



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15574
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90410
Type	doctoral thesis
File Information	KONDO_Takafumi.pdf



学 位 論 文

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)

2023 年 6 月

北 海 道 大 学

近 藤 享 史

学 位 論 文

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)

2023 年 6 月

北 海 道 大 学

近 藤 享 史

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	3 頁
略語表	6 頁
緒言	7 頁
方法	10 頁
結果	16 頁
考察	34 頁
結論	37 頁
謝辞	38 頁
利益相反	39 頁
引用文献	40 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Kondo T, Honda S, Suzuki H, Ito M Y, Kawakita I, Okmura K, Ara M, Minato M, Kitagawa N, Tanaka Y, Tanaka M, Shinkai M, Hishiki T, Watanabe K, Ida K, Takatori A, Hiyama E, Taketomi A
A novel risk stratification model based on the Children's Hepatic Tumours International Collaboration-Hepatoblastoma Stratification and deoxyribonucleic acid methylation analysis for hepatoblastoma
European Journal of Cancer. 2022 Sep; 172: 311-322.

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 近藤 享史、本多 昌平、鈴木 拓、奥村 一慶、荒 桃子、武富 紹信
肝芽腫における DNA メチル化解析に基づく予後予測モデルの確立
第 62 回日本小児血液・がん学会学術集会, 2020. 11. 20-22・Web
2. 近藤 享史、本多 昌平、鈴木 拓、奥村 一慶、荒 桃子、北河 徳彦、田中 祐吉、田中 水緒、新開 真人、檜山 英三、武富 紹信
肝芽腫に対する DNA メチル化解析に基づく予後層別化の試み
第 121 回日本外科学会定期学術集会, 2021. 4. 8-10・千葉 Web
3. 近藤 享史、本多 昌平、鈴木 拓、河北 一誠、荒 桃子、北河 徳彦、田中 祐吉、田中 水緒、新開 真人、檜山 英三、武富 紹信
肝芽腫 CHIC 分類を DNA メチル化解析と統合して予後層別化の向上を図る
第 58 回日本小児外科学会学術集会, 2021. 4. 28-30・横浜 Web
4. 近藤 享史、本多 昌平、鈴木 拓、河北 一誠、荒 桃子、北河 徳彦、田中 祐吉、田中 水緒、新開 真人、檜山 英三、武富 紹信
肝芽腫 CHIC 分類と DNA メチル化解析の統合による新規リスク分類
第 32 回日本消化器癌発生学会総会, 2021. 11. 26-27・Web
5. 近藤 享史、本多 昌平、鈴木 拓、河北 一誠、荒 桃子、北河 徳彦、田中 祐吉、田中 水緒、新開 真人、檜山 英三、武富 紹信
肝芽腫における DNA メチル化解析に基づく新規リスク分類とエピゲノム治療開発

第 122 回日本外科学会定期学術集会, 2022. 4. 14-16・熊本 Web

6. 近藤 享史、本多 昌平、鈴木 拓、河北 一誠、荒 桃子、北河 徳彦、田中 祐吉、田中 水緒、新開 真人、檜山 英三、武富 紹信

肝芽腫における DNA メチル化解析に基づく新規リスク分類 : Methylation based CHIC-HS (mCHIC-HS)

第 59 回日本小児外科学会学術集会, 2022. 5. 19-21・東京

7. Takafumi Kondo, Shohei Honda, Hiromu Suzuki, Issei Kawakita, Momoko Ara, Norihiko Kitagawa, Yukichi Tanaka, Mio Tanaka, Masato Shinkai, Eiso Hiyama, Akinobu Taketomi

A novel risk stratification model based on CHIC-HS and DNA methylation analysis for hepatoblastoma

The 67th annual congress of international college of surgeons Japan section, 2022. 6. 4・Chiba

8. Takafumi Kondo, Shohei Honda, Hiromu Suzuki, Issei Kawakita, Momoko Ara, Norihiko Kitagawa, Yukichi Tanaka, Mio Tanaka, Masato Shinkai, Eiso Hiyama, Akinobu Taketomi

A new risk stratification based on DNA methylation analysis for hepatoblastoma

The 47th annual congress of Japanese college of surgeons, 2022. 6. 15-17・Iwate

要 旨

【背景と目的】

肝芽腫は小児肝悪性腫瘍の 80%を占め、小児 3 大固形腫瘍の一つとされる。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、臨床病理学的因子に基づく治療の層別化と、手術による腫瘍切除、シスプラチン (Cisplatin; CDDP) 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ー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) が中心となって治療プロトコールを提案してきた。本邦で施行された臨床研究である JPLT-2 のプロトコールでは、PRETEXT 分類や遠隔転移の有無、その他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、その全体の 5 年生存率は 80%程度と比較的良好な結果が認められたものの、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。そのため、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って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 1605 例の大規模国際データベースの解析に基づき、臨床病理学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。

本研究では、肝芽腫においてゲノム変異が稀であることから、エピゲノム変異がその発生、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た。これまで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と報告された *RASSF1A*、*PARP6*、*OCLAD2*、*MST1R*、*GPR180* の 5 つの遺伝子のメチル化率の定量的評価と、臨床病理学的予後因子を統合した CHIC-HS 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 の関連施設で JPLT-2 プロトコールに基づき治療を受け、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 DNA メチル化解析に用い

た。DNA メチル化解析には、バイサルファイトパイロシークエンシング法を用い、*RASSF1A*、*PARP6*、*OCIAD2*、*MST1R*、*GPR180*の5つの遺伝子の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。生存または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、非メチル化群の 2 群に群別化し、Kaplan-Meier 曲線を log-rank 検定により比較したところ、4 遺伝子いずれにおいてもメチル化群で OS、EFS 共に有意に不良であった。いずれの遺伝子も高メチル化と年齢 3 歳以上に有意な関連が認められた。高メチル化遺伝子を多くもつ症例程予後不良となる傾向を認めたため、同様に ROC 解析よりカットオフ値を 2 と設定し、log-rank 検定を行ったところ、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 が不良であることが示された。単変量 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、既存の臨床病理学的因子に比べて、OS に関して最も高いハザード比を示した (Mean 7.005; Range 3.177-15.45)。また、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 個以上高メチル化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 に比べて高値であった。

【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*、*OCLAD2*、*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。各遺伝子の高メチル化と診断時の年齢が高いことには有意な関連があり、DNA メチル化は、高年齢が肝芽腫の重要な臨床的な予後不良因子となっていることの分子学的背景になっている可能性があると考えられた。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、より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 micro RNA 発現異常を組み合わせて評価するものや、16 遺伝子の発現状態の評価を組み込んだものなどが報告されている。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ことや、低リスク群の層別化がなされていないことなどの問題点がある。その点、本研究のモデルは、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。

略語集

ACTB	Actin beta
AFP	Alpha-fetoprotein
AXIN1	Axis inhibition protein 1
AXIN2	Axis inhibition protein 2
CDDP	Cisplatin
CHIC	Children's Hepatic tumors International Collaboration
CHIC-HS	CHIC-Hepatoblastoma Stratification
COG	The Children's Oncology Group
CTNNB1	Catenin beta 1
DNA	Deoxyribonucleic acid
EFS	Event Free Survival
GPOH	Society of Pediatric Oncology and Hematology
GPR180	G protein-coupled receptor 180
HMGA2	High Mobility Group AT-Hook 2
JPLT	Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor
LIN28B	Lin-28 Homolog B
MST1R	Macrophage Stimulating 1 Receptor
MYC	MYC Proto-Oncogene
MYCN	MYCN Proto-Oncogene
NFE2L2	NFE2 Like BZIP Transcription Factor 2
OCLAD2	Ovarian carcinoma immunoreactive antigen-like protein 2
OS	Overall Survival
PARP6	Poly (ADP-Ribose) Polymerase Family Member 6
PHITT	Pediatric Hepatic International Tumor Trial
PRETEXT	Pre-Treatment Extent of disease
qPCR	Real-time quantitative polymerase chain reaction
RASSF1A	Ras association domain family 1 isoform A
RNA	Ribonucleic acid
ROC	Receiver Operating Characteristic
SIOPEL	International Society for Pediatric Oncology-Epithelial Liver Tumors

緒 言

肝芽腫は、小児において最も主要な肝腫瘍の一つである。一方で小児悪性腫瘍の1-2%程度を占めるに過ぎず、その発生率は100万出生に1.2-1.5人程度とされる希少癌でもある (Spector et al, 2012; McLaughlin et al, 2006)。その治療は、Pre-treatment Extent of disease (PRETEXT) と呼ばれる画像診断や、転移の有無、血清AFP値といった臨床病理学的因子に基づく治療の層別化と、手術による腫瘍切除、シスプラチン (Cisplatin; CDDP) を主体とした化学療法を中心に構成される。これまで、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 (von Schweinitz, 2012)、本邦の日本小児肝癌スタディグループ (Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor; JPLT)、米国の The Children's Oncology Group (COG)、欧州の International Society for Pediatric Oncology-Epithelial Liver Tumors (SIOPEL)、ドイツの Society of Pediatric Oncology and Hematology (GPOH) の4つのスタディグループが主要な役割を果たしてきた (Haeberle et al, 2012; Malogolowkin et al, 2012; Hishiki et al, 2011; Perilongo et al, 2009)。

本邦において JPLT が主体となって施行した臨床研究である JPLT2 のプロトコルでは、PRETEXT 分類や遠隔転移の有無、その他血管浸潤の有無といった付記因子に従って治療層別化が行われた。その全体の5年生存率は80%程度と比較的良好な結果であったが、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った。また化学療法による耳毒性などの長期毒性も課題とされた (Hiyama et al, 2020; Hishiki et al, 2011)。そのため、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って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1605例の大規模国際データベースの解析に基づき、臨床病理学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、このリスク分類に基づき、国際共同研究である Pediatric Hepatic International Tumor Trial (PHITT) が進行中である (Meyers et al, 2017)。

一方、肝芽腫における分子学的予後因子による層別化の試みもなされてきた。16遺伝子の発現プロファイルから2群に群別化し、予後不良群においては特に *MYC*、*MYCN* の発現が有意に高いことを示した報告 (Cairo et al, 2008) や、近年盛んに行われている網羅的解析の結果から、予後不良群は、*NFE2L2*、*LIN28B*、*HMGA2*、*SALL4*、*AFP* の高発現によって特徴付けられるとする報告など、様々な報告がされ

つつある (Hooks et al, 2018; Sumazin et al, 2017)。しかし、依然として高悪性肝芽腫がどのような分子学的背景に基づいて発生するのか解明されていない。肝芽腫においては、*CTNNB1* 変異や *APC*、*AXIN1* や *AXIN2* の変異を 80% と高頻度に認めることから、Wnt pathway の異常が Hallmark として知られている (Zhang Yi et al, 2021)。一方で、ゲノム変異が 1 腫瘍あたり平均 2.9 程度と非常に少ないことが知られており (Sumazin et al, 2017; Buendia et al, 2014)、これは成人腫瘍に比べてゲノム変異の少ない小児腫瘍においても特に少ない (Grobner et al, 2018)。したがって、胎児肝の発生過程におけるエピゲノム異常が、肝芽腫の発生・進展において重要な役割を果たしていると考えられる。

エピゲノム異常とは一般的に、遺伝子配列の変化を伴わない遺伝子発現調節機構の異常とされ、DNA メチル化やヒストンアセチル化、micro RNA の異常などを含む概念である。DNA メチル化とは、DNA を構成する 4 塩基のうち、シトシンの 5 位の炭素原子にメチル基 (CH₃) が付加される現象のことである。遺伝子のプロモーター領域に存在する CpG island と呼称される CG rich な領域の高メチル化は、転写因子の結合阻害や、転写活性の低い凝集したヘテロクロマチンの形成に寄与し、遺伝子発現の抑制に関わると考えられている。このプロモーター領域の高メチル化は特に、正常細胞に比べて、がん細胞で顕著に見られる特徴であり、メチル化によって細胞に生じた遺伝子発現の変化が、がんの成り立ちに重要な役割を果たしていると考えられている (Klutstein et al, 2016)。近年肝芽腫においても、ゲノムワイドなメチル化異常の研究・報告がなされてきている (Carrillo-Reixach et al, 2020; Cui et al, 2016; Maschietto et al, 2016)。

