



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
Author(s)	藤好, 直
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第14173号
Issue Date	2020-06-30
DOI	10.14943/doctoral.k14173
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/78905
Type	theses (doctoral)
File Information	Sunao_Fujiyoshi.pdf



[Instructions for use](#)

学 位 論 文

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)

2020年6月

北 海 道 大 学

藤 好 直

学 位 論 文

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)

2020年6月

北 海 道 大 学

藤 好 直

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語集	5 頁
緒言	6 頁
方法	8 頁
結果	15 頁
考察	26 頁
総括および結論	30 頁
謝辞	31 頁
利益相反	32 頁
引用文献	33 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究は以下の論文に発表した。

1. Fujiyoshi S, Honda S, Minato M, Ara M, Suzuki H, Hiyama E, Taketomi A
Hypermethylation of CSF3R is a novel cisplatin resistance marker and predictor of response to postoperative chemotherapy in hepatoblastoma
Hepatology Research. 2020 Jan 1. Doi: 10.1111/hepr.13479. [Epub ahead of print]

本研究は以下の学会に発表した。

1. 藤好 直、本多 昌平、湊 雅嗣、鈴木 拓、檜山 英三、武富 紹信
Investigation of aberrant hypermethylation of DNA in association with cisplatin-resistance in hepatoblastoma
第 28 回日本消化器癌発生学会, 2017. 11. 17-18, 熊本
2. 藤好 直、本多 昌平、湊 雅嗣、鈴木 拓、檜山 英三、武富 紹信
Evaluation of cisplatin-resistant associated genes in hepatoblastoma cell lines
第 77 回日本癌学会, 2018. 9. 27-29, 大阪
3. Fujiyoshi S, Honda S, Minato M, Ara M, Suzuki H, Hiyama E, Taketomi A
Investigation of aberrant DNA methylation in association with cisplatin-resistant hepatoblastoma
ASCO GI, 2019. 1. 17-19, San Francisco

要旨

【背景と目的】

肝芽腫は小児の3大固形腫瘍の一つであり、稀な疾患である。肝芽腫に対してはほとんどの症例でCDDPを主体とした術前・術後化学療法が施行されており、化学療法感受性が治療効果を左右すると言っても過言ではない。化学療法感受性のある症例は予後良好であるが、22.％を超える症例で術前化学療法に耐性が認められ、これらの症例の予後は不良とされている。さらに、術前化学療法に感受性のある患者においても24.2％で術後5年以内に再発を認め、CDDP主体の術後化学療法に耐性を示すと考えられる。すなわち、術後化学療法におけるCDDPへの感受性が予後に影響することから、術前化学療法においてCDDPに対する感受性がある症例に対しても、術後化学療法におけるCDDPの感受性を予測できることが望まれる。しかし、肝芽腫におけるCDDP耐性の予測バイオマーカーは確立されておらず、術後化学療法決定の指標となりうるものが存在しない。

肝芽腫の分子生物学的解析により、高頻度に β カテニン変異が認められその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低く、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。当教室では肝芽腫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。他癌腫において、DNAメチル化異常とCDDP耐性への関与が報告されており、肝芽腫においてDNAメチル化異常がCDDP耐性に関与することが予想される。しかし、これまでにDNAメチル化異常とCDDP耐性に関連する研究はなされておらず、バイオマーカーは確立されていない。本研究では、肝芽腫においてDNAメチル化異常とCDDP耐性の関与を明らかにし、DNAメチル化に着目したCDDP耐性のバイオマーカー、特に術後化学療法選択のためのバイオマーカーになりうる遺伝子の同定と関連するin vitro解析を行った。

【対象と方法】

本研究ではまずCDDP耐性遺伝子の選出を行った。日本小児肝癌スタディグループ（Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor; JPLT）より供与された、肝芽腫患者の新鮮凍結検体から抽出されたDNAサンプルを用い、CDDP感受性群6例、CDDP耐性群5例のDNAに対し網羅的DNAメチル化ビーズアレイ解析を行い、メチル化傾向とCDDP耐性の関連を確認したのち、CDDP耐性群で高メチル化している遺伝子を選定した。次に肝芽腫細胞株であるHuH6を用いて、CDDP耐性株（HuH6CR）を作成した。CDDPやgemcitabine、5-fluorouracil、pirarubicineを用いて、MTSアッセイにて耐性株と野生株（HuH6WT）の薬剤耐性を比較し、CDDP耐性を確認した。その後にHuH6CRとHuH6WTよりRNAを抽出し、マイクロア

レイを用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、HuH6CR で発現低下している遺伝子を選定した。メチル化ビーズアレイとマイクロアレイの結果より、CDDP 耐性肝芽腫において高メチル化、低発現している遺伝子を選定し、さらに統計学的解析手法を用いて、CDDP 耐性に最も関連の強い遺伝子を選定した。続いて、術前 CDDP 治療に感受性のあった肝芽腫患者 38 症例に対し、バイサルファイトパイロシークエンシング法を用いて、先に選出した CDDP 耐性遺伝子のメチル化率を測定し、ROC 解析や再発解析で決定したカットオフ値を用いて、患者を高メチル化群、低メチル化群に群別化した。高メチル化群、低メチル化群、術前 CDDP 耐性群で再発曲線、生存曲線を比較し CDDP 耐性遺伝子のメチル化率と再発や予後との関連を解析した。最後に、選出した CDDP 耐性遺伝子の CDDP 処理前後での発現変化を評価した。CDDP 暴露前後で HuH6WT と HuH6CR から RNA やタンパクを抽出し、real-time quantitative PCR 法、ウェスタンブロットティング法により CDDP 耐性遺伝子の RNA やタンパク発現を測定し、その発現動態を評価した。P 値は 0.05 未満を有意とした。

【結果】

メチル化ビーズアレイの結果を用いて教師なし階層的クラスタ解析および主成分分析を行い、CDDP 感受性患者では類似したメチル化傾向を認め、そこから逸脱するに従い CDDP 耐性を獲得し、悪性度が上昇する傾向を認めた。また、そのメチル化傾向により患者群を Group1 と Group2 に群別化し生存率を比較したところ、Group1 は Group2 に比較し全生存率と無再発生存率ともに有意に低下していた。また、CDDP 耐性患者において 15,102 プローブ (4,637 遺伝子) が高メチル化しており、候補遺伝子として選出した。次に、HuH6CR と HuH6WT の CDDP 耐性を IC50 算出により比較し、HuH6CR で有意に高値であることを確認した ($20.8 \pm 4.0 \mu\text{g/ml}$ vs $9.9 \pm 3.3 \mu\text{g/ml}$)。また、他の抗癌剤 (pirarubicine、Gemcitabine、5-fluorouracil) に対する交叉耐性を認めなかった。HuH6WT と HuH6CR を用い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。これらのアレイデータを用いて、CDDP 耐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 CDDP 耐性と最も関連が強かった *CSF3R* を CDDP 耐性遺伝子として選定した。続いて術前 CDDP 感受性患者に対するパイロシークエンシングのデータより ROC 解析、再発解析を行い、*CSF3R* のメチル化のカットオフ値を 54% と設定した。これを用い、患者を *CSF3R* 高メチル化群 (4 例)、低メチル化群 (34 例) に群別化し、CDDP 耐性群 (5 例) と再発曲線を比較したところ、1 年後の再発率は、高メチル化群、低メチル化群、CDDP 耐性群でそれぞれ 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率を示した。また高メチル化群と CDDP 耐性群は類似した再発曲線を呈した。さらに、細胞株を用いた CDDP 処理前後での *CSF3R* の発現変動は、mRNA レベル、タンパ

クレベルともに、CDDP 処理前では HuH6WT に比較し HuH6CR で *CSF3R* の発現が減少していたのに対し、CDDP 処理した後は、HuH6WT に比較し HuH6CR の *CSF3R* 発現が有意に上昇した。

【考察】

本研究において、CDDP 耐性に着目してビーズアレイによるゲノムワイドなメチル化解析を行ったところ、CDDP 感受性患者メチル化傾向は類似しており、その集団から逸脱するにしたがって、CDDP への耐性傾向や悪性度上昇を示し、予後が有意に不良となった。このことから肝芽腫の CDDP 耐性を獲得する過程でメチル化プロファイルが変化し得ることが示唆され、CDDP 耐性獲得に DNA メチル化プロセスの関与が示唆された。CDDP 耐性サブタイプにおいて、メチル化変動を示す一連の遺伝子のパスウェイなどを解析することで、CDDP 耐性の機序解明の一助になる可能性も考えられた。また、術前 CDDP 感受性であるにもかかわらず、*CSF3R* が高メチル化を示した群は、術前化学療法耐性群と類似した再発曲線を示した。これは、術後化学療法耐性患者の腫瘍が、初期の段階では *CSF3R* の低メチル化細胞が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* 高メチル化細胞が優位となり、再発に寄与すると推察された。それゆえ、*CSF3R* のメチル化状態は、CDDP 耐性のバイオマーカーとなり得、適切な術後化学療法レジメンを選択するための指標となり得ると考えられた。

CSF3R は神経堤由来腫瘍の癌幹細胞のマーカーであるとされており、治療耐性や再発、転移、予後不良に関連すると考えられている。本研究の結果より、定常状態では CDDP 耐性細胞はエピジェネティックな制御によって *CSF3R* を発現低下しているが、CDDP 暴露のようなストレス環境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が示唆された。

【結論】

DNA メチル化プロファイルの解析により、メチル化異常が CDDP 耐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 耐性のバイオマーカーとなり得、術後化学療法としての 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 耐性に関与する可能性が示唆された。

略語集

APBSCT, Autologous peripheral blood stem cell transplantation
APBTL, Autologous peripheral blood cell transplantation
CDDP, Cisplatin
CR, Complete response
CSF3R, Colony stimulating factor 3 receptor
EFS, Event free survival
FFPE, Formalin fixed paraffin embedded
FMNL3, Formin like 3
GAPDH, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GPR180, G protein-coupled receptor 180
IGF2, Insulin-like growth factor 2
JCRB, Japanese cancer research resource bank
JPLT, Japanese study group for pediatric liver tumor
MST1R, Macrophage stimulating 1 receptor
NC, No change
OAF, Out at first homolog
OCIAD2, Ovarian carcinoma immunoreactive antigen-like protein 2
OS, Overall survival
PARP6, Poly[ADP-ribose] polymerase family member 6
PCA, Principal component analysis
PCR, Polymerase chain reaction
PD, Progressive disease
PLAGL1, PLAG1 like zinc finger 1
PR, Partial response
PRETEXT, Pre-treatment extent of tumor
qPCR, real-time quantitative PCR
RASSF1A, Ras association domain family 1 isoform A
RECIST, Response evaluation criteria in solid tumors
ROC, Receiver operating characteristic
TRAF5, TNF receptor associated factor 5
TSS, Transcriptional start site

