

博士論文

統合的マルチオミックス解析による
肝芽腫の分子基盤の解明と治療標的の同定

関口 昌央

論文題目

統合的マルチオミックス解析による

肝芽腫の分子基盤の解明と治療標的の同定

所属

東京大学大学院医学系研究科 生殖・発達・加齢医学専攻 小児科学教室

指導教員

岡 明

氏名

関口 昌央

目次

要旨	3
序文	4
方法	7
結果	26
考察	57
結論	63
謝辭	64
引用文献	65

要旨

肝芽腫は小児で最多の肝悪性腫瘍であるが、その分子遺伝学的多様性についてはまだよくわかっていない。本研究では肝芽腫 59 例の腫瘍検体を収集し、マルチオミックス解析を行った。その結果、肝芽腫は DNA メチル化のパターンにより、臨床的特徴と非常によく相関する 3 群 (F、E1、E2) に分類された。予後不良の E1、E2 群は HNF4A/CEBPA 結合領域の高メチル化、胎児肝に類似した発現様式、Cell-cycle パスウェイの亢進、*NQO1* や *ODC1* の高発現といった遺伝学的特徴を有していた。さらに肝芽腫細胞株で *NQO1* と *ODC1* の阻害実験を行ったところ、抗がん剤感受性の亢進や細胞増殖抑制が認められた。DNA メチル化に基づく分類は、肝芽腫の多様性の分子基盤解明と、治療標的の同定に有用であった。

序文

肝芽腫は小児に発生する肝悪性腫瘍の大部分を占める胎児性腫瘍であり¹、日本での年間発症者数は40-60例程度である。治療は外科的切除が基本ではあるが、一次的に切除することができない巨大腫瘍を形成することも多いため、プラチナ製剤やアントラサイクリン系薬剤を用いた術前・術後化学療法が重要とされる。化学療法や支持療法の発達、外科的アプローチの進歩によって、近年の肝芽腫の5年全生存率は70-80%程度と向上してきている²。しかしながら、肝芽腫の臨床像は多様であり、化学療法を要さず腫瘍切除のみで治癒するような予後良好な症例群もあれば、強力な化学療法や肝移植術を併用してもなお再発を来すような予後不良な症例群もあるため、予後予測に基づく治療層別化が重要である。予後不良因子として知られているものとして、治療開始前の腫瘍進展度が高いこと(PRETEXT分類のStage IV)、腫瘍マーカー(alpha-fetoprotein, AFP)の値が極めて高い(>1,000,000 ng/mL)または低い(<100 ng/mL)こと、初発時点での遠隔転移の存在、そして高年齢(3歳以上、中でも8歳以上)が挙げられる。これらの予後不良因子を有する高リスク肝芽腫の治療成績はいまだに不良である³。すでに高リスク肝芽腫に対する治療強度は限界に達しつつあることから、それらの治療成績を向上させるためには、生物学的特性を踏まえた上での標的治療の導入が不可欠と考えられる。

肝芽腫の遺伝学的特性としてよく知られているのが、βカテニンの蓄積によるWntシグナル経路の亢進である⁴。その原因として、βカテニンをコードするCTNNB1遺伝子のホットスポット変異や、βカテニンの分解に関わるAPC、AXINI/2といった遺伝子の機能喪失変異が知られており、これらの変異のいずれ

かが肝芽腫のほぼ全例で認められる⁵⁻⁹。一方で、それ以外の遺伝子変異は極めて少なく、全エクソーム解析で検出される遺伝子変異数は肝芽腫 1 検体あたり 5 個程度であり、しかもその多くはパッセンジャー変異と考えられている¹⁰⁻¹²。そのため、遺伝子変異のプロファイルは肝芽腫の検体間であまり違いはなく、少なくとも肝芽腫の臨床的多様性を説明するには不十分である。これまで、遺伝学的な予後不良マーカーの探索はいくつかの研究で行われているものの^{10,12}、予後との関連が再現性に乏しい、あるいは生物学的な意味付けが不十分であるといった問題がある。たとえば、2008 年に Cairo らが報告した肝芽腫の遺伝子発現解析において、肝芽腫を 16 遺伝子の発現シグネチャーに基づいて予後良好な C1 群と予後不良な C2 群に分類できるという方法が提示されている¹⁰。しかし 2017 年の Sumazin らの報告によると、別の肝芽腫のコホートでは C1/C2 の分類と予後との関連が再現されないことが示されており¹²、16 遺伝子の発現シグネチャーが予後マーカーとして意義が確立しているとは言い難い状況である。

さらに、肝芽腫はあらゆる癌種の中で最も遺伝子変異数の少ない腫瘍の一つである¹³。唯一高頻度に見られるのが前述した Wnt シグナル経路活性化変異であるが、そのような癌種に対する Wnt 阻害剤の効果は示されていない。そのため、肝芽腫に対して特異的な標的治療はいまだに見出されていない。

以上より、肝芽腫のバイオロジー研究における課題として、Wnt シグナル経路の亢進がドライバーとして確立している一方、低リスク群と高リスク群を分ける分子遺伝学的メカニズムがはっきりしていない点、そして高リスク肝芽腫の克服に不可欠な治療標的の同定がなされていない点が挙げられる。

近年、がんの分子基盤を解明するための技術として、網羅的ゲノム解析、す

すなわち次世代シーケンサーやマイクロアレイを用いて DNA や RNA の全領域を解析し、がんのゲノム異常の全体像を把握するというプロセスが極めて重要な位置付けとなっている¹⁴。網羅的ゲノム解析によってがんのドライバーとなる変異や構造異常が同定され、さらにそれらを標的とした分子標的療法が導入されることによって、がんの基礎研究だけでなく臨床のあり方も急速に変化している。

肝芽腫においてもこれまで遺伝子変異、コピー数変化、遺伝子発現異常、メチル化異常といった様々な側面に関して網羅的なゲノムデータ、すなわちオミックスデータの解析はなされている^{10-12,15-17}。しかしながら、これまでになされた研究は各々単独のオミックスデータ（たとえばエクソーム解析による遺伝子変異解析のみなど）しか扱っていないものがほとんどである。すなわち、同一コホートに対して複数のオミックスデータを収集し、それらを統合して肝芽腫の分子メカニズムの全体像に迫るような研究は、これまでほとんどなされていない。

そこで本研究では、ターゲットシーケンスによる遺伝子変異解析、SNP アレイによるコピー数解析、メチル化アレイを用いた網羅的 DNA メチル化解析、そして RNA シーケンスによる遺伝子発現解析を含む、統合的マルチオミックス解析を行うことにより、肝芽腫の分子基盤の解明と、高リスク群を規定する分子遺伝学的因子の同定を試みることにした。さらに、そこから同定された高リスク群における治療標的候補遺伝子に対して、その有用性を肝芽腫細胞株を用いた機能解析により検証した。

方法

患者と検体

本研究は東京大学倫理委員会により承認された小児固形腫瘍のゲノム研究（研究課題名：固形腫瘍における遺伝子異常の網羅的解析、承認番号：1598）の一環として施行された。東京大学医学部附属病院小児科、及び研究協力施設（九州大学病院小児外科、埼玉県立小児医療センター血液・腫瘍科、神奈川県立こども医療センター病理診断科、国立成育医療研究センター小児がんセンター）で診療された肝芽腫の小児患者計 60 名を抽出し、そこから肝芽腫の腫瘍新鮮凍結検体 59 検体、正常肝組織検体 7 検体、及び正常末梢血検体 15 検体を収集した。検体使用は患者または保護者により記載された研究同意書に基づいて行われた。肝芽腫 59 検体のうち、生検検体が 39 検体（HBL01P-HBL39P）、化学療法後切除検体が 20 検体（HBL40C-HBL59C）であった。それらの患者検体に加え、購入した肝芽腫細胞株 HepG2、HuH6 の細胞を用いて、ゲノム DNA とトータル RNA の抽出を行い、次世代シーケンサーやマイクロアレイを用いた網羅的ゲノム解析を行った。さらに正常コントロールの検体数を増やすため、BioChain 及び ZYAGEN から購入した、成人肝組織より抽出されたゲノム DNA とトータル RNA も解析を行った。各サンプルに対して行われた解析の種類に関して表 1 に示す。また各症例の年齢、性別、生存期間といった臨床情報は、診療録を参照することで収集した（表 2）。

表 1. マルチオミックス解析を施行した検体のリストと解析の種類

患者 ID	検体 ID	検体の種類	ターゲット シーケンス	SNP アレイ	DNA メチル化 アレイ	RNA シーケンス
HBL01	HBL01P	肝芽腫生検検体	○	○	○	○
HBL02	HBL02P	肝芽腫生検検体	○	○	○	○
HBL03	HBL03P	肝芽腫生検検体	○	○	○	○
HBL04	HBL04P	肝芽腫生検検体	○	○	○	○
HBL05	HBL05P	肝芽腫生検検体	○	○	○	○
HBL06	HBL06P	肝芽腫生検検体	○	○	○	○
HBL07	HBL07P	肝芽腫生検検体	○	○	○	×
HBL08	HBL08P	肝芽腫生検検体	○	○	○	○
HBL09	HBL09P	肝芽腫生検検体	○	○	○	○
HBL10	HBL10P	肝芽腫生検検体	○	○	○	○
HBL11	HBL11P	肝芽腫生検検体	○	○	○	○
HBL12	HBL12P	肝芽腫生検検体	○	○	○	○
HBL13	HBL13P	肝芽腫生検検体	○	○	○	○
HBL14	HBL14P	肝芽腫生検検体	○	○	○	×
HBL15	HBL15P	肝芽腫生検検体	○	○	○	○
HBL16	HBL16P	肝芽腫生検検体	○	○	○	○
HBL17	HBL17P	肝芽腫生検検体	○	○	○	○
HBL18	HBL18P	肝芽腫生検検体	○	○	○	○
HBL19	HBL19P	肝芽腫生検検体	○	○	○	○
HBL20	HBL20P	肝芽腫生検検体	○	○	○	○
HBL21	HBL21P	肝芽腫生検検体	○	○	○	○
HBL22	HBL22P	肝芽腫生検検体	○	○	○	○
HBL23	HBL23P	肝芽腫生検検体	○	○	○	○
HBL24	HBL24P	肝芽腫生検検体	○	○	○	○
HBL25	HBL25P	肝芽腫生検検体	○	○	○	○
HBL26	HBL26P	肝芽腫生検検体	○	○	○	×
HBL27	HBL27P	肝芽腫生検検体	○	○	○	○
HBL28	HBL28P	肝芽腫生検検体	○	○	○	○
HBL29	HBL29P	肝芽腫生検検体	○	○	○	○
HBL30	HBL30P	肝芽腫生検検体	○	○	○	○
HBL31	HBL31P	肝芽腫生検検体	○	○	○	○
HBL32	HBL32P	肝芽腫生検検体	○	○	○	×
HBL33	HBL33P	肝芽腫生検検体	○	○	○	○
HBL34	HBL34P	肝芽腫生検検体	○	○	○	○
HBL35	HBL35P	肝芽腫生検検体	○	○	○	○
HBL36	HBL36P	肝芽腫生検検体	○	○	○	○
HBL37	HBL37P	肝芽腫生検検体	○	○	○	○
HBL38	HBL38P	肝芽腫生検検体	○	○	○	○
HBL39	HBL39P	肝芽腫生検検体	○	○	○	○
HBL40	HBL40C	肝芽腫化学療法後切除検体	○	○	○	×
HBL41	HBL41C	肝芽腫化学療法後切除検体	○	○	○	○
HBL42	HBL42C	肝芽腫化学療法後切除検体	○	○	○	○

表 1. 続き

患者 ID	検体 ID	検体の種類	ターゲット シーケンス	SNP アレイ	DNA メチル化 アレイ	RNA シーケンス
HBL43	HBL43C	肝芽腫化学療法後切除検体	○	○	○	○
HBL44	HBL44C	肝芽腫化学療法後切除検体	○	○	○	×
HBL45	HBL45C	肝芽腫化学療法後切除検体	○	○	○	○
HBL46	HBL46C	肝芽腫化学療法後切除検体	○	○	○	○
HBL47	HBL47C	肝芽腫化学療法後切除検体	○	○	○	○
HBL48	HBL48C	肝芽腫化学療法後切除検体	○	○	○	○
HBL49	HBL49C	肝芽腫化学療法後切除検体	○	○	○	○
HBL50	HBL50C	肝芽腫化学療法後切除検体	○	○	○	○
HBL51	HBL51C	肝芽腫化学療法後切除検体	○	○	○	○
HBL52	HBL52C	肝芽腫化学療法後切除検体	○	○	○	○
HBL53	HBL53C	肝芽腫化学療法後切除検体	○	○	○	○
HBL54	HBL54C	肝芽腫化学療法後切除検体	○	○	○	×
HBL55	HBL55C	肝芽腫化学療法後切除検体	○	○	○	○
HBL56	HBL56C	肝芽腫化学療法後切除検体	○	○	○	○
HBL57	HBL57C	肝芽腫化学療法後切除検体	○	○	○	×
HBL58	HBL58C	肝芽腫化学療法後切除検体	○	○	○	○
HBL59	HBL59C	肝芽腫化学療法後切除検体	○	○	○	×
HBL01	HBL01NL	肝芽腫患者の正常肝	×	×	○	○
HBL03	HBL03NL	肝芽腫患者の正常肝	×	×	○	○
HBL04	HBL04NL	肝芽腫患者の正常肝	×	×	○	○
HBL13	HBL13NL	肝芽腫患者の正常肝	×	×	○	○
HBL31	HBL31NL	肝芽腫患者の正常肝	×	×	○	○
HBL36	HBL36NL	肝芽腫患者の正常肝	×	×	○	○
HBL60	HBL60NL	肝芽腫患者の正常肝	×	×	○	○
Adult01	NLDNA01	成人肝のゲノム DNA	×	×	○	×
Adult02	NLDNA02	成人肝のゲノム DNA	×	×	○	×
Adult03	NLRNA01	成人肝のトータル RNA	×	×	×	○
Adult04	NLRNA02	成人肝のトータル RNA	×	×	×	○
Adult05	NLRNA03	成人肝のトータル RNA	×	×	×	○
HepG2	HepG2	肝芽腫細胞株	○	○	○	○
HuH6	HuH6	肝芽腫細胞株	○	○	○	○

表 2. 本研究における肝芽腫コホートの臨床的特徴

		初発時生検	化学療法後検体
症例数		39	20
性別	女性	19	11
	男性	20	9
年齢	0-2 歳	32	16
	3-7 歳	4	3
	8 歳以上	3	1
AFP (ng/mL)	<100	0	0
	100-999,999	29	16
	≥1,000,000	10	4
PRETEXT	I	2	0
	II	10	4
	III	14	10
	IV	13	6
病理像 (上皮成分)	胎児型	9	5
	混合型	26	13
	胎芽型	4	1
	その他	0	1
初発時遠隔転移	無し	31	15
	有り	8	5
肝移植	無し	29	14
	有り	10	6
再発	無し	28	15
	有り	11	5
生死	生存	31	19
	死亡	8	1

統計解析

本研究で行われた統計解析はすべて統計解析ソフトウェア R(バージョン 3.5.1) を用いて行った (<https://www.R-project.org/>)。

ターゲットキャプチャーシーケンスによる遺伝子変異解析

肝芽腫 59 検体及び肝芽腫細胞株 2 検体から抽出されたゲノム DNA を用いてターゲットシーケンスを行った。SureSelect XT custom kit (Agilent Technologies) を用いて、断片化したゲノム DNA からターゲット領域の DNA を濃縮し、シーケンスライブラリを作成した。ターゲット領域に関しては、小児がんに関連する計 380 の遺伝子・領域を含むように以下のように設計した。