これまで肝芽腫において、がん抑制遺伝子である *RASSF1A* (Ras association domain family 1 isoform A) の高メチル化が予後予測因子となること (Honda et al, 2008)、さらにそのメチル化率の定量的評価が予後マーカーとして有用であることが報告された (Honda et al, 2013)。また、肝芽腫 FFPE 切片を用いた網羅的メチル化解析、及び肝芽腫細胞株の脱メチル化処理前後の網羅的発現解析から、候補となるがん抑制遺伝子を抽出し、腫瘍検体を用いた定量的メチル化解析を通して、がん抑制遺伝子である *PARP6* (Poly (ADP-Ribose) Polymerase Family Member 6)、*OClAD2* (Ovarian carcinoma immunoreactive antigen-like protein 2)、*MST1R* (Macrophage Stimulating 1 Receptor)、*GPR180* (G protein-coupled receptor 180) の 4 つの遺伝子の高メチル化が、予後不良因子となることが報告された (Honda et al, 2016)。

臨床的予後因子と分子学的予後因子を統合した層別化は、小児固形腫瘍においては、早くから神経芽腫において *MYCN* の増幅と DNA ploidy の有無を組み込んだ病期分類が採用され、実臨床に用いられているが (London WB et al, 2011; Monclair T

et al, 2009) 、肝芽腫にはそのようなモデルは存在しない。

そこで、本研究では、これら当教室でこれまでに見出してきた DNA メチル化異常に基づく分子学的予後因子を、臨床病理学的予後因子に基づく CHIC-HS に統合し、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うこととした。またこれら予後予測因子となる遺伝子の発現解析を行い、メチル化との関係についても評価した。

方 法

1. 対象

本研究は、1999年から2012年までに、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、臨床研究JPLT-2で規定された肝芽腫治療プロトコール(図1)に従って、肝切除術を受けた肝芽腫患者132例を対象とした。JPLT-2は小児固形がん臨床試験共同機構が主導する「小児固形腫瘍観察研究」に含まれる。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われ、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、RNA検体が、JPLT事務局(広島大学 自然科学研究支援開発センター)で保存された。北海道大学病院 消化器外科IはJPLT関連施設の一つであり、対象患者より抽出されたDNA検体132例とRNA検体20例がJPLTより供与され、これを本研究に用いた。また北海道大学病院で2016年、2019年に同様にJPLT-2に組み込まれて治療された肝芽腫2症例の腫瘍と正常肝から抽出されたRNA検体も発現状態の検討に用いた。年齢、性別、診断時の血清AFP値、PRETEXT分類(図2)、付記因子(静脈浸潤、門脈浸潤、肝外進展、多中心性、破裂、転移の有無)、組織診断、生存・イベント情報などの臨床病理学的因子は、JPLTデータベースより後方視的に収集された。これらの情報に基づき、CHIC-HS(図3)に従ってCHIC-HS各リスク群の判定を行った。

本研究計画は、北海道大学大学院医学研究院 医の倫理委員会(医18-012)により承認を得て行われた。また全ての患者は、各施設の担当医によって研究参加の同意が得られた。

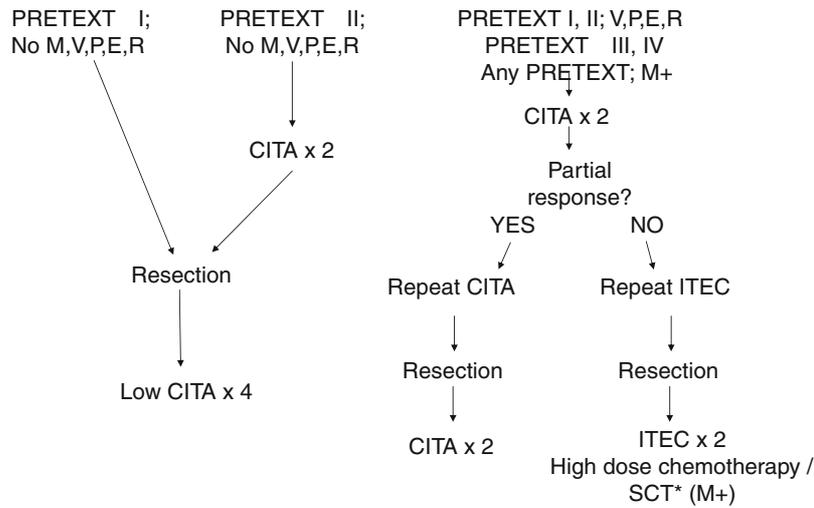
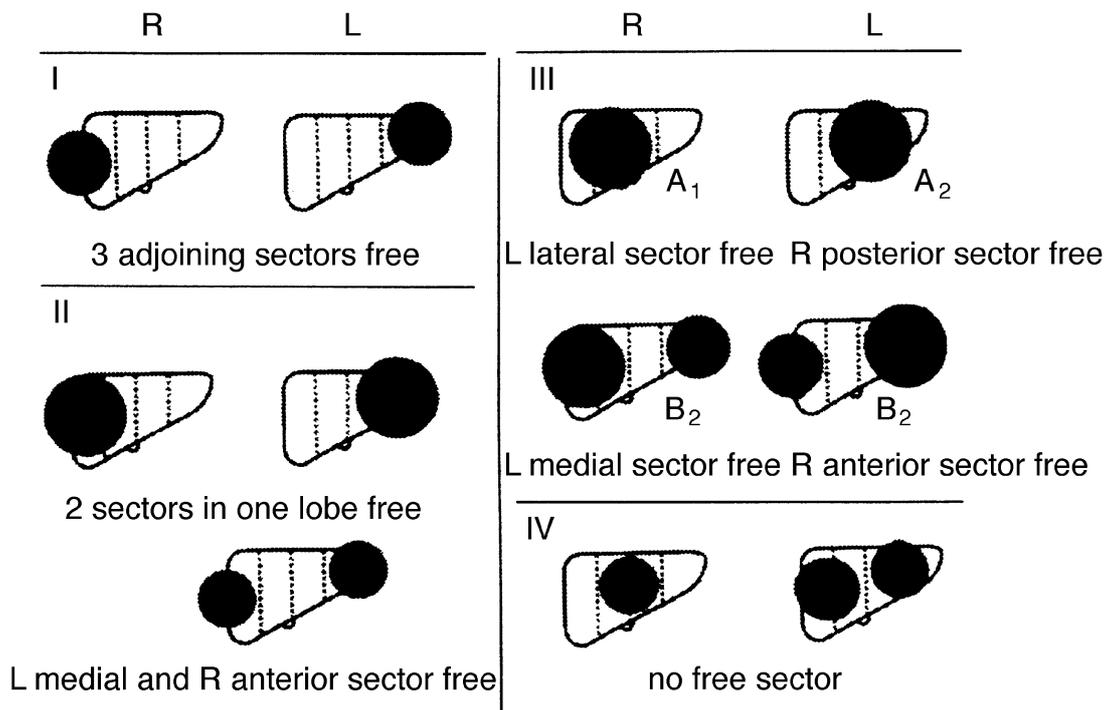


図 1. JPLT-2 プロトコール (Hishiki et al, 2011)

PRETEXT: Pre-Treatment Extent of Tumor, M: Metastasis, V: Venous invasion, P: Portal invasion, E: Extrahepatic extension, R: Rupture, 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), SCT: Stem cell transplantation.



病期	
I	隣接する3区域に腫瘍が存在しない(1つの肝区域にのみ腫瘍が存在)
II	隣接する2区域に腫瘍が存在しない(腫瘍は2つの肝区域に関連する)
III	1つまたは2つの隣接しない区域に腫瘍が存在しない(腫瘍は2つまたは3つの肝区域に関連する)
IV	腫瘍が存在しない区域がない(4つの区域全て腫瘍がある)

図 2. Pre-treatment extent of disease (PRETEXT) 分類 (Brown et al, 2000 より改変)

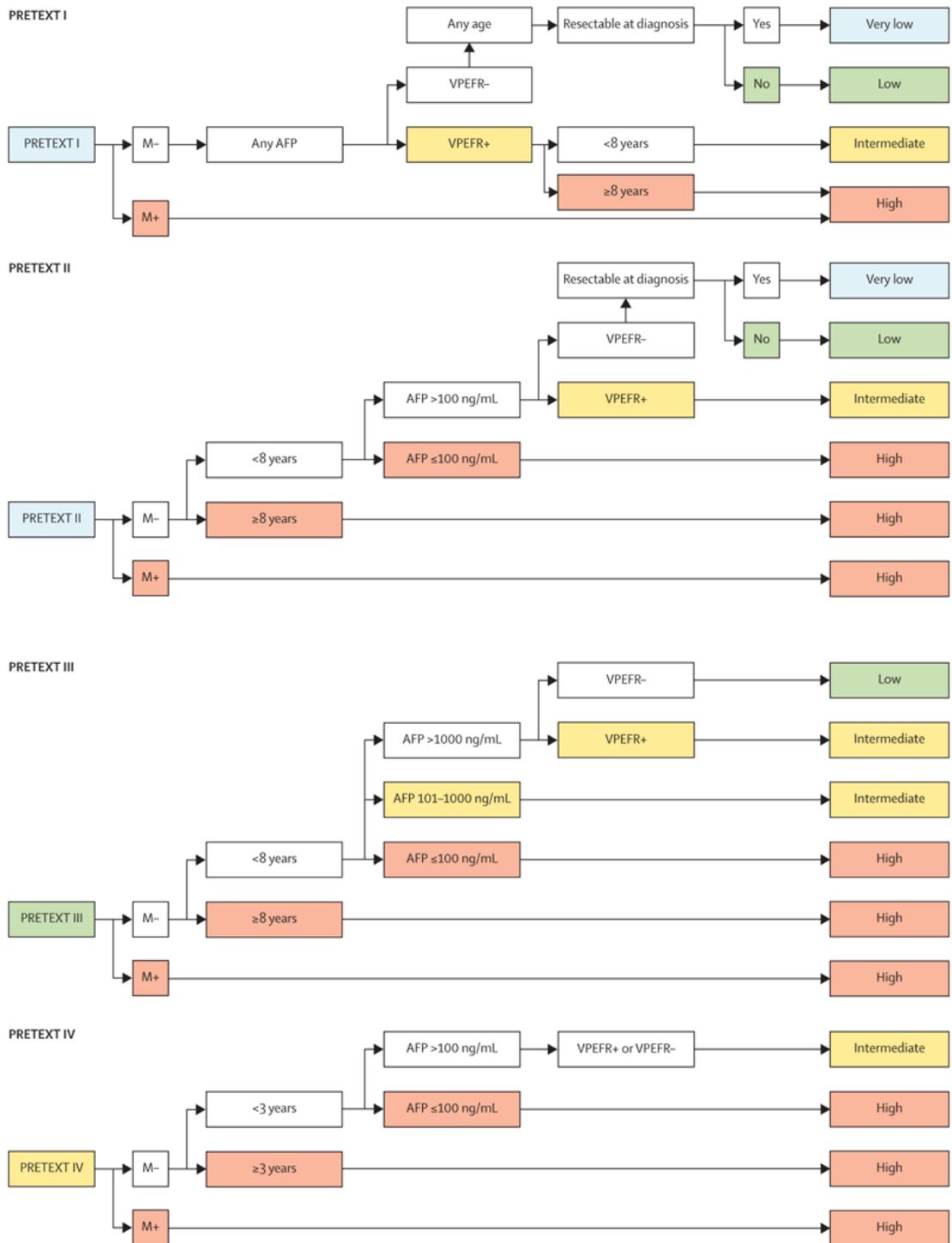


図 3. Children's Hepatic tumors International Collaboration-Hepatoblastoma Stratification (CHIC-HS) (Meyers RL et al, 2017)

AFP: Alfa-fetoprotein, VPEFR+: 静脈浸潤、門脈浸潤、肝外浸潤、多中心性、破裂の何れかを認める, VPEFR-: 静脈浸潤、門脈浸潤、肝外浸潤、多中心性、破裂の何れも認めない