緒言

肝芽腫は小児における肝腫瘍で最も多く、小児悪性腫瘍の 1%程度を占めると言われており (Litten et al., 2008; Finegold et al., 2008)、わが国では 100 万出生に 1 人程度の罹患率と言われている。その治療には化学療法や手術、肝移植、化学塞栓術、分子標的薬などの集学的治療を要する (von chweinitz et al., 2012)。肝芽腫はシスプラチン (Cisplatin, CDDP) に対する反応性が良好な腫瘍であり、早期の切除可能症例を除くほとんどの症例で、CDDP を主体とした術前・術後化学療法が国内外で用いられている。化学療法感受性のある症例が多く、3 年生存率 70%程度と比較的予後が良いとされている (Hiyama et al., 2015)。しかし、肝芽腫患者の 22.3%で術前化学療法に耐性があり、予後は不良であるとされている (Hiyama et al., 2016)。さらに、CDDP をベースとした術前化学療法に感受性のある患者の 24.2%で、術後 5 年以内に再発を認めている (Hiyama et al., 2016)。この理由として、術前化学療法に感受性があると診断された腫瘍にも耐性のある subpopulation が存在し、これらの細胞の残存が術後再発に関与すると考えられる。このようなケースでは、術後化学療法には CDDP を主体としたレジメンは不相当であると考えられる。このため、術前化学療法への反応性に関わらず、肝芽腫切除検体より検出可能な CDDP 耐性バイオマーカーの同定は、術後化学療法決定における良い指標となり得、また予後を改善させ得る因子と考えられる。しかし、肝芽腫において CDDP 耐性に関連する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となりうるものが存在しないのが現状である。

肝芽腫において、 β カテニン変異に代表される Wnt pathway の異常 (Koch et al., 1999; Sharada et al., 2014) や Ubiquitin pathway の異常 (Jia et al., 2014) が高頻度に認められるが、近年の全エクソームシーケンス解析により、肝芽腫ではゲノム変異は 1 症例当たり 2.9 変異程度とその頻度が非常に低いことが報告されている (Buendia et al., 2014)。肝芽腫において、胎児肝の発生過程におけるエピジェネティックな遺伝子制御は、肝細胞から肝芽腫へ発癌および進展するための重要なメカニズムの一つである (Sumazin et al., 2017)。細胞の遺伝子発現制御方法の一つとして、その遺伝子配列に変化を伴わず後天的な修飾による遺伝子発現の制御を行う、エピジェネティックな遺伝子制御がある。その機構の一つに DNA メチル化が挙げられる。多くの真核生物ではゲノム中の CpG ジヌクレオチドのシトシン 5 位炭素原子にメチル基が付加される。CpG の 60-90%でメチル化を受けるが、多くの遺伝子 promoter 領域の CG rich な領域 (CpG island) では、通常メチル化を受けない。正常細胞では、CpG island のほとんどが非メチル化状態に、繰り返し配列では高メチル化状態に保たれている。一方、がん組織では、一部の CpG island がメチル化され、繰り返し配

列では低メチル化状態になるという異常がみられる。特に、**promoter** 領域の **CpG island** での高メチル化は、転写因子の結合阻害や転写不活性なヘテロクロマチン形成により遺伝子発現を抑制させる。このように、**promoter** 領域のメチル化異常による遺伝子発現制御と発癌や悪性度の関連は、肝細胞癌をはじめとした様々な癌種で以前より報告されてきた (Zhang et al., 2019; Liu et al., 2018; Pan et al., 2018)。最近では、ゲノムワイドなメチル化状態の解析が可能になり、**promoter** 以外の様々な領域における、様々なメチル化異常が癌の悪性度に関与すると注目されてきている (Yang et al., 2014; Sarda et al., 2017)。肝細胞癌において、エピジェネティックな異常が様々な遺伝子の発現異常に関わると報告されており (Nakamura et al., 2019)、肝芽腫においてもゲノムワイドなメチル化異常が研究・報告されてきている (Cui et al., 2016; Maschietto et al., 2016)。当教室では以前より、肝芽腫の発生・進展に DNA メチル化が重要な役割を担っていると考え、臨床病理学的因子とのかかわりについて研究を進めてきた。肝芽腫における、がん抑制遺伝子である **RASSF1A** (Ras association domain family 1 isoform A) の高メチル化が独立した予後予測因子となること (Honda et al., 2008)、**IGF2/H19** インプリンティング領域の異常メチル化 (Honda et al., 2008)、**RASSF1A** メチル化と組織型との関連 (Honda et al., 2013) を証明した。さらに、肝芽腫の **FFPE** (Formalin fixed paraffin embedded) 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 例のパイロシークエンシング解析を行い、4 つの新規がん抑制遺伝子 (**OCLAD2** [Ovarian carcinoma immunoreactive antigen-like protein 2], **GPR180** [G protein-coupled receptor 180], **PARP6** [Poly(ADP-Ribose) Polymerase Family Member 6], **MST1R** [Macrophage Stimulating 1 Receptor]) を同定し、その高メチル化が予後不良因子となることを報告した (Honda S, et al., 2016)。また、食道癌や肺癌、胃癌、大腸癌など他癌腫において、DNA メチル化異常と **CDDP** など化学療法耐性への関与が報告されてきた (Cao et al., 2017; Cortes-Sempere et al., 2013; Maeda et al., 2014; Nogales et al., 2016; He et al., 2017)。これらのことから、肝芽腫において DNA メチル化異常が **CDDP** 耐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** 耐性に関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のが現状である。切除検体より **CDDP** 耐性に関わる DNA メチル化異常のバイオマーカーが確立できれば、術後化学療法のレジメン決定の指標となり得、テーラーメイド治療による予後向上につながると考えられる。そこで本研究では、肝芽腫において DNA メチル化異常と **CDDP** 耐性の関与を明らかにし、DNA メチル化に着目した **CDDP** 耐性のバイオマーカー、特に術後化学療法選択のためのバイオマーカーになりうる遺伝子の同定と、再発や予後解析を行った。

方法

1. 対象

本研究は、当教室を含む日本小児肝癌スタディグループ（Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor; JPLT）の関連施設で2000年から2006年までに肝切除術を受けた肝芽腫患者43例を対象にした。JPLTは小児固形がん臨床試験共同機構が主体として行なっている「小児固形腫瘍観察研究」に含まれており、登録情報および中央診断に送付された検体の余剰分の新鮮凍結検体から抽出されたDNAサンプルが研究グループへ提供された。小児固形腫瘍観察研究の一次登録は国立成育医療研究センター小児がん登録室内のデータベースセンターで行い、JPLT事務局（広島大学 自然科学研究支援開発センター）が検体を保存した。当教室はスタディグループに参加しており、対象患者より抽出されたDNAサンプルをJPLTより供与され、これを本研究に用いた。本学自主臨床研究（自010-0202）「DNAメチル化解析による進行肝芽腫予後予測分子マーカーの確立」においてJPLTからの検体供与につき承認を受けた。対象の43例はいずれもJPLTで規定された肝芽腫治療プロトコール（JPLT-2スタディ）に則り術前・術後化学療法を施行された。JPLT-2スタディのプロトコールは下記図1に記載した。化学療法への感受性の効果判定は、固形がんの治療効果判定のための新ガイドライン（Response Evaluation Criteria in Solid Tumors; RECIST）に則って行った。患者は化学療法への反応性により以下の2群に群別化した。術前化学療法に対する治療効果がRECISTで完全奏功（complete response; CR）または部分奏効（partial response; PR）の患者を化学療法感受性群（CDDP感受性群）、安定（no change; NC）または進行（progressive disease; PD）の患者を化学療法耐性群（CDDP耐性群）とした。対象患者のうち、CDDP感受性群は38症例、CDDP耐性群は5症例であった。患者の術前病期分類は下記図2のPRETEXT分類（Pre-Treatment Extent of Tumor）を用いて行った。本実験のプロトコールは北海道大学病院倫理委員会（北海道大学病院 自主臨床研究審査委員会（自010-0202））により承認を得て行われた。また、各施設の倫理委員会の承認を得て行われ、すべての患者は担当医より研究参加の同意を得られた。

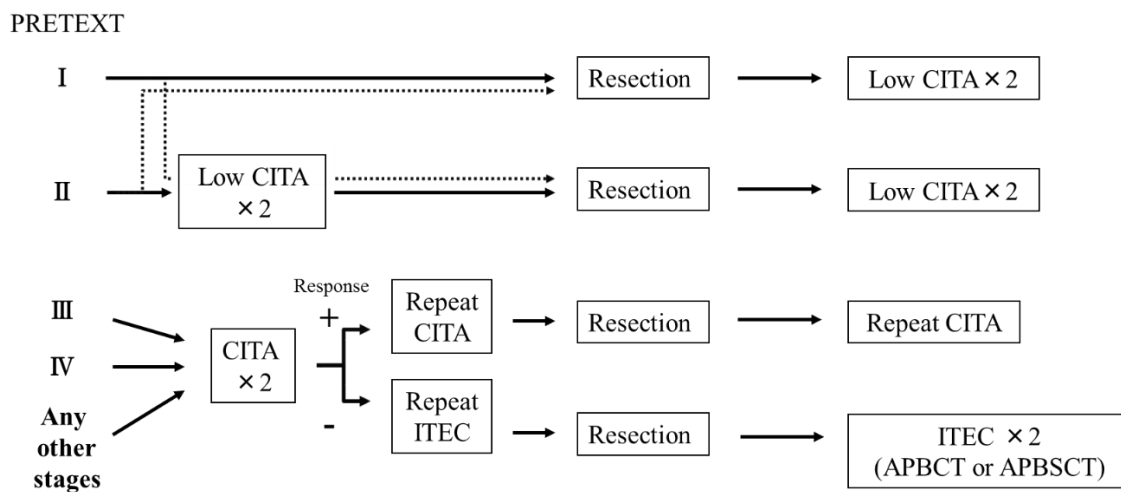
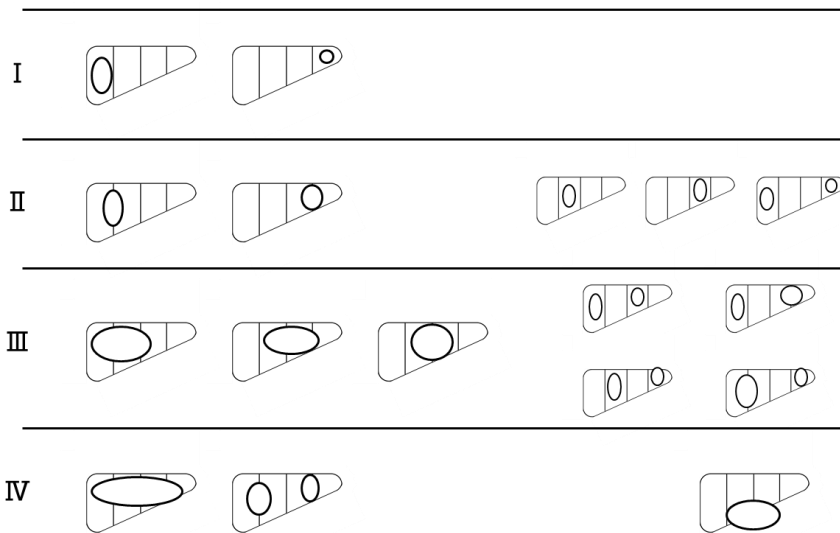


図1 JPLT-2 治療プロトコール (Hiyama et al., 2015)

PRETEXT I の一部の症例を除いた多くの症例で、シスプラチンをベースとした術前化学療法を施行する。III期以上の症例では化学療法の効果判定を行い、シスプラチンに反応性の乏しい症例はカルボプラチンベースの化学療法に変更する。切除可能症例では、術後も化学療法を施行する。

PRETEXT: Pre-Treatment Extent of Tumor, Low CITA: cisplatin 40 mg/m²/day (day 1) and THP-adriamycin 30 mg/m²/day (day 2) , CITA: cisplatin 80 mg/m²/day (day 1) and THP-adriamycin 30 mg/m²/day ×2 (day 2 and 3) , ITEC: ifosfamide 3.0 g/m²/day ×2 (day 1 and 2) , carboplatin 400 mg/m²/day (day 3) , THP-adriamycin 30 mg/m²/day ×2 (day 4 and 5) , and etoposide 100 mg/m²/day ×5 (day 1~5) . APBTL: autologous peripheral blood cell transplantation, APBSCT: autologous peripheral blood stem cell transplantation.



