



|                     |   |
|---------------------|---|
| Title               | 肝芽腫におけるOCIAD2の機能解析 [論文内容及び審査の要旨]  |
| Author(s)           | 湊, 雅嗣   |
| Description         | 配架番号 : 2860   |
| Degree Grantor      | 北海道大学   |
| Degree Name         | 博士(医学)  |
| Dissertation Number | 甲第15926号  |
| Issue Date          | 2024-03-25  |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/92213">https://hdl.handle.net/2115/92213</a>                       |
| Rights(URL)         | <a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a> |
| Type                | doctoral thesis   |
| File Information    | MINATO_Masashi_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 湊 雅嗣

## 学位論文題名 肝芽腫における OCIAD2 の機能解析 (Functional analysis of OCIAD2 in Hepatoblastoma)

### 要旨

#### 【背景と目的】

小児に発症する肝悪性腫瘍のなかで、最も多くを占めるのが肝芽腫であり、小児3大固形腫瘍のひとつとされている。その発生頻度は非常に稀で、数万人に1人の発症である。治療は外科的切除を基本とし、化学療法を組み合わせることで肝芽腫全体の予後は5年無病生存率で74%程度に5年全生存率は90%程度に改善した。しかし、遠隔転移を有する例や、再発症例などでは依然予後が不良である。このような難治例に対する治療成績の向上のためには、個々の症例に適した個別化治療が必要であるが、そのためには有効な予後予測によって治療方針を決定する必要がある。分子生物学的な発生機序の全容は判明しておらず、有効な分子標的薬や予後予測因子として使用できるバイオマーカーに確立されたものがないのが現状である。

肝芽腫においては、多くの症例でβカテニンをコードしている CTNNB1 遺伝子の変異を認め、その結果おこるβカテニンの蓄積が肝芽腫発症に関与していることが知られているが、肝芽腫症例の悪性度や進展度の個体差の説明には不十分である。近年行われた網羅的な Genomic 解析からも、新しい有用な知見は得られておらず、Genomic 異常でない機序、つまり Epigenetic な要因を考える必要があると考えた。われわれのグループは、Epigenetic 異常として DNA のメチル化異常に焦点をあて研究を行い、癌抑制遺伝子である RASSF1A プロモーター領域の異常メチル化が独立した予後予測因子となることや IGF2 プロモーター領域の異常メチル化が癌化に関与していることを見出した。メチル化の関与が証明されたところで、さらにメチル化異常の網羅的解析を行い、肝芽腫症例の予後予測因子となる4つの異常メチル化遺伝子を特定した。これらの遺伝子の異常メチル化は、予後予測マーカーとして利用が可能であるものの、実際の分子細胞学的影響は未知であるため、これを解明することでより臨床応用に結びつく可能性がある。本研究では、これら異常メチル化を認めた4遺伝子のうちのひとつである OCIAD2 に対し、異常メチル化と OCIAD2 の発現の関係、また肝芽腫における OCIAD2 の機能について解析した。

#### 【対象と方法】

使用した臨床検体の対象は1994年から2011年の間に当院で外科的切除を受けた患者9例で、肝芽腫腫瘍検体とペアの正常肝組織である。また、細胞実験にはヒト肝芽腫細胞株である HepG2 と HUH6 を使用し、HLF をヒト低分化型肝細胞癌細胞株として使用した。

肝芽腫腫瘍組織および正常肝組織の FFPE 切片から正常肝、胎児型腫瘍部、胎芽型腫瘍部を macrodissection にて分別し、DNA サンプルを抽出した。抽出したゲノム DNA を Sodium Bisulfite 処理し、OCIAD2 プロモーター領域のメチル化状態を、バイサルファイトパイロシーケンス法で解析した。免疫組織化学染色は前述の FFPE 切片に対し抗 OCIAD2 抗体を用いて

行い、正常肝組織、胎児型肝芽腫腫瘍部、胎芽型肝芽腫腫瘍部、混合型肝芽腫腫瘍部でそれぞれの染色状態を評価した。また、各部位から抽出した mRNA、タンパク抽出液を用いて OCIAD2 の発現をリアルタイム PCR、ウエスタンブロットにより解析した。

HepG2、HUH6、HLF に対し、遺伝子組み込みを行い、OCIAD2 の強制発現株を作成した。強制発現株および空ベクター株における OCIAD2 の発現は、定量的リアルタイム PCR およびウエスタンブロット法にて確認した。細胞機能評価として、細胞増殖能、浸潤能、遊走能について検討した。細胞増殖能は Cell Titer 96 Aqueous One Kit を用い、浸潤能の評価には Matrigel invasion chamber を用い、遊走能の評価には Transwell を用いて評価した。各細胞株について E-cadherin、Vimentin、MMP2、GAPDH の発現をウエスタンブロット法にて解析した。

#### 【結果】

免疫組織染色では、OCIAD2 の非メチル化検体では OCIAD2 の発現が 64.3% に認められたが、OCIAD2 のメチル化検体では全検体で OCIAD2 の発現がみられなかった。腫瘍部では OCIAD2 のメチル化検体が有意に多く、OCIAD2 の発現検体は有意に低かった。リアルタイム PCR、ウエスタンブロットの結果からも、OCIAD2 のメチル化群では有意に OCIAD2 の発現が低かった。

HepG2、HUH6 の細胞株は、リアルタイム PCR、ウエスタンブロット法にて解析すると、OCIAD2 の発現を認めず、OCIAD2 強制発現株で OCIAD2 の発現を認めた。細胞増殖能は OCIAD2 の強制発現によって有意な変化は見られなかった。遊走能、浸潤能は OCIAD2 強制発現株で有意に低下した。HepG2、HUH6、HLF において、OCIAD2 の強制発現株では E-cadherin、Vimentin の発現に変化は見られなかった。MMP2 の発現は OCIAD2 の強制発現株で低下した。

#### 【考察】

OCIAD2 は、卵巣癌患者腹水から同定された OCIAD1 に類似するタンパクとして 2001 年に発見されたが、その発現制御や機能については詳しくわかっていなかった。発現制御としての DNA メチル化について、本研究では OCIAD2 のメチル化が OCIAD2 の発現を抑制しているといった結果を得たが、他方では 5-AZA 処理による OCIAD2 の脱メチル化により OCIAD2 の発現が回復するといった報告があり、これらを合わせると OCIAD2 の発現は OCIAD2 のメチル化によって制御されていると考えられた。

本研究では、OCIAD2 の強制発現により肝芽腫細胞の浸潤能・遊走能が抑制されたが、同様の結果が他の HCC 細胞株を用いた研究でも示されている。その機序として本研究では浸潤に関わるタンパクである MMP2 の低下が示唆された。他の研究で OCIAD2 は AKT 経路を抑制することや、AKT 経路の活性化は MMP2 の発現を上昇させることが示されており、本研究結果を支持している。一方で、胎児腎臓細胞株での OCIAD2 強制発現では、細胞増殖と遊走能の増加がみられ、本研究とは反対の結果がでており、組織によって応答が異なる可能性が考えられた。

#### 【結論】

OCIAD2 は OCIAD2 DNA のメチル化により発現が抑制される。肝芽腫細胞において、OCIAD2 は遊走能、浸潤能を抑制しており、メチル化によりその抑制が解除されることで、より悪性度が高くなると考えられた。また、OCIAD2 のメチル化状態を解析するのではなく、OCIAD2 タンパクの発現を直接解析することで予後予測に活用できる可能性も示唆された。