- (1) 成人がん及び小児がんでは反復して変異が報告されている 366 遺伝子(表 3) の翻訳領域
- (2) 上記 366 遺伝子のうち 16 遺伝子 (*CD274*, *CTNNB1*, *ERG*, *ETV1*, *ETV4*, *EWSR1*, *FEV*, *FLII*, *FOXO1*, *FUS*, *INO80D*, *NCOA1*, *NCOA2*, *NOTCH1*, *PAX3*, *PAX7*) の非翻訳領域やイントロン (欠失や融合遺伝子といった構造異常の断端を検出するため)
- (3) *TERT* 周辺の 110,000 塩基 (*TERT* 遺伝子の再構成やプロモーター、エンハンサーの変異を検出するため)
- (4) *FGFR3* のプロモーター、及び *MYC* のエンハンサー領域
- (5) 11 のマイクロ RNA 遺伝子 (*MIR100*, *MIRLET7A1*, *MIRLET7A2*, *MIRLET7A3*, *MIRLET7B*, *MIRLET7C*, *MIRLET7D*, *MIRLET7E*, *MIRLET7F1*, *MIRLET7F2*, *MIRLET7G*)

表 3. ターゲットキャプチャーシーケンスでエクソン領域をシーケンスした 366 遺伝子のリスト

<i>ABL1</i>	<i>ABL2</i>	<i>AFF3</i>	<i>AKT1</i>	<i>AKT2</i>
<i>AKT3</i>	<i>ALK</i>	<i>AMER1</i>	<i>APC</i>	<i>AR</i>
<i>ARHGAP35</i>	<i>ARID1A</i>	<i>ARID1B</i>	<i>ARID2</i>	<i>ASXL1</i>
<i>ATM</i>	<i>ATR</i>	<i>ATRX</i>	<i>AURKA</i>	<i>AURKB</i>
<i>AXIN1</i>	<i>AXIN2</i>	<i>AXL</i>	<i>BAK1</i>	<i>BAP1</i>
<i>BARD1</i>	<i>BCL10</i>	<i>BCL2</i>	<i>BCL2L1</i>	<i>BCL2L2</i>
<i>BCL6</i>	<i>BCOR</i>	<i>BCORL1</i>	<i>BIRC3</i>	<i>BLM</i>
<i>BRAF</i>	<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>	<i>BRIP1</i>	<i>BTK</i>
<i>BUB1B</i>	<i>CAPRIN2</i>	<i>CARD11</i>	<i>CASP8</i>	<i>CBFB</i>
<i>CBL</i>	<i>CBLB</i>	<i>CCND1</i>	<i>CCND2</i>	<i>CCND3</i>
<i>CCNE1</i>	<i>CD274</i>	<i>CD79A</i>	<i>CD79B</i>	<i>CDC27</i>
<i>CDC73</i>	<i>CDH1</i>	<i>CDK12</i>	<i>CDK4</i>	<i>CDK6</i>
<i>CDK8</i>	<i>CDKN1A</i>	<i>CDKN1B</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>CDKN2B</i>
<i>CDKN2C</i>	<i>CEBPA</i>	<i>CHEK1</i>	<i>CHEK2</i>	<i>CIC</i>
<i>COL2A1</i>	<i>COL5A1</i>	<i>COL5A2</i>	<i>CREBBP</i>	<i>CRKL</i>
<i>CRLF2</i>	<i>CSF1R</i>	<i>CSMD1</i>	<i>CSMD2</i>	<i>CSMD3</i>
<i>CTCF</i>	<i>CTNNA1</i>	<i>CTNNB1</i>	<i>CUL3</i>	<i>CYLD</i>
<i>DAXX</i>	<i>DDB2</i>	<i>DDR2</i>	<i>DICER1</i>	<i>DKK1</i>
<i>DKK2</i>	<i>DKK3</i>	<i>DKK4</i>	<i>DNMT3A</i>	<i>DPPA3</i>
<i>DROSHA</i>	<i>DST</i>	<i>ECT2L</i>	<i>EGFR</i>	<i>EP300</i>
<i>EPCAM</i>	<i>EPHA3</i>	<i>EPHA7</i>	<i>EPHB1</i>	<i>ERBB2</i>
<i>ERBB3</i>	<i>ERBB4</i>	<i>ERCC5</i>	<i>ERG</i>	<i>ESR1</i>
<i>ETV1</i>	<i>ETV4</i>	<i>EWSR1</i>	<i>EZH2</i>	<i>FAM46C</i>
<i>FANCA</i>	<i>FANCC</i>	<i>FANCD2</i>	<i>FANCE</i>	<i>FANCF</i>
<i>FANCG</i>	<i>FAS</i>	<i>FAT1</i>	<i>FBXO11</i>	<i>FBXW7</i>
<i>FEV</i>	<i>FGF19</i>	<i>FGF3</i>	<i>FGF4</i>	<i>FGFR1</i>
<i>FGFR2</i>	<i>FGFR3</i>	<i>FGFR4</i>	<i>FH</i>	<i>FLCN</i>
<i>FLI1</i>	<i>FLT1</i>	<i>FLT3</i>	<i>FLT4</i>	<i>FOXL2</i>
<i>FOXO1</i>	<i>FOXP1</i>	<i>FUBP1</i>	<i>FUS</i>	<i>FZD10</i>
<i>FZD3</i>	<i>GAB1</i>	<i>GATA1</i>	<i>GATA2</i>	<i>GATA3</i>
<i>GLI1</i>	<i>GNA11</i>	<i>GNAQ</i>	<i>GNAS</i>	<i>GPC3</i>
<i>GRB2</i>	<i>GRIN2A</i>	<i>H3F3A</i>	<i>H3F3B</i>	<i>HIST1H3B</i>
<i>HNF1A</i>	<i>HRAS</i>	<i>HSPH1</i>	<i>IDH1</i>	<i>IDH2</i>
<i>IGF1R</i>	<i>IGF2</i>	<i>IGF2R</i>	<i>IKBKE</i>	<i>IKZF1</i>
<i>IL6ST</i>	<i>IL7R</i>	<i>INO80D</i>	<i>IRF4</i>	<i>IRS2</i>
<i>JAK1</i>	<i>JAK2</i>	<i>JAK3</i>	<i>JMJD1C</i>	<i>JUN</i>
<i>KDM5C</i>	<i>KDM6A</i>	<i>KDR</i>	<i>KEAP1</i>	<i>KIT</i>
<i>KLF4</i>	<i>KLF6</i>	<i>KMT2A</i>	<i>KMT2B</i>	<i>KMT2C</i>

表 3. 続き

<i>KMT2D</i>	<i>KRAS</i>	<i>LGR5</i>	<i>LIN28A</i>	<i>LIN28B</i>
<i>LMO1</i>	<i>LRP1</i>	<i>LRP1B</i>	<i>LRP5</i>	<i>MAP2K1</i>
<i>MAP2K2</i>	<i>MAP2K4</i>	<i>MAP3K1</i>	<i>MAP4K3</i>	<i>MAPK1</i>
<i>MAPK3</i>	<i>MCL1</i>	<i>MDM2</i>	<i>MDM4</i>	<i>MED12</i>
<i>MEN1</i>	<i>MET</i>	<i>MITF</i>	<i>MLH1</i>	<i>MRE11A</i>
<i>MSH2</i>	<i>MSH6</i>	<i>MTMR4</i>	<i>MTOR</i>	<i>MUC16</i>
<i>MUC4</i>	<i>MUTYH</i>	<i>MYC</i>	<i>MYCL1</i>	<i>MYCN</i>
<i>MYD88</i>	<i>MYH2</i>	<i>MYOD1</i>	<i>NANOG</i>	<i>NBN</i>
<i>NCOA1</i>	<i>NCOA2</i>	<i>NES</i>	<i>NF1</i>	<i>NF2</i>
<i>NFE2L2</i>	<i>NFKBIA</i>	<i>NKX2-1</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>NOTCH2</i>
<i>NOTCH3</i>	<i>NOTCH4</i>	<i>NPM1</i>	<i>NRAS</i>	<i>NSD1</i>
<i>NTRK1</i>	<i>NTRK3</i>	<i>OBSCN</i>	<i>PALB2</i>	<i>PARK2</i>
<i>PARP1</i>	<i>PAX3</i>	<i>PAX5</i>	<i>PAX7</i>	<i>PBRM1</i>
<i>PDCD1LG2</i>	<i>PDE11A</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>PDGFRB</i>	<i>PEG10</i>
<i>PHF6</i>	<i>PHOX2B</i>	<i>PIK3C2B</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>PIK3CB</i>
<i>PIK3CD</i>	<i>PIK3CG</i>	<i>PIK3R1</i>	<i>PIK3R2</i>	<i>PINK1</i>
<i>PLAG1</i>	<i>PLVAP</i>	<i>PMS2</i>	<i>POLE</i>	<i>POU5F1</i>
<i>PPP2R1A</i>	<i>PRB2</i>	<i>PRDM1</i>	<i>PRDM9</i>	<i>PRKARIA</i>
<i>PRKCZ</i>	<i>PRKDC</i>	<i>PRKRIR</i>	<i>PTCH1</i>	<i>PTEN</i>
<i>PTPN11</i>	<i>PTPRB</i>	<i>PTPRD</i>	<i>PTPRN</i>	<i>PTPRO</i>
<i>PTPRT</i>	<i>PZP</i>	<i>RAC1</i>	<i>RAD17</i>	<i>RAD50</i>
<i>RAD51</i>	<i>RAF1</i>	<i>RARA</i>	<i>RBI</i>	<i>RET</i>
<i>RHOA</i>	<i>ROBO1</i>	<i>ROS1</i>	<i>RSPO2</i>	<i>RUNX1</i>
<i>RUNX1T1</i>	<i>SDHA</i>	<i>SDHB</i>	<i>SDHC</i>	<i>SDHD</i>
<i>SETD2</i>	<i>SF3B1</i>	<i>SHC1</i>	<i>SHOC2</i>	<i>SLC7A8</i>
<i>SMAD2</i>	<i>SMAD3</i>	<i>SMAD4</i>	<i>SMARCA2</i>	<i>SMARCA4</i>
<i>SMARCB1</i>	<i>SMO</i>	<i>SOCS1</i>	<i>SOS1</i>	<i>SOX2</i>
<i>SOX9</i>	<i>SPEN</i>	<i>SPOP</i>	<i>SPRED1</i>	<i>SPRY4</i>
<i>SRC</i>	<i>STAG2</i>	<i>STAT3</i>	<i>STK11</i>	<i>SUFU</i>
<i>SYK</i>	<i>SYNE1</i>	<i>TCF3</i>	<i>TCF7L2</i>	<i>TERT</i>
<i>TET1</i>	<i>TET2</i>	<i>TET3</i>	<i>TFAP2C</i>	<i>TGFBR2</i>
<i>TIAM1</i>	<i>TNFAIP3</i>	<i>TNFRSF14</i>	<i>TOP1</i>	<i>TP53</i>
<i>TRAF7</i>	<i>TRIM60</i>	<i>TSC1</i>	<i>TSC2</i>	<i>TSHR</i>
<i>U2AF1</i>	<i>USP28</i>	<i>VHL</i>	<i>WT1</i>	<i>XPC</i>
<i>XPO1</i>	<i>XRCC2</i>	<i>ZMYM3</i>	<i>ZNF2</i>	<i>ZNF518B</i>
<i>ZRSR2</i>				

ライブラリのシーケンスは HiSeq 2000/2500 プラットフォーム (Illumina) を用いて、製造元のプロトコルに従い 126 塩基ペアエンド法で行った。共同研究施設である東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターで開発された Genomon パイプライン (<https://github.com/Genomon-Project/>) のバージョン 2.5.3 を用いて、シーケンス結果をリファレンスとなるゲノム (hg19) にアライメントし、さらに遺伝子変異や構造異常のコールを行った。

コールされた遺伝子変異や構造異常の中には、真に意味のあるものだけではなく、患者が元来保有する多型や、その他多くのエラーも含まれている。それらをフィルターするために以下の作業を行った。まず遺伝子変異に関しては、シーケンスやマッピングにおけるエラー、及び意義不明の変異を除去する目的で、まず以下のフィルターを行った。

- (1) マッピングクオリティスコア 20 未満の変異を除く
- (2) ベースクオリティスコア 15 未満の変異を除く
- (3) エクソン内の非同義置換とスプライス部位変異以外を除く
- (4) スtrand比が 0 または 1 の変異を除く
- (5) リード深度 100 未満の変異を除く
- (6) リファレンスとバリアントのリードペア数のいずれかが 5 未満の変異を除く
- (7) バリアントのアレル頻度 0.05 未満の変異を除く
- (8) EBCall¹⁸ p 値が 10^{-20} 以上の変異を除く
- (9) Integrative Genomics Viewer のブラウザを用いて、視覚的にマッピングエラーであることが同定できた変異を除く

続いて、患者が元来保有する多型、生殖細胞変異を除き、がんにおける体細胞変異のみを抽出する目的で、以下の第2のフィルターを行った。

- (1) SNP データベースに登録のある変異を除く
- (2) コピー数変化がなくヘテロ接合性消失もない領域に関しては、バリエーションのアレル頻度 0.35 以上の変異を除き、コピー数増加がありヘテロ接合性消失のない領域に関しては、バリエーションのアレル頻度 0.25 以上の変異を除く（コピー数減少またはヘテロ接合性消失のいずれかがある領域に関しては、アレル頻度に基づく変異の除去は行わない）
- (3) Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer (COSMIC) データベースのバージョン 68WGS またはバージョン 70 において、固形腫瘍で 10 例以上の登録がある変異が(1)及び(2)のフィルターで除かれていた場合、再度含め直す

以上の第2のフィルターの妥当性を検証するため、腫瘍と正常組織の両方のDNAが利用可能であった17例（HBL01、HBL02、HBL03、HBL04、HBL08、HBL12、HBL16、HBL24、HBL25、HBL30、HBL31、HBL33、HBL35、HBL37、HBL41、HBL43、HBL45）において第1のフィルターを通過した192の変異に対し、Sangerシーケンス法を用いて実際にそれらの変異が体細胞変異なのか生殖細胞変異なのかを判定した。その結果、第2のフィルターで「体細胞変異」と判定された21の変異のうち19は実際に体細胞変異であり、また「生殖細胞変異」と判定された173の変異はすべて実際に生殖細胞変異であった。すなわち、第2のフィルターの体細胞変異予測における陽性的中率、陰性的中率はそれぞれ91%、100%と十分であったため、他の検体にもそのフィルターを適用し、エクソン領域と

スプライス部位の体細胞変異のリストを確定した。また生殖細胞変異のうち、*APC* の機能喪失変異は肝芽腫発症に強く寄与していることから^{5,9}、ピックアップして変異のリストに加えた。

さらに、肝芽腫の一部で変異があることが知られている *TERT* のプロモーター変異に関しては、上記のフィルターでは除外されてしまうため、以下のような固有のフィルターを適用した。

(1) ゲノム上の位置が chr5:1295105–1295353 (hg19)

(2) EBCall p 値が 10^{-4} 未満

以上の通り、エクソン領域とスプライス部位の体細胞変異、*APC* の機能喪失型の生殖細胞変異、及び *TERT* のプロモーター変異を合わせて変異のリストを確定した。

一方で、構造異常に関してはエラーや意義不明の異常を除く目的で、以下のフィルターにより絞り込みを行った。

(1) リファレンスのリードペア数 300 未満のものを除く

(2) バリアントのリードペア数 20 未満のものを除く

(3) 最大オーバーハングが断端のいずれかで 150 塩基未満のものを除く

(4) 断端のいずれかがミトコンドリア DNA や線形 DNA に位置するものを除く

(5) 同一染色体内の欠失やタンDEM反復で、その範囲がエクソンに重複しないもの

以上のフィルターにより構造異常のリストを確定した。

SNP アレイを用いたコピー数及びアレル不均衡解析

肝芽腫 59 検体及び肝芽腫細胞株 2 検体から抽出されたゲノム DNA を用いて SNP アレイ解析を行った。アレイの種類として Human Mapping 250K Nsp Array for Cytogenetics (Affymetrix) を使用し、製造元のプロトコルに従って実験を行った。得られたアレイデータからコピー数及びアレル不均衡を解析するために、CNAG ソフトウェアのバージョン 3.5.1 を使用した^{19,20}。