病期	手術前の状態 (VPCEM は転移部位)
I	腫瘍は1つの肝区域のみ、他の隣接する3区域は腫瘍の浸潤はない
II	腫瘍は2つの肝区域にあるが、他の隣接する2区域は腫瘍の浸潤はない
III	腫瘍は2つ以上の隣接しない肝区域にある、または隣接する3つの肝区域にある
IV	腫瘍は4つの区域にある、または肝門部にあり切除不能なもの
V	大静脈または3つの肝静脈すべて
P	主門脈または門脈分岐部
C	尾状葉
E	肝外の隣接部
M	遠隔転移

図2 PRETEXT分類

病期は腫瘍の占拠部位で分類され、存在区域が多いほど病期は進行する。

2. 網羅的DNAメチル化解析

まず、CDDP感受性患者38例のうち、CDDP耐性患者と比較し臨床データにおいてPRETEXT進行度や転移の有無などで偏りのないように留意し6例をピックアップした。CDDP感受性群6例、CDDP耐性群5例より抽出したDNAを用い、DNAメチル化ビーズアレイ解析を行った。DNAはDNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Valencia, California, USA)を用いて抽出した。これらのサンプルを、Infinium Human Methylation450 BeadChip array (Illumina, California, USA)を用いてメチル化ビーズアレイ解析を行った。生データはR言語を用いてバックグラウンド補正、

カラーバイアス補正を行い、解析に用いた。まず、得られたデータで教師なしの階層的クラスター解析、主成分分析 (Principal Component Analysis; PCA) を行った。これらの分析より 2 群間に群別化し、生存を評価した。また、得られた 2 群間の β 値の補正データを Mann-Whitney U 検定を用いて検定を行い、 P 値 <0.05 を有意差ありとし、その中で CDDP 耐性群において平均 β 値が CDDP 感受性群の平均 β 値の 0.15 以上高いものを、CDDP 耐性群で有意に高メチル化しているプローブとしてピックアップした。そのプローブのコード遺伝子を CDDP 耐性関連候補遺伝子として選定した。

3. 肝芽腫細胞株の維持と CDDP 耐性株の樹立

ヒト肝芽腫細胞株である HuH6 を用いて CDDP 耐性株を作成した。HuH6 は JCRB (Japanese Cancer Research Resource Bank) 細胞バンクより供給された。維持には培養液として 10% (v/v) の fetal bovine serum (Equitech-Bio Inc., TX, USA) と 1% (v/v) の penicillin/streptomycin (Gibco, New York, USA) を添加した Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan) を使用し、5% CO₂ 濃度で 37°C の環境下の培養器で維持した。

CDDP 耐性の HuH6 (HuH6CR) を樹立するため、断続的、段階的に濃度を上昇させた CDDP (Wako Pure Chemicals Industries, Osaka, Japan) に暴露させた。0.01 μ g/ml から 2 μ g/ml まで段階的に暴露濃度を上昇させ、細胞の死滅を防ぐため、24 時間程度のシスプラチン暴露ののちに通常の維持培養や 2 継代程度の継代を行い、sub-confluent な状態で再度シスプラチンに暴露し、約 3 か月かけて耐性株を作成した。

4. 細胞生存アッセイ

HuH6 の野生株 (HuH6WT) と樹立した HuH6CR を 10,000 cells/well で 96-ウェルプレートに播種し一晩培養したのち、0-50 μ g/ml の各濃度の CDDP に 48 時間暴露させた。その後、CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega Corporation, Wisconsin, USA) を用いて細胞生存アッセイを行った。CDDP に暴露されていない細胞の吸光度を 100% として、それぞれの CDDP 濃度下での細胞の吸光度の比を百分率で算出した。そのデータより生存曲線を作成し、また IC₅₀ を算出し、HuH6WT と HuH6CR を比較した。

また、他の抗癌剤への交叉耐性を確認するため、上記と同様の方法で gemcitabine (Eli Lilly and company, Indiana, USA)、5-fluorouracil (Wako)、pirarubicin (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) についても生存曲線を作成し、HuH6WT と HuH6CR を比較した。暴露濃度はそれぞれ 0-1,000 μ M、0-1,000 μ g/ml、0-100 μ M の各濃度で行った。実験はすべて triplicate で行い、Mann-Whitney U 検定で $p<0.05$ をもって有意差ありとした。

5. RNA抽出とHuH6における遺伝子発現解析

Total RNA を HuH6WT と HuH6CR より抽出し、マイクロアレイを用いて遺伝子発現解析を行った。まず、各細胞株より QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen) と RNase-Free DNase Set (Qiagen) を用いて Total RNA を抽出した。そして、Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification kit (Agilent Technologies, California, USA) を用いて、サンプルの増幅とラベリングを行った。Cy3 でラベリングされたサンプルをハイブリダイズしたのち、4×44K Whole Human Genome Oligo Microarray (Agilent Technologies) を用いてマイクロアレイ解析を行った。スキャンは Agilent G 2565BA microarray scanner (Agilent Technologies) を用いて行い、生データは Transcriptome Analysis Console software (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) を用いて正規化を行った。解析はそれぞれ 2 サンプルを用いて行った。このデータを用いて、HuH6CR において HuH6WT と比較し発現レベルが 1/2 以下かつ ANOVAP 値<0.05 の遺伝子を有意な発現低下遺伝子として選定した。

6. 候補遺伝子の選定

上記の方法により選定した遺伝子のうち、CDDP 耐性群で高メチル化し、かつ CDDP 耐性株で低発現していた遺伝子を CDDP 耐性関連候補遺伝子として選定した。また、その中で高メチル化している部位が転写開始点 (transcriptional start site; TSS) 付近にある遺伝子を候補遺伝子として選定した。ここで選定した候補遺伝子のうち、重回帰分析を行い、相関係数が最も高く、変数選択で選択された遺伝子を、CDDP 耐性遺伝子として選定した。

7. バイサルファイトパイロシークエンシング

肝芽腫サンプルにおける CDDP 耐性関連候補遺伝子のメチル化率を測定するため、バイサルファイトパイロシークエンシングを行った。Polymerase chain reaction (PCR) のプライマーとシークエンスプライマーは下記表 1 に示した。肝芽腫 DNA サンプルを、EpiTect bisulfite kit (Qiagen) を用いてバイサルファイト処理したのち、PyroMark Q24 MDx system (Qiagen) and PyroMark Q24 MDx software (Qiagen) を用いてパイロシークエンシングを施行した。隣接する複数個所の CpG サイトのメチル化率を測定し、平均値を算出した。

まず、前述した CDDP 耐性関連候補遺伝子に関して、メチル化ビーズアレイを施行した同症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、メチル化ビーズアレイのデータと重回帰分析、分散分析を行い相互の関連を評価した。続いて、CDDP 耐性遺伝子に関して、術前化学療法感受性患者 38 例の検体を用いて、バイサルファ

イトパイロシークエンシングを施行した。ROC 解析と再発解析を行い、高メチル化と低メチル化のカットオフ値を決定したのち、CDDP 耐性遺伝子の高メチル化群、低メチル化群に群別化し、術前化学療法抵抗性群を追加した 3 群間での再発、生存率の比較を行った。

表 1 パイロシークエンシングに用いたプライマー

	PCR primer F	PCR primer R	Sequencing primer
<i>CSF3R</i>	AAAAGAGAGAGTAATAGGAAGAGTGAT	ATCTCTCRATATCTCTCTAACCTCAAT	GGAAGAGTGATAGAGTG
<i>FMNL3</i>	AGGYGGYGGGTGTGAGTAAGAGT	AAAACRCCRAAAATCCCTAAAATCCC	GTTTTYGTYYGTTTTGTTT
<i>OAF</i>	GGTGGGATTGAATGAAAAGTGTAATAAT	TAAATAACRCTCAACAAAACRCCCCC	AAAGTGTAATAATAGGTT
<i>PLAGL1</i>	GTTYGGAGTTYGTGGTTTATTGGGTT	ACTAAAATCRAAAAAAATCRCCCCRC	TGGTTTATTGGGTTAGTTT
<i>TRAF5</i>	TTTGAYGGAAGAGTAAGA	AAGTAAGGTTTTGAGTAAATGGGTTAAT	TCTACAAATCCAATCATCTAATTTCCC

8. qPCR

CDDP で 10 μ g/ml の濃度で 24 時間処理した HuH6WT と HuH6CR の細胞と、CDDP 未処理の細胞を回収し、RNeasy MiniKit (Qiagen) を用いて total RNA を抽出した。そのうち 1 μ g を ReverTra Ace (Toyobo., Osaka, Japan) を用いて逆転写し cDNA を作成した。この cDNA を用いて TB Green Premix Ex Taq II (Takara) でリアルタイム PCR (real-time quantitative PCR; qPCR) を施行した。シークエンスに使用したプライマーは下記表 2 に示した。コントロールには β -アクチン (*ACTB*) を用いた。実験は全て triplicate で行い、データは $\Delta\Delta$ Ct 法で解析した。各細胞における *CSF3R* の発現を、CDDP 未処理の HuH6WT を 1 として比較した。

表 2 qPCR に用いたプライマー

	qPCR primer F	qPCR primer R
<i>ACTB</i>	CTGGAACGGTGAAGGTGACA	AAGGGACTTCCTGTAACAATGCA
<i>CSF3R</i>	CACTCCGAGACCTTCTCAG	CCCCACTCAATCACATAGCC

9. ウェスタンブロッティング

上記と同様の手法で CDDP 処理を施した前後の HuH6WT と HuH6CR の細胞を回収し、ウェスタンブロッティング法によりタンパクの検出を行った。プロテアーゼ阻害剤を添加した NP40 バッファーベースの溶解バッファーで回収細胞を溶解し、回収した 40 μ g のタンパクを 6 \times SB 液で希釈し 5 分加熱。Mini-PROTEAN TGX gel (BIO-RAD, California, USA) で電気泳動したのち、Poly Vinylidene Di-Fluoride

(PVDF) メンブレンに転写した。ブロッキングには 3%BSA と 2%スキムミルクを使用した。一次抗体には *CSF3R* antibody (1:500; PA5-28988; Thermo Fisher Scientific) と *GAPDH* antibody (1:5000; #5174; CST) を用い、二次抗体には Anti-rabbit polyclonal antibody (1:6000; #7074; CST) を用いた。抗体を付けた各メンブレンを ChemiDoc XRS+ system (BIO-RAD) でビジュアル化し、Image Lab Software (BIO-RAD) を用いてバンドシグナルの定量化を行った。コントロールとして *GAPDH* (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) を使用した。このデータを用いて、各細胞での *CSF3R* のタンパク発現を比較した。

