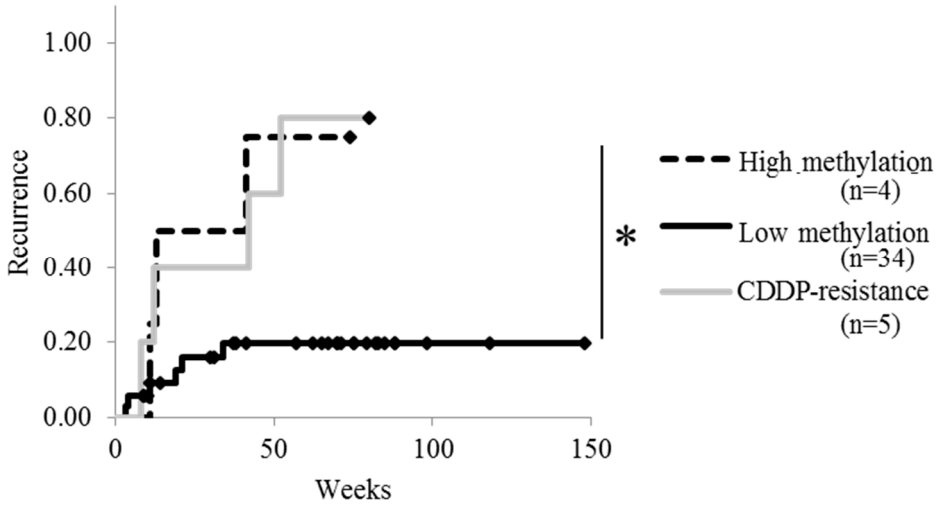
83　網羅的epigenetic解析による小児肝芽腫治療抵抗性の解明	武冨　紹信

【目的】多くの肝芽腫患者はシスプラチン（CDDP）を 1st ラインとした術前・術後化学療法を施行される。約 20%の患者で術前化学療法に抵抗性を持ち、予後は不良となる。しかし、中には術前化学療法に感受性があっても術後化学療法中に早期再発がみられる患者もいる。我々は、それらの症例において術前化学療法後にも少数の化学療法抵抗性細胞が残存していると考えた。最近の研究では、DNA 高メチル化と肝芽腫の進展が報告されている。本研究では、DNA 高メチル化が CDDP 抵抗性に関与するか、また、術後化学療法に CDDP を行う指標となり得るかを検討した。

【方法】43 症例の肝芽腫切除検体より DNA を抽出した。そのうち、CDDP 感受性の 6 例および抵抗性の 5 例を含む 11 例に対しゲノムワイドメチル化アレイ解析を施行した。我々はまた、肝芽腫細胞株である HuH6 を用いて CDDP 耐性株を作製後、HuH6 野生株と耐性株を用いて cDNA マイクロアレイ解析を施行した。これらのアレイデータより統計学的に CDDP 耐性と最も関連のある遺伝子を抽出した。バイサルファイトパイロシークエンシング法を用いて、術前化学療法に抵抗性のあった 38 症例に対し、抽出した遺伝子のメチル化率を計測した。メチル化率と臨床データの比較を行った。

【結果】*CSF3R* が CDDP 耐性に最も関連する遺伝子であった。バイサルファイトパイロシークエンシング法でも、*CSF3R* は CDDP 抵抗性群で有意に高メチル化していた。術前化学療法感受性の 38 症例でも、*CSF3R* 高メチル化群は低メチル化群と比較し有意に早期再発を認めた。また、高メチル化群の再発曲線は、術前化学療法抵抗性群と相似していた。

術後再発曲線



83. 網羅的 epigenetic 解析による小児肝芽腫治療抵抗性の解明

武冨　紹信

北海道大学 大学院医学研究院 消化器外科学教室 I

Key words：肝芽腫，シスプラチン耐性，DNA メチル化，*CSF3R*

緒　言

肝芽腫は小児における三大固形腫瘍の一つである。その治療には集学的な治療を要し、化学療法のファーストラインとなるのがシスプラチン（CDDP）である。しかし、約 22%の症例で術前化学療法に抵抗性を持ち、さらに術前化学療法に感受性であった患者の約 24%で 5 年以内の早期再発を認める。術前に感受性があったにもかかわらず、術後早期再発を認める症例には、もともと少数の CDDP 抵抗性細胞が存在し、術前化学療法後も抵抗性細胞の残存し早期再発を起こすことが予想される。そのような症例に対し、CDDP ベースの術後化学療法は適切ではない。それ故、CDDP 抵抗性のバイオマーカーを同定し、切除検体での評価を行えば、術後化学療法に CDDP を使用することが適切かの判断材料になりうる。