メチル化アレイを用いた網羅的 DNA メチル化解析

肝芽腫 59 検体、正常肝組織 9 検体、及び肝芽腫細胞株 2 検体から抽出されたゲノム DNA を用いてメチル化アレイ解析を行った。アレイの種類として Infinium MethylationEPIC BeadChip (Illumina) を使用し、製造元のプロトコルに従って実験を行った。クオリティコントロール、シグナル値補正とメチル化 β 値 (解析された DNA の中で、その部位のメチル化されている断片の数的割合を示す値)、データの正規化とメチル化可変領域の抽出に関しては、R パッケージの ChAMP (バージョン 2.10.1)²¹ を使用した。

DNA メチル化データのコンセンサスクラスタリング

肝芽腫の多様性を遺伝学的に説明するため、R パッケージの ConsensusClusterPlus (バージョン 1.44.0)²² を用いて DNA メチル化データのコンセンサスクラスタリングを行った。

まず肝芽腫 59 検体のクラスタリングに際して、全検体内におけるメチル化変動の大きい CpG プローブを選ぶため、プロモーター関連プローブの中で β 値の

標準偏差が大きい順に上位 100、1,000、2,000、3,000、10,000 プローブを選択した。続いてそれらのプローブにおけるメチル化データを、Euclidean 法と Pearson 法の 2 つの距離法を用いて 1000 回反復のコンセンサスクラスタリングを行った。2,000 プローブ、Pearson 法を用いて 2 群に分類する際に最も頑健な分類が得られたので、その 2 群の臨床情報の比較を行った。

続いて、生検検体 39 検体のクラスタリングにおいて、先と同様にメチル化変動の大きい CpG プローブを選び、そのメチル化データに対して Euclidean 法と Pearson 法の 2 つの距離法を用いて 1000 回反復のコンセンサスクラスタリングを行った。3,000 プローブ、Euclidean 法を用いて 2 群に分類する際に最も頑健な分類が得られたので、その 2 群を F 群、E 群と呼ぶこととした。さらに E 群に含まれる 30 検体に対して、同様に第 2 段階のコンセンサスクラスタリングを行った。その際は 1,000 プローブ、Pearson 法を用いて 2 群に分類する際に最も頑健な分類が得られたので、その 2 群 E1 群、E2 群と呼ぶこととした。

メチル化可変領域のエンリッチメント解析

2 群間のメチル化可変領域がゲノム上のどのような領域と最も有意にオーバーラップしているかを調べるため、R パッケージの LOLA (バージョン 1.6.0)²³ を用いたエンリッチメント解析を行った。具体的には、メチル化アレイでメチル化割合を解析した 865,859 か所のメチル化プローブの中で、以下の 2 つの事象が独立かどうかを検定した。

1. 肝芽腫生検検体の F 群と E1/E2 群との間で最も有意にメチル化変動を来している上位 2,000 プローブに含まれるかどうか

2. LOLA のコアデータベースに登録されている各々のシーケンスデータの領域に含まれるかどうか

上記の 1 と 2 の独立性については、2x2 表に対する Fisher 検定で検定を行った。その後、検定で得られた p 値に対して多重検定補正を行って False discovery rate (FDR) q 値を算出し、FDR q 値が 0.001 未満のものを有意な領域として抽出した。

RNA シーケンス

肝芽腫 59 検体のうち、RNA シーケンスを施行するに足る十分なトータル RNA の質 (Agilent Technologies の TapeStation システムで RINe 値が 5.0 以上) を担保できたのが 50 検体であった。その 50 検体 (生検 35 検体、化学療法後 15 検体) に加え、正常肝組織 10 検体と肝芽腫細胞株 2 検体に対して RNA シーケンスを行った。

NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs) を用いて、トータル RNA から mRNA を濃縮した上で断片化と cDNA 化を行い、シーケンスライブラリを作成した。ライブラリのシーケンスは HiSeq 2000/2500 プラットフォーム (Illumina) を用いて、製造元のプロトコルに従い 100 塩基または 126 塩基ペアエンド法で行った。Genomon パイプラインのバージョン 2.5.3 を用いて、シーケンス結果をリファレンスとなるゲノム (hg19) にアライメントし、リードカウントによる遺伝子発現データの作成を行った。

遺伝子発現解析

RNA シーケンスによるリードカウントデータの正規化、及び発現変動解析は、R パッケージの DESeq2 (バージョン 1.20.0)²⁴ を用いて行った。

正常肝及び肝芽腫 3 群 (F 群、E1 群、E2 群) の計 4 群間の遺伝子発現変動解析は、full and reduced models を用いた尤度比検定を用いて行い、p 値の低い上位 2,000 遺伝子を用いてヒートマップ描画を行った。

発現変動遺伝子のパスウェイ解析については、R パッケージの GAGE (バージョン 2.30.0)²⁵ を用いて行った。上記の 4 群間から 2 群を選んでそれぞれ発現変動解析を行い、FDR q 値 0.001 未満の KEGG パスウェイ²⁶ を有意な発現変動パスウェイとしてリスト化した。

また遺伝子発現の主成分分析に関しては、肝芽腫の生検 35 検体と正常肝 10 検体の中での log 変換された発現値の中央絶対偏差の上位 10,000 遺伝子に対して行った。

正常成人肝及び正常胎児肝の DNA メチル化アレイデータの解析

Infinium HumanMethylation450K BeadChip (Illumina) により得られた正常成人肝と正常胎児肝の DNA メチル化アレイデータを、Gene Expression Omnibus (GEO) のアクセッション番号 GSE61278 からダウンロードし²⁷、R パッケージの ChAMP (バージョン 2.10.1) を用いて本研究データと同様に解析した。

正常成人肝及び正常胎児肝の RNA シーケンスデータを用いた発現変動解析

正常成人肝と正常胎児肝の RNA シーケンスデータを GEO のアクセッション番号 GSE96981 からダウンロードし²⁸、Genomon パイプライン(バージョン 2.5.3)

と R パッケージの DESeq2 (バージョン 1.20.0) を用いて本研究データと同様に解析した。成人肝、胎生 17.5 週の胎児肝、及び胎生 10.5 週の胎児肝の計 3 群間での発現変動遺伝子に関しては、DESeq2 に実装された full and reduced models を用いた尤度比検定を行い、p 値の低い上位 1,000 遺伝子を用いてヒートマップ描画を行った。

遺伝子レベルでの DNA メチル化変動解析と発現変動解析の統合

DNA メチル化と遺伝子発現との関連について調べるため、肝芽腫の F 群と E1/E2 群の間におけるそれぞれの変動解析を、以下の形で統合した。まず 2 群間における各遺伝子のプロモーターのメチル化 β 値の平均値の差を以下のように求めた。その遺伝子に関連するプロモーター関連プローブをすべて抽出し、F 群におけるその全プローブの β 値の平均と、E1/E2 群における平均をそれぞれ求め、その差を取った。

一方で、遺伝子発現変動に関しては R パッケージの DESeq2 を用いて解析を行い、それぞれの遺伝子における発現変動の \log_2 比を取った。

プロモーター関連プローブのメチル化 β 値の平均値の差を横軸、発現変動の \log_2 比を縦軸として各遺伝子をプロットし、スターバーストプロットを作成した。

酵素活性を決定する C609T 多型に基づく *NQO1* 発現値の補正

NQO1 遺伝子内の C609T 多型 (rs1800566) が *NQO1* の酵素活性に大きく影響し、T/T の遺伝子型の場合は野生型の C/C の場合と比較して 2-4%の酵素活性し

か示さないという報告に基づき^{29,30}、*NQO1* の補正後 FPKM (fragments per kilobase of transcript per million mapped reads) を以下の式によって求めた (Nc、Nt はそれぞれ RNA シーケンスデータにおける rs1800566 の C 及び T アレルのリード数を示す)。

$$\text{Corrected } NQO1 \text{ FPKM} = \text{raw } NQO1 \text{ FPKM} \times \frac{Nc + 0.03 \times Nt}{Nc + Nt}$$

生存解析

全生存率は、診断日からあらゆる原因による死亡、または最後のフォローアップの日までの日数により計算した。一方無イベント生存率は、診断日から最初のイベント（再発、非寛解、二次がん、あらゆる原因による死亡）の発生または最後のフォローアップの日までの日数により計算した。非寛解は第 0 日目のイベントとして計算した。生存曲線の作成には Kaplan-Meier 法を用い、また群間の生存率の差の有意性の検定には log-rank 検定を用いた。

細胞株

肝芽腫の細胞株である HepG2 (RCB1886) と HuH6 (RCB1367) はいずれも理化学研究所の細胞材料開発室から購入した。細胞株はいずれも 10% のウシ胎児血清 (Gibco, Invitrogen) を加えた high-glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium (Sigma Aldrich) を用いて、インキュベーター内で温度 37°C、二酸化炭素濃度 5% の環境下で培養した。

NQO1 阻害と抗がん剤感受性アッセイ

NQO1 阻害により肝芽腫細胞株において抗がん剤感受性がどのように変化するかを観察するため、以下の実験を行った。まず HepG2、または HuH6 の細胞を 96 ウェルプレート内におよそ 5,000 細胞ずつ播種し、その 24 時間後に *NQO1* 阻害の処置または陰性コントロールの処置を行った。阻害方法は 2 種類であり、1 つは Applied Biosystems より購入した *NQO1* siRNA (s4089/s4091) を Lipofectamine RNAiMAX reagent (Life Technologies) を用いてトランスフェクションするもので、陰性コントロールには negative control siRNA (#4390843) を使用した。もう 1 種類は *NQO1* 阻害剤であるジクマロール (東京化成工業) 濃度 30 μ M となるように加えるもので、陰性コントロールにはその溶媒のみを加えた。以上のいずれかの処置を行った 24 時間後にドキソルビシン (Cayman Chemical) を種々の濃度 (0-5,000 ng/mL) となるように加え、その 48 時間後に CellTiter-Glo reagent (Promega) を用いて細胞活性を測定した。実験はいずれも triplicate で行い、さらに複数回の実験で同様の結果を得た。

***ODC1* 阻害による *NQO1* タンパクの不安定化を見るためのウェスタンブロット**

まず 6 cm ディッシュに HepG2 細胞を 500,000 細胞ずつ播種し、その後以下の通り *NQO1* 阻害の処置または陰性コントロールの処置を行った。阻害方法は 2 種類で、1 つは細胞播種の 24 時間後に Applied Biosystems より購入した *NQO1* siRNA (s4089/s4091) を Lipofectamine RNAiMAX reagent (Life Technologies) を用いてトランスフェクションするもので、陰性コントロールには negative control siRNA (#4390843) を使用し、トランスフェクションの 36 時間後に細胞を回収した。もう 1 つは細胞播種の 48 時間後に *NQO1* 阻害剤であるジクマロール (東

京化成工業) を濃度 30 μM となるように加えるもので、陰性コントロールにはその溶媒のみを加え、その処置の 12 時間後に細胞を回収した。これらの細胞溶解液に対し、 α チュブリン (ab7291; Abcam)、NQO1 (NB200-209; Novus Biologicals)、及び ODC1 (GTX101521; GeneTex) に対する一次抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。実験はすべて triplicate で行った。ODC1 のバンドのシグナル強度の標準化は、同じ処理条件における α チュブリンのバンドのシグナル強度で除することにより行った。

ODC1 阻害と細胞増殖アッセイ

ODC1 阻害が肝芽腫細胞株において細胞増殖能にどのように影響するかを観察するため、以下の実験を行った。まず HepG2、または HuH6 の細胞を 96 ウェルプレート内におよそ 5,000 細胞ずつ播種し、その 24 時間後に ODC1 阻害の処置または陰性コントロールの処置を行った。阻害方法は 2 種類であり、1 つは Applied Biosystems より購入した NQO1 siRNA (s9821) を Lipofectamine RNAiMAX reagent (Life Technologies) を用いてトランスフェクションするもので、陰性コントロールには negative control siRNA (#4390843) を使用した。もう 1 種類は ODC1 阻害剤であるジフルオロメチルオルニチン (DFMO; 東京化成工業) 濃度 0.1 μM 、0.5 μM 、1.0 μM 、及び 5.0 μM となるように加えるもので、陰性コントロールにはその溶媒のみを加えた。以上のいずれかの処置を行った後、24 時間後、48 時間後、72 時間後、及び 96 時間後に CellTiter-Glo reagent (Promega) を用いて細胞活性を測定した。実験はいずれも triplicate で行い、さらに複数回の実験で同様の結果を得た。

シーケンスデータ、及びマイクロアレイデータの登録

本研究で得られたターゲットシーケンス、SNP アレイ、DNA メチル化アレイ、及び RNA シーケンスデータはすべて、Japanese Genotype-phenotype Archive³¹ にアクセス番号 JGAS00000000188 の下に登録した。

結果

遺伝子変異、構造異常、コピー数異常、及びアレル不均衡のプロファイル

まずターゲットシーケンスと SNP アレイ解析により同定された遺伝子変異、構造異常、コピー数変化、及びアレル不均衡の全体像を図 1 に示す。ターゲットシーケンスの結果として、肝芽腫 59 例で計 76 個の体細胞変異と構造異常が同定され、さらに 4 例で *APC* の機能喪失型の生殖細胞変異が同定された。ドライバー変異に関して言えば、 β カテニンをコードする遺伝子である *CTNNB1* のミスセンス変異、またはインフレーム欠失が 59 例中 54 例 (92%) で見られた。これらはすべてエクソン 3 に関連したものであり (図 2a)、過去の報告から β カテニンの分解を阻害し、Wnt シグナルの異常亢進、そして肝芽腫の発症に寄与する変異、構造異常であると考えられた^{6,32}。一方、*APC* も同様に肝芽腫のドライバー遺伝子であることが知られているが^{5,9}、*APC* の機能喪失変異を有する 4 例に関しては、そのうち 3 例が付加的な *APC* の体細胞変異、構造異常を伴っており、結果として両アレルの機能喪失を来していた (図 2b)。ターゲットシーケンスで *CTNNB1*、*APC* のいずれの変異、構造異常も検出できなかった 1 例

(HBL50C) に関しては、後に行われた RNA シーケンスで *CTNNB1* のエクソン 3 内の 15 塩基のインフレーム欠失 (c.83_94del) が検出された。これも合わせると、肝芽腫のドライバーと考えられる *CTNNB1* ないし *APC* の変異、構造異常は全 59 例で検出された。一方で、その 2 遺伝子を除く遺伝子の変異、構造異常は極めて少なく、*TERT* のプロモーター、*DST*、*PEG10*、*PTPRO* の変異がそれぞれ 2 例ずつ (3%) で見られたのみであった。