10. 統計学的解析

メチル化率の比較は Student の t-検定を用いて行った。臨床データの比較は Fisher の正確確率検定を用いて行った。臨床検体における *CSF3R* の高メチル化と低メチル化の threshold を決めるために、Receiver Operating Characteristic (ROC) 解析と再発解析を行った。再発曲線は Kaplan–Meier 法で作成し、Log-rank 検定を用いて比較した。再発までの期間は診断から再発、または最終フォローアップまでの期間と定義した。mRNA の発現レベルの比較は、Student の t-検定を用いて行った。

統計学的解析およびグラフィック作成は R software version 3.4.0 (www.r-project.org)、Bell Curve for Excel version 2.00 (Social Survey Research Information Co., Ltd., Tokyo, Japan) および Qlucore Omics Explorer (Qlucore, Scania, Sweden) を用いて行った。P 値は 0.05 未満を有意とした。

結果

1. 肝芽腫患者における CDDP 耐性に関わるメチル化傾向と CDDP 耐性候補遺伝子の高メチル化

CDDP 感受性群 6 例と CDDP 耐性群 5 例の患者検体を用いて、DNA メチル化ビーズアレイ解析を行った。これらの患者の臨床データは表 3 に示す。

表 3 CDDP 感受性群 6 例と耐性群 5 例の臨床データ

Characteristics		11 cases		P value†
		Sensitive n=6	Resistant n=5	
Sex	Male	5	3	0.546
	Female	1	2	
Age at diagnosis	≤ 365 days	1	1	1.000
	> 365 days	5	4	
PRETEXT	I	0	0	0.113
	II	0	1	
	III	1	3	
	IV	5	1	
Metastasis	No	5	3	0.546
	Yes	1	2	
Rupture	No	5	5	1.000
	Yes	1	0	
Extrahepatic disease	No	6	5	1.000
	Yes	0	0	
Portal vein invasion	No	6	5	1.000
	Yes	0	0	
Hepatic vein invasion	No	5	5	1.000
	Yes	1	0	
Histological type	Fetal	1	3	0.242
	Embryonal	5	2	
Outcome	Alive	6	2	0.0606
	Dead	0	3	
Chemo response	CR	1	0	0.00649
	PR	5	0	
	NC	0	4	
	PD	0	1	

† Fisher's exact test. PRETEXT, Pretreatment Extent of Disease; CR, complete response; PR, partial response; NC, no change; PD, progressive disease

すべての患者は JPLT-2 のプロトコールに従い、術前化学療法を施行されていた。

CDDP への治療反応性以外は、2 群間に有意差は認めなかった。まず DNA メチル化ビーズアレイデータを用いて、教師なし階層的クラスター解析および PCA を行った (図 3-1)。CDDP 感受性患者のメチル化傾向は類似していたが、そこから逸脱するに従い CDDP 耐性を獲得し、悪性度が上昇する傾向がみられた。また、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 (Overall Survival; OS) と無再発生存率 (Event Free Survival; EFS) はともに有意に低下していた (図 3-2)。これらのことから、肝芽腫の悪性度上昇や CDDP 耐性に伴い、DNA メチル化プロファイルが変化していることが示唆された。次に β 値を 2 群間比較し、CDDP 感受性患者において 28556 プローブ(6775 遺伝子) が有意に高メチル化しており、CDDP 耐性患者において 15102 プローブ(4637 遺伝子) が有意に高メチル化していた。これらの CDDP 耐性患者および感受性患者における高メチル化プローブの中で、おのおの 17%と 16%が TSS であり、21%と 5%が CpG アイランドであった。

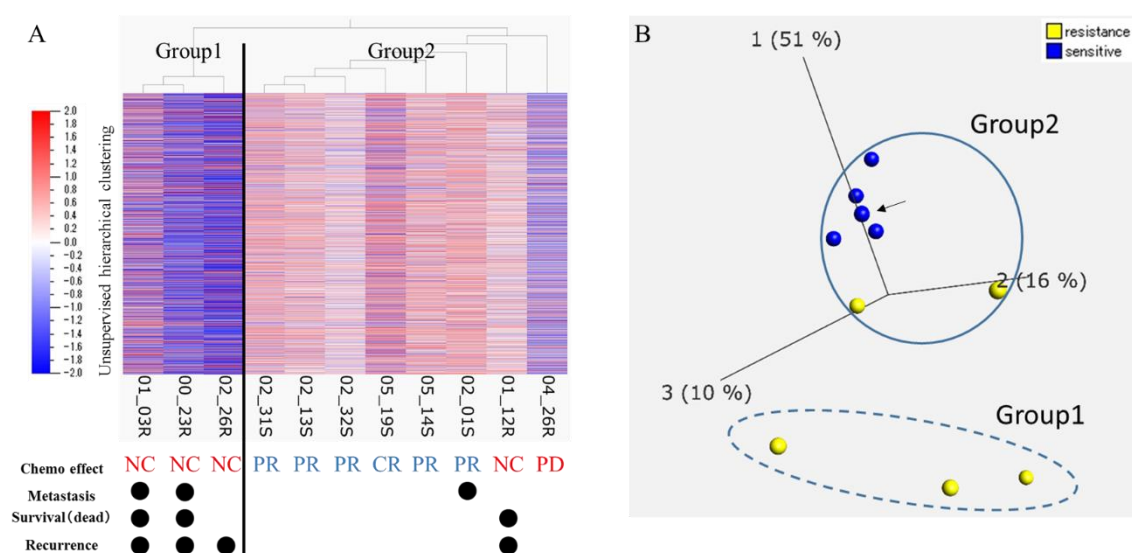


図 3-1 マイクロアレイデータによる網羅的 DNA メチル化解析

(解析条件 : variance 0.55, projection score 0.34 by Qlucore Omics Explorer)

A : Unsupervised hierarchical clustering analysis。メチル化傾向より Group1 と Group2 に群別化した。Group1 は全て耐性群であり、転移・再発率が多かった。

B : Principal component analysis。CDDP 感受性群は類似したメチル化傾向を示し、CDDP 耐性群はそこからの逸脱したメチル化傾向を示した。(矢印 : ドットの重なりがあり、実際には 2 ドット存在。)

NC: no change, PD: Passive disease, PR: partial response, CR: complete

response

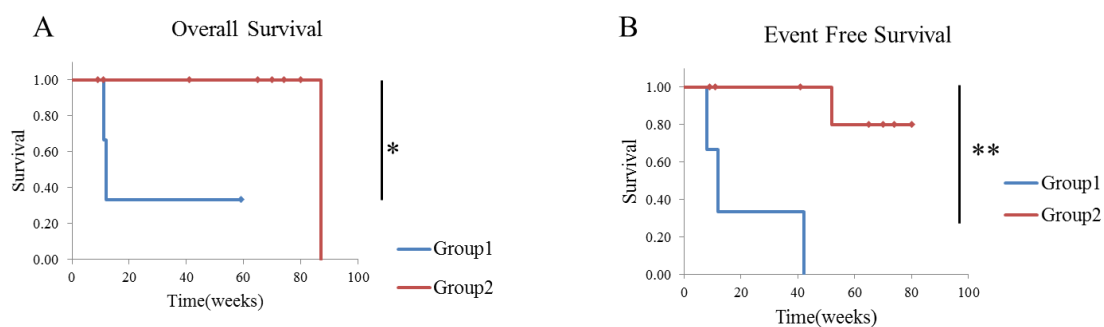


図 3-2 Group1 と Group2 における Overall survival (OS)、Event free survival (EFS) の比較

A : Overall survival curve. Group2 は Group1 と比較し有意に予後良好であった。

B : Event free survival curve. Group2 は Group1 と比較し有意に予後良好であった。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

2. CDDP 耐性 HuH6 の樹立

HuH6WT と、上記方法で作成した HuH6CR の CDDP 耐性を、上記方法で施行した MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) アッセイにより比較した。生存曲線では (図 4-1A)、HuH6CR がより高い CDDP 耐性を持つ傾向であり、算出した IC₅₀ は HuH6CR (20.8 ± 4.0 µg/ml) は HuH6WT (9.9 ± 3.3 µg/ml) と比較し、有意に高かった (図 4-1B)。

さらに、同様の方法により gemcitabine、5-fluorouracil、pirarubicin に対する交叉耐性を評価した。生存曲線において、HuH6CR の他の抗癌剤への明らかな交叉耐性は認めず、pirarubicin への IC₅₀ は HuH6CR (1.11 ± 0.63 µM) と HuH6WT (1.38 ± 0.49 µM) で有意差を認めなかった (図 4-2)。

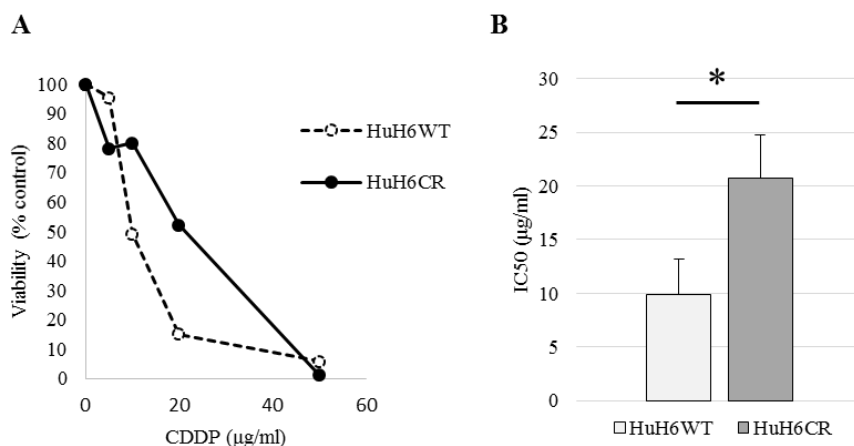


図 4-1 生存アッセイにおける HuH6WT (HuH6 野生株) と HuH6CR (HuH6 CDDP 耐性株) の CDDP 耐性の比較

A : Viability curve. HuH6CR は HuH6WT と比較し、CDDP 耐性が強い傾向にあった。

B : Comparison of IC50. IC50 の比較において、HuH6CR は HuH6WT に比し有意に CDDP 耐性が高かった。

* $p < 0.05$

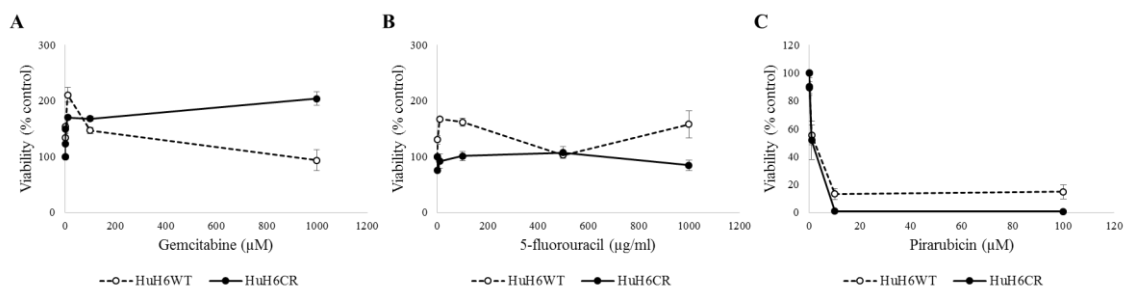


図 4-2 生存アッセイにおける HuH6WT (HuH6 野生株) と HuH6CR (HuH6 CDDP 耐性株) の各抗癌剤への耐性の比較

A: Gemcitabine 耐性の比較。HuH6WT、HuH6CR とともに Gemcitabine への反応性を示さず、明らかな耐性の差は認めなかった。

B: 5-fluorouracil 耐性の比較。HuH6WT、HuH6CR とともに 5-fluorouracil への反応性を示さず、明らかな耐性の差は認めなかった。