2. バイサルファイトパイロシークエンシング

肝芽腫 DNA 検体を用いて、*RASSF1A*、*PARP6*、*OCIAD2*、*MST1R*、*GPR180* の DNA メチル化状態の定量的解析を行うため、バイサルファイトパイロシークエンシングを行った。肝芽腫 DNA 検体 500ng を、EpiTect® Bisulfite Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いてバイサルファイト処理したのち、PSQ96MA system (Biotage, Uppsala, Sweden) を用いてパイロシークエンシングを施行した。Polymerase chain reaction (PCR) のプライマーとシークエンシングプライマーを表 1 に示す。各遺伝子の隣接する複数個所の CpG サイトのメチル化率を Pyro Q-CpG software (Biotage, Uppsala, Sweden) を用いて解析し、その平均値を各遺伝子のメチル化率として検討に用いた。

表 1. バイサルファイトパイロシークエンシングに用いたプライマー

	Forward primer	Reverse primer	Sequencing primer
<i>RASSF1A</i>	GAAGGAGGGAAGGAAGGGTAAG	GCCTCCCCCAAATCCAA	TTGTATTTAGGTTTTTATTG
<i>PARP6</i>	GGAGTAGGTYGTTAGGTTGTTGGTT	CAAACCAAAAAACRAAAACRAACCTA	GGTTGTTGGTTAGGAG
<i>OCIAD2</i>	AGATAGGTGGGGTATTYGGGAAGT	CCRAAACRAAAACTCACCTATATAATC	TATTYGGGAAGTTGGAG
<i>MST1R</i>	TYGGTTGAGYGTTAAGYGTAGTGT	CCRACCCTCRAATCTAAACACCTAA	TTAAGCGTTAGTGTATAG
<i>GPR180</i>	TTGGTTTTAGGTTTTAGAGTAGTAGG	CATACCCRTCTCCAAATCTACACC	ATTTYGTTTTTTTTTAGTTGT

3. Real-Time Quantitative PCR (RT-qPCR)

肝芽腫 RNA 検体 22 例、正常肝 RNA 検体 2 例を用いて、*RASSF1A*、*PARP6*、*OCIAD2*、*MST1R* の発現状態を確認するために qPCR を行なった。北海道大学病院で切除された 2 症例については、肝芽腫凍結検体、対照の正常肝凍結検体より RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて Total RNA を抽出した。RNA 検体 200 ng を ReverTraAce (TOYOBO, Osaka, Japan) を用いて逆転写し、cDNA を作成した。cDNA 10 ng を用いて TB Green Premix Ex Taq II (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)、StepOne plus (Applied Biosystems, Foster City, CA) を使用して RT-qPCR を施行した。使用したプライマーを表 2 に示す。コントロールには β -アクチン (*ACTB*) を用い、 $\Delta\Delta$ Ct 法で解析した。実験は全て triplicate で行った。

表 2. qPCR に用いたプライマー

	Forward primer	Reverse primer
<i>RASSF1A</i>	GCAAGTTTGCACCTCTTTGAGC	CCTTCAGGACAAAGCTCAGG
<i>PARP6</i>	ACTGCACATCCACAGAGCAG	CTAGTCCCTGGGTGACAAGC
<i>OCIAD2</i>	TGATGAGCAGCATGTCTTCC	TGACGCCCAGTGTGTAGAAG
<i>MST1R</i>	CTCGCCTACCTGTGAAGTGG	GGTCAAAAGGGTCAATGTGG
<i>ACTB</i>	ACTCTTCCAGCCTTCCTTCC	AGCACTGTGTTGGCGTACAG

4. 統計学的解析

統計学的解析には、GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, CA)、及び EZR (Saitama Medical Center, Jichi Medical University, Saitama, Japan) (Kanda et al, 2013) を用いた。

予後予測に用いる各遺伝子のメチル化率の適切なカットオフ値を定めるために Receiver operating characteristics (ROC) 解析を行い、設定したカットオフ値に基づき、メチル化群と非メチル化群の 2 群に群別化した。Overall survival (OS) は、診断時から死亡または最終フォロー時までの期間とし、Event-free survival (EFS) は、診断時から初回再発、死亡、二次がんの発症、ないし最終フォロー時までの期間と定義した。OS、EFS 曲線は Kaplan-Meier 法を用いて作成し、Log-rank 検定を施行して比較検討を行なった。メチル化状態と臨床病理学的因子の関連は、Fisher の正確確率検定を用いて評価した。3 群に分けた年齢群におけるメチル化率の比較には、一元配置分散分析 (one-way ANOVA) を用い、各群間の比較には Bonferroni の多重比較を用いた。メチル化状態、臨床病理学的因子の OS、EFS との関連を評価するために Cox 回帰分析を行なった。単変量 Cox 回帰分析により有意差のあった項目を、多変量 Cox 回帰分析に用いた。2 群間の連続変数の比較には Mann-Whitney の U 検定を用いた。P 値は 0.05 未満を有意と評価した。

結 果

1. 患者背景

肝芽腫患者 132 名の臨床病理学的背景因子を表 3 に示す。JPLT-2 に組み込まれた全患者の 37%が本研究の対象となった (Hiyama E et al, 2020)。年齢の中央値は 18 ヶ月 (範囲: 0-177 ヶ月) であった。術前化学療法を受けなかった患者は 24 名 (18%) であり、残りの 108 名 (82%) は術前化学療法を施行されていた。CHIC-HS 各リスクグループの内訳は、超低リスク (VL) 17 名、低リスク (L) 57 名、中間リスク (I) 29 名、高リスク (H) 29 名であった。各々のリスクグループの 3 年 OS はそれぞれ 100%、94.7%、81.8%、65.0% (P=0.001) であり、3 年 EFS はそれぞれ 93.8%、83.8%、78.6%、51.7% (P=0.004) であった。

表 3. 肝芽腫患者 132 名の臨床病理学的背景

	Total (n=132)
Age, months (median, [range])	18 [0-177]
Age group	
<3 years	105
3-7 years	19
≥8 years	8
Sex (male / female)	76 / 56
Serum AFP, ng/mL (median, [range])	266,000 [110-7,653,000]
Serum AFP group	
≤100 ng/mL	0
101-1,000 ng/mL	5
>1,000 ng/mL	116
NA	11
Clinical classification: CHIC-HS (VL / L / I / H)	17 / 57 / 29 / 29
Preoperative chemotherapy (Y / N, %)	108 / 24 (82%)
Tumor characteristics	
PRETEXT stage (I / II / III / IV)	13 / 44 / 50 / 25

	Venous invasion (Y / N, %)	11 / 121 (9%)
	Portal invasion (Y / N, %)	6 / 126 (5%)
	Extrahepatic extension (Y / N, %)	2 / 130 (2%)
	Multifocality (Y / N, %)	19 / 113 (14%)
	Rupture (Y / N, %)	12 / 120 (9%)
	Metastasis at diagnosis (Y / N, %)	20 / 112 (15%)
Histology		
	Fetal / embryonal	23 / 11
	Mixed epithelial / mixed epithelial and mesenchymal / NA	43 / 16 / 39
	Follow-up, months (median, [range])	68 [0–174]
Outcome		
	Deaths (Y / N, %)	29 / 103 (22%)
	Cancer-related deaths or tumor recurrence (Y / N, %)	39 / 93 (30%)

AFP: alpha-fetoprotein, NA: non-available, CHIC-HS: Children's Hepatic Tumors International Collaboration-Hepatoblastoma Stratification (VL: very low, L: low, I: intermediate, H: high risk), PRETEXT: Pre-treatment extent of disease.

2. 5 遺伝子のメチル化率とカットオフ値の設定

RASSF1A, *PARP6*, *OCIAD2*, *MST1R*, *GPR180* 各遺伝子のメチル化率はそれぞれ 13.42% (範囲: 1.97-84.35%)、7.01% (0-65.38%)、5.91% (0-82.16%)、7.73% (0-81.62%)、1.61% (0-64.37%)であった。メチル化率の分布を図 4 に示す。

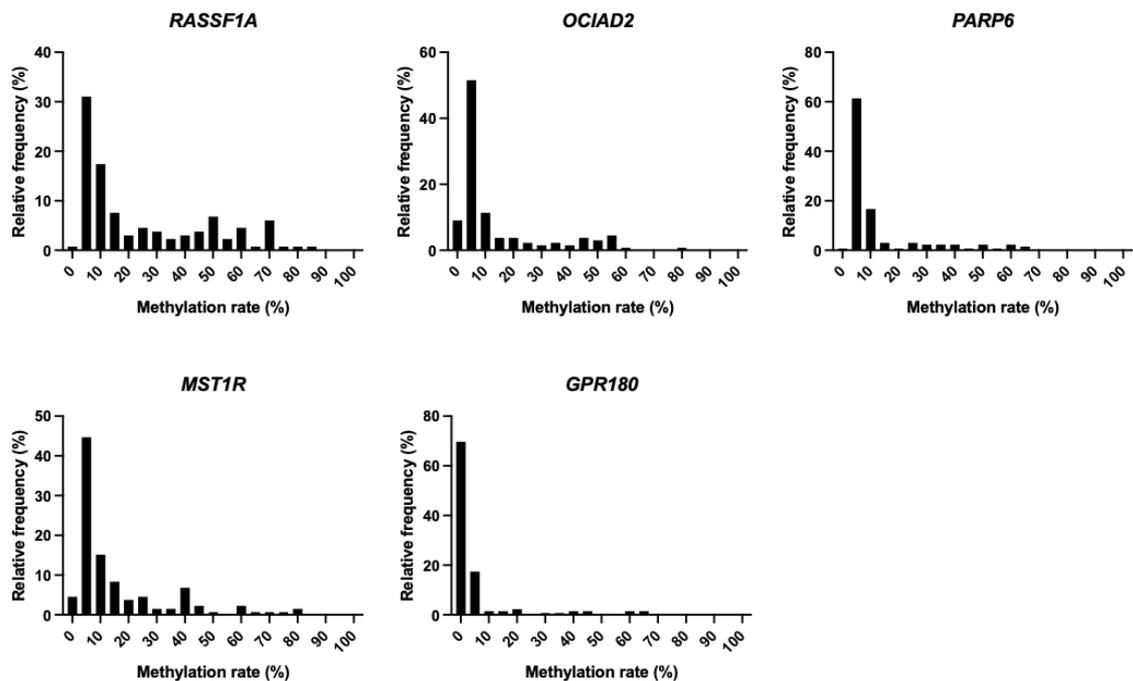
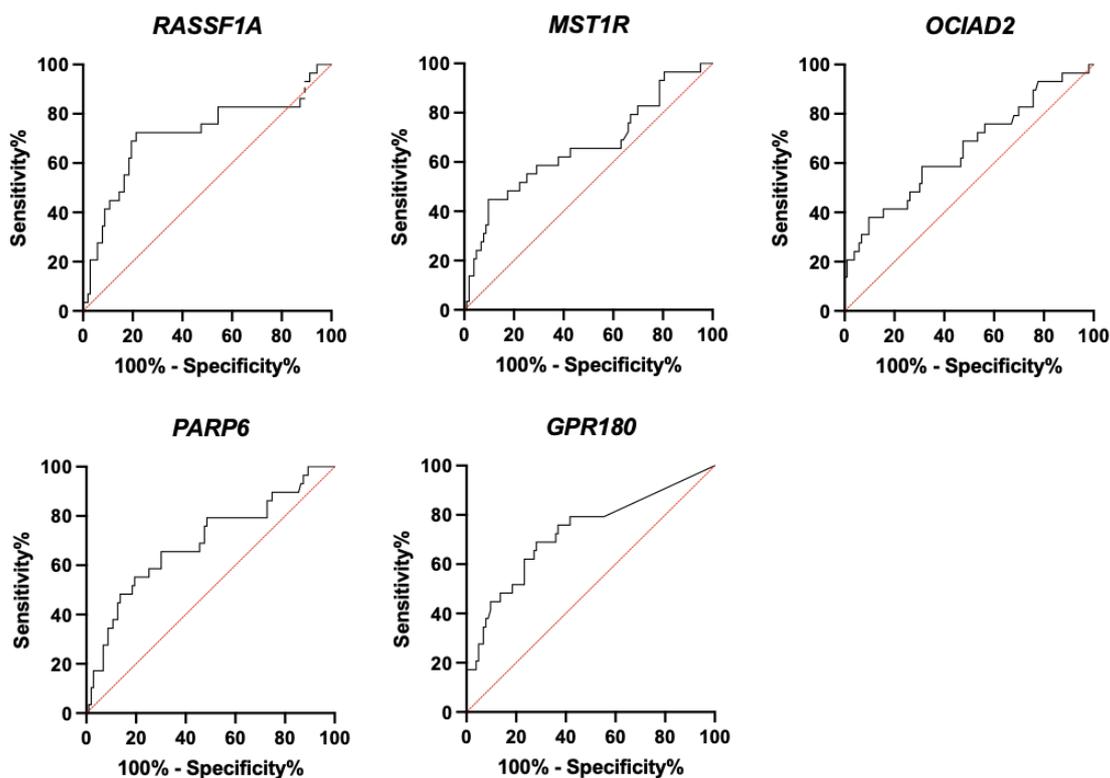