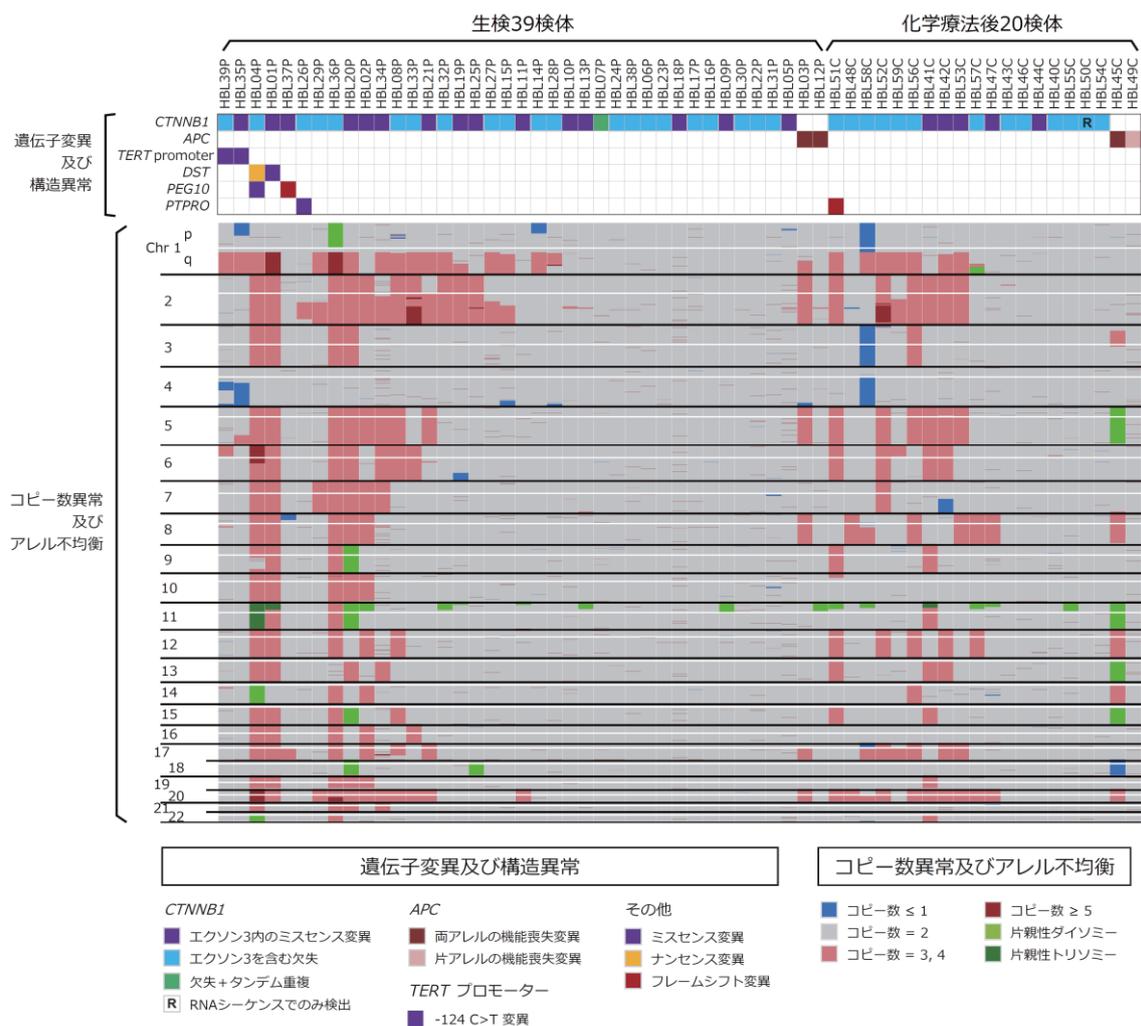
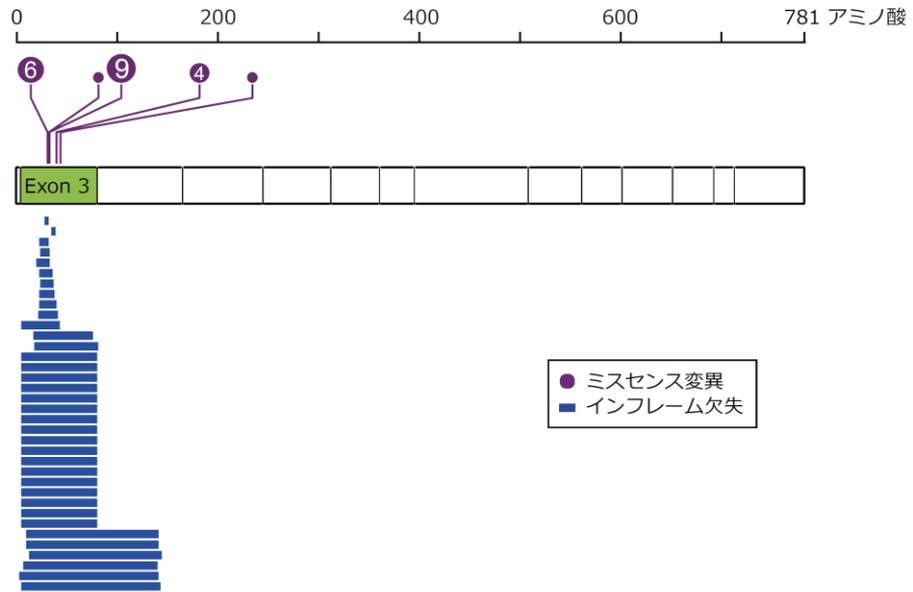


図 1. 肝芽腫のゲノム異常のプロファイル

肝芽腫 59 例に対して施行したターゲットシーケンス及び SNP アレイ解析で同定された遺伝子変異、構造異常、コピー数異常、及びアレル不均衡を検体ごとに示している。遺伝子変異と構造異常に関しては 2 例以上で反復して異常の見られた遺伝子についてのみ示している。

a CTNNB1 NM_001098209



b APC NM_000038

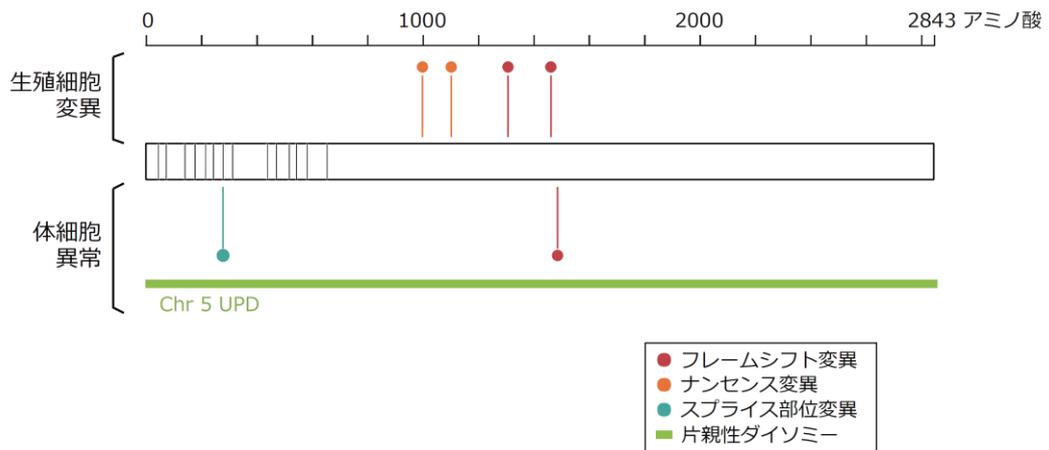


図 2. 肝芽腫のドライバー変異の分布

肝芽腫 59 例のターゲットシーケンスで同定された *CTNNB1* (a) 及び *APC* (b) の遺伝子変異、構造異常の位置、種類を示す。変異を示す丸印の中の数字は、その位置に変異を有する症例の数を示している。

またコピー数異常とアレル不均衡に関しては、染色体単位または腕単位でのコピー数増加の頻度が高く、コピー数減少を来す領域はわずかであった(図3)。また59例中18例(31%)で11番染色体の一部または全体の片親性ダイソミーまたは片親性トリソミーが見られた(図4)。

以上のゲノム異常は、過去に報告された肝芽腫のゲノム異常のプロファイルと傾向を同じくするものであった^{10-12,15,16}。βカテニンの安定化を来す*CTNNB1*、*APC*の変異、構造異常は極めて高頻度で見られ、その重要性は再確認されたものの、それ以外の異常は肝芽腫の多様性を説明するのに十分な情報とは言えず、さらなる解析の必要性が示唆された。

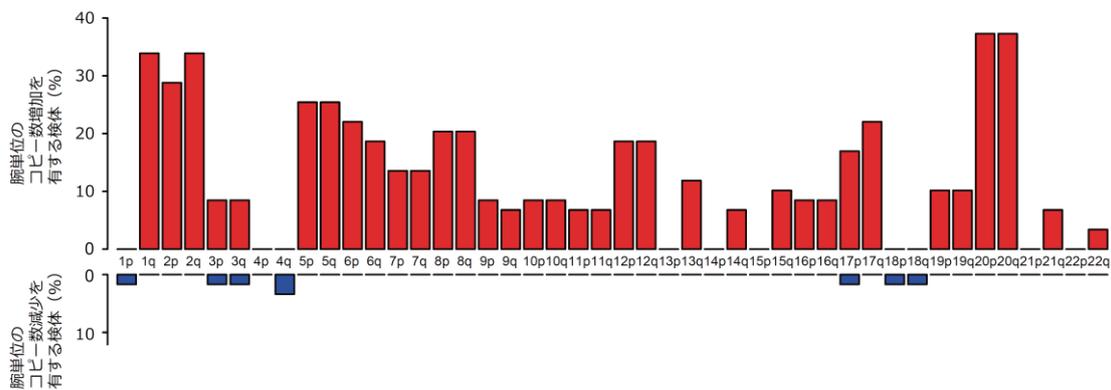


図3. 肝芽腫59例におけるコピー数異常のスペクトラム

各常染色体の長腕及び短腕に対し、腕単位でのコピー数増加、または減少を呈した症例の割合が示されている。腕単位でのコピー数増加、または減少とは、その腕の塩基数の80%以上の領域においてコピー数増加、または減少が見られることと定義している。

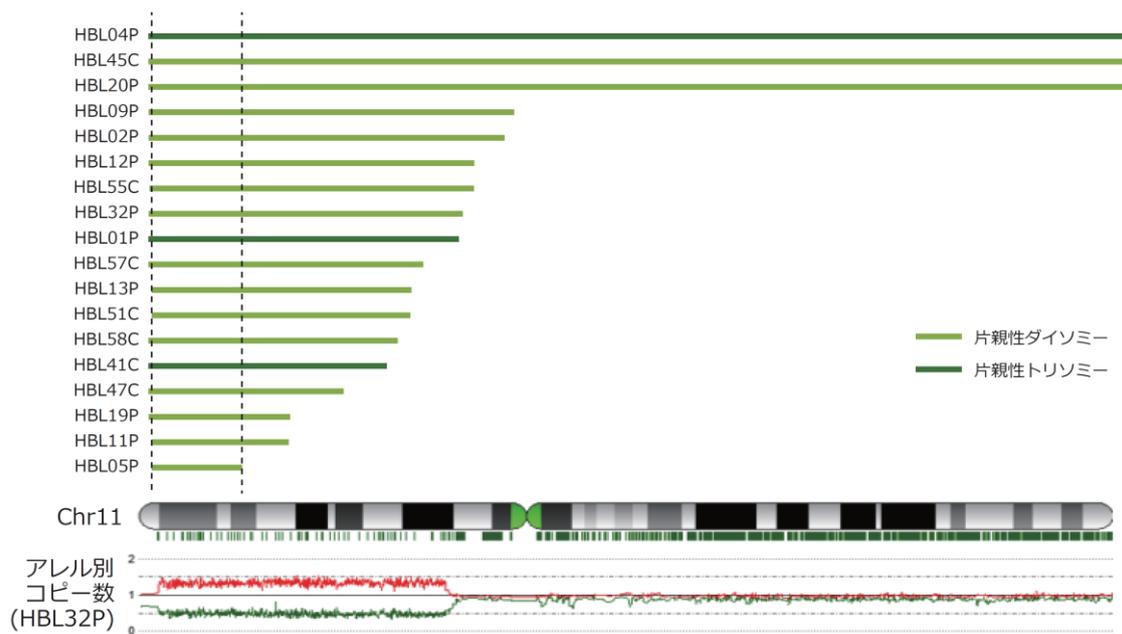


図 4.11 番染色体の一部または全体の片親性ダイソミー・トリソミー

緑色のバーは各検体において片親性ダイソミー・トリソミーを呈している領域を示しており、点線で囲まれた部位はそれらの最小共通領域を示している。下端に一例として、検体 HBL32P におけるアレル別コピー数を赤と緑の線で示した。

網羅的 DNA メチル化解析に基づく肝芽腫の新規分類

肝芽腫の遺伝学的特徴とその多様性をもたらす分子基盤についてより詳細に検討するため、マイクロアレイによる網羅的 DNA メチル化解析を行った。そして DNA メチル化のプロファイルに基づき、肝芽腫を生物学的に異なるサブグループに分類できるかを検証してみたが、59 例全例に対して様々な条件でコンセンサスクラスタリングによる分類を試みたところ、分類法として安定しておりかつ生物学的に意味があると考えられるような分類の仕方は見出せなかった

(図 5)。その理由として、59 例の中に生検検体と化学療法後検体が混在しており、生検検体と比較して化学療法後検体は抗がん剤の影響による様々な修飾が加わっており、そのことが解析結果の解釈を困難にしていると考えられた。実際、生検検体 39 例だけに絞って解析したところ、後述する通り安定かつ生物学的に意義のある分類法が得られた。そのため、以下のメチル化プロファイルに基づくクラスタリング解析は生検検体 39 例に絞って行うこととした。

まず、39 例のメチル化データに対してコンセンサスクラスタリングを行ったところ、肝芽腫は大きく 2 つのクラスターに分類された。これを臨床情報と照らし合わせたところ、一方のクラスターは病理学的により高分化な胎児型 (fetal type) が多くを占めており、もう一方のクラスターはより低分化な胎芽型

(embryonal type)、または胎児型と胎芽型との混合型が多くを占めていることが見出された。そのためそれらを F 群及び E 群と呼ぶこととした (図 6a-c)。さらに E 群に分類された 30 例に対して第 2 段階のコンセンサスクラスタリングを行ったところ、さらに 2 つのクラスターに分類された。これらは、診断時年齢が 2 歳よりも下のクラスターと上のクラスターとに概ね対応しており、年少

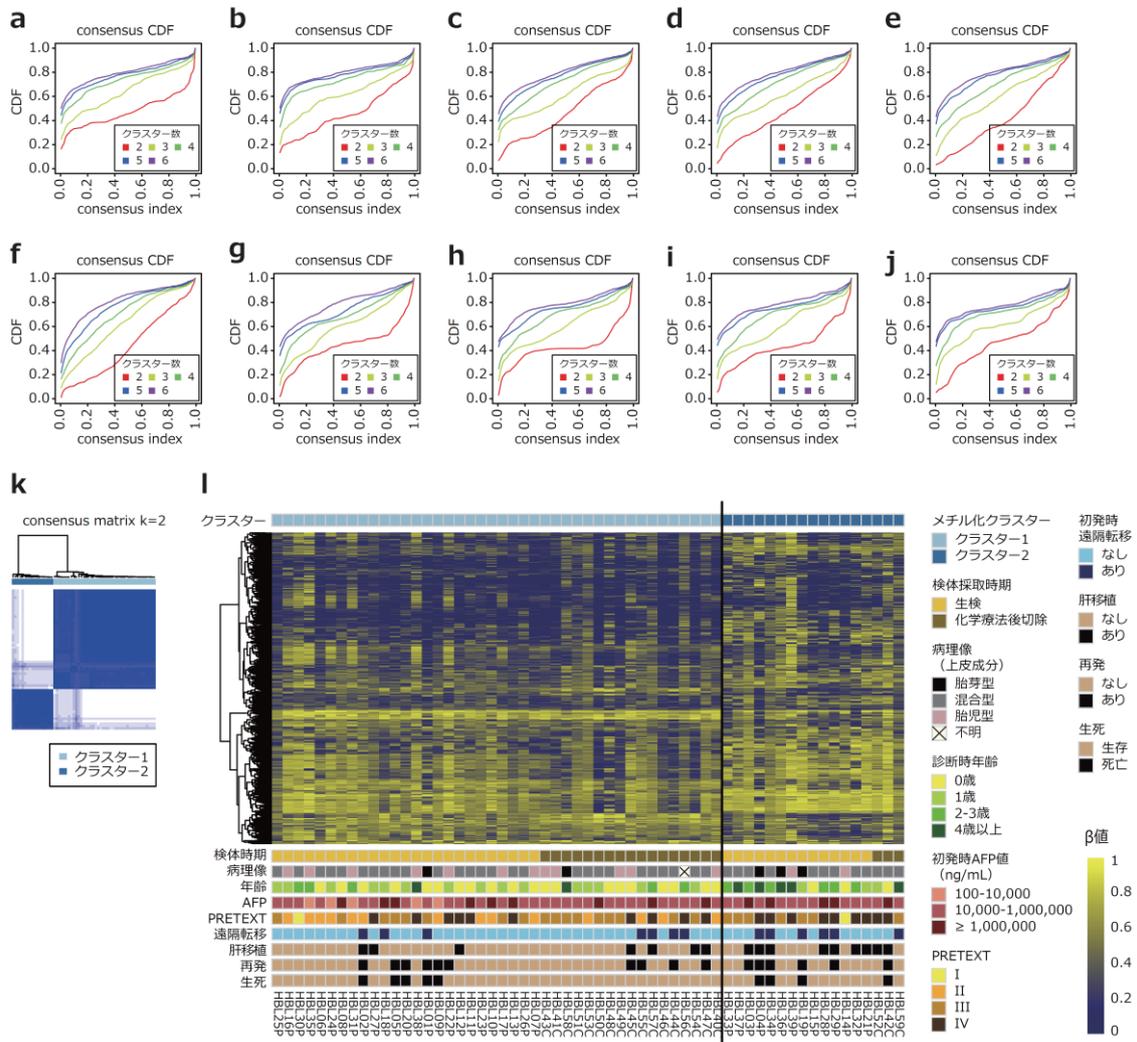


図 5. 肝芽腫 59 例のメチル化データに対するコンセンサスクラスタリング

(a-j) β 値の標準偏差の上位 100 (a,f)、1,000 (b,g)、2,000 (c,h)、3,000 (d,i)、及び 10,000 (e,j) プロブを用いて、Euclidean 法 (a-e) 及び Pearson 法 (f-j) で行ったコンセンサスクラスタリングの累積分布関数プロット。上位 2,000 プロブを用いて Pearson 法で 2 群にクラスタリングした場合 (h) が最も安定した分類法であることが示唆される。(k-l) 上位 2,000 プロブ、Pearson 法での 2 群へのコンセンサスクラスタリングに対応するコンセンサスマトリックス (k) と、その分類に基づくメチル化のヒートマップと各検体の臨床情報 (l)。コンセンサスクラスタリングで分類された 2 群の間で、明確な臨床的特徴の差は見出されず、生物学的に意義のある分類法とは言えない。