C: Pirarubicin 耐性の比較。HuH6WT と HuH6CR に明らかな Pirarubicin への耐性の差異は認めなかった。

3. HuH6CR における遺伝子変動

HuH6WT と HuH6CR から抽出した RNA を用いて、マイクロアレイ解析を行った。アレイの結果、HuH6CR が HuH6WT より有意に発現減少していた遺伝子は 119 遺伝子で、有意に発現上昇していた遺伝子は 161 遺伝子であった。

4. CDDP 耐性候補遺伝子の選定

患者検体を用いたヒト肝芽腫の DNA メチル化アレイ解析の結果と、肝芽腫細胞株の HuH6 を用いたマイクロアレイの結果より、CDDP 耐性関連候補遺伝子の抽出を行った。メチル化アレイ解析より、CDDP 抵抗群で有意に高メチル化していた遺伝子は 4631 遺伝子であり、HuH6CR で有意に発現低下していた遺伝子は 119 遺伝子であった。これらでオーバーラップしていた遺伝子は 18 遺伝子であった。このうち、TSS 付近で高メチル化していたものは 5 遺伝子 (*CSF3R* [Colony stimulating factor 3 receptor]、*FMNL3*[Formin like 3]、*OAF*[Out at first homolog]、*PLAGL1*[PLAG1 like zinc finger 1]、*TRAF5*[TNF receptor associated factor 5]) であった。これらの候補遺伝子をさらに絞り込むため、重回帰分析を行った。これら 5 遺伝子に対する DNA メチル化アレイのデータと CDDP 耐性の相関において、*CSF3R* が CDDP 耐性に最も相関係数 R が大きく、variable selection でも唯一選択された遺伝子であった (図 5-1)。また、同 11 例で施行したパイロシーケンシングのデータと DNA メチル化ビーズアレイのデータの相関を解析したところ、*CSF3R* が 2 データ間で唯一有意な相関を示した (図 5-2)。それ以外の遺伝子は、この 2 モダリティ間に有意な相関を認めなかった (図 5-3) ため、*CSF3R* を CDDP 耐性遺伝子として選定した。

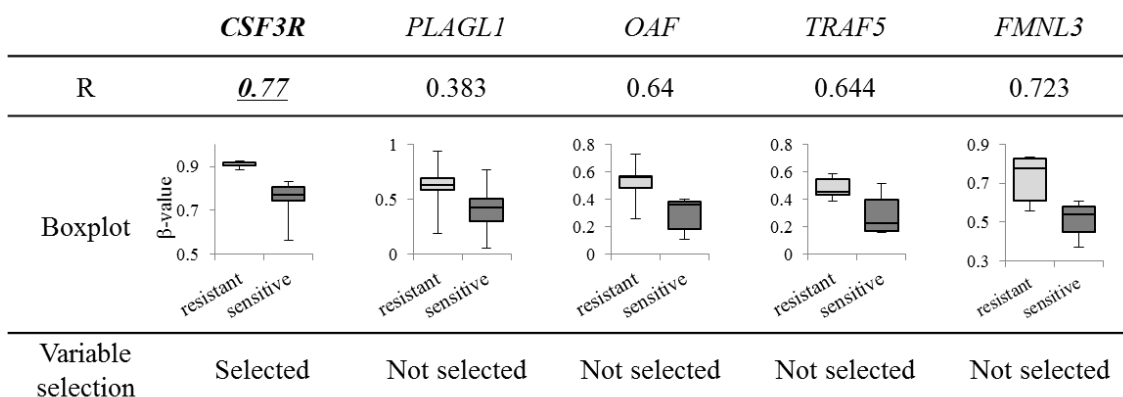


図 5-1 CDDP 耐性関連候補遺伝子の数学的選定

DNA メチル化アレイの結果を用いた重回帰分析より、CDDP 耐性と β 値の相関係数 R が最も高かったのは *CSF3R* であり、変数選択では *CSF3R* が唯一説明変数として選択された。

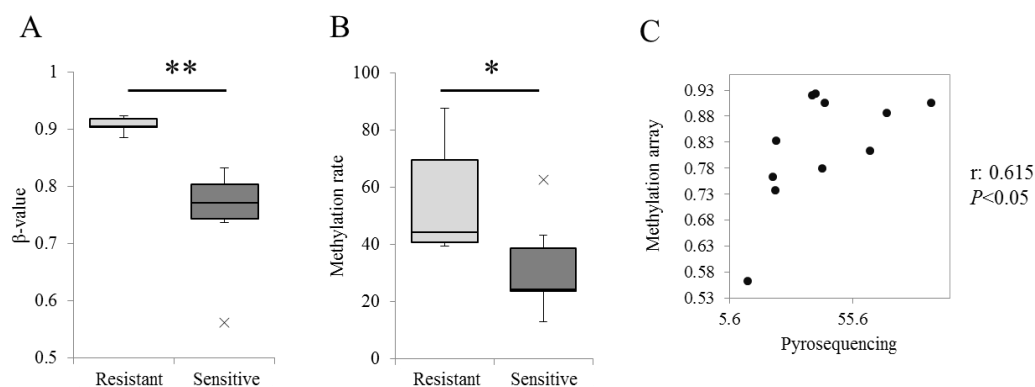


図 5-2 *CSF3R* における DNA メチル化アレイデータとパイロシークエンシングデータの比較

A: *CSF3R* における DNA メチル化アレイデータを用いた Cisplatin (CDDP) 耐性群と CDDP 感受性群の比較。CDDP 耐性群の β 値は、感受性群に比較し有意に高かった。

B: *CSF3R* におけるパイロシークエンシングデータを用いた CDDP 耐性群と CDDP 感受性群の比較。CDDP 耐性群のメチル化率は、感受性群に比較し有意に高かった。

C: *CSF3R* における β 値とメチル化率の相関関係。2 モダリティ間の相関係数 R は 0.615 であり、有意に相関していた。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

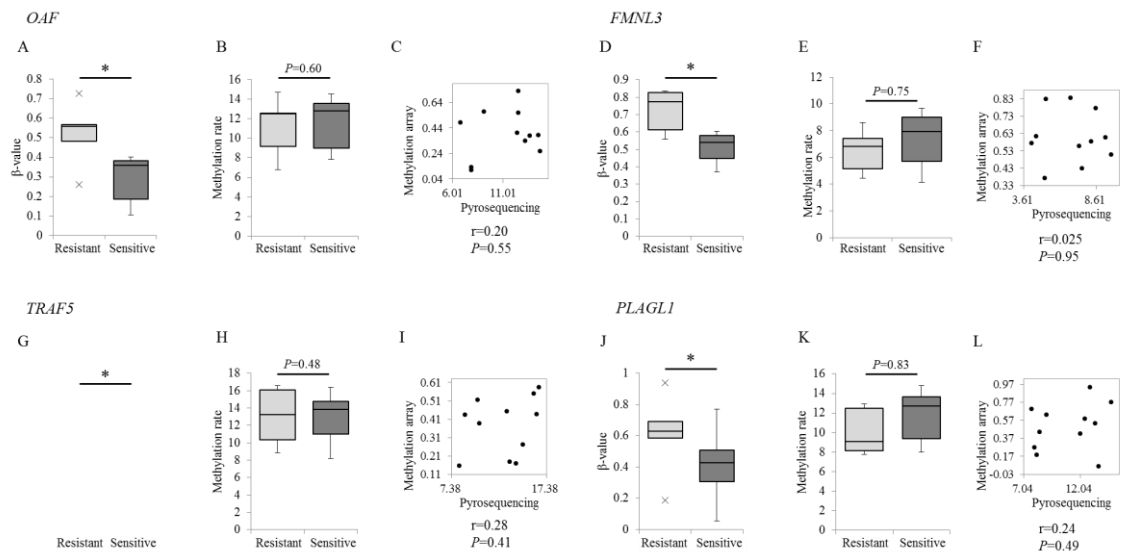


図 5-3 4 遺伝子における DNA メチル化アレイデータとパイロシーケンシングデータの比較

A: *OAF* における DNA メチル化アレイデータを用いた Cisplatin (CDDP) 耐性群と CDDP 感受性群の比較。CDDP 耐性群の β 値は、感受性群に比較し有意に高かった。

B: *OAF* におけるパイロシーケンシングデータを用いた CDDP 耐性群と CDDP 感受性群の比較。CDDP 耐性群と感受性群間にメチル化率の有意差は認めなかった。

C: *OAF* における β 値とメチル化率の相関関係。2 モダリティ間の相関係数 R は 0.20 であり、有意な相関は認めなかった。

D: *FMNL3* における DNA メチル化アレイデータを用いた CDDP 耐性群と CDDP 感受性群の比較。CDDP 耐性群の β 値は、感受性群に比較し有意に高かった。

E: *FMNL3* におけるパイロシーケンシングデータを用いた CDDP 耐性群と CDDP 感受性群の比較。CDDP 耐性群と感受性群間にメチル化率の有意差は認めなかった。

F: *FMNL3* における β 値とメチル化率の相関関係。2 モダリティ間の相関係数 R は 0.025 であり、有意な相関は認めなかった。

G: *TRAF5* における DNA メチル化アレイデータを用いた CDDP 耐性群と CDDP 感受性群の比較。CDDP 耐性群の β 値は、感受性群に比較し有意に高かった。

H: *TRAF5* におけるパイロシーケンシングデータを用いた CDDP 耐性群と CDDP 感受性群の比較。CDDP 耐性群と感受性群間にメチル化率の有意差は

認めなかった。

I: *TRAF5*における β 値とメチル化率の相関関係。2モダリティ間の相関係数Rは0.28であり、有意な相関は認めなかった。

J: *PLAGL1*におけるDNAメチル化アレイデータを用いたCDDP耐性群とCDDP感受性群の比較。CDDP耐性群の β 値は、感受性群に比較し有意に高かった。

K: *PLAGL1*におけるパイロシークエンシングデータを用いたCDDP耐性群とCDDP感受性群の比較。CDDP耐性群と感受性群間にメチル化率の有意差は認めなかった。

L: *PLAGL1*における β 値とメチル化率の相関関係。2モダリティ間の相関係数Rは0.24であり、有意な相関は認めなかった。

* $p < 0.05$

5. *CSF3R*の高メチル化はCDDP耐性により術後再発に関与する

術前CDDP感受性患者38例に対して施行したパイロシークエンシングにおける*CSF3R*のメチル化率と再発率の解析を行った(図6-1)。各メチル化率と再発率の関連の分布より、メチル化率54%以上で高い再発率を認めた。また、ROC解析で算出された高メチルまたは低メチル化のthresholdは56.47%であった。これらの結果より、高メチル化、低メチル化のカットオフ値を54%に設定した。

次に、メチル化率54%以上を高メチル化、54%未満を低メチル化として、38例を群別化した。高メチル化群は4症例、低メチル化群は34症例であった。38症例の臨床データは次の表4に示す。

表 4 バイサルファイトパイロシークエンシングを施行した、CDDP 感受性患者 38 例の臨床データ

		CSF3R		P-value†
		High methylation n=4	Low methylation n=34	
Sex	Male	0	23	<0.05
	Female	4	11	
Age	≤ 365 days	1	10	1.0000
	> 365 days	3	24	
PRETEXT	1	0	0	0.0535
	2	3	9	
	3	1	17	
	4	0	8	
Metastasis	Yes	2	6	0.189
	No	2	28	
Portal vein invasion	Yes	0	1	1.000
	No	4	33	
Hepatic vein invasion	Yes	1	1	0.202
	No	3	33	
Extrahepatic disease	Yes	0	0	1.0000
	No	4	34	
Rapture	Yes	0	2	0.4960
	No	4	32	
Histological type	Fetal	2	13	0.549
	Embryonal	2	19	
	Others	0	2	

† Fisher's exact test. PRETEXT, Pretreatment Extent of Tumor.