図 4.5 遺伝子のメチル化率の分布

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、その値は *RASSF1A*、*PARP6*、*OCIAD2*、*MST1R*、*GPR180* それぞれ、31.77、9.93、34.33、32.94、2.34 であった (図 5)。*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な値であったため (Murphy SK et al, 2012)、後の検討から除外することとした。カットオフ値に基づき、カットオフ値以上の症例をメチル化群、カットオフ値未満の症例を非メチル化群として群別化した。



	<i>RASSF1A</i>	<i>MST1R</i>	<i>OCIAD2</i>	<i>PARP6</i>	<i>GPR180</i>
AUC	0.717	0.659	0.655	0.692	0.727
95% CI	0.595–0.839	0.536–0.781	0.535–0.776	0.576–0.808	0.614–0.840
Cutoff	31.77	32.94	34.33	9.93	2.34

図 5.5 遺伝子の生存、死亡をアウトカムとしたメチル化率に基づく ROC 解析

3. メチル化状態と臨床病理学的因子との関連

各遺伝子のメチル化状態と臨床病理学的因子との関連を表 4 に示す。4 遺伝子全てにおいてメチル化群と年齢に有意な関連があった。*RASSF1A* の高メチル化は、PRETEXT IV、静脈浸潤、転移ありと有意な関連があった。*PARP6* の高メチル化は静脈浸潤、門脈浸潤、多中心性と有意な関連があり、*OCIAD2* の高メチル化は転移ありと有意な関連があった。何れの遺伝子も病理診断との有意な関連は認めなかった。年齢を 3 群に分類し、メチル化率との関係を検討したところ、何れの遺伝子においても 3 歳以上 7 歳以下では 2 歳以下に比べて有意に高いメチル化率を示しており、さらに *RASSF1A*、*PARP6*、*MST1R* では 3 歳以上 7 歳以下に比べて、8 歳以上の方が高いメチル化率を示したが、*MST1R* を除き有意差はなかった (図 6)。

表 4. 4 遺伝子のメチル化状態と臨床病理学的因子との関連

		<i>RASSF1A</i>			<i>MST1R</i>			<i>OCLAD2</i>			<i>PARP6</i>		
		M	U	<i>P</i> -value	M	U	<i>P</i> -value	M	U	<i>P</i> -value	M	U	<i>P</i> -value
		n=43	n=89		n=23	n=109		n=21	n=111		n=36	n=96	
	0-2	20	85		8	97		10	95		17	88	
Age group (years)	3-7	16	3	<0.001	9	10	<0.001	9	10	<0.001	14	5	<0.001
	≥8	7	1		6	2		2	6		5	3	
Sex	M	22	54	0.349	9	67	0.064	12	64	1	16	60	0.085
	F	21	35		14	42		9	47		20	36	
Serum AFP ≥1,000,000 ng/mL	Y	7	15	0.808	3	19	0.565	1	21	0.118	3	19	0.076
	N	36	63		20	79		20	79		33	66	
Preoperative chemotherapy	Y	37	71	0.474	17	91	0.370	18	90	0.764	28	80	0.457
	N	6	18		6	18		3	21		8	16	
Tumor characteristics:													
PRETEXT IV	Y	14	11	0.009	7	18	0.145	4	21	1	10	15	0.136
	N	29	78		16	91		17	90		26	81	
Venous invasion	Y	8	3	0.005	4	7	0.100	3	8	0.381	7	4	0.009
	N	35	86		19	102		18	103		29	92	
Portal invasion	Y	4	2	0.088	3	3	0.065	1	5	1	4	2	0.047
	N	39	87		20	106		20	106		32	94	
Extrahepatic extension	Y	2	0	0.104	0	2	1	0	2	1	1	1	0.473
	N	41	89		23	107		21	109		35	95	

Multifocality	Y	10	9	0.063	5	14	0.325	4	15	0.504	9	10	0.049
	N	33	80		18	95		17	96		27	86	
Rupture	Y	5	7	0.525	4	8	0.222	3	9	0.405	5	7	0.307
	N	38	82		19	101		18	102		31	89	
Metastasis at diagnosis	Y	14	6	<0.001	5	15	0.343	7	13	0.019	8	12	0.180
	N	29	83		18	94		14	98		28	84	
HB histology:													
	Fetal	6	17		5	18		1	22		7	16	
	Embryonal	4	7		2	9		2	9		4	7	
	Mixed epithelial	16	27	0.516	9	34	0.597	8	35	0.425	12	31	0.777
	Mixed epithelial and mesenchymal	3	13		16	15		28	14		3	13	
	NA	14	25		0	33		0	31		10	29	

P-values were calculated using Fisher's exact test.

AFP: alpha-fetoprotein, Y: yes, N: no, PRETEXT: PREtreatment EXTent of disease, NA: non-available, M: methylated, U: unmethylated, HB: hepatoblastoma.

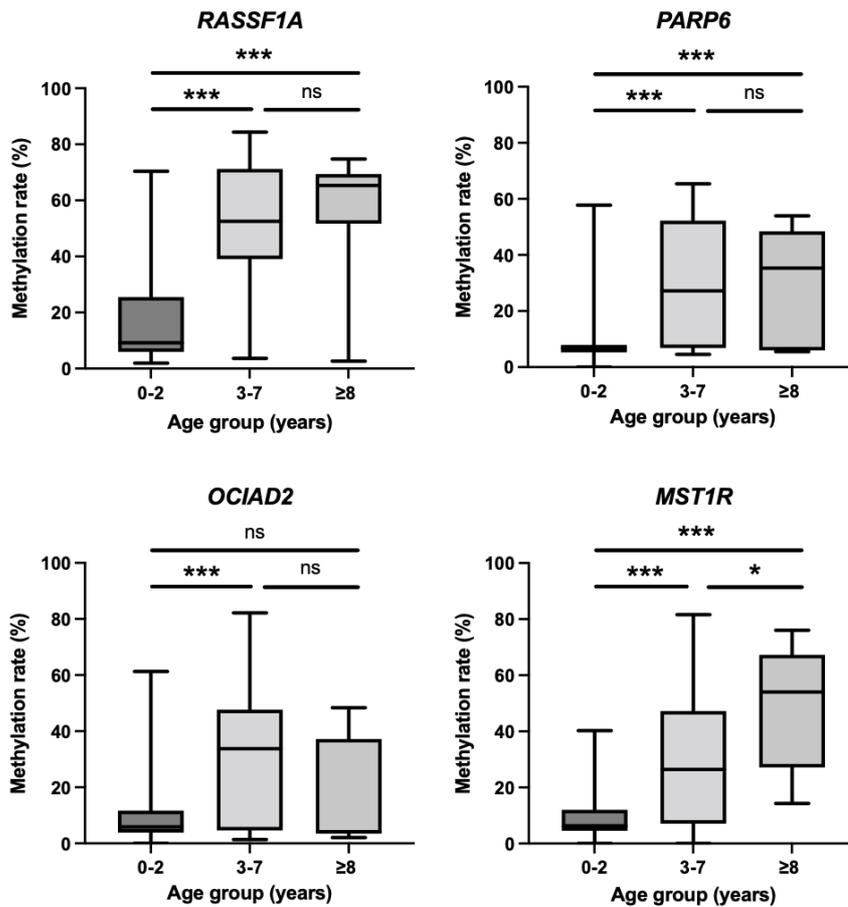


図6. メチル化率と年齢群の関連。Ns: 有意差なし、*: $P < 0.05$ 、**: $P < 0.01$ 、***: $P < 0.001$ 。

4. メチル化状態と予後との関連

Log-rank 検定の結果、*RASSF1A*、*PARP6*、*OCIAD2*、*MST1R*の高メチル化群は、何れも OS、EFS 共に有意に不良であった (図7)。

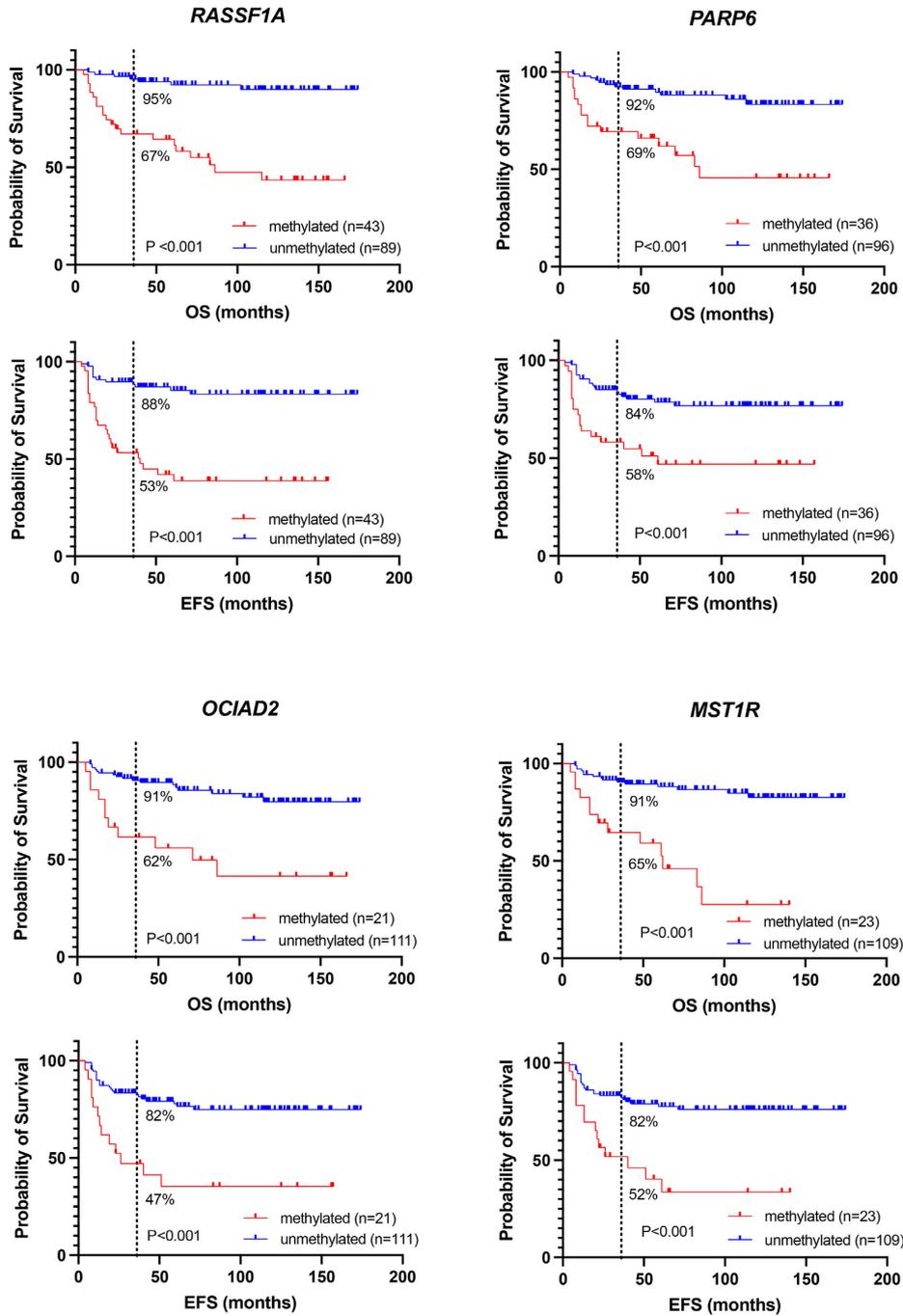


図 7.4 遺伝子の DNA メチル化状態に基づく OS (上段)、EFS (下段) に関する Kaplan-Meier 曲線。青線が非メチル化群、赤線がメチル化群を示す。波線は 3 年 OS、EFS を示す。