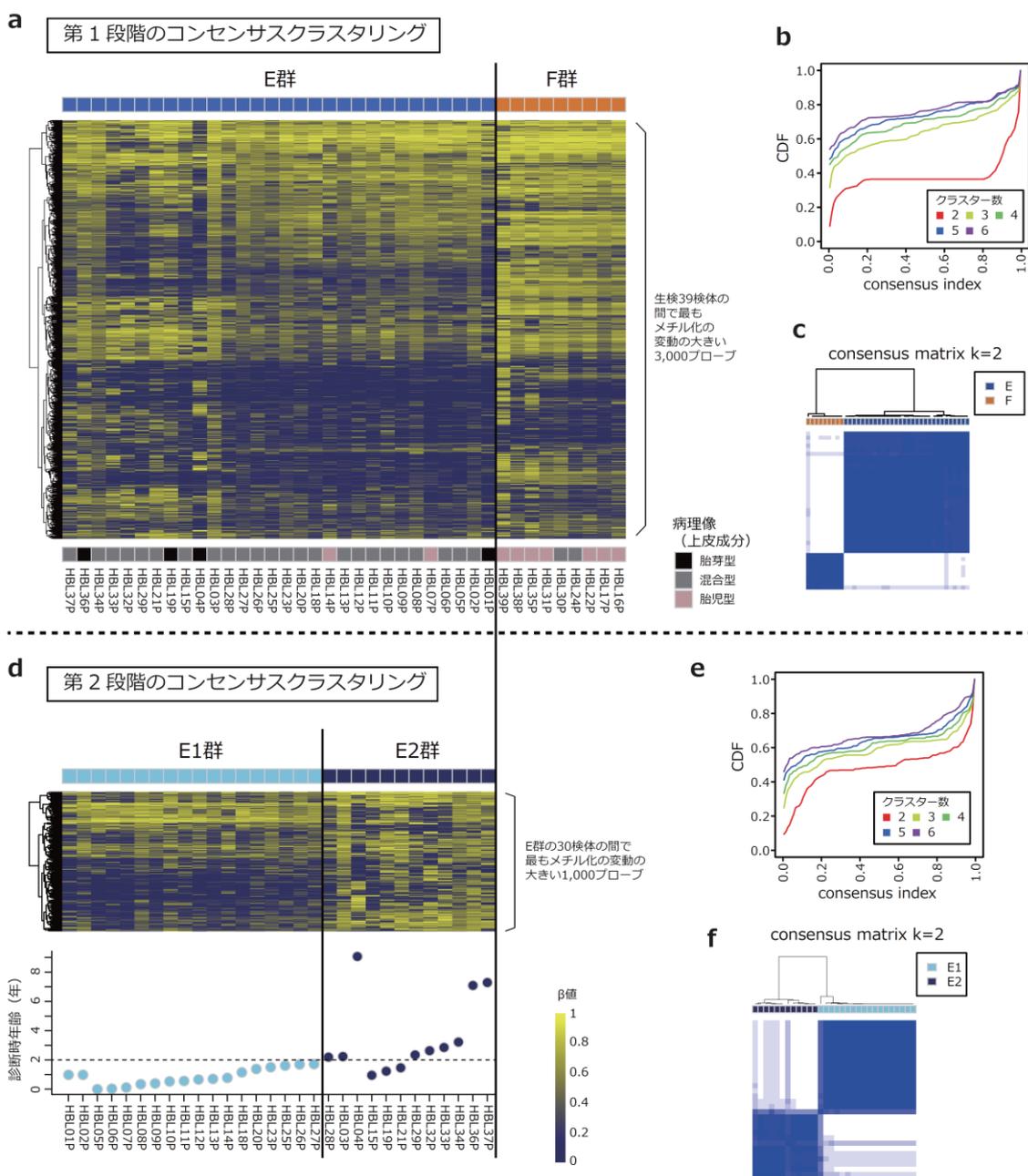


図 6. 生検検体 39 例のメチル化データに対するコンセンサスクラスタリング

(a-c) 生検の 39 検体に対し、メチル化の変動の大きい上位 3,000 プローブ (β 値の標準偏差の大きい順) を用いて行った第 1 段階のコンセンサスクラスタリング。使用した 3,000 プローブの β 値のヒートマップ (a) と累積分布関数プロット (b)、コンセンサスマトリックス (c)。(d-f) E 群の 30 検体に対し、メチル化の変動の大きい上位 1,000 プローブを用いて行った第 2 段階のコンセンサスクラスタリング。使用した 1,000 プローブの β 値のヒートマップ (d) と累積分布関数プロット (e)、コンセンサスマトリックス (f)。

のクラスターを E1、年長のクラスターを E2 と呼ぶこととした (図 6d-f)。これらのメチル化クラスターは、病理組織像や年齢だけでなく、その他の臨床的特徴とも強く相関していた (図 7)。特に F 群と比較して E1 及び E2 群は、初発時の AFP 値がより高値であり、遠隔転移や再発、死亡がより高頻度であった。また肝移植を要する症例は E2 群で最も高頻度であり、次いで E1 群で多く、F 群では見られなかった。これらの臨床的特徴の差は、クラスター間で異なる生物学的メカニズムが存在することを示唆しており、DNA メチル化に基づく分類の有用性が示唆された。先に示した遺伝子変異や構造異常、コピー数変化、及びアレル不均衡に関して、クラスター間で差が見られるかを検証したが (図 8)、遺伝子変異や構造異常に関しては明らかなクラスター間の差は見られなかった。またコピー数に関しては、E2 群で最もコピー数増加の頻度が高く、次いで E1 群、F 群が続き、F 群ではコピー数異常が極めて少なかった。しかしコピー数異常やアレル不均衡も各クラスター内で全例共通というものではなく、それらがクラスター形成の要因である可能性は低いと考えられた。

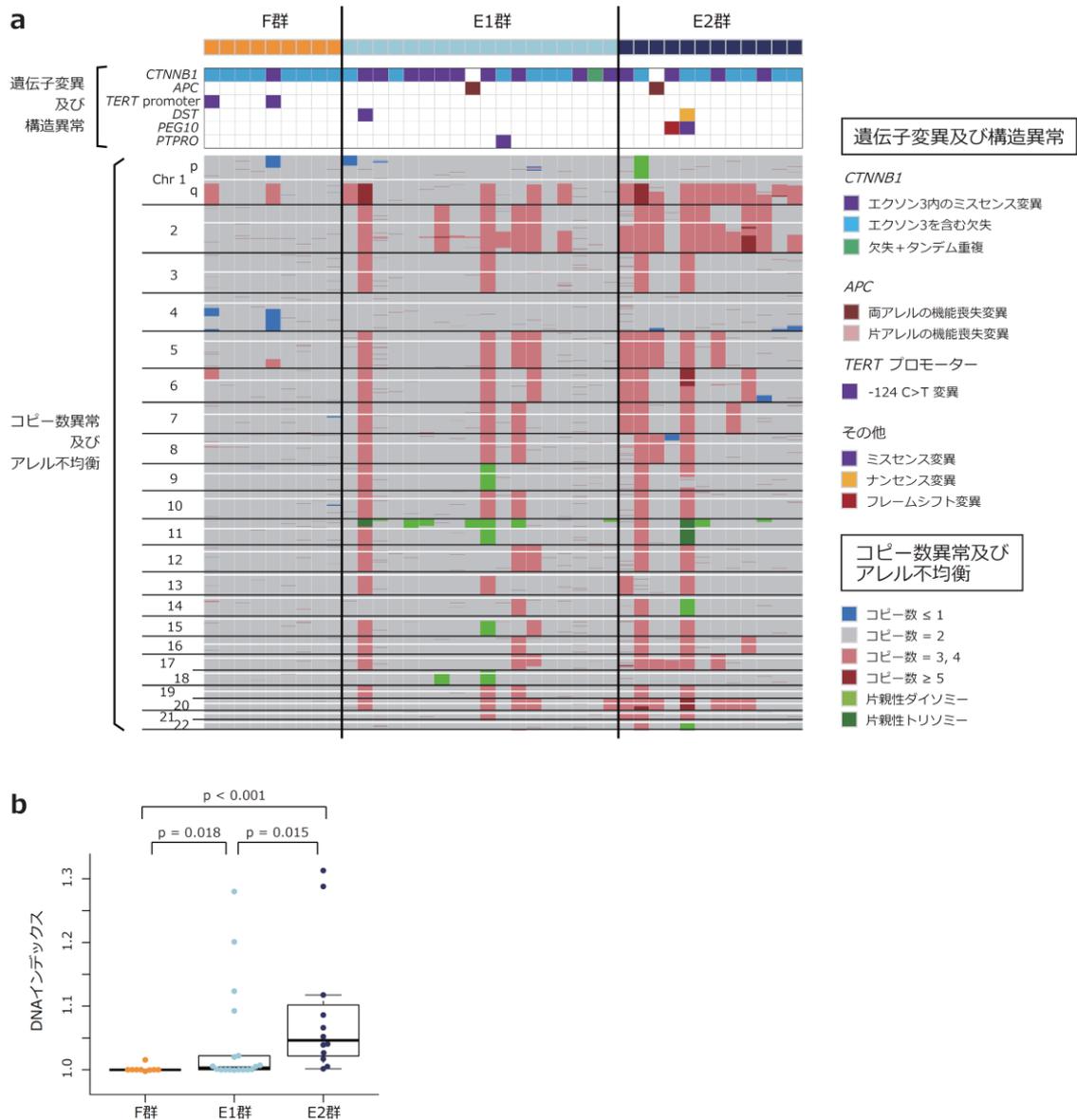


図 8. メチル化クラスターごとの遺伝子変異、構造異常、コピー数異常、アレル不均衡のプロファイル

(a) 肝芽腫の生検検体 39 例の遺伝子変異、構造異常、コピー数異常、アレル不均衡についてメチル化クラスター別に示している。(b) DNA インデックスのクラスター間の比較。DNA インデックスは常染色体上の全領域の平均のコピー数を 2 で割ったものとして計算している。クラスター間の差に対する Wilcoxon の順位和検定の p 値がそれぞれ示されている。

遺伝子発現解析によるメチル化クラスターの遺伝学的特徴付け

各メチル化クラスターを遺伝学的に特徴付けるため、RNA シーケンスによる遺伝子発現解析を行った。RNA シーケンスを施行するに足る量のトータル RNA が抽出できた肝芽腫の生検検体 35 例と、コントロールとしての正常肝 10 例に対して RNA シーケンスを施行し、遺伝子発現のプロファイリングを行った。まず、肝芽腫のメチル化クラスター 3 群と正常肝とを合わせた計 4 群の間での発現変動遺伝子に対してクラスタリングを行い、ヒートマップを描画したところ、その発現の特徴によって遺伝子は大きく 4 群に分類された (図 9)。まず正常肝で低発現、肝芽腫 3 群で共通して高発現の遺伝子群の中には、*AXIN2*、*DKK4*、*TCF7* といった Wnt シグナル経路に関連する遺伝子が含まれていた。次に正常肝で低発現、肝芽腫の F 群で低度～中等度発現、E1 群及び E2 群で高発現の遺伝子群の中には、*CCNB1*、*CCNB2*、*CDK4* といった細胞周期に関連する遺伝子の他、肝芽腫の腫瘍マーカーである *AFP* も含まれていた。一方で、正常肝で高発現の遺伝子群はいずれもチトクロム P450 (CYP) ファミリーや UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) ファミリーといった正常肝機能に関連する遺伝子が含まれていた。そしてそれらは肝芽腫の E1 群及び E2 群ではいずれも低発現であったが、F 群における挙動によって大きく 2 群に分かれた。すなわち、F 群で E1 群、E2 群と同じく低発現の遺伝子群と、F 群において中等度～高度に発現している遺伝子群とに分かれた。これらを見ると、E1 群と E2 群の遺伝子発現パターンは類似しており、正常肝と対照的だったのに対して、F 群の遺伝子発現は一部の遺伝子群に関しては E1 群、E2 群と類似しているものの、一部の遺伝子群に関しては比較的正常肝に近いパターンを取っていることが見て取れた。

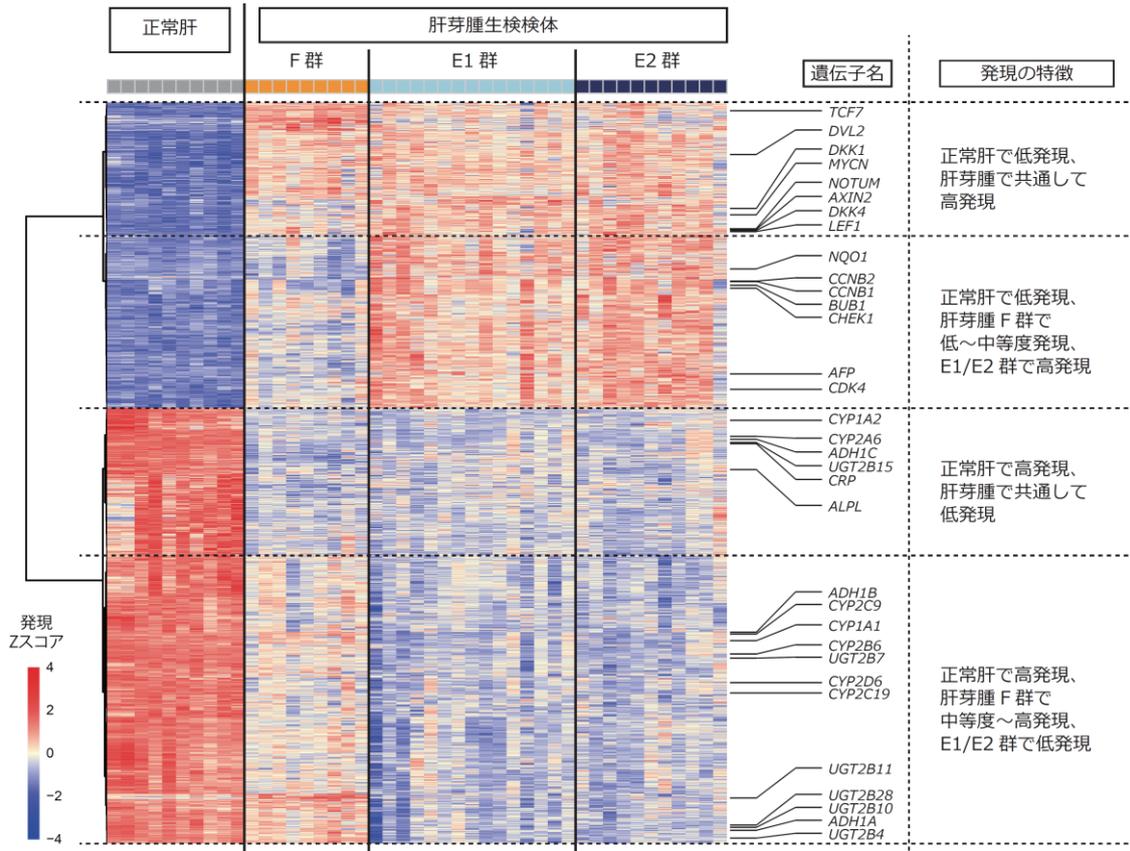


図 9. 肝芽腫のメチル化クラスター3 群と正常肝との間での発現変動遺伝子のヒートマップ

発現変動遺伝子の上位 2,000 個に対してヒートマップが描画されている。遺伝子方向については階層的クラスタリングで並べ替えられており、結果として 2,000 個の遺伝子は検体群ごとの発現の特徴によって 4 つの遺伝子群に分けられている。