高メチル化群では有意に女性患者が多く、低メチル化群では PRETEXT 分類で高ステージ患者が多い傾向であった。パイロシークエンシングのデータを用いて、*CSF3R* 高メチル化群 (4 例)、低メチル化群 (34 例)、CDDP 耐性群 (5 例) に群別化し再発曲線を比較した (図 6-2)。1 年後の再発率は、高メチル化群、低メチル化群、CDDP 耐性群でそれぞれ 75%、20% および 80% であった。高メチル化群は低メチル化群に比較し有意に高い再発率を示した。また高メチル化群と CDDP 耐性群は類似した再発曲線を呈した。

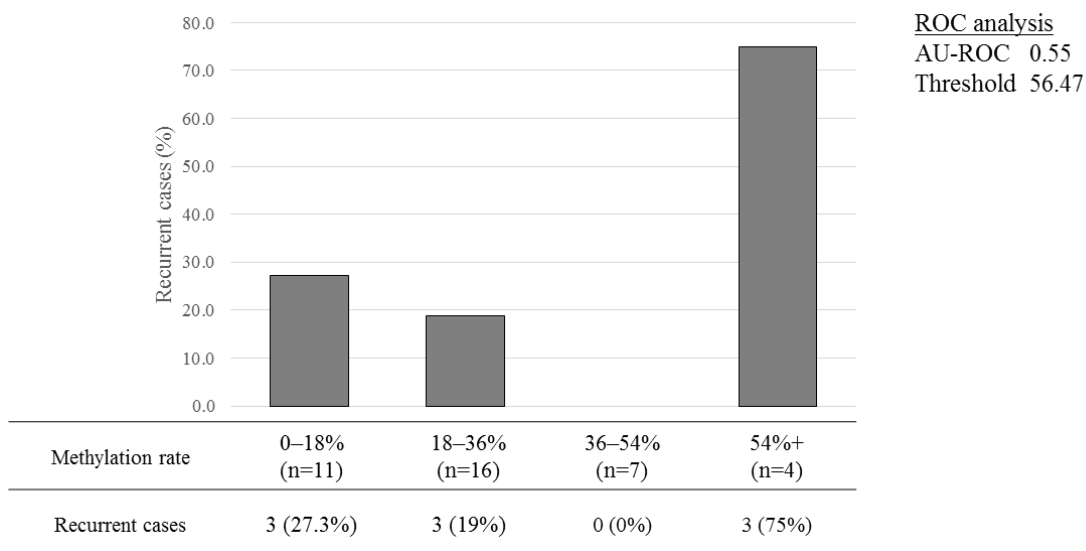


図 6-1 *CSF3R* のメチル化率と再発率の関係

メチル化率 0-54% までは低い再発率であったが、54% を越えると再発率 75% と高い再発率を認めた。ROC 解析では、Threshold は 56.47% と算出された。

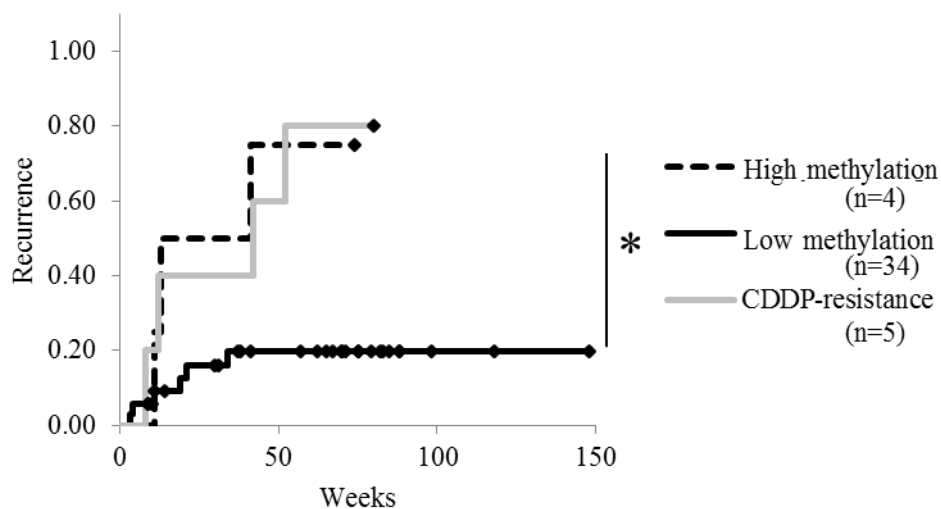


図 6-2 各群における再発曲線

低メチル化群は高メチル化群に比較し、有意に低い再発を示した。また、高メチル化群と術前 CDDP 耐性群は類似した再発曲線を示した。

6. CDDP 耐性肝芽腫において *CSF3R* は CDDP 環境下で発現上昇する

HuH6WT と HuH6CR における *CSF3R* 発現の動的な変化を調べるため、CDDP 処

理前後で各細胞株より RNA とタンパクを抽出し、qPCR とウェスタンブロッティング法により *CSF3R* の発現を評価した (図 7)。mRNA レベルでは、CDDP 処理した HuH6CR (HuH6CR/CDDP) は処理前に比べ有意に発現上昇し、タンパクレベルでも上昇する傾向であった。一方、CDDP 処理した HuH6WT (HuH6WT/CDDP) では、処理前に比べ *CSF3R* の発現が有意に減少し、タンパクレベルでも同様の傾向であった。結果として、CDDP 処理した後は、HuH6WT に比較し HuH6CR の *CSF3R* 発現が有意に上昇した。

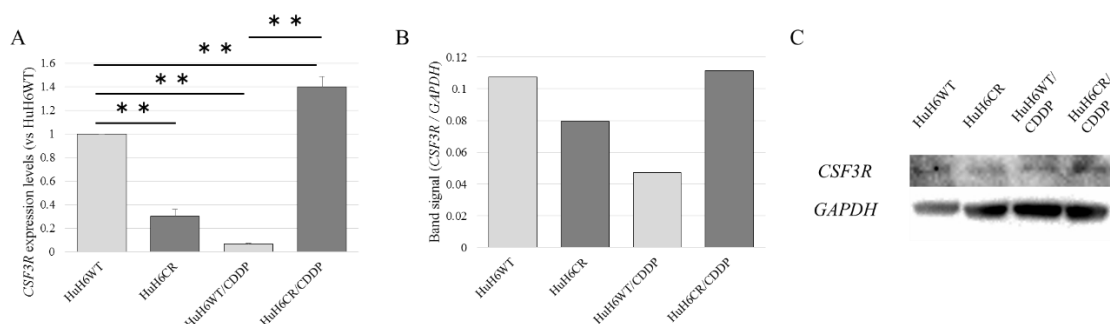


図 7 CDDP 暴露前後での HuH6WT (HuH6 野生株) と HuH6CR (HuH6 CDDP 耐性株) の *CSF3R* 発現変動

A:CDDP 暴露前後での *CSF3R* 発現レベルの比較。

B,C:CDDP 暴露前後での *CSF3R* タンパク発現レベルの比較。(B: 数値化した Band signal、C:Band の図)

HuH6CR/CDDP: CDDP 処理後の HuH6CR, HuH6WT/CDDP: CDDP 処理後の HuH6WT

**p<0.01

考察

次世代シーケンサーの発達とともに、ゲノムワイドながん遺伝子のジェネティック、エピジェネティックな異常に関して、短時間に多くの情報を得られるようになった。国内外で、肝芽腫における遺伝子のゲノムワイドな網羅的解析が行われ、分子生物学的解析、予後別サブタイプ化の解析など様々な解析が行われてきている

(Sumazin et al., 2017; Anna et al., 2017)。本研究において、CDDP 耐性に着目してメチル化ビーズアレイによるゲノムワイドなメチル化解析を行ったところ、CDDP 感受性患者のメチル化傾向は類似しており、そのメチル化傾向から逸脱するにしたがって、CDDP への耐性を獲得し、悪性度が上昇する傾向を示した。この結果より、肝芽腫が CDDP 耐性を獲得する過程でメチル化プロファイルが変化し得ることが示唆され、また CDDP 耐性獲得に DNA メチル化プロセスの関与が示唆された。階層的クラスター解析により分類したサブタイプ (Group1 vs Group2) 別の予後解析では、CDDP 感受性患者のメチル化傾向から逸脱した Group1 の患者は有意に予後不良であった。既報のサブタイプ化の解析同様、メチル化プロファイルによる予後不良分類が可能であり、CDDP 耐性群と類似した分類になったため、CDDP 耐性サブタイプ確立の可能性も示唆された。CDDP 耐性サブタイプにおいて、メチル化変動を示す遺伝子のパスウェイなどを解析することで、CDDP 耐性の機序解明の一助になる可能性も考えられた。また当科の先行研究 (Honda et al., 2008) で、単変量解析において RASSF1A の高メチル化が予後不良や CDDP に対する反応性と関連することを報告した。本研究においても、メチル化ビーズアレイで CDDP 耐性群において RASSF1A の高メチル化を認めた。しかし、細胞株での発現アレイで RASSF1A の低発現を認めなかったため、CDDP 耐性に関連する遺伝子としてピックアップできなかった。しかし、発現アレイが実際の RNA 発現と解離することもしばしば認められるため、qPCR では RNA 発現が低下している可能性も考えられた。いずれにしても、CDDP 耐性に着目して群別化した実験の結果からも CDDP 耐性群で RASSF1A の高メチル化を認め、CDDP 耐性に関連する遺伝子の高メチル化として既報と矛盾しない結果となり、RASSF1A の高メチル化は CDDP 耐性の予測因子としても使用可能と考えられた。