5. 高メチル化遺伝子数の評価の有用性

Log-rank 検定より、4 遺伝子のうち高メチル化した遺伝子を多く持つ症例ほど、段階的に予後不良であることが見出されたため (図 8A)、予後因子として高メチル化遺伝子数に着目し、生存・死亡をアウトカムとした ROC 解析からカットオフ値を 2 と設定して (AUC: 0.764, 95%CI: 0.661-0.868)、2 群に群別化し、Log-rank 検定により予後を検討したところ、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は有意に予後不良であった (図 8B)。

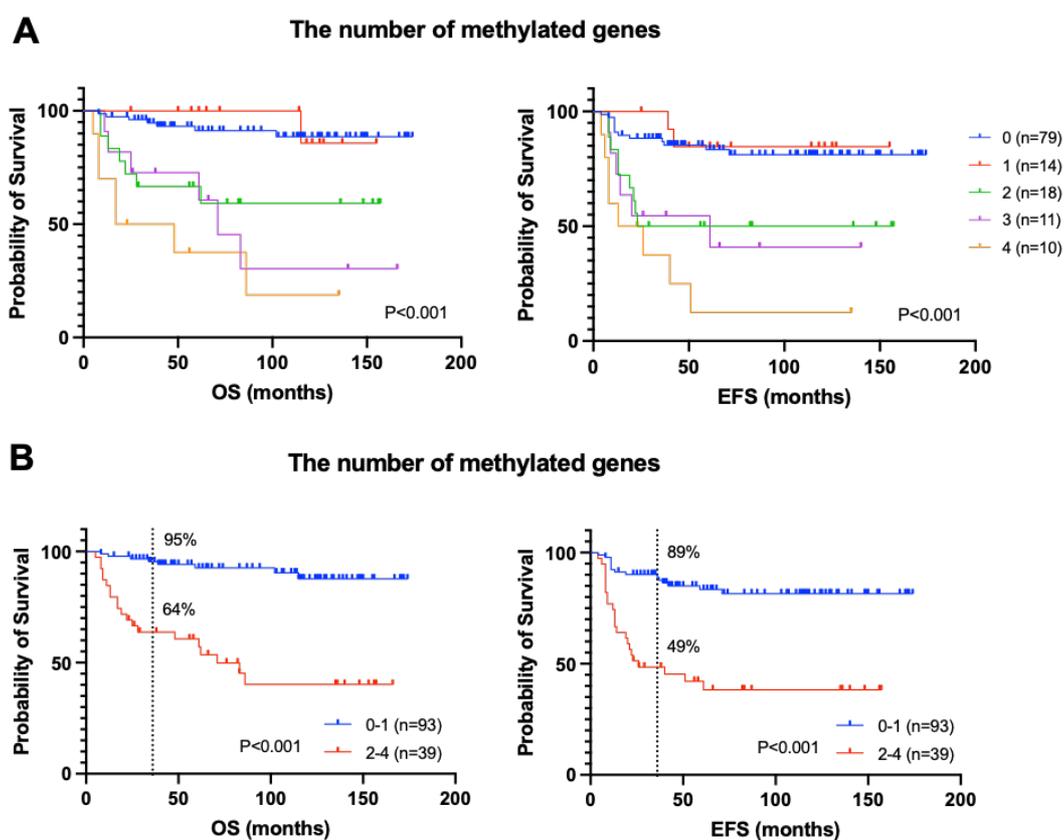


図 8. 高メチル化遺伝子数に基づく OS (左図)、EFS (右図) に関する Kaplan-Meier 曲線

A: 高メチル化遺伝子数に基づく Kaplan-Meier 曲線。高メチル化遺伝子を多く持つ症例ほど予後不良であった。

B: カットオフ値を 2 とした場合の Kaplan-Meier 曲線。高メチル化遺伝子を 2 個以上持つ群は有意に予後不良であった。

単変量 Cox 回帰分析の結果を Forest plot にして図 9 に示す。DNA メチル化解析に

基づく分子学的因子のハザード比は、既存の臨床的因子に比べて高い傾向があり、さらに単一遺伝子の DNA メチル化状態の評価に比べて、4 遺伝子を組み合わせた評価は OS に関して最も高いハザード比を示した (mean 7.005, range 3.177-15.45, $P < 0.001$)。

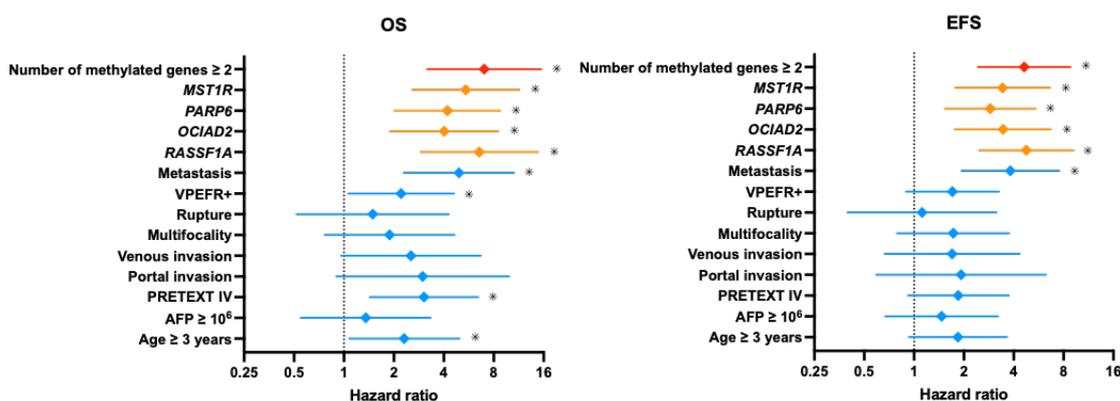


図 9. 単変量 Cox 回帰分析に基づく、DNA メチル化解析並びに臨床的因子の OS (左図)、EFS (右図) に関するハザード比の Forest plot。青線が臨床的因子、橙線が単一遺伝子の高メチル化、赤線が高メチル化遺伝子 2 個以上を示す。*: P 値 < 0.05 。

単変量 Cox 回帰分析で有意であった因子を組み込み、多変量 Cox 回帰分析を行ったところ、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 (表 5)。

表 5. 多変量 Cox 回帰分析

OS	HR	95% CI	Pvalue
Age \geq 3 years	0.574	0.219–1.505	0.259
Metastasis	2.351	1.029–5.372	0.043
VPEFR+	1.249	0.504–3.098	0.631
PRETEXT IV	1.923	0.837–4.419	0.124
Number of methylated genes \geq 2	6.014	2.367–15.28	<0.001

EFS	HR	95% CI	Pvalue
Metastasis	2.212	1.070–4.574	0.032
Number of methylated genes \geq 2	3.684	1.847–7.350	<0.001

HR: hazard ratio, CI: confidence interval, PRETEXT: PRETreatment EXTent of disease, VPEFR+: at least one of the PRETEXT annotation factors (involvement of hepatic vein, involvement of portal vein, extrahepatic tumor extension, multifocal liver tumor, and tumor rupture at diagnosis) was present.

6. CHIC-HS 各リスク群におけるサブグループ解析

CHIC-HS 各リスク群において、2 個以上高メチル化遺伝子を持つことの評価が有用であるか、Log-rank 検定を用いて群別比較を行うサブグループ解析を行った (図 10)。CHIC-HS VL/L 群において、2 個以上高メチル化遺伝子を持つ群は、OS、EFS 共に有意に予後不良であった (3 年 OS: 98% vs 83%, $P=0.011$, 3 年 EFS: 90% vs 66%, $P=0.0046$)。CHIC-HS I 群においては、2 個以上高メチル化遺伝子を持つ群が、有意に不良な OS を示し (3 年 OS: 95% vs 50%, $P=0.011$)、EFS に関しても不良な傾向を認めた (3 年 EFS: 90% vs 50%, $P=0.053$)。CHIC-HS H 群においては、OS、EFS 共に不良である傾向を認めたものの、共に有意差は無かった (3 年 OS: 79% vs 57%, $P=0.053$; 3 年 EFS: 80% vs 37%, $P=0.101$)。

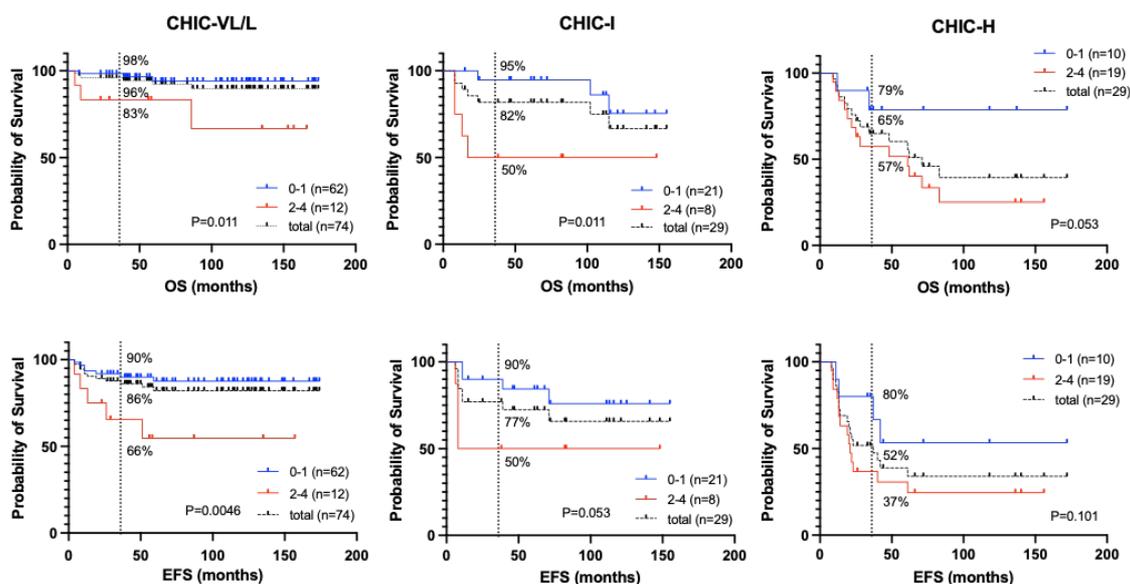


図 10. CHIC-HS 各リスク群における、高メチル化遺伝子数の評価に基づく OS (上段)、EFS (下段) に関する Kaplan-Meier 曲線。青線は高メチル化遺伝子数 0-1 個、赤線が 2 個以上、黒線が各群の症例全体を示す。波線は 3 年 OS、EFS を示す。

図 11 に肝芽腫全 132 症例の DNA メチル化状態と臨床病理学的因子を CHIC-HS 各リスク群毎に可視化したものを示す。例えば CHIC-HS において、臨床的予後不良因子を持たずに、低リスク群に層別化されながらも、死亡ないしイベントを認めた CHIC-HS L 群のカラムの左から 4 例が、DNA メチル化解析により予後不良群として選別できており、DNA メチル化解析がこれらの症例の治療を適正化し得ると考えられる。

