



Title	肝芽腫におけるシスプラチン耐性に関わる新規バイオマーカーの探索 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	藤好, 直
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第14173号
Issue Date	2020-06-30
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/78904">http://hdl.handle.net/2115/78904</a>
Rights(URL)	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Sunao_Fujiyoshi_abstract.pdf (論文内容の要旨)



[Instructions for use](#)

## 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 藤好 直

### 学位論文題名

肝芽腫におけるシスプラチン耐性に関わる新規バイオマーカーの探索  
(Study on the novel biomarkers of CDDP-resistance in Hepatoblastoma)

【背景と目的】 肝芽腫(HB)は小児の3大固形腫瘍の一つであり、稀な疾患である。治療には化学療法を中心とした集学的治療を要する。HBはCisplatin(CDDP)を主体とした術前・術後化学療法が用いられている。化学療法感受性の症例は予後良好であるが、22.3%で術前化学療法に抵抗性があり、その予後は不良である。さらに、術前化学療法感受性の患者の24.2%で術後5年以内に再発を認め、従来の化学療法抵抗性症例に対する術後化学療法にCDDP主体のレジメンは不適當である。しかし、HBにおいてCDDP抵抗性の予測バイオマーカーは同定されておらず、術後化学療法決定の指標はない。HBには $\beta$ カテニン変異が高頻度に認められそのhallmarkとして知られているが、ゲノム変異は1症例当たり2.9変異程度と他癌腫に比べその頻度が非常に少なく、エピジェネティックな遺伝子制御が重要なメカニズムの一つと考えられる。当教室ではHBにおけるエピゲノム変異としてDNAメチル化と臨床病理学的因子との関連などを報告してきた。また、他癌腫において、DNAメチル化異常とCDDP抵抗性への関与が報告されている。HBにおいてもDNAメチル化異常がCDDP抵抗性に関与することが予想されるが、これまでにDNAメチル化異常とCDDP抵抗性に関連する研究はなされておらず、バイオマーカーが確立されていない。本研究では、HBにおいてDNAメチル化異常とCDDP抵抗性の関与を明らかにし、術後化学療法選択の指標になりうるCDDP抵抗性のバイオマーカーの同定と関連するin vitro解析を行った。

【対象と方法】 本研究は、日本小児肝癌スタディグループ(JPLT)の関連施設で2000年から2006年までに肝切除術を受けたHB患者43例を対象にした。対象患者の新鮮凍結検体より抽出されたDNAサンプルをJPLTより供与され、本研究に用いた。対象の43例(術前CDDP感受性群38症例、CDDP抵抗性群5症例)はいずれもJPLTで規定されたHB治療プロトコールに則って術前・術後化学療法を施行された。CDDP感受性群6例、CDDP抵抗性群5例を対象に網羅的DNAメチル化ビーズアレイ解析を行った。更にはHB細胞株であるHuH6を用いて、CDDPへの断続的、段階的な3か月間の暴露により抵抗性株(HuH6CR)を作成した。CDDPやgemcitabine、5-fluorouracil、pirarubicineを用いてHuH6CRと野生株(HuH6WT)の薬剤耐性を比較した。HuH6CRとHuH6WTよりRNAマイクロアレイを用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。メチル化ビーズアレイとマイクロアレイの結果より、CDDP抵抗性HBにおいて高メチル化、低発現している遺伝子を選定し、統計学的解析手法を用いてCDDP抵抗性に最も関連遺伝子として選定した。43症例検体を用いて、バイサルファイトパイロシークエンシング法によりCSF3Rのメチル化率を測定した。メチル化ビーズアレイの結果とパイロシークエンシングの結果が統計学的に相関することを確認し、術前

CDDP 感受性患者 38 例の検査結果より、高メチル化群と低メチル化群に群別化し、再発曲線を比較した。さらに、リアルタイム PCR 法、ウェスタンブロット法により、CDDP 暴露前後での HuH6WT と HuH6CR の CSF3R の発現状況を測定し、発現動態を評価した。

【結果】 メチル化ビーズアレイの結果により、CDDP 抵抗性患者において 15,102 プロンプ (4,637 遺伝子) が高メチル化しており、17%が Transcriptional Start Site、21%が CpG アイランドであった。教師なし階層的クラスター解析および PCA では、そのメチル化傾向により、患者群を Group1 と Group2 に群別化した。Group1 は Group2 に比較し、全生存率と無再発生存率はともに有意に悪かった。CDDP 感受性患者のメチル化傾向は類似し、そこから逸脱する症例は CDDP 抵抗性を持ち、悪性度が上昇する傾向がみられた。HuH6CR と HuH6WT の各抗癌剤に対する IC50 算出し、HuH6CR で CDDP に対し有意に抵抗性を認めた。他の抗癌剤への交叉耐性を認めなかった。マイクロアレイ解析より、HuH6CR で有意に発現低下したのは 119 遺伝子であった。これらのデータより、CDDP 抵抗性関連候補遺伝子として 5 遺伝子を選定し、その中から統計学的に最も CDDP 抵抗性と関連が強かった CSF3R を CDDP 抵抗性遺伝子として選定した。パイロシークエンシングのデータよりカットオフ値 54%を算出し、CSF3R 高メチル化群 (4 例)、低メチル化群 (34 例) に群別化した。高メチル化群、低メチル化群、CDDP 抵抗性群の再発曲線を比較し、1 年後の再発率はそれぞれ 75%、20%および 80%であり、高メチル化群は低メチル化群に比較し有意に高い再発を示した。高メチル化群と CDDP 抵抗性群は類似した再発曲線を呈した。また、mRNA、タンパクレベルともに、CDDP 処理後は HuH6WT に比し HuH6CR の CSF3R 発現が有意に上昇した。

【考察】 ゲノムワイドメチル化解析の結果より、CDDP 感受性患者のメチル化傾向は類似し、そのメチル化傾向から逸脱する症例は CDDP 抵抗性や悪性度の上昇傾向を示し、予後が有意に不良となった。HB が CDDP 抵抗性を獲得する過程でメチル化プロファイルが変化し得、CDDP 抵抗性獲得に DNA メチル化プロセスの関与が示唆された。また、術前 CDDP 感受性にも関わらず、CSF3R が高メチル化を示した術後化学療法 non-responder の再発曲線は、術前化学療法 non-responder の再発曲線と類似していた。これは、術後化学療法 non-responder の腫瘍が初期段階では CSF3R の低メチル化細胞優位に存在する不均一な集団であるが、術前化学療法後は CSF3R 高メチル化細胞が生存し優位となり、再発に寄与すると推察された。故に、CSF3R のメチル化状態は、CDDP 抵抗性のバイオマーカーとなり得、適切な術後化学療法を選択するための指標となり得ると考えられた。さらに、CDDP 非暴露下では CDDP 抵抗性細胞はエピジェネティックな制御によって、癌幹細胞マーカーの一つである CSF3R を発現低下しているが、CDDP 暴露下では発現上昇させて癌幹細胞形質を示し生存に寄与している可能性が考えられた。また、癌細胞が抗癌剤暴露下で、エピジェネティックな制御によってその遺伝子発現を動的に変動させうることを示唆された。

#### 【結論】

DNA メチル化プロファイル解析により、メチル化異常が CDDP 抵抗性獲得に関連すると考えられた。また、CSF3R の高メチル化は CDDP 抵抗性のバイオマーカーとなり得、術後化学療法での CDDP 使用の指標となり得る。さらに、CSF3R はエピジェネティックに制御されており、CDDP 環境下では発現上昇し CDDP 抵抗性に関与する可能性が示唆された。