonarson H, Loomes KM, Matthews RP. Methylation Microarray Studies Highlight PDGFA Expression as a Factor in Biliary Atresia. PLoS One. 2016 Mar 24;11(3):e0151521. DOI: 10.1371/journal.pone.0151521.