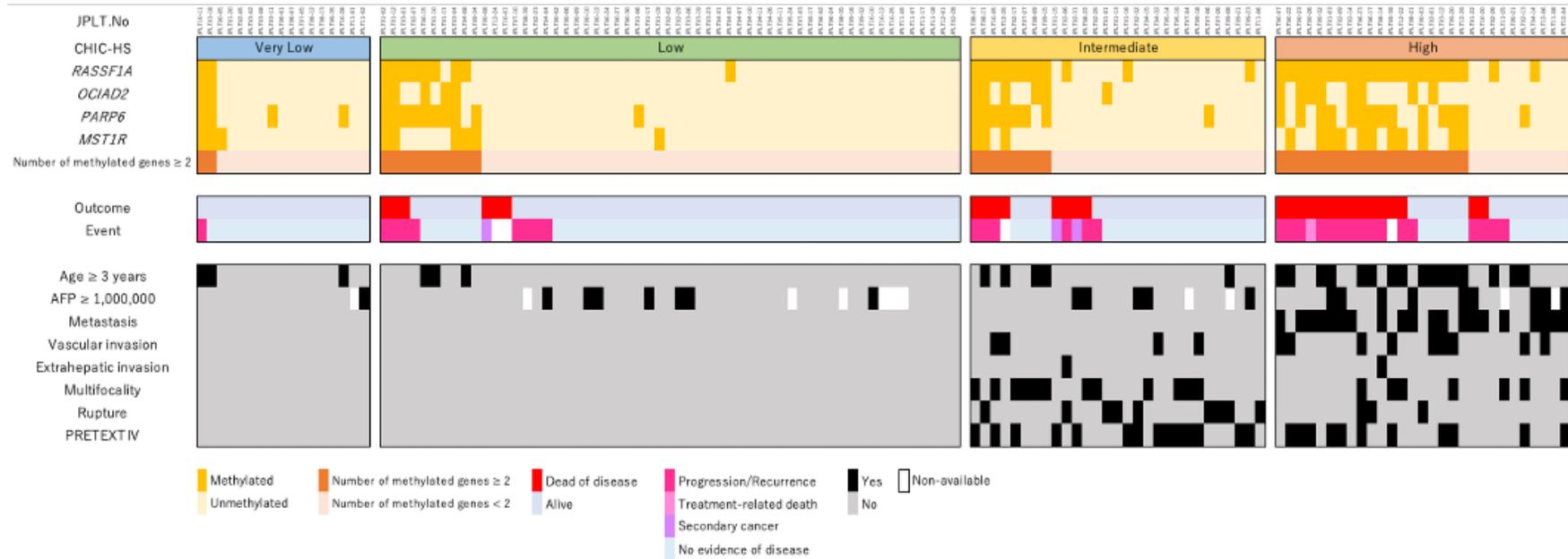


図 11. 肝芽腫 132 例の DNA メチル化状態と臨床的因子。上段が DNA メチル化状態、中段が予後、下段が臨床的因子を示す。

7. 新規リスク分類: methylation based CHIC-HS (mCHIC-HS)

CHIC-HS に DNA メチル化状態の評価を組み込んだ新規分類として、Methylation-based CHIC-HS (mCHIC-HS) を作成した。図 12 に新規分類のアルゴリズムを示す。これは CHIC-HS VL/L 群、I 群を対象として 4 遺伝子の DNA メチル化解析を行い、2 個以上高メチル化した遺伝子を持つ症例をより上位のリスク群に層別化するものである。

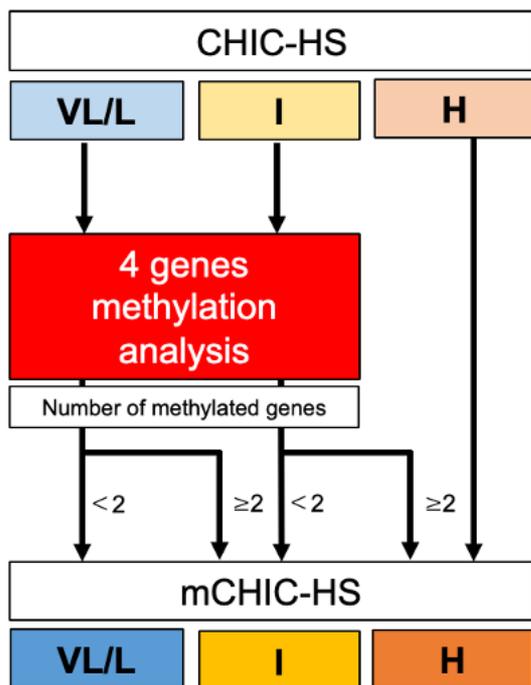


図 12. 新規分類のアルゴリズム

図 13 に CHIC-HS と mCHIC-HS の各リスク群の OS、EFS に関する Kaplan-Meier 曲線を示す。mCHIC-HS に従い再分類された mCHIC-HS VL/L 群の 3 年 OS は 96%から 98%へと向上し、患者集団は 74 名から 62 名へと縮小し、より予後の良い集団へと再定義された。一方、mCHIC-HS H 群の 3 年 OS は 65%から 62%へと低下し、患者集団は 29 名から 37 名へと増加し、より予後の悪い集団へと再定義された。mCHIC-HS の 3 年 OS、EFS に関する AUC はそれぞれ 0.817 (95%CI: 0.725-0.908)、0.731 (95%CI: 0.626-0.836)であり、CHIC-HS の AUC がそれぞれ 0.762 (95%CI: 0.649-0.876)、0.687 (95%CI: 0.569-0.804)であったのに比べて高かったが、有意差はなかった (P=0.087、P=0.128)。

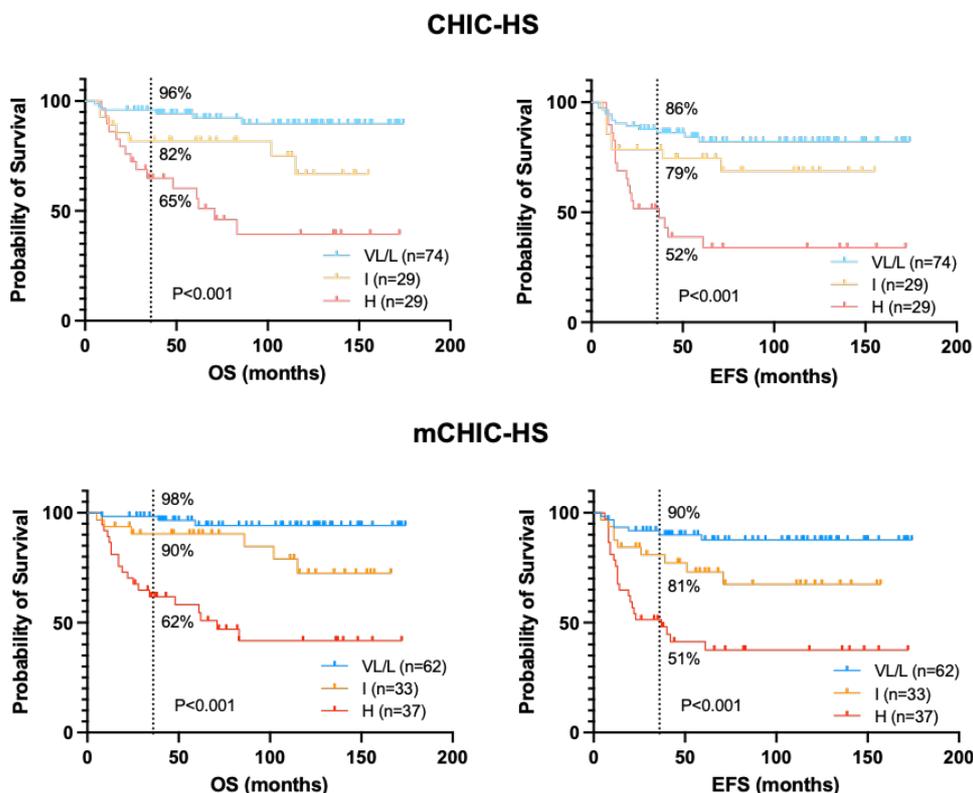


図 13. CHIC-HS (上段)、mCHIC-HS (下段) に基づく OS (左列)、EFS (右列) に関する Kaplan-Meier 曲線。青線が超低リスク/低リスク群、橙線が中間リスク群、赤線が高リスク群を示す。波線は 3 年 OS、EFS を示す。

8. 4 遺伝子の臨床検体における発現状態と DNA メチル化状態の関連

JPLT より供与された肝芽腫 RNA 検体 20 例と当院で治療された肝芽腫 RNA 検体 2 例、同症例の正常肝部より抽出された RNA 検体 2 例を用いて、RT-qPCR により、*RASSF1A*、*PARP6*、*OCIAD2*、*MST1R* の 4 遺伝子の mRNA の発現状況を評価し、DNA メチル化率との関連を検討した。

発現状態と DNA メチル化率の相関関係を評価したところ、*PARP6*、*OCIAD2* では発現とメチル化率の有意な負の相関関係を認めしたが、*RASSF1A*、*MST1R* では有意な相関関係を認めなかった (図 14)。予測モデルに用いたカットオフ値を用いてメチル化群と非メチル化群に群別化し、各遺伝子の発現状態の比較を行ったところ、同様に *PARP6*、*OCIAD2* では、メチル化群で有意に発現低下が見られたが、*RASSF1A*、*MST1R* では 2 群間に有意差を認めなかった (図 15)。

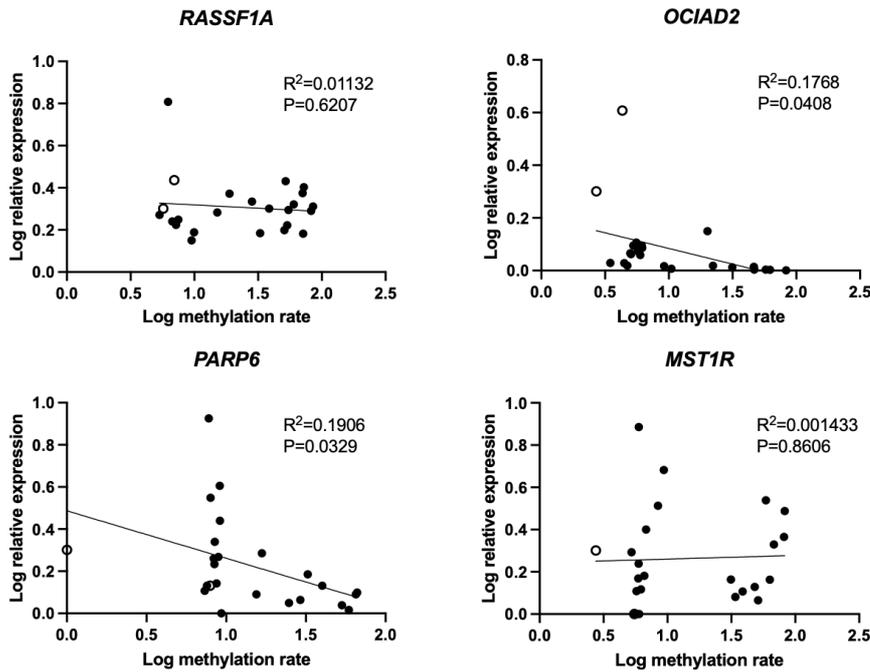


図 14. 各遺伝子の mRNA の発現状態とメチル化率の相関。黒丸が肝芽腫検体、白丸が正常肝を示す。

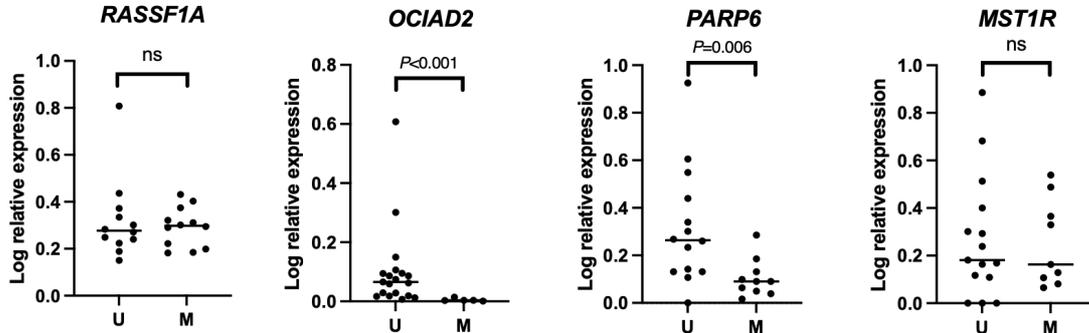


図 15. 各遺伝子のメチル化群、非メチル化群における mRNA の発現状態の比較。

9. 化学療法の有無による DNA メチル化状態の比較と、化学療法前後における DNA メチル化状態の比較

化学療法の有無が、DNA メチル化状態に影響を及ぼしているか確認するため、4 遺伝子のメチル化率を、術前化学療法の有無に基づき 2 群間で比較したところ、メチル化率に有意差はなかった (図 16)。

