



Title	肝芽腫におけるDNA メチル化解析に基づく新規リスク層別化モデルの検討 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	近藤, 享史
Description	配架番号 : 2800
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15574号
Issue Date	2023-06-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90399
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	KONDO_Takafumi_abstract.pdf, 論文内容の要旨



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 近藤 享史

学 位 論 文 題 名

肝芽腫における DNA メチル化解析に基づく新規リスク層別化モデルの検討
(Study on the novel risk stratification model based on DNA-methylation analysis
for Hepatoblastoma)

【背景と目的】肝芽腫は小児肝悪性腫瘍の 80%を占める主要な腫瘍である。一方、全小児悪性腫瘍の 1-2%を占める希少癌でもある。その治療は、臨床的因子に基づく治療層別化と、手術による腫瘍切除、シスプラチンを主体とした化学療法を中心に構成されるが、各国のスタディグループが独自のプロトコルを用いて治療にあたってきた現状があり、本邦では日本小児肝癌スタディグループ（Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor; JPLT）が中心となり治療プロトコルを提案してきた。本邦で施行された臨床研究 JPLT-2 のプロトコルでは、PRETEXT 分類や遠隔転移、血管浸潤の有無といった付記因子に従って治療層別化を行い、全体の 5 年生存率は 80%程度と比較的良好な結果が認められたが、完全切除可能とされる PRETEXT II の約 2 割に再発、1 割に死亡例を認めた他、遠隔転移例の予後は依然として不良であり、化学療法による長期毒性も課題とされた。従って、より有効な予後予測因子による高悪性症例の選別と、リスク層別化による過不足ない治療強度の選択が重要であると考えられた。そのような背景の中、近年各国のスタディグループが中心となり国際的小児肝癌研究組織である Children's Hepatic tumors International Collaboration (CHIC) が立ち上げられ、これにより形成された大規模国際データベースの解析に基づき、臨床的予後因子を統合した新規リスク分類である CHIC-Hepatoblastoma Stratification (CHIC-HS) が提唱された。さらに、CHIC-HS の妥当性を検証する目的で国際共同研究 Pediatric Hepatic International Tumor Trial (PHITT) が進行中である。当教室では、肝芽腫においてゲノム変異が稀であることから、エピゲノム変異が発生、進展に重要な役割を果たしていると考え、特に DNA メチル化異常に着目し、*RASSF1A*、*PARP6*、*OCIAD2*、*MST1R*、*GPR180* の 5 遺伝子のメチル化率の定量的評価が予後予測因子として有効であることを報告してきた。本研究では、臨床的予後因子を統合した CHIC-HS に DNA メチル化異常に基づく分子学的予後因子を統合し、より有用な予後予測モデルを作成することを目的として検討を行った。

【対象と方法】1999 年から 2012 年までに JPLT 関連施設で JPLT-2 プロトコルに基づく治療、肝切除を施行された肝芽腫患者 132 例を対象とした。JPLT より供与された対象患者の新鮮凍結検体より抽出された DNA サンプルを解析に用いた。DNA メチル化解析には、バイサルファイトパイロシーケンシング法を用い、*RASSF1A*、*PARP6*、*OCIAD2*、*MST1R*、*GPR180* の 5 遺伝子の DNA メチル化率の定量的評価を行った。Overall survival (OS)、Event-free survival (EFS) や臨床病理学的因子は、JPLT データベースより抽出され、これらとメチ

ル化率の関係について統計学的解析を行った。CHIC-HS 各リスク群におけるメチル化状態の評価の有用性を検討し、DNA メチル化状態の評価を組み込んだ新規リスクモデルを作成した。P 値は 0.05 未満を有意とした。

【結果】132 例中 108 例 (82%) が術前化学療法を施行されていた。5 遺伝子 (*RASSF1A*、*PARP6*、*OCIAD2*、*MST1R*、*GPR180*) のメチル化率の中央値はそれぞれ 13.42%、7.01%、5.91%、7.73%、1.61%であった。生存死亡をアウトカムとした ROC 解析よりカットオフ値を設定したところ、それぞれ 31.77、9.93、34.33、32.94、2.34 であった。*GPR180* のカットオフ値はパイロシークエンサーの誤差範囲に入る程小さい値であったため、後の検討から除外した。カットオフ値に基づきメチル化群、非メチル化群に群別し、生存曲線を log-rank 検定により比較したところ、4 遺伝子全てにおいて、メチル化群で OS、EFS 共に有意に不良であった。高メチル化遺伝子を多く持つ症例程予後不良となる傾向を認め、同様に ROC 解析よりカットオフ値を 2 と設定し、log-rank 検体を行ったところ、4 遺伝子のうち 2 個以上高メチル化した遺伝子を持つ群で、有意に OS、EFS が不良であった。多変量 Cox 回帰分析から、高メチル化遺伝子を 2 個以上持つことは、OS、EFS に関する独立した予後因子であることが示された。さらに CHIC-HS 各群におけるサブグループ解析を行ったところ、超低・低リスク群、中間リスク群においても高メチル化遺伝子を 2 個以上持つ群の OS は有意に不良であることが示された。CHIC-HS 超低・低リスク、中間リスク群に 4 遺伝子のメチル化解析を行い、2 個以上高メチル遺伝子を持つ群をより上位のリスク群に層別化する新規リスク分類 (methylation-based CHIC-HS; mCHIC-HS) を作成したところ、その 3 年 OS は超低・低リスク、中間リスク、高リスク群でそれぞれ 98%、90%、62%であり (vs CHIC-HS [96%、82%、65%], $P < 0.001$)、CHIC-HS を適正化し得た。また、その AUC は 0.762 (vs CHIC-HS 0.687, $P = 0.087$) と CHIC-HS に比べて高値だった。

【考察】本研究において、本邦における多数の肝芽腫 DNA 検体の解析を通して、*RASSF1A*、*PARP6*、*OCIAD2*、*MST1R* の DNA メチル化状態の定量的評価が、予後因子として有用であることが改めて検証された。また、高メチル化遺伝子を 2 個以上持つことが、既存の臨床病理学的因子と独立した強い予後不良因子であり、これを CHIC-HS に組み込むことで、予後予測モデルを最適化することが可能であった。近年の CHIC-HS に分子学的マーカーを組み込んだ報告には、網羅的 DNA メチル化解析と 14q32 領域の miRNA 発現異常を組み合わせで評価するものや、16 遺伝子の発現状態の評価を組み込んだものの報告がある。それぞれ網羅的解析を必要とする点で実臨床への適応のハードルが高い点や、低リスク群の層別化がされていない点などの問題がある。その点、我々のモデルは、パイロシークエンシング法を用いることで、網羅的解析に比べてコストが低く、高い再現性もあり、必要とする検体も DNA であることから安定性が高いというメリットがある。また、低リスク群に含まれる高リスク症例を拾い上げることが可能であり、不十分な治療強度となることを是正することが可能なモデルと考えられた。

【結論】CHIC-HS に DNA メチル化解析に基づく分子学的予後因子を統合することで、より適切な予後層別化が可能となり、リスクに応じた治療選択が実現し得る。今後、このモデルの有用性を前向きに検討していきたい。