肝芽腫において、エピゲノム異常が肝芽腫への分化逸脱のメカニズムの一つであることが報告されている［1］。β カテニンの mutation は肝芽腫の hallmark であるが、最近の全 exome シークエンス解析ではその他の mutation は少数しか認められていない［2, 3］。我々は今まで肝芽腫における DNA の高メチル化と予後不良について報告してきた［4, 5］。他癌腫において、DNA メチル化異常が CDDP 抵抗性に関与しているという報告もされてきている［6］。そこで我々は、肝芽腫において CDDP 抵抗性に DNA メチル化が関与し、術後化学療法に CDDP を用いるべきかの指標となりうると仮定した。

方　法

1. 患者

日本小児肝癌スタディグループ（JPLT）より供与された、43 名の肝芽腫患者切除検体より抽出した DNA サンプルを使用した。この 43 例は 2000 年から 2006 年の間に JPLT 関連施設で手術を受けた。すべての症例は JPLT-2 のプロトコールに則り術前・術後化学療法を施行された。化学療法の治療効果判定は RECIST を用いて評価し、完全奏功、部分奏功は化学療法感受性群（S 群）、安定、進行は化学療法抵抗性群（R 群）に群別化した。43 例中、S 群は 38 例、R 群は 5 例であった。

2. 全ゲノムメチル化解析

S 群 6 例、R 群 5 例より抽出した DNA サンプルを用い、Infinium HumanMethylation450 BeadsChip array（Illumina）で全ゲノムメチル化解析を行った。β 値を用いてマン - ホイットニー検定にて抵抗性群で有意に上昇しており、かつ平均 β 値が 0.15 以上上昇している遺伝子を有意な高メチル化遺伝子として抽出した。これらの遺伝子のうち、TSS 周囲の高メチル化を示している遺伝子をさらに候補遺伝子として絞り込んだ。

3. CDDP 耐性肝芽腫遺伝子の作製

ヒト肝芽腫細胞株である HuH6 を用いて、CDDP 耐性株を作製した。CDDP は 3 か月間断続的に、徐々に濃度を上昇させながら暴露した。細胞の維持は、DMEM に 10%FBS、1%ペニシリン／ストレプトマイシンを混合した培養液で、5%CO_2、37℃の環境下で行った。

4. 細胞生存アッセイ

野生型 HuH6（HuH6WT）と作製した CDDP 耐性 HuH6（HuH6CR）の CDDP 耐性能を評価するため、IC_{50} の算出を行った。96 ウェルプレートに各細胞を 20,000 個／well で播種し、オーバーナイトで well に接着させたのち、各濃度（0～50 μg/ml）の CDDP に暴露させ 48 時間培養した。その後、MTS アッセイを用いて生存細胞の比率より IC_{50} を算出し、HuH6WT と HuH6CR で比較した。

5. 細胞株の RNA 抽出と発現アレイ解析

HuH6WT および HuH6CR より RNA を抽出した後、発現アレイ解析を行った。HuH6WT と HuH6CR を比較し、Fold change > 2 かつ ANOVA P 値 < 0.05 を有意な発現変動とし、HuH6CR で有意に発現低下している遺伝子を抽出した。

6. 候補遺伝子抽出

全ゲノムメチル化アレイおよび発現アレイの解析結果より、CDDP 耐性の候補遺伝子の抽出を行った。さらに、重回帰分析や分散分析を行い、候補遺伝子の中から CDDP 耐性と最も関連の強い遺伝子を 1 つ抽出した。

7. バイサルファイトパイロシークエンシング

抽出した候補遺伝子について、まず全ゲノムメチル化アレイを行った 11 例に対しバイサルファイトパイロシークエンシングを行い、メチル化率を測定した。測定したメチル化率とメチル化アレイでの β 値を、重回帰分析を用いて比較し、結果が矛盾しないことを確認した。その後、S 群患者 38 例に対しバイサルファイトパイロシークエンシングを施行し、メチル化率と臨床経過を解析した。高メチル、低メチル化の群別化を行う際に、ROC 解析により threshold を算出し、cutoff 値として使用した。