CDDP は肝芽腫において 1st ラインの抗癌剤である。わが国では肝芽腫患者の約 20%が CDDP ベースの術前化学療法への non-responder であり、その予後は不良で高い再発率を示す (Hiyama et al., 2016)。しかし、術前化学療法に対する responder の中でも、完全切除後に再発を認める症例もある。術後再発をきたす症例には、微小転移や他の要因による癌細胞の残存が疑われる。Hiyama らの報告 (Hiyama et al., 2015; Hiyama et al., 2016) によると、再発のリスク要因として、

診断時の年齢、診断時の **alpha-fetoprotein** 低値、非解剖学的肝部分切除、非完全切除、腫瘍破裂が挙げられた。今回、術前化学療法感受性患者に腫瘍完全切除を行った症例での再発の原因として、**CDDP** 耐性癌細胞の微小転移による残存であると推察し、これらの細胞のクローン進化において、**DNA** メチル化異常が重要な役割を担うと仮説を立てた。本研究では、**CDDP** 耐性と **DNA** メチル化異常の関連に着目し、**CDDP** 感受性患者と耐性患者の **DNA** メチル化を比較した。今回の研究結果より統計学的手法を用いて、**CDDP** 耐性に最も関連のある遺伝子として **CSF3R** を選定した。**CSF3R** は **CDDP** 耐性患者において、メチル化ビーズアレイとパイロシークエンシングの結果ともに有意に高メチル化を示した。このことは、パイロシークエンシングの結果がメチル化ビーズアレイの代用として使用可能であることを示した。**CDDP** 感受性の 38 例において、9 例が術後化学療法への反応性が低下し、再発を認めた。また、その内 4 例で、**CSF3R** が術後化学療法感受性患者と比較し高メチル化していた。加えて、**CSF3R** が高メチル化を示した術後化学療法耐性患者の再発曲線は術前化学療法耐性患者の再発曲線と類似していた。これらのことより、術後化学療法耐性患者は術前化学療法の前には癌不均一性により **CSF3R** の高メチル化細胞・低メチル化細胞の双方を有し、低メチル化細胞を多く有するために術前化学療法に対し感受性ありと判断させると仮定された。そして、術前化学療法後も **CSF3R** 高メチル化細胞が生存し、再発に寄与すると推察された。それゆえ、**CSF3R** のメチル化状態は、**CDDP** 耐性のバイオマーカーとなり得、適切な術後化学療法レジメンを選択するための指標となり得ると考えられた。ここで、私はメチル化解析を用いた分類に基づいた新たなプロトコルを図 8 に示した。**CDDP** ベースの化学療法後の腫瘍切除後に **CSF3R** のメチル化率を解析し、**CSF3R** 低メチル化患者は引き続き **CDDP** ベースの術後化学療法を継続し、**CSF3R** 高メチル化の患者は **CDDP** ベース以外の術後治療を選択すべきである。

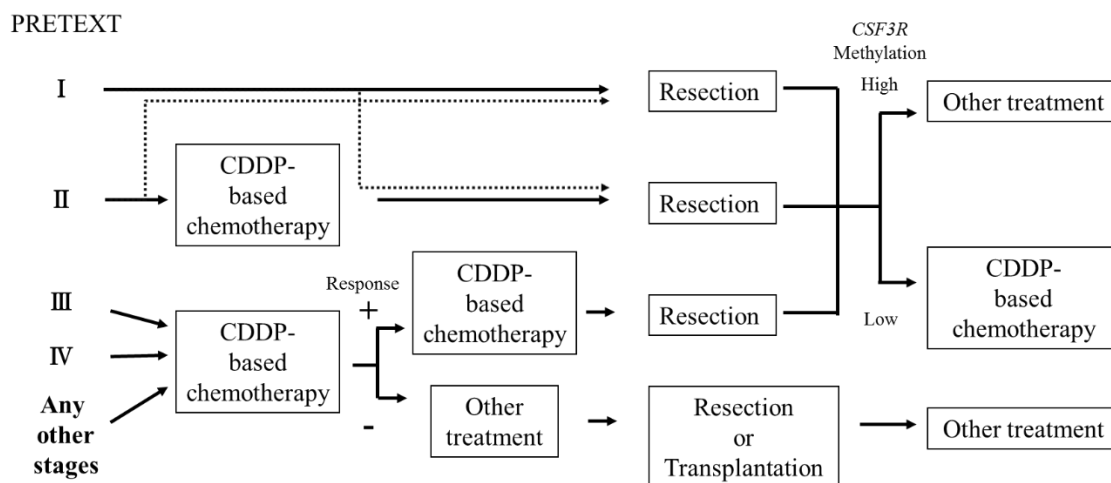


図8 切除検体のメチル化解析に基づいた、新規術後療法プロトコル案

Resection 後に CDDP-based chemotherapy を行う可能性のある症例には、切除検体を用いて *CSF3R* のメチル化率を測定し、High methylation 群は CDDP 以外の治療、Low methylation 群は従来の CDDP-based chemotherapy を行うことが推奨される。

CSF3R は顆粒球刺激因子受容体または細胞表面マーカーの CD114 として知られている。この遺伝子がコードするタンパクはサイトカイン受容体ファミリーの一種であり、細胞表面接着や認識過程の機能を担うとされている。近年の研究では、*CSF3R* の遺伝子異常は白血病の発症を活発にさせると報告されている (Maxson et al., 2016; Rohrabough et al., 2017)。しかし、*CSF3R* の固形腫瘍における変異はほとんど研究されていない。最近の研究では、CD114 は神経芽腫や悪性黒色腫などの神経堤由来腫瘍の癌幹細胞のマーカーであるとされている (Hsu et al., 2013; Zage et al., 2017; Zhang et al., 2017; Liu et al., 2017)。癌幹細胞は様々な癌腫において治療耐性や再発、転移、予後不良に関連すると考えられている。本研究において、定常状態では CDDP 耐性肝芽腫において *CSF3R* は高メチル化により発現低下されていた。しかし、CDDP 暴露下において CDDP 耐性細胞は感受性細胞と比較し、*CSF3R* の発現を上昇させた。このことは、定常状態では CDDP 耐性細胞はエピジェネティックな制御によって、癌幹細胞のマーカーの一つである *CSF3R* を発現低下しているが、CDDP 暴露のようなストレス環境下では *CSF3R* を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。ここで、CDDP 暴露前後の *CSF3R* 発現変化における実験系の妥当性について考察する。本研究で作成した HuH6CR は、 $2\mu\text{g/ml}$ の濃度で生存し続けることが可能な状態となった。投与方法は異なるが、小児の固形腫瘍に対する CDDP 治療中の血中濃度は $1\text{-}2\mu\text{g/ml}$ 程度であるとされ (Murakami et al., 1990)、実臨床を想定した CDDP 耐性の細胞株が作成されたと考えられた。また投与最高濃度は $10\mu\text{g/ml}$ であるという報告 (村上ら., 1988) があることや、HuH6 野生株の CDDP に対する 48 時間の IC_{50} が $9.9 \pm 3.3\mu\text{g/ml}$ であったことを考慮し、体内で想定される高い濃度でかつ、野生株がある程度生存可能な $10\mu\text{g/ml}$ を CDDP 処理濃度と設定し、このような発現変化がみられた。これは、体内での環境を模した実験系として妥当であると考えられ、上記変化は体内でも起こり得ると考えられた。また、本研究では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ることが分かった。これは CDDP 耐性肝芽腫細胞が、癌幹細胞形質のエピジェネティックな制御能を CDDP 暴露中に獲得した、あるいはもともと備わっている能力なのかもしれない。しかし、臨床の場で経時的に癌細胞の動的な遺伝子発現変化を直接フォローアップしていくのは困難である。それゆえ、CDDP 治療後の

定常状態で切除を受けた腫瘍サンプルを用いて、遺伝子発現変動を予測するために CDDP 耐性マーカーの一つとして *CSF3R* のメチル化を評価することは理に適っていると考えられた。しかし、CDDP 耐性肝芽腫細胞がなぜ定常状態において *CSF3R* の発現を抑制し、発現上昇がどのように CDDP 耐性に関与するかは未だに不透明な部分が多い。それゆえ、これらを解明するために、更なる研究が必要である。加えて、*CSF3R* のメチル化と CDDP 耐性や再発、癌幹細胞形質の関連に関して更なる研究を行うことで、肝芽腫の新規治療戦略や治療ターゲットの手掛かりになる可能性がある。

近年、様々な部位の様々なメチル化異常と DNA 発現や制御の関連が報告されてきている (Liang et al., 2017; Liu et al., 2017; Sarda et al., 2017; Yang et al., 2014)。本研究では、プロモーターサイトの高メチル化を示した *CSF3R* を CDDP 耐性遺伝子として選定した。しかし、TSS 以外にも gene body や他のサイトでの様々なメチル化異常が起こっていた。これらのメチル化異常も CDDP 耐性に関与している可能性がある。それゆえ、さらなるゲノムワイドな高メチル化、低メチル化の解析が必要であり、肝芽腫の CDDP 耐性遺伝子やバイオマーカーをさらに検出できる可能性がある。

本研究にはいくつか制限があった。まず、その希少性から、肝芽腫患者の DNA サンプルが少数しか使用出来ず、それぞれのケースでの DNA メチル化異常と mRNA 発現やタンパク発現を直接比較できなかった。さらに、ほとんどすべての患者が術前化学療法として CDDP 治療を受けており、治療による DNA メチル化の影響を排除できなかった。DNA 以外の検体サンプル、CDDP 治療以前のサンプルなどを用いた解析が可能となれば、肝芽腫における DNA メチル化異常や *CSF3R* の CDDP 耐性への関与をより詳細に解明できる可能性があると考えられた。

総括および結論

1. DNA メチル化プロファイルの解析により、DNA メチル化異常が CDDP 耐性獲得に関連すると考えられた。
2. *CSF3R* の高メチル化は CDDP 耐性のバイオマーカーとなり得、術後化学療法としての CDDP 適用の指標となり得る。
3. *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 耐性に関与する可能性が示唆された。

本研究において、肝芽腫の CDDP 耐性に DNA メチル化異常の関与が示唆された。さらに、癌細胞がダイナミックに遺伝子発現を変動させ、その制御に epigenetic regulation が関与することが示唆された。症例数を増やし、ゲノムワイドな DNA メチル化プロファイルの詳細な検討、CDDP 暴露前後でのメチル化プロファイルの検討、他のエピゲノム異常の解析を行うことで、CDDP 耐性に関与する driver gene の同定やエピゲノム制御による CDDP 耐性解除などの治療成績向上に貢献できる可能性があると考えられる。

また、切除検体の *CSF3R* のメチル化を測定することで、術後化学療法のレジメン決定の指標になると考えられ、術後治療の治療成績貢献できると考えられる。肝芽腫における *CSF3R* の機能評価を行う必要があり、遺伝子編集した細胞実験等も必要である。さらに、CDDP 耐性が予想された患者に対する、従来法以外の化学療法レジメンの検討も必要となる。CDDP 耐性肝芽腫が他のどの化学療法に感受性を持つのかなども含め、新規治療方針の開発が課題となる。