遺伝子発現データに対して行った主成分分析のプロットを見ても、F群がE1群、E2群よりも正常肝に近い所に位置していた（図10）。さらに、クラスター間の発現変動に対してパスウェイ解析を行ったところ、肝芽腫の3群はいずれも正常肝と比較して Wnt シグナル経路や cell cycle 経路が亢進し、チトクロム P450 関連経路など正常肝機能に関するパスウェイは低下していた。一方、肝芽腫内でクラスター間の比較を行ったところ、E1群とE2群の間では有意なパスウェイ変動がほとんどなかったのに対し、F群はそれら2群とは大きく異なるパターンを呈していた。特に、F群はE1群、E2群と比較して cell cycle 経路が低下しており、一方で正常肝機能に関するパスウェイは相対的に亢進していた。

これらの遺伝子発現のパターンから、E1群とE2群の類似性、及びF群が相対的に正常肝に近いことが示唆された。臨床的特徴やDNAメチル化のパターンを振り返って見ても、F群とE1/E2群との差異が大きく、それと比較するとE1群とE2群との間の差異は小さかった。以上から、肝芽腫の中の臨床的及び遺伝学的な多様性を考慮するにあたり、F群とE1/E2群との比較が最も重要であると考えられた。

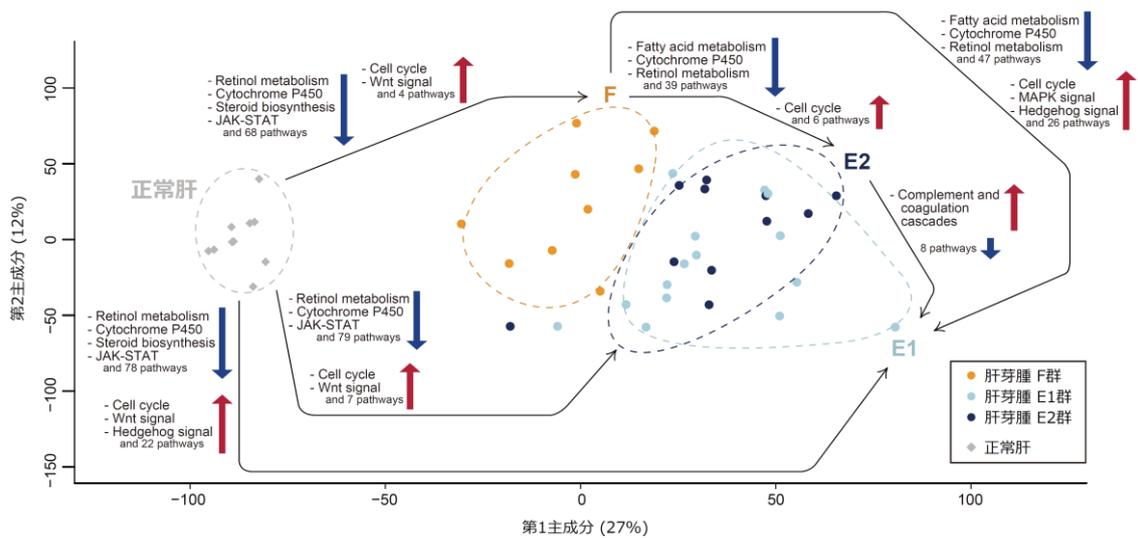


図 10. 肝芽腫と正常肝の遺伝子発現データに対する主成分分析と、クラスター間の発現変動に対するパスウェイ解析の結果

肝芽腫の生検検体 35 例と正常肝 10 例の間で発現変動の大きい 10,000 遺伝子（標準化された遺伝子発現値の平均絶対偏差が大きい順）の発現データに対して主成分分析を行い、第 1 及び第 2 主成分を 2 つの軸としてプロットしている。また発現変動のパスウェイ解析の結果については、各クラスター間で有意に変動のある KEGG パスウェイのうち、腫瘍に関連するものや正常肝機能に関連するものを中心に記載している。クラスター X から Y に向けて黒色の矢印があり、その近くにパスウェイ A と上向き矢印が記載されている場合、クラスター X と比較してクラスター Y においてパスウェイ A が有意に亢進していることを示す。逆にそれが下向き矢印と共に記載されている場合、クラスター X と比較してクラスター Y でパスウェイ A が低下していることを示す。

メチル化クラスター間の DNA メチル化変動と発現変動との関係

肝芽腫のメチル化クラスターの中で、F 群と E1/E2 群とをより詳細に比較し、さらに DNA メチル化変動が遺伝子発現に及ぼす影響を検討するため、メチル化データと遺伝子発現データとの統合を行った。F 群と E1/E2 群との間で有意にメチル化変動のある CpG 領域を抽出し、それがデータベース上のどのようなゲノム領域と有意にオーバーラップしているかを解析するため、region set enrichment analysis を行った。その結果、F 群と比較して E1/E2 群で高メチル化となっている CpG 領域と有意にオーバーラップするゲノム領域として、FDR q 値 0.001 未満のものが計 50 領域抽出され、その中で q 値が最も低い 2 つの領域が、正常肝細胞に対して HNF4A 及び CEBPA に対する抗体を用いて施行されたクロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-seq) のピーク領域であった。すなわち、肝細胞の分化に必須の転写因子として知られている HNF4A と CEBPA³³ の結合領域が、E1/E2 群で高メチル化になっている領域と最も有意にオーバーラップしているという結果であった。実際に、E1/E2 群の高メチル化領域と、HNF4A 及び CEBPA 抗体による ChIP-seq のピーク領域との間のオーバーラップについて、正常な胎児肝、及び成人肝のメチル化アレイデータで確認してみたところ、胎児肝では E1/E2 群と同様に高メチル化となっている一方、成人肝では F 群と同様に低メチル化となっていた (図 11)。これらを考え合わせると、F 群と比較して E1/E2 群で高メチル化となっている領域は、肝細胞としての分化において重要な領域であると考えられた。

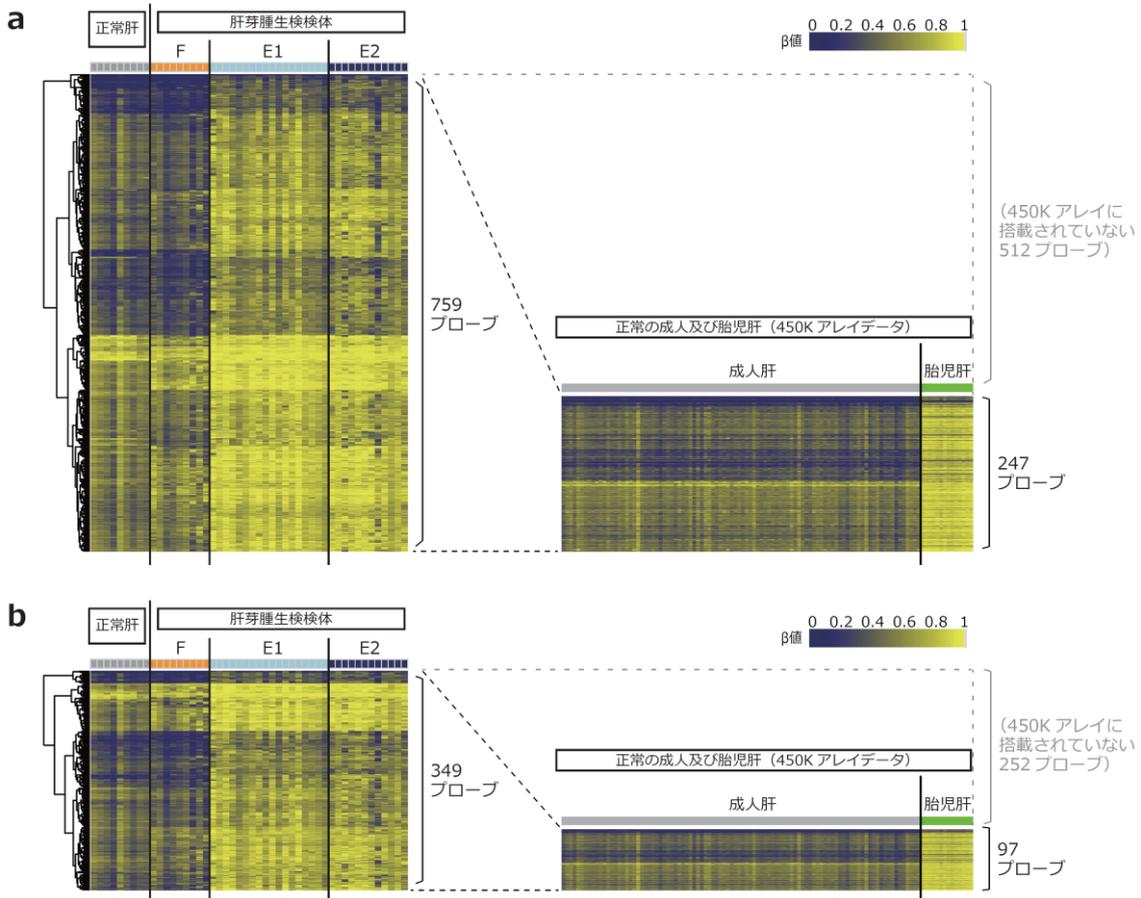


図 11. HNF4A/CEBPA の結合領域における F 群と E1/E2 群との間のメチル化変動は成人肝と胎児肝との間のメチル化変動に類似する

(a) 肝芽腫の E1/E2 群において F 群と比較して高メチル化の CpG 領域の中で、HNF4A の結合領域とオーバーラップする 759 プローブを用いて、当研究コホートの正常肝 9 例と肝芽腫生検検体 39 例に対して描画されたメチル化ヒートマップが左に示されている。右にはその 759 プローブの中で、450K メチル化アレイに搭載されている 247 プローブを用いて、正常な成人肝及び胎児肝検体に対して描画されたメチル化ヒートマップが示されている。(b) 肝芽腫の E1/E2 群において F 群と比較して高メチル化の CpG 領域の中で、CEBPA の結合領域とオーバーラップする 349 プローブを用いて、当研究コホートの正常肝 9 例と肝芽腫生検検体 39 例に対して描画されたメチル化ヒートマップが左に示されている。右にはその 349 プローブの中で 450K メチル化アレイに搭載されている 97 プローブを用いて、正常な成人肝及び胎児肝検体に対して描画されたメチル化ヒートマップが示されている。

このことが遺伝子発現の側面からも確認できるか検証するため、正常な胎児肝、及び成人肝の RNA シーケンスデータと当研究コホートの正常肝、及び肝芽腫の RNA シーケンスデータとを比較した。すると正常な胎児肝で高発現の遺伝子群は肝芽腫の E1/E2 群でより高発現であり、一方で正常な成人肝で高発現の遺伝子群は F 群で相対的に高発現であった (図 12、13)。これらの遺伝子発現様式は、先に示された HNF4A/CEBPA の結合領域のメチル化変動、そして病理組織像とも整合性が取れていると考えられた。すなわち、肝芽腫の E1/E2 群において HNF4A/CEBPA の結合領域が高メチル化となっているが、これは肝細胞としての分化に必須の転写因子の結合を阻害すると考えられる。すると肝細胞としての分化が抑制されるため、より未熟な胎児肝に類似した遺伝子発現様式を呈し、また病理学的にはより未分化な胎芽型の組織像を呈すると考えられた。これらの事実から、F 群と E1/E2 群との間にある遺伝子発現様式と病理組織像の差異は、HNF4A/CEBPA の結合領域のメチル化の差異に基づいていることが示唆された。

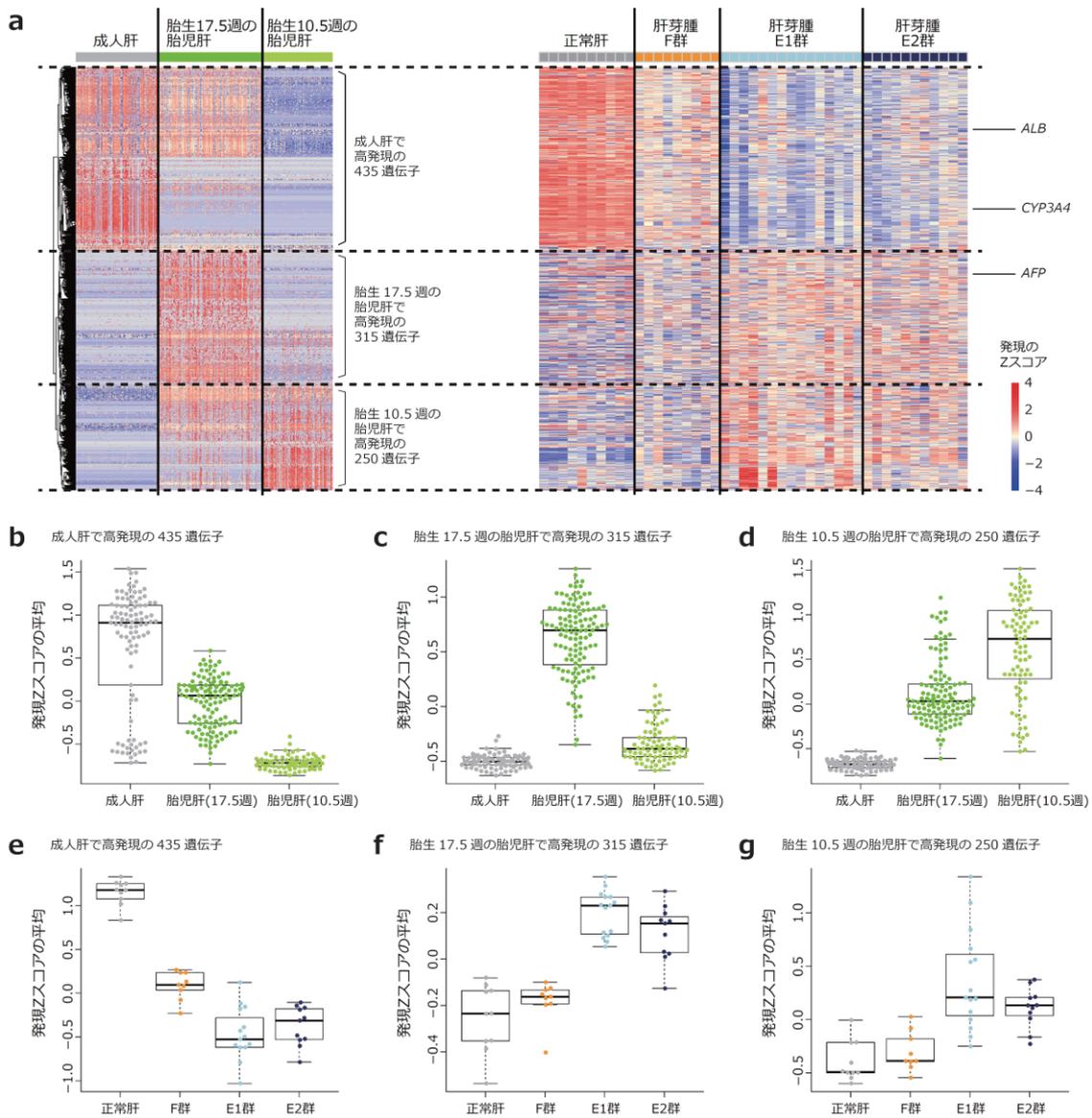


図 12. 遺伝子発現様式から見た肝芽腫のクラスター間の分化度の差異

(a) 正常な胎生 10.5 週及び 17.5 週の胎児肝、及び成人肝検体に対して、3 群間での発現変動遺伝子 1,000 個の発現ヒートマップが左に示されている。遺伝子方向については階層的クラスタリングで並べ替えられており、どの群で高発現かによって 3 つの遺伝子群に分けられている。同じ遺伝子を用いて当研究コホートの肝芽腫 35 例及び正常肝 10 例に対して描画された発現ヒートマップが右に示されている。(b-g) 成人肝で高発現の 435 遺伝子 (b,e)、17.5 週の胎児肝で高発現の 315 遺伝子 (c,f)、及び 10.5 週の胎児肝で高発現の 250 遺伝子 (d,g)、それぞれの発現の標準化 Z スコアの平均値を検体ごとに計算し、正常肝 (b-d) 及び当研究コホート (e-g) の群ごとにプロットしている。