8. 統計解析

メチル化率の比較解析、細胞株の IC_{50} 比較解析は student の t-test を行った。再発曲線は Kaplan-Meier method を用いて描出し、Log-rank test で比較した。再発解析には診断から再発または最終診察（最終無再発確認）までの時間を用いた。$P < 0.05$ を有意差ありとした。

結　果

1.　R 群で有意に高メチル化を認めた遺伝子

全ゲノムメチル化アレイ解析に用いた R 群 5 例、S 群 6 例の臨床所見は、術前 CDDP への感受性以外には有意差を認めなかった。メチル化ビーズアレイのデータより、4,637 遺伝子が R 群で有意に高メチル化していた。

2.　HuH6CR の樹立

HuH6WT と HuH6CR の CDDP 暴露 48 時間時点での IC_{50} を算出し、IC_{50} はそれぞれ 9.9±3.3 μg/ml、20.8±4.0 μg/ml であり、有意に HuH6CR で上昇していることを確認した。

3.　HuH6CR で高発現していた遺伝子

HuH6WT、HuH6CR から抽出した RNA を用いて施行した発現アレイ解析の結果より、HuH6CR で有意に発現低下していたのは 119 遺伝子であった。

4.　CDDP 耐性遺伝子の抽出

メチル化ビーズアレイで高メチル化していた 4,637 遺伝子と発現アレイで低発現していた 119 遺伝子より共通していた遺伝子は 18 遺伝子であった。そのうち、TSS 周囲に高メチル化を認めたのは 5 遺伝子であった。この 5 遺伝子を前述の統計手法を用いて、CDDP 耐性と最も関連の強い遺伝子として *CSF3R* を抽出した。

5. メチル化率の比較、再発解析

CSF3R のR群とS群でのβ値、メチル化率を比較した（図1）。メチル化アレイ、パイロシークエンスそれぞれR群とS群のβ値、メチル化率は0.91±0.015 vs 0.75±0.097、56.3±21.3（%） vs 31.9±18.0（%）でありどちらもR群で有意に上昇していた。また両データには有意な相関を認めた。

S群38例を用いた解析では、ROC解析よりcutoff値を54%に設定した。高メチル化していたのは4例、低メチル化は34例であった。再発解析を行い、低メチル化群で有意に再発の低下を認めた。また、高メチル化群では再発曲線はR群と相似していた。