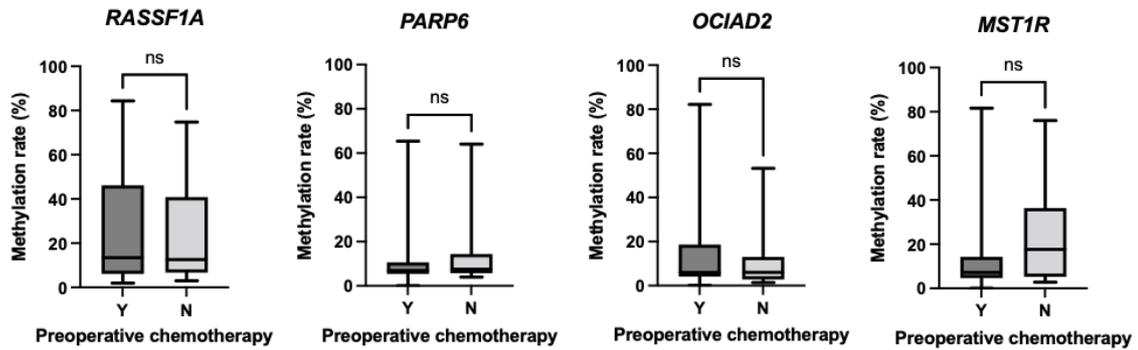


図 16. 術前化学療法の有無によるメチル化率の比較。Y: 術前化学療法あり、N: 術前化学療法なし。

さらに、Nagae ら (Nagae et al, 2021) が JPLT-2 の術前化学療法前の生検検体を用いて行った網羅的 DNA メチル化解析の報告から、本研究にて解析したサンプルと重なる 59 例を抽出し、その β 値と本研究において測定した術前化学療法後の切除検体の解析から得られたメチル化率との相関を検討したところ、4 遺伝子全てにおいて高い相関関係が得られた (図 17)。

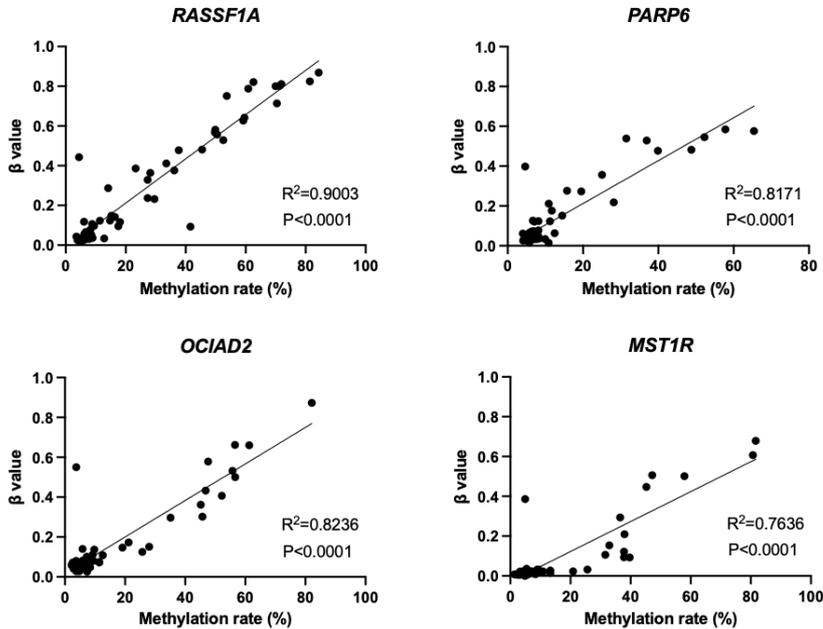


図 17. 同一症例における生検検体の網羅的メチル化解析の β 値と化学療法後切除検体のメチル化率の相関関係。

10. 化学療法前検体の網羅的 DNA メチル化解析データを用いた validation

Nagae ら (Nagae et al, 2021) の網羅的 DNA メチル化解析 136 例のデータから、本研究で検討した 4 遺伝子の β 値を元に、本研究で用いたカットオフ値を用いて、メチル化群と非メチル化群に群別化し、その OS を Log-rank 検定で比較したところ、何れの遺伝子においてもメチル化群で不良であり、本研究と同様の結果となった (図 18)。

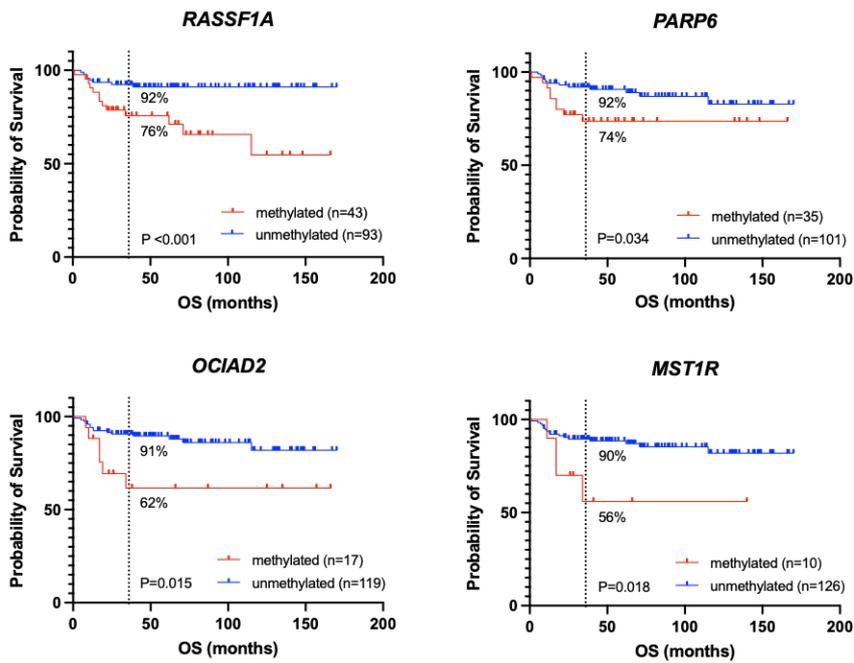


図 18. 生検検体におけるメチル化群と非メチル化群の予後比較。波線は 3 年 OS を示す。

考 察

本研究において、*RASSF1A*、*PARP6*、*OCIAD2*、*MST1R*のDNAメチル化状態の評価が、有用な分子学的予後マーカーとして使用可能であることが、日本における多数検体を用いて確認された。また興味深いことに、これらの高メチル化遺伝子を多く持つ症例ほど予後不良であった。高メチル化遺伝子を2個以上持つことは、Log-rank 検定、多変量Cox回帰分析より、既存の臨床的因子と独立した強い予後因子であることが確認され、これをCHIC-HSに組み込むことで、層別化を適正化し得ることが示された。

今回の検討において、各遺伝子の高メチル化と年齢に有意な関係があった。診断時の年齢の高さは、肝芽腫の重要な臨床的予後因子として知られており、3歳以上、8歳以上と年齢が高くなるほど予後不良となることが示されている (Czaudera et al, 2016)。加齢はメチル化異常を誘導する因子の一つとされていることから (Ushijima et al, 2005)、年齢が予後因子とされていることの分子学的背景の一つとして、加齢によるメチル化が関与している可能性が考えられた。年齢群が高くなる程、メチル化率が高くなる傾向が確認されたことも、これを示唆する結果と言える。

今回、4遺伝子の発現解析の検討から、*PARP6*、*OCIAD2*においてはメチル化率と発現の負の相関関係、有意差を持った高メチル化群における発現低下を認めた。肝芽腫の悪性化に、これらのがん抑制遺伝子の高メチル化、発現低下が関わっていることが示唆された。今回の検討で、*RASSF1A*、*MST1R*においては同様の関係が見出されなかった。*RASSF1A*に関しては、過去にMethylation specific PCRとRT-PCRの結果から、高メチル化と発現の負の相関関係が示されている (Honda et al, 2008)。この差異には、今回検討したCpG siteが直接発現低下に関わっている部位ではない可能性がある (Koch et al, 2018)。また、今回用いたRNA検体は、中央のバンキング施設において抽出されたもので、バイオアナライザーによるクオリティチェックができていないため、品質の影響も考えられる。希少検体で症例数も少なかったため、今後改めて検討すべき余地があると考え、同部位のCpG siteのメチル化率の評価が予後マーカーとして有用であることは疑い得ない。

近年、CHIC-HSに分子学的予後因子を組み込んだ報告がなされている。一つはCarrillo-Reixachらによるもので、彼らは、網羅的発現解析、網羅的メチル化解析の結果から、14q32 DLK1-DIO3領域に存在するmiRNA遺伝子群の高発現と、Epigenetic-Cluster B (Epi-CB) と呼称する特定のメチル化傾向が予後不良因子となることを報告した。さらに、これらの因子の有無からMolecular risk stratification (MRS) -1、MRS-2、MRS-3の3群に群別化し、これとCHIC-HSを組み合わせ、

低リスク、中間リスク、高リスクの3群に分ける層別化モデルを提唱した (Carrillo-Reixach et al, 2020) 。Epi-CB は、CpG アイランドの高メチル化により特徴付けられるグループであるが、本研究も各遺伝子のプロモーター周囲の CpG アイランドのメチル化率を検討していることから、高メチル化した4遺伝子の組み合わせの評価が、先の研究で示されているようなハイリスク肝芽腫に特有のメチル化傾向を反映することで、予後因子として機能しているものと考えられた。一方、Cairo らは CHIC-HS に16 遺伝子の qPCR に基づく発現状態の評価を組み合わせたモデルを報告している (Cairo et al, 2020) 。これは CHIC-HS I 群、CHIC-HS H 群に対して16 遺伝子の発現検討を行い、この2群を中間リスク群 (IR-C1)、高リスク群 (HR-C2) に再層別化するものである。これにより高リスク群から低リスク患者を拾い上げることで、不必要な高強度の治療の低減化に寄与するとしている。

本研究において、CHIC-HS を適正化すべく、mCHIC-HS と呼称する、バイサルファイトパイロシークエンシング法による DNA メチル化率の定量的解析に基づく新規分類を提唱した。図 11 にも示したように、本研究におけるコホートにおいても、臨床的因子のみで形成された CHIC-HS によれば、生物学的には予後不良な腫瘍でありながらも VL、L 群に分類され、予後良好群として不十分な治療を受けうる症例が存在している。しかし、mCHIC-HS ではこれらの症例をメチル化解析により抽出し、I 群として再定義することで、十分な治療強度が担保可能となり得る。同様に I 群の中に存在するよりハイリスクな症例に対し、H 群相当の治療強度を提供することが可能となる。

先に示した先行研究 (Cairo et al, 2020; Carrillo-Reixach et al, 2020) と比較して、本研究の主に異なる点、利点を述べる。一つは解析に用いるモダリティであり、パイロシークエンサーによる DNA メチル化解析を基礎としている点である。バイサルファイトパイロシークエンシング法は、高い定量性、再現性のある手法であり (Tost J et al, 2003) 、実臨床に応用する際にも信頼できる検査手法である。また、検体として安定性の高い DNA を用いる点で、不安定な RNA を用いた解析に比べて有利である。これは、実際に臨床応用する際には、中央診断施設において送付された生検検体から DNA を抽出し、解析することになると予想されるためである。また、網羅的解析に比べてコストの点で導入のハードルが低いことも利点となり得る。網羅的解析に要する費用も徐々に低下傾向であるが、依然として高価な手法であることは間違いない。1 検体あたり、4 遺伝子の検討を行っても、そのコストは網羅的解析の 1%程度にしかならないと見積もっている。検討すべき遺伝子数が4つと少ないことも、コストの点、予測モデルとして煩雑とならない点で有利である。

次に、本研究のモデルが、低リスク患者から高リスク患者を層別化する点を重視したモデルである点である。Cairo ら (Cairo et al, 2020) のモデルは、高リスク群の治

療低減に重きが置かれており、低リスク群の層別化には至っていないため、本研究のモデルと組み合わせることで、さらに適切なモデルを形成することができるかもしれない。

しかしながら、本研究にはいくつかの制限があった。まず、本研究が後方視的研究であることである。それゆえ、JPLT-2 で収集された付記因子の定義 (Hishiki et al, 2011) と、CHIC-HS で採用された付記因子の定義が異なる (Towbin et al, 2018)。例えば血管浸潤に関して、CHIC-HS では血管を腫瘍が 180 度以上取り巻く場合には陽性とされるが、JPLT-2 ではこれは陽性としないため、本研究において JPLT-2 のデータから CHIC-HS L 群として分類した症例の中に、CHIC-HS では本来 I 群に相当する症例が含まれている可能性がある。