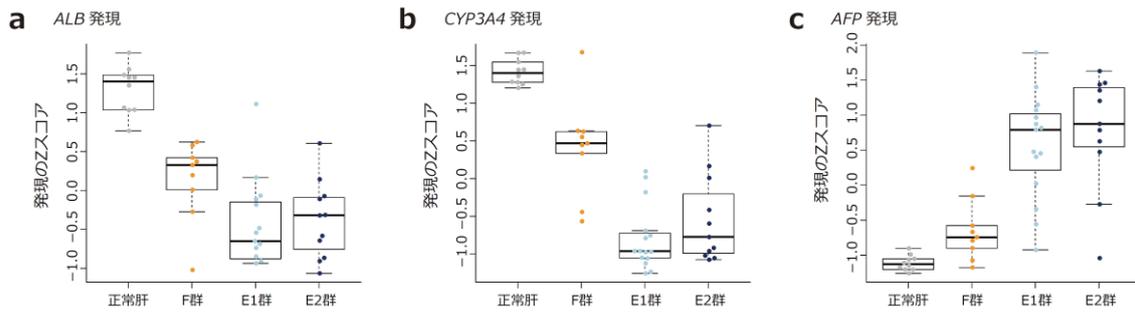


図 13. 肝芽腫のクラスター間における肝分化関連遺伝子の発現の比較
 正常肝細胞の分化度の指標として知られる *ALB* (a)、*CYP3A4* (b)、*AFP* (c) の遺伝子発現の標準化 Z スコアを群ごとにプロットしている。

DNA メチル化データと発現データの統合による、抗がん剤抵抗性関連の治療標的 *NQO1* の同定

DNA メチル化が遺伝子発現に及ぼす影響をより詳細に検証するため、F 群と E1/E2 群との間での遺伝子レベルでのメチル化変動解析、及び発現変動解析の結果を統合した。その結果、F 群と比較して E1/E2 群において最もプロモーター領域の低メチル化によって高発現となっている遺伝子は *NQO1* であった (図 14a)。F 群と E1/E2 群との間での *NQO1* のプロモーター領域のメチル化変動は、正常な成人肝と胎児肝との間でのメチル化変動と類似しており (図 15a)、また正常な肝の分化において *NQO1* は胎生 10.5 週では低発現であるが、胎生 17.5 週では高発現であり、成熟肝では再び低発現となっていた (図 16)。以上から、肝芽腫における *NQO1* 発現は正常肝と同様、分化度によって規定されていることが示唆された。

また *NQO1* の発現と最も相関が強かった CpG プローブは、*NQO1* のエンハンサーである抗酸化剤応答配列 (antioxidant response element : ARE)³⁴ に最も近接したプローブである cg26598152 であった (図 14b、図 15b-e)。すなわち、肝芽腫における *NQO1* の発現は、*NQO1*-ARE のメチル化によって強く制御されているものと考えられた。

NQO1 は NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1 をコードする遺伝子で、抗酸化能や解毒代謝、キノン化合物の還元や解毒に関与しており³⁵、*NQO1* の高発現は肝芽腫を含む種々の癌腫において予後不良因子であることが報告されている^{11,36,37}。肝芽腫の化学療法においてキノン化合物の一種であるアントラサイクリンが重要な役目を果たしていることと、E1/E2 群が F 群と比較して予後不良で

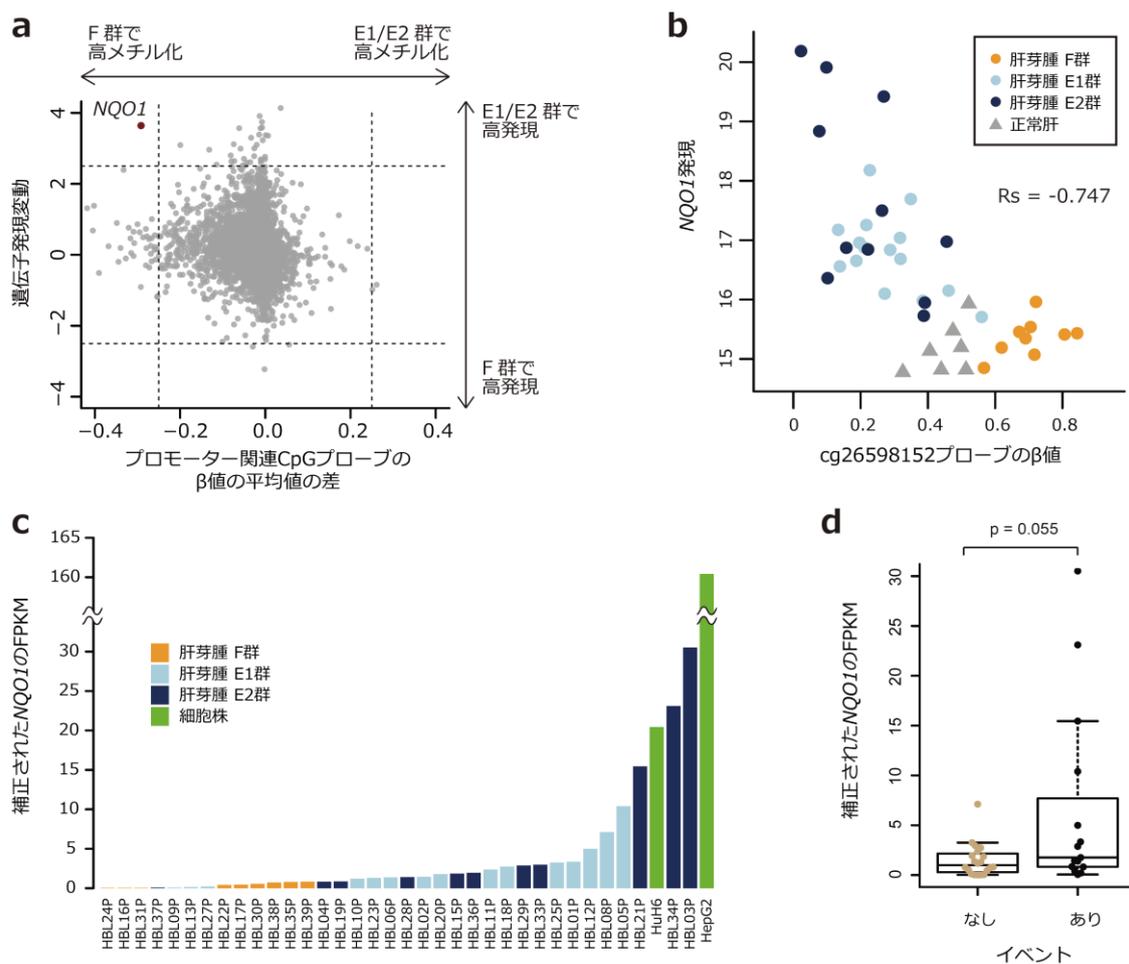


図 14. E1/E2 群における *NQO1* のプロモーターの低メチル化に伴う高発現

(a) F 群と E1/E2 群の間での各遺伝子のプロモーターのメチル化変動と発現変動との関係を示すスターバーストプロット。プロモーターのメチル化変動が β 値の平均値で 0.25 以上、発現変動が \log_2 比で 2.5 以上を示す唯一の遺伝子が *NQO1* であり、赤色のプロットで示されている。(b) *NQO1* のプロモーター関連の CpG プローブである cg26598152 のメチル化の β 値と *NQO1* 発現との相関。 R_s は Spearman の相関係数を表す。(c) 肝芽腫の生検検体 35 例と肝芽腫細胞株 2 例の *NQO1* の補正された FPKM (fragments per kilobase of transcript per million mapped reads)。補正は *NQO1* の酵素活性に大きく影響する一塩基多型 (C609T) のリード数に基づいて行っている (材料と方法を参照)。(d) *NQO1* の補正された FPKM を、イベント (肝移植、再発、死亡) を来した症例と来さなかった症例との間で比較している。Wilcoxon の順位和検定の p 値が示されている。

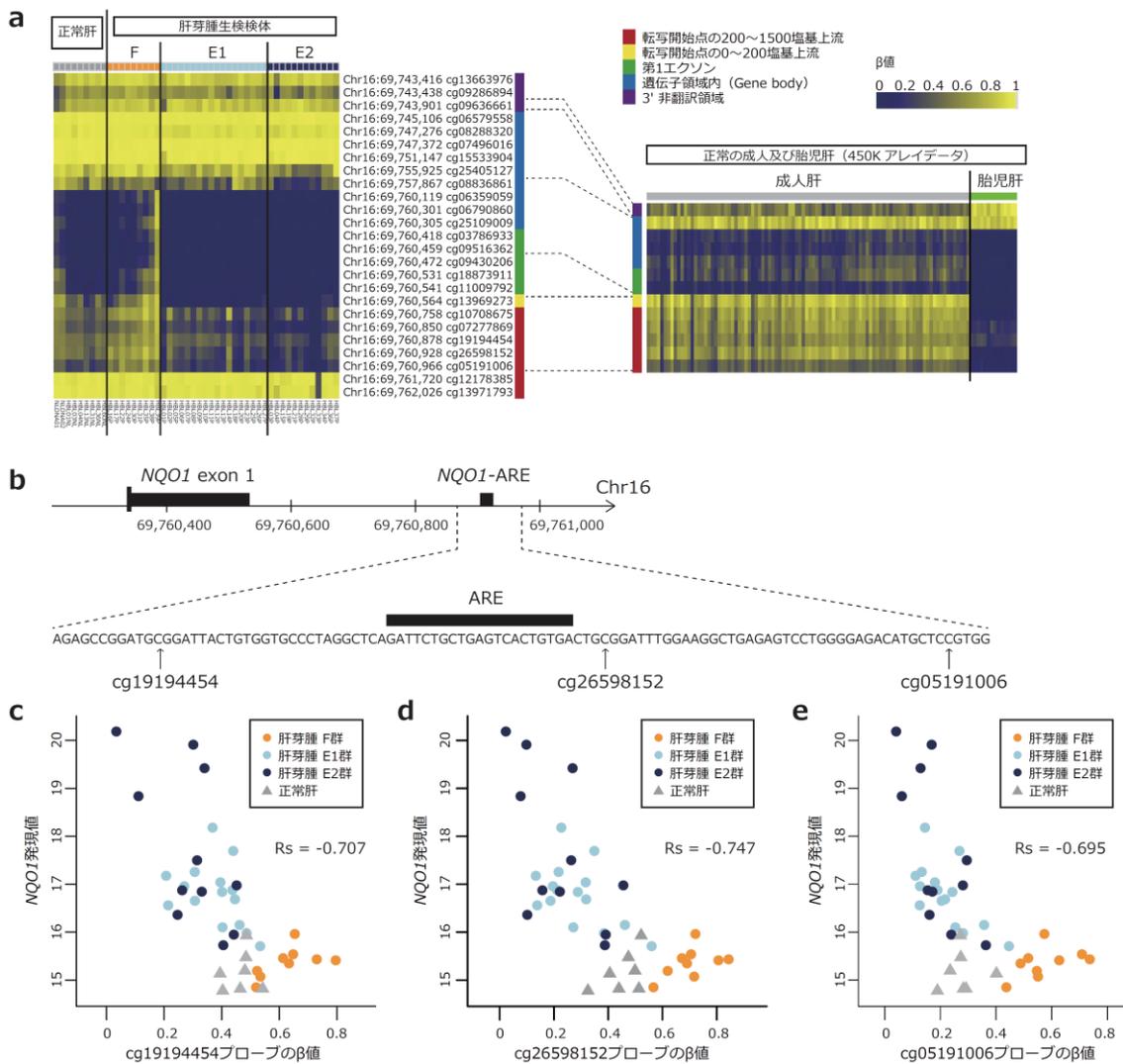


図 15. F 群と E1/E2 群における *NQO1* のプロモーター領域のメチル化変動

(a) *NQO1* に関連する CpG 領域のメチル化のヒートマップ。左は当研究コホートにおける肝芽腫検体と正常肝検体に対して、右は正常な成人肝及び胎児肝検体に対してヒートマップが描画されている。(b) *NQO1* のエクソン 1 と antioxidant response element (ARE)、及びその周辺の CpG プローブのゲノム上の位置関係。位置番号はヒトゲノムのリファレンス配列 hg19 に基づく。(c-e) *NQO1*-ARE の周辺に位置する CpG プローブである cg19194454 (c)、cg26598152 (d)、及び cg05191006 (e) のメチル化の β 値と *NQO1* 発現との相関。 R_s は Spearman の相関係数を表す。*NQO1*-ARE の最も近傍に位置する cg26598152 のメチル化が *NQO1* 発現と最も強く相関している。

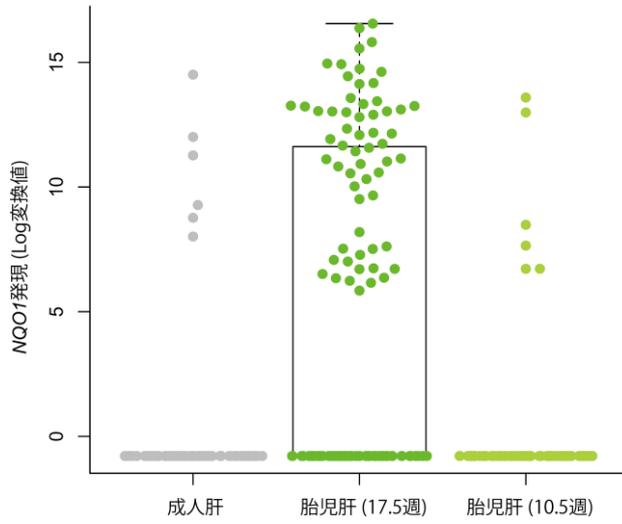


図 16. 正常肝の分化に伴う *NQO1* 発現の変化

左から成人肝、胎生 17.5 週の胎児肝、胎生 10.5 週の胎児肝の細胞における *NQO1* 発現の高さを示している。

あることを考慮すると、*NQO1* の高発現は化学療法抵抗性に関与していることが予測された。実際に、*NQO1* の酵素活性を規定する SNP (C609T) のリード数によって補正された *NQO1* 発現は、化学療法の反応不良のためイベント（肝移植、再発、死亡）を来した症例において、その他の症例と比較して有意に高値であった（図 14c,d）。*NQO1* が肝芽腫のアントラサイクリン抵抗性に与える影響について検証するため、肝芽腫細胞株を用いて抗がん剤感受性アッセイを行った。その結果、*NQO1* ノックダウン用の siRNA や *NQO1* 阻害剤であるジクマロールを使用することにより、*NQO1* 高発現の肝芽腫細胞株である HepG2 や HuH6 において、ドキソルビシンの 50%効果濃度 (EC₅₀) は低下した（図 17a,b,e,f）。またドキソルビシン単独と比較して、*NQO1* 阻害とドキソルビシンの併用は有意に生細胞率を低下させた（図 17c,d,g,h）。以上より、*NQO1* 高発現はアントラサイクリン抵抗性に重要な役目を果たすことが示唆された。

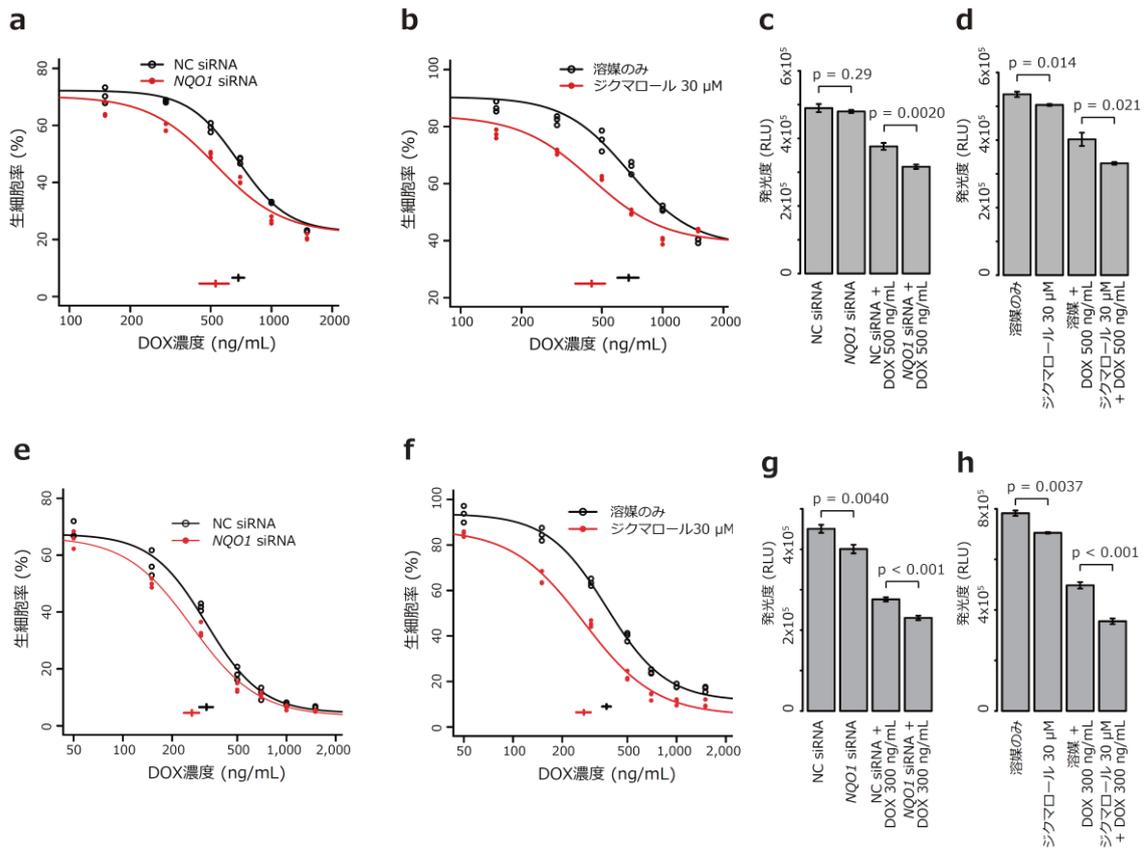


図 17. *NQO1* 高発現の肝芽腫細胞株における *NQO1* 阻害はドキソルビシン感受性を亢進させる

肝芽腫細胞株である HepG2 (a-d) と HuH6 (e-h) を用いた抗がん剤感受性アッセイの結果を示す。(a,b,e,f) *NQO1* 阻害時 (赤線) と陰性コントロール (黒線) におけるドキソルビシン (DOX) の用量反応曲線。siRNA を用いた実験 (a,e) では *NQO1* siRNA に対する陰性コントロールとして Negative control siRNA (NC siRNA) を、また *NQO1* 阻害剤のジクマロールを用いた実験 (b,f) では陰性コントロールとして溶媒のみを加えた場合と比較を行っている。グラフ底部に示されたひげ付きのバーは *NQO1* 阻害時 (赤線) と陰性コントロール (黒線) における EC₅₀ 値とその 95%信頼区間を示す。(c,d,g,h) *NQO1* 阻害とドキソルビシンに有無の組み合わせによる、ATP アッセイの発光度の比較。siRNA を用いた実験 (c,g) では *NQO1* siRNA に対する陰性コントロールとして NC siRNA を、また *NQO1* 阻害剤のジクマロールを用いた実験 (d,h) では陰性コントロールとして溶媒のみを加えている。条件間の比較は対応のない Student の t 検定で行い、その p 値が示されている。エラーバーはそれぞれ 3 回実験の結果の標準偏差を示す。

高リスク肝芽腫における *ODC1* の高発現とそれを標的とした治療可能性

さらに新規の治療標的を同定するため、上記の抗がん剤感受性アッセイにおいて、*NQO1* 阻害単独で肝芽腫細胞株の細胞増殖抑制が見られた点に注目した (図 16d,g,h)。そして、*NQO1* の抗酸化能や解毒代謝以外に知られる機能として、ポリアミン合成や細胞増殖のキーとなる酵素である *ODC1* の安定化があることから (図 18a)³⁸、*NQO1* 阻害に伴う細胞増殖抑制は *ODC1* の不安定化によるものと推測した。実際、肝芽腫細胞株の HepG2 で *NQO1* 阻害時に *ODC1* のタンパク量の有意な減少が認められた (図 18b,c)。

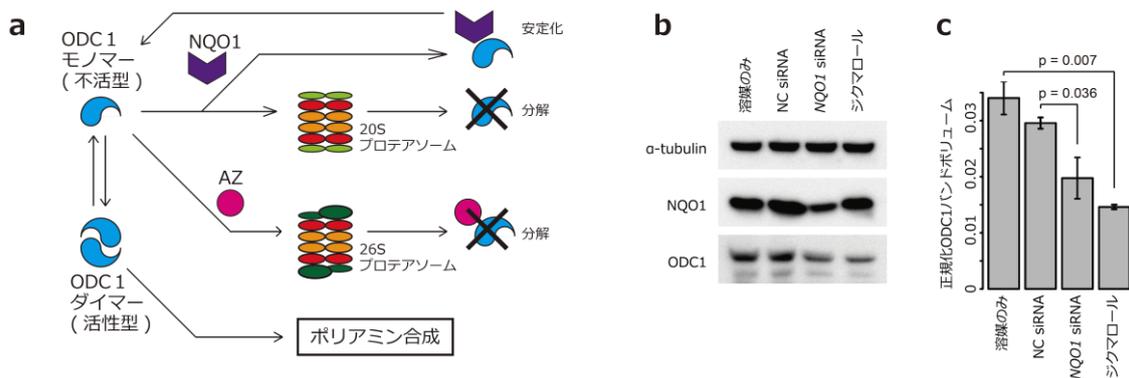


図 18. *NQO1* 阻害による *ODC1* の不安定化

(a) *ODC1* の分解機序、*NQO1* による安定化を示すスキーム。(b,c) 肝芽腫細胞株 HepG2 における *NQO1* 阻害の有無による比較を行うためのウェスタンブロット解析。(b) α チュブリン、*NQO1*、*ODC1* のバンド。(c) 各条件において α チュブリンの信号強度で正規化した *ODC1* の信号強度の比較。条件間の比較は対応のない Student の t 検定で行い、その p 値が示されている。エラーバーはそれぞれ 3 回実験の結果の標準偏差を示す。

加えて、肝芽腫検体における *ODC1* 発現を見たところ、F 群と比較して予後不良な E1/E2 群で最も顕著に高発現となっている遺伝子の 1 つであり (図 19a)、*ODC1* 高発現群の死亡リスクは極めて高かった (図 19b,c)。以上を考え合わせ、*ODC1* は高リスク肝芽腫の高度の細胞増殖にとって重要な分子であり、治療標的の候補であると推測した。その仮説を検証するため、*ODC1* を高発現する肝芽腫細胞株、HepG2 及び HuH6 を用いて細胞増殖アッセイを行った。siRNA または阻害剤を用いた *ODC1* 阻害によって細胞増殖速度が変化するかを見たところ、*ODC1* siRNA と *ODC1* 阻害剤であるジフルオロメチルオルニチン (difluoromethylornithine : DFMO) はいずれも、HepG2 と HuH6 の増殖を有意に抑制した (図 20)。以上より、*ODC1* は高リスク肝芽腫における新たな治療標的候補であることが示された。

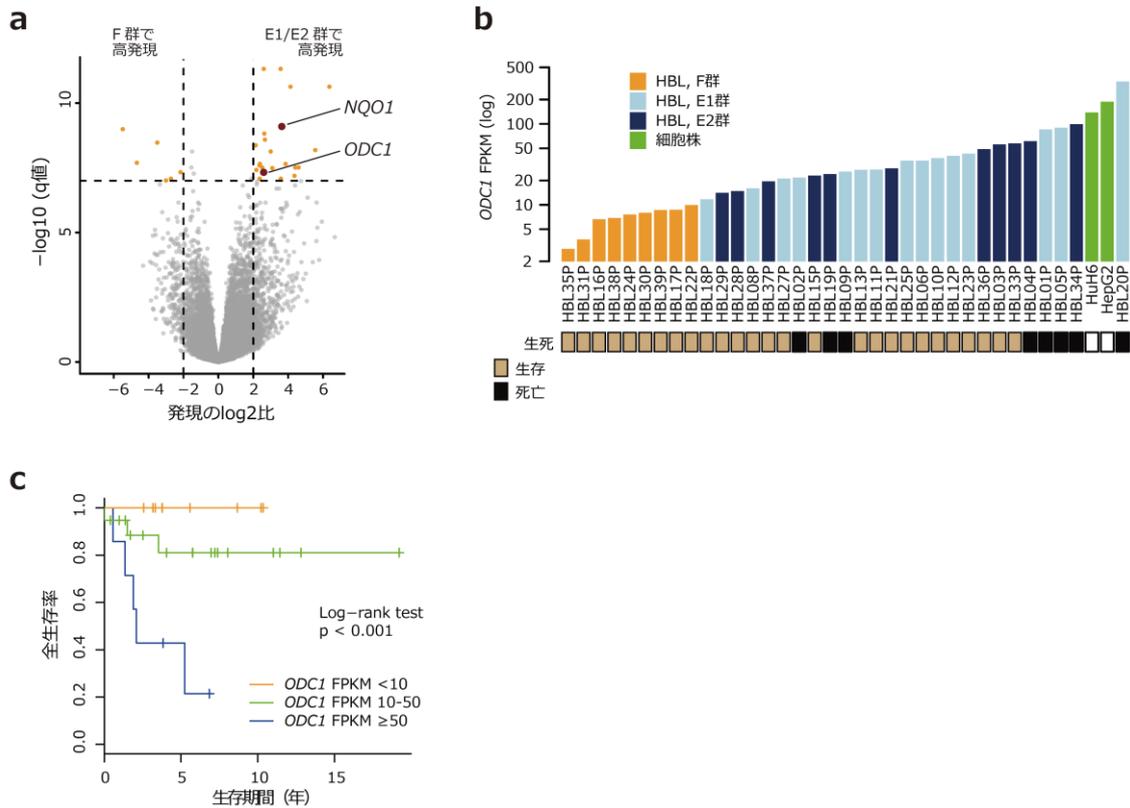


図 19. 高リスク肝芽腫における *ODC1* の高発現

(a) 肝芽腫の F 群と E1/E2 群との間での遺伝子発現変動を示すボルケーノプロット。発現変動解析における log2 比を横軸、false discovery rate (FDR) q 値の常用対数の正負反転値を縦軸として各遺伝子をプロットしている。発現の log2 比の絶対値が 2 以上、FDR q 値が 10^{-7} 以下の遺伝子をオレンジで、また *NQO1* と *ODC1* を赤で表示している。(b) 肝芽腫検体及び肝芽腫細胞株における *ODC1* の発現 (fragments per kilobase of transcript per million mapped reads : FPKM) と、各肝芽腫症例の転帰を示している。(c) *ODC1* 発現ごとの肝芽腫の全生存率を示す Kaplan-Meier 曲線。群間の生存率の差に対する Log-rank 検定の p 値が示されている。

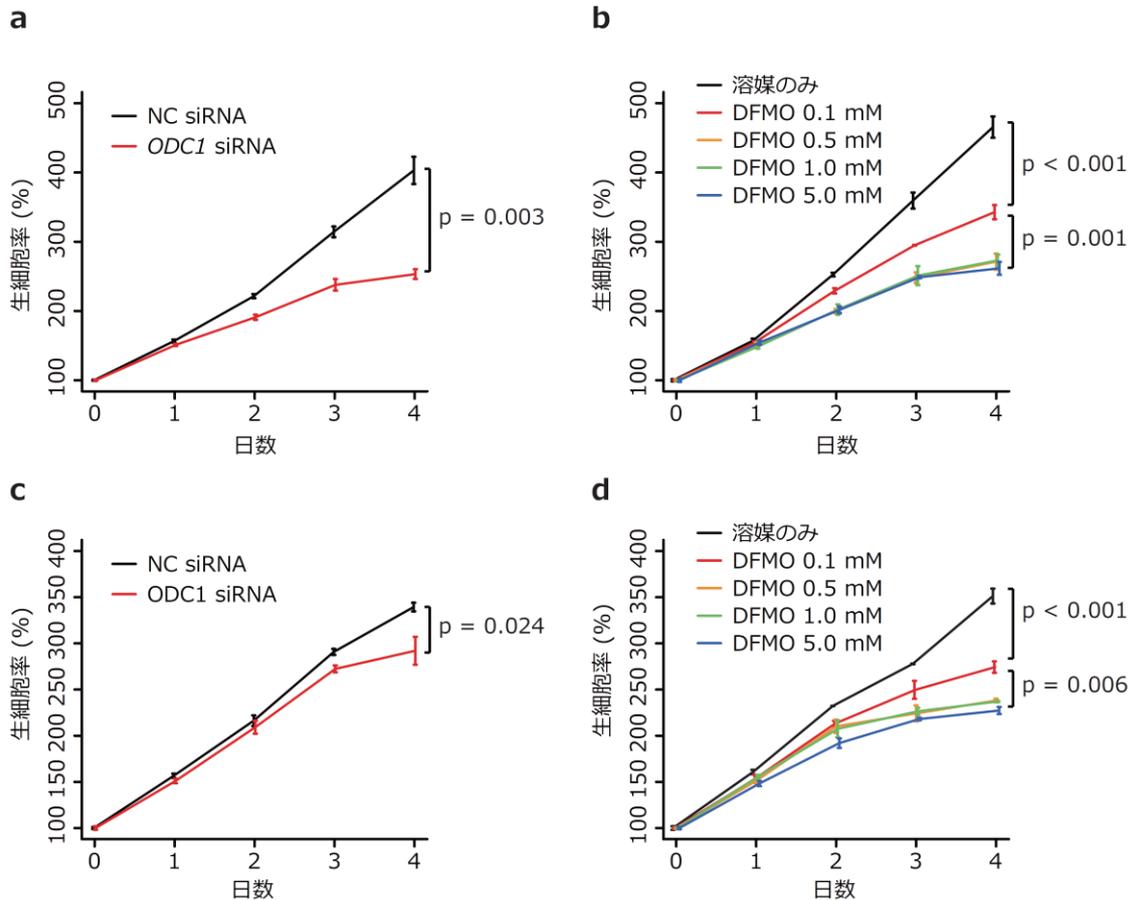


図 20. *ODC1* 高発現の肝芽腫細胞株における *ODC1* 阻害は細胞増殖を抑制する
 肝芽腫細胞株である HepG2 (a,b) と HuH6 (c,d) を用いた細胞増殖アッセイの結果を示す。siRNA を用いた実験 (a,c) では *ODC1* siRNA に対する陰性コントロールとして Negative control siRNA (NC siRNA) を、また *ODC1* 阻害剤のジフルオロメチルオルニチン (difluoromethylornitine : DFMO) を用いた実験 (b,d) では陰性コントロールとして溶媒のみを加えた場合と比較を行っている。siRNA または阻害剤による処理を開始して 4 日後の生細胞率を対応のない Student の t 検定で比較しており、その p 値が示されている。エラーバーはそれぞれ 3 回実験の結果の標準偏差を示す。

結果のまとめ

肝芽腫 59 例に対するマルチオミックス解析の結果、*CTNNB1*、*APC* のドライバー変異は全例に認められたが、それ以外の変異は極めて少なく、構造異常やコピー数異常も肝芽腫の多様性を説明するのに十分ではなかった。一方、DNAメチル化のプロファイルを基にした 3 群への分類 (F、E1、E2) は、病理学的、臨床的、そして遺伝学的な特徴ともよく関