謝辞

稿を終えるにあたり、研究の御指導やパイロシーケンシングの実施を賜りました札幌医科大学医学部分子生物学講座 鈴木拓教授、貴重な臨床検体や臨床資料を御供与頂きました広島大学大学院医系科学研究科外科学小児外科 檜山英三教授および JPLT 研究参加施設の御担当医、研究の御指導を賜りました北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室 I 武富紹信教授に深く謝意を表します。また、本研究に関わる御助言、技術的御指導を賜りました北海道大学病院消化器外科 I 講師 本多昌平先生をはじめ同教室の先生方や学術研究員の皆様に、厚く御礼を申し上げます。

本研究は、日本学術振興会 (Grant Numbers JP15K10915 and JP16K15740)、上原記念生命科学財団および秋山記念生命科学振興財団より研究助成を得たものである。

利益相反

本研究に関して、著者全員に開示すべき利益相反はない。

引用文献

- Buendia, MA. (2014) . Unravelling the genetics of hepatoblastoma: few mutations, what else? *J Hepatol* *61*. 1202-1204.
- Cao, Y., Chen, Y., Huang, Y., Liu, Z., Li, G. (2017) . In vitro study of human mutL homolog 1 hypermethylation in inducing drug resistance of esophageal carcinoma. *Ir J Med Sci* *186*. 257-263.
- Cortes-Sempere, M., de Miguel, MP., Pernia, O., Rodriguez, C., de Castro, Carpeño, J., Nistal, M., Conde, E., López-Ríos, F., Belda-Iniesta, C., Perona, R., et al. (2013) . IGFBP-3 methylation-derived deficiency mediates the resistance to cisplatin through the activation of the IGFIR/Akt pathway in non-small cell lung cancer. *Oncogene* *32*. 1274-1283.
- Cui, X., Liu, B., Zheng, S., Dong, K., Dong, R. (2016) . Genome-wide analysis of DNA methylation in hepatoblastoma tissues. *Oncol Lett* *2*. 1529-1534.
- Finegold, MJ., Egler, RA., Goss, JA., Guillerman, RP., Karpen, SJ., Krishnamurthy, R., O'Mahony, CA. (2008) . Liver tumors: pediatric population. *Liver Transpl* *11*. 1545-1556.
- He, T., Zhang, M., Zheng, R., Zheng, S., Linghu, E., Herman, JG., Guo, M. (2017) . Methylation of SLFN11 is a marker of poor prognosis and cisplatin resistance in colorectal cancer. *Epigenomics* *2*. 139-148.
- Hiyama, E., Hishiki, T., Watanabe, K., Ida, K., Yano, M., Oue, T., Iehara, T., Hoshino, K., Koh, K., Tanaka, Y., et al. (2015) . Mortality and morbidity in primarily resected hepatoblastomas in Japan: Experience of the JPLT (Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor) trials. *J Pediatr Surg* *50*, 2098-2101.
- Hiyama, E., Hishiki, T., Watanabe, K., Ida, K., Yano, M., Oue, T., Iehara, T., Hoshino, K., Koh, K., Tanaka, Y., et al. (2016) . 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* *51*, 2053-2057.
- Honda, S., Arai, Y., Haruta, M., Sasaki, F., Ohira, M., Yamaoka, H., Horie, H., Nakagawara, A., Hiyama, E., Todo, S., et al. (2008) . Loss of imprinting of IGF2 correlates with hypermethylation of the H19 differentially methylated region in

hepatoblastoma. *Br J Cancer* *99*. 1891-1899.

Honda, S., Haruta, M., Sugawara, W., Sasaki, F., Ohira, M., Matsunaga, T., Yamaoka, H., Horie, H., Ohnuma, N., Nakagawara, A., et al. (2008) . The methylation status of RASSF1A promoter predicts responsiveness to chemotherapy and eventual cure in hepatoblastoma patients. *Int J Cancer* *123*. 1117-1125.

Honda, S., Miyagi, H., Suzuki, H., Minato, M., Haruta, M., Kaneko, Y., Hatanaka, KC., Hiyama, E., Kamijo, T., Okada, T., et al. (2013) . RASSF1A methylation indicates a poor prognosis in hepatoblastoma patients. *Pediatr Surg Int* *29*. 1147-1152.

Honda, S., Minato, M., Suzuki, H., Fujiyoshi, M., Miyagi, H., Haruta, M., Kaneko, Y., Hatanaka, KC., Hiyama, E., Kamijo, T., et al. (2016) . Clinical prognostic value of DNA methylation in hepatoblastoma: Four novel tumor suppressor candidates. *Cancer Sci* *107*. 812-819.

Hsu, DM., Agarwal, S., Benham, A., Coarfa, C., Trahan, DN., Chen, Z., Stowers, PN., Courtney, AN., Lakoma, A., Barbieri E., et al. (2013) . G-CSF receptor positive neuroblastoma subpopulations are enriched in chemotherapy-resistant or relapsed tumors and are highly tumorigenic. *Cancer Res* *73*. 4134-4146.

Jia, D., Dong, R., Jing, Y., Xu, D., Wang, Q., Chen, L., Li, Q., Huang, Y., Zhang, Y., Zhang, Z., et al. (2014) . Exome sequencing of hepatoblastoma reveals novel mutations and cancer genes in the Wnt pathway and ubiquitin ligase complex. *Hepatology* *60*. 1686-1696.

Koch, A., Denkhaus, D., Albrecht, S., Leuschner, I., von, Schweinitz, D., Pietsch, T. (1999) . Childhood hepatoblastomas frequently carry a mutated degradation targeting box of the beta-catenin gene. *Cancer Res* *15*, 269-273.

Liang, G., Weisenberger, DJ. (2017) . DNA methylation aberrancies as a guide for surveillance and treatment of human cancers. *Epigenetics* *3*. 416-432.

Litten, JB., Tomlinson, GE. (2008) . Liver tumors in children. *Oncologist* *7*. 812-820.

Liu, B., Cui, X., Zheng, S., Dong, K., Dong, R. (2017) . Aberrant KLK4 gene promoter hypomethylation in pediatric hepatoblastomas. *Oncol Lett* *13*. 1360-1364.

Liu, X., Chen, X., Zeng, K., Xu, M., He, B., Pan, Y., Sun, H., Pan, B., Xu, X., Xu, T., et al. (2018) . DNA-methylation-mediated silencing of miR-486-5p promotes colorectal cancer proliferation and migration through activation of PLAGL2/IGF2/ β -catenin signal pathways. *Cell Death Dis* *9*. 1037.

Maeda, O., Ando, T., Ohmiya, N., Ishiguro, K., Watanabe, O., Miyahara, R., Hibi, Y., Nagai, T., Yamada, K., Goto, H., et al. (2014) . Alteration of gene expression and DNA methylation in drug-resistant gastric cancer. *Oncol Rep* *31*. 1883-1890.

Maschietto, M., Rodrigues, TC., Kashiwabara, AY., de Araujo, ÉSS., Marques, Aguiar, TF., da Costa, CML., da Cunha, IW., Dos, Reis, Vasques, L., Cypriano, M., Brentani, H. (2016) . DNA methylation landscape of hepatoblastomas reveals arrest at early stages of liver differentiation and cancer-related alterations. *Oncotarget* *58*. 97871-97889.

Maxson, JE., Luty, SB., MacManiman, JD., Paik, JC3., Gotlib, J3., Greenber, P., Bahamadi, S., Savage, SL., Abel, ML., Eide, CA., et al. (2016) . The Colony-Stimulating Factor 3 Receptor T640N Mutation Is Oncogenic, Sensitive to JAK Inhibition, and Mimics T618I. *Clin Cancer Res* *22*. 757-764.

Mokkapati, S., Niopek, K., Huang, L., Cunniff, KJ., Ruteshouser, EC., deCaestecker, M., Finegold, MJ., Huff, V. (2014) . β -catenin activation in a novel liver progenitor cell type is sufficient to cause hepatocellular carcinoma and hepatoblastoma. *Cancer Res* *74*. 4515-4525.

Murakami, T., Inoue, S., Sasaki K., Fujimoto, T. (1990) . Studies on age-dependent plasma platinum pharmacokinetics and ototoxicity of cisplatin. *Sel Cancer Ther* *6*. 145-151.

Nogales, V., Reinhold, WC., Varma, S., Martinez-Cardus, A., Moutinho, C., Moran, S., Heyn, H., Sebio, A., Barnadas, A., Pommier, Y., et al. (2016) . Epigenetic inactivation of the putative DNA/RtNA helicase SLFN11 in human cancer confers resistance to platinum drugs. *Oncotarget* *7*. 3084-3097.

Pan, Y., Liu, G., Zhou, F., Su, B., Li, Y. (2018) . DNA methylation profiles in cancer diagnosis and therapeutics. *Clin Exp Med* *18*. 1-14.

Rohrbaugh, S., Kesarwani, M., Kincaid, Z., Huber, E., Leddonne, J., Siddiqui, Z., Khalifa, Y., Komurov, K., Grimes, HL., Azam, M. (2017) . Enhanced MAPK

signaling is essential for CSF3R-induced leukemia. *Leukemia* *31*. 1770-1778.

Sarda, S., Das, A., Vinson, C., Hannenhalli, S. (2017) . Distal CpG islands can serve as alternative promoters to transcribe genes with silenced proximal promoters. *Genome Res* *27*. 553-566.

Sumazin, P., Chen, Y., Trevino, LR., Sarabia, SF., Hampton, OA., Patel, K., Mistretta, TA., Zorman, B., Thompson, P., Heczey, A., et al. (2017) . Genomic analysis of hepatoblastoma identifies distinct molecular and prognostic subgroups. *Hepatology* *65*, 104-121.

Nakamura, M., Chiba, T., Kanayama, K., Kanzaki, H., Saito, T., Kusakabe, Y., Kato, N. (2019) . Epigenetic dysregulation in hepatocellular carcinoma: an up-to-date review. *Hepatol Res* *49*, 3-13.

Von, Schweinitz, D. (2012) . Hepatoblastoma: recent developments in research and treatment. *Semin Pediatr Surg* *21*, 21-30.

Yang, X., Han, H., De, Carvalho, DD., Lay, FD., Jones, PA., Liang G. (2014) . Gene body methylation can alter gene expression and is a therapeutic target in cancer. *Cancer Cell* *13*. 577-590.

Zage, PE., Whittle, SB., Shohet, JM. (2017) . CD114: A New Member of the Neural Crest-Derived Cancer Stem Cell Marker Family. *J Cell Biochem* *118*. 221-231.

Zhang, C., Ge, S., Wang, J., Jing, X., Li, H., Mei, S., Zhang, J., Liang, K., Xu, H., Zhang, X., et al. (2019) . Epigenomic profiling of DNA methylation for hepatocellular carcinoma diagnosis and prognosis prediction. *J Gastroenterol Hepatol* *34*. 1869-1877.

Zhang, L., Agarwal, S., Shohet, JM., Zage, PE. (2015) . CD114 Expression Mediates Melanoma Tumor Cell Growth and Treatment Resistance. *Anticancer Res* *35*. 3787-3792.

村上正，佐々木邦明，藤本孟男．（2005）．小児癌患児における cis-diamminedichloroplatinum（CDDP）の薬物療法に関する研究（第1報）遊離および総 CDDP の血中薬物動態の検討．日本癌治療学会誌 *23*， 1672-1680.