次に、解析に用いられた全検体の 82% に相当する症例が、術前化学療法を施行されており、DNA メチル化状態に影響を与えている可能性がある。このモデルを実臨床に応用する場合には、化学療法の影響を受けていない生検材料を用いることが想定されるため、今回の検討を直接当てはめることはできず、化学療法の修飾を受けていない検体での validation が必要になると思われる。しかし本研究において、4 遺伝子のメチル化率を術前化学療法の有無に基づき 2 群間で比較したところ、メチル化率に有意差はなかった。さらに、JPLT-2 における術前化学療法前の生検検体を用いて行った網羅的 DNA メチル化解析に基づく β 値と、本研究における術前化学療法後の切除検体の解析から得られたメチル化率には、4 遺伝子全てにおいて高い相関関係が得られた。加えて、術前化学療法前の網羅的 DNA メチル化解析のデータに基づいて、4 遺伝子のメチル化状態の評価が予後因子となり得るか validation を行ったところ、4 遺伝子の高メチル化群が、いずれも有意に予後不良な転帰を遂げており、本研究の結果を改めて確認できる結果となった。以上の成果から、本研究で得られた予後予測マーカーは、生検検体で validation した際にも、その有用性を確認できるものと考えている。

最後に、本研究では層別化された集団に対して、特異的な治療の提案には至っておらず、治療強度の強化を提案するのみに留まっており、この点に関しては今後の前向き研究における更なる検討を要する。

結 論

1. 肝芽腫において *RASSF1A*, *PARP6*, *OCIAD2*, *MST1R* の DNA メチル化状態の評価は、有用な分子学的予後マーカーとして使用可能であることが、多数検体で確認された。
2. 4 遺伝子のうち 2 個以上の高メチル化遺伝子を持つことが、既存の臨床的因子と独立した強い予後因子であった。
3. DNA メチル化解析を CHIC-HS に組み込んだ新規分類が、さらに層別化を適正化し得ることが示された。

本研究において、*RASSF1A*, *PARP6*, *OCIAD2*, *MST1R* の高メチル化が、分子学的予後マーカーとしての有用性が、多数検体で示された。また、これら 4 遺伝子の組み合わせの評価は、単一遺伝子の評価に比べて強力な予後因子として既存の臨床的因子とは独立した因子であり、高悪性肝芽腫に特有なメチル化状態をこれら遺伝子の組み合わせが反映しているものと考えられた。肝芽腫の悪性化に、これら 4 つのがん抑制遺伝子の高メチル化による発現低下の関与が推察されたが、有意差を持って発現低下を認めたのは *PARP6*, *OCIAD2* のみであった。

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、臨床的因子のみで低リスクと層別化された群から、予後不良な症例を抽出することが可能であり、新規分類 (mCHIC-HS) の 3 年 OS、EFS に関する AUC は、CHIC-HS に比べて高値であった。mCHIC-HS は、実臨床への応用実現性が高く、これにより、さらに適切な過不足ない強度の治療提供が可能となり得る。

今後、このモデルの有用性を、生検材料を用いて前向きに検討し、次に企画される国際共同研究の層別化モデルとして組み込んでいきたい。層別化された治療群に対して過不足のない治療を行うことは今後の課題であり、本研究で層別化された群の発現プロファイルの比較検討などから、選択可能な分子標的薬を選別し新規治療薬を見出していく試みが必要である。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、研究の御指導やパイロシークエ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、肝芽腫検体や臨床情報を提供頂きました広島大学自然科学研究支援開発センター 檜山英三教授ならびに JPLT 参加施設の皆様、網羅的メチル化解析データを供与下さった東京大学先端科学技術研究センター 永江玄太特任准教授、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、北海道大学病院消化器外科 I 本多昌平講師をはじめ、同教室の先生方や学術研究員の皆様に、厚く御礼申し上げます。

本研究は、日本学術振興会 科学研究費助成事業 (Grant Numbers 18K16250 and 18K07781)、上原記念生命科学財団、武田科学振興財団、および榆刀会外科基金より研究助成を得て行われました。

利益相反

本研究に関して、研究にバイアスをもたらす可能性のある利害関係（金銭的・個人的関係）はありません。

引用文献

Brown J, Perilongo G, Shafford E, Keeling J, Pritchard J, Brock P, Dicks-Mireaux C, Phillips A, Vos A and Plaschkes J (2000) Pretreatment prognostic factors for children with hepatoblastoma -results from the International Society of Paediatric Oncology (SIOP) Study SIOPEL 1. *Eur J Cancer* 36, 1418–1425.

Buendia MA (2014) Unravelling the genetics of hepatoblastoma: few mutations, what else? *J Hepatol* 61, 1202–1204.

Cairo S, Armengol C, De Reyniès A, Wei Y, Thomas E, Renard CA, Goga A, Balakrishnan A, Semeraro M, Gresh L, et al (2008) Hepatic stem-like phenotype and interplay of Wnt/beta-catenin and Myc signaling in aggressive childhood liver cancer. *Canc Cell* 14, 471–484.

Cairo S, Armengol C, Maibach R, Häberle B, Becker K, Carrillo-Reixach J, Guettier C, Vokuhl C, Schmid I, Buendia MA, et al (2020) A combined clinical and biological risk classification improves prediction of outcome in hepatoblastoma patients. *Eur J Cancer* 141, 30–39.

Carrillo-Reixach J, Torrens L, Simon-Coma M, Royo L, Domingo-Sabat M, Abril-Fornaguera J, Akers N, Sala M, Ragull S, Arnal M, et al (2020) Epigenetic footprint enables molecular risk stratification of hepatoblastoma with clinical implications. *J Hepatol* 73, 328–341.

Cui X, Liu B, Zheng S, Dong K, Dong Rui (2016) Genome-wide analysis of DNA methylation in hepatoblastoma tissues. *Oncol Lett* 12, 1529–1534.

Czauderna P, Häberle B, Hiyama E, Rangaswami A, Krallo M, Maibach R, Rinaldi E, Feng Y, Aronson D, Malogolowkin M, et al (2016) The children's hepatic tumors international collaboration (CHIC): novel global rare tumor database yields new prognostic factors in hepatoblastoma and becomes a research model. *Eur J Cancer* 52, 92–101.

Eichenmüller M, Trippel F, Kreuder M, Beck A, Schwarzmayr T, Häberle B, Cairo S, Leuschner I, von Schweinitz D, Strom TM, et al (2014) The genomic landscape of hepatoblastoma and their progenies with HCC-like features. *J Hepatol* 61, 1312–1320.

Gröbner SN, Worest BC, Weischenfeldt J, Buchhalter I, Kleinheinz K, Rudneva VA, Johann PD, Balasubramanian GP, Segura-Wang M, Brabetz S, et al (2018) The landscape of genomic alterations across childhood cancers. *Nature* 559, E10.

Haeberle B, Schweinitz DV (2012) Treatment of hepatoblastoma in the German cooperative pediatric liver tumor studies. *Front Biosci (Elite Ed)* 4, 493–498.

Hishiki T, Matsunaga T, Sasaki F, Yano M, Ida K, Horie H, Kondo S, Watanabe K, Oue T, Tajiri T, et al (2011) Outcome of hepatoblastomas treated using the Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor (JPLT) protocol-2: report from the JPLT. *Pediatr Surg Int* 27, 1–8.

Hiyama E, Hishiki T, Watanabe K, Ida K, Ueda Y, Kurihara S, Yano M, Hoshino K, Yokoi A, Takama Y, et al (2020) Outcome and late complications of hepatoblastomas treated using the Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor 2 protocol. *J Clin Oncol* 38, 2488–2498.

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.

Hooks KB, Audoux J, Fazli H, Lesjean S, Ernault T, Dugot-Senant N, Leste-Lasserre T, Hagedorn M, Rousseau B, Danet C, et al (2018) New insights into diagnosis and therapeutic options for proliferative hepatoblastoma. *Hepatology* 68, 89–102.

Kanda Y (2013) Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* 48, 452–458.

Koch A, Joosten SC, Feng Z, de Ruijter TC, Draht MX, Melotte V, Smits KM, Veeck J, Herman JG, Neste LV, et al (2018) Analysis of DNA methylation in cancer: location revisited. *Nat Rev Clin Oncol* 15, 459–466.

Klustein M, Nejman D, Greenfield R, Cedar H (2016) DNA methylation in cancer and aging. *Cancer Res* 76, 3446–3450.

London WB, Castel V, Monclair T, Ambros PF, Pearson A, Cohn SL, Berthold F, Nakagawara A, Ladenstein RL, Iehara T, et al (2011) Clinical and biologic features predictive of survival after relapse of neuroblastoma: a report from the international neuroblastoma risk group project. *J Clin Oncol* 29, 3286–3292.

Malogolowkin MH, Katzenstein H, Krailo MD, Chen Z, Bowman L, Reynolds M, Finegold M, Greffe B, Rowland J, Newman K, et al (2006) Intensified platinum therapy is an ineffective strategy for improving outcome in pediatric patients with advanced hepatoblastoma. *J Clin Oncol* 24, 2879–2884.

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, et al (2016) DNA methylation landscape of hepatoblastomas reveals arrest at early stages of liver differentiation and cancer-related alterations. *Oncotarget* 58, 97871–97889.

McLaughlin CC, Baptiste MS, Schymura MJ, Nasca PC, Zdeb MS (2006) Maternal and infant birth characteristics and hepatoblastoma. *Am J Epidemiol* 163, 818–828.

Meyers RL, Maibach R, Hiyama E, Häberle B, Krailo M, Rangaswami A, Aronson DC, Malogolowkin MH, Perilongo G, von Schweinitz D, et al (2017) Risk-stratified staging in paediatric hepatoblastoma: a unified analysis from the Children's Hepatic tumors International Collaboration. *Lancet Oncol* 18, 122–131.

Monclair T, Brodeur GM, Ambros PF, Brise HJ, Cecchetto G, Holmes K, Kaneko M, London WB, Matthay KK, Nuchtern JG, et al (2009) The international neuroblastoma risk group (INRG) staging system : an INRG task force report. *J Clin Oncol* 27, 298–303.

Murphy SK, Huang Z, Hoyo C (2012) Differentially methylated regions of imprinted genes in prenatal, perinatal and postnatal human tissues. *PLOS ONE* 7, e40924.

Nagae G, Yamamoto S, Fujita M, Fujita T, Nonaka A, Umeda T, Fukuda S, Tatsuno K, Maejima K, Hayashi A, et al (2021) Genetic and epigenetic basis of hepatoblastoma diversity. *Nat Commun* 12, 5423.

Perilongo G, Maibach R, Shafford E, Brugieres L, Brock P, Morland B, de Camargo B, Zsiros J, Roebuck D, Zimmermann A, et al (2009) Cisplatin versus cisplatin plus doxorubicin for standard-risk hepatoblastoma. *N Engl J Med* 361, 1662–1670.

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

Spector LG, Birch J (2012) The epidemiology of hepatoblastoma. *Pediatr Blood Cancer* 59, 776–779.

Tost J, Dunker J, Gut IG (2003) Analysis and quantification of multiple methylation variable positions in CpG islands by pyrosequencing. *Biotechniques* 35, 152–156.

Towbin AJ, Meyers RL, Woodley H, Miyazaki O, Weldon CB, Morland B, Hiyama

E, Czauderna P, Roebuck DJ and Tiao GM (2018) 2017 PRETEXT: radiologic staging system for primary hepatic malignancies of childhood revised for the Paediatric Hepatic International Tumour Trial (PHITT). *Pediatr Radiol* 48, 536–554.

Ushijima T, Okochi-Takada E (2005) Aberrant methylations in cancer cells: where do they come from? *Cancer Sci* 96, 206–211.

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

Zhong Y, Solinas A, Cairo S, Evert M, Chen X, Calvisi DF (2021) Molecular mechanisms of hepatoblastoma. *Semin Liver Dis* 41, 28–41.