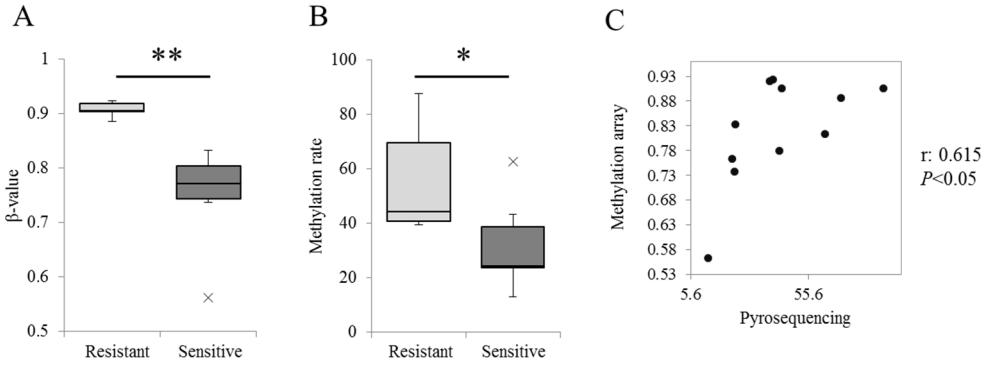


図1. メチル化アレイとパイロシークエンスによる *CSF3R* のメチル化の比較

A）メチル化アレイによるS群とR群でのβ値の比較

B）パイロシークエンスによるS群とR群のメチル化率の比較

C）両データのscatter plot

** : P < 0.01、* : P < 0.05 (Student t-test)

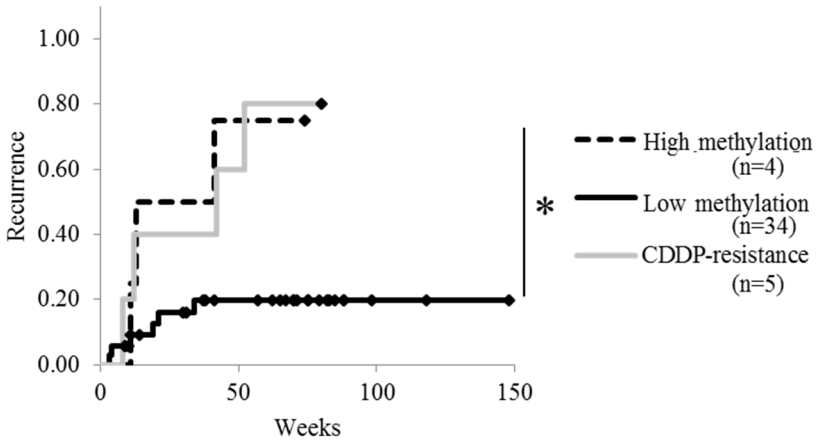


図2. 再発曲線

高メチル化、低メチル化、R群で比較した。

低メチル化群に対し、高メチル化群R群では再発が有意に高値であった。

* : P < 0.05 (Log-rank test)

考　察

CDDP は肝芽腫の 1st ライン治療となるが、約 20%の症例で治療抵抗性であり、予後は不良となる。また、術前治療感受性と判断された患者でも、約 24%で術後早期の再発を認める。我々は、腫瘍切除後の再発は、残存した CDDP 抵抗性腫瘍細胞の micrometastasis に由来するものと考え、これらの細胞のクローナルな分化には DNA メチル化が関与すると仮定した。本研究では、CDDP 耐性に最も関連が強い高メチル化遺伝子として、*CSF3R* を抽出した。術前化学療法感受性患者においても、*CSF3R* の高メチル化を認めた患者では、低メチル化患者に比較し有意に高い再発曲線を呈し、またその再発曲線は術前化学療法抵抗性患者と類似していた。我々は、腫瘍不均一性により腫瘍組織内には *CSF3R* の高メチル細胞、低メチル細胞が混在すると仮定した。高メチル化細胞（CDDP 抵抗性）が多く存在する腫瘍は術前化学療法抵抗性を呈し、低メチル化細胞（CDDP 感受性）が多く存在していれば術前化学療法感受性を呈すると考えられた。さらに、術前化学療法で感受性を示した腫瘍でも、残存した腫瘍の内部に高メチル化細胞が多く割合を占める症例であれば、術後 CDDP 治療が奏功せず早期の再発の可能性が考えられた。故に、術後の切除腫瘍より *CSF3R* のメチル化率を測定し、高メチル化を認めた症例では CDDP 以外の術後化学療法を施行することで、肝芽腫の層別化に基づく治療戦略が可能となると考えられた。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、札幌医科大学医学部分子生物学講座の鈴木拓教授、広島大学小児外科学講座の檜山英三教授である。

文　献

1） Hiyama E, Hishiki T, Watanabe K, et al. Resectability and tumor response after preoperative chemotherapy in hepatoblastoma treated by the Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor (JPLT)-2 protocol. J Pediatr Surg. 2016 Dec;51(12):2053-2057. Epub 2016 Sep 17. PMID: 27712887 DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2016.09.038.

2） Koch A, Denkhaus D, Albrecht S, et al. Childhood hepatoblastomas frequently carry a mutated degradation targeting box of the beta-catenin gene. Cancer Res. 1999 Jan 15;59(2):269-73. PMID: 9927029

3） Buendia MA. Unravelling the genetics of hepatoblastoma: few mutations, what else? J Hepatol. 2014 Dec;61(6):1202-4. Epub 2014 Sep 17. PMID: 25239079 DOI: 10.1016/j.jhep.2014.09.016.

4） Honda S, Haruta M, Sugawara W. The methylation status of RASSF1A promoter predicts responsiveness to chemotherapy and eventual cure in hepatoblastoma patients. Int J Cancer. 2008 Sep 1;123(5):1117-25. PMID: 18537155 DOI: 10.1002/ijc.23613.

5） Honda S, Minato M, Suzuki H. Clinical prognostic value of DNA methylation in hepatoblastoma: Four novel tumor suppressor candidates. Cancer Sci. 2016 Jun;107(6):812-9. Epub 2016 Apr 27. PMID: 26991471 DOI: 10.1111/cas.12928.

6） Ibanez de Caceres I1, Cortes-Sempere M, Moratilla C. IGFBP-3 hypermethylation-derived deficiency mediates cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer. Oncogene. 2010 Mar 18;29(11):1681-90. Epub 2009 Dec 21. PMID: 20023704 DOI: 10.1038/onc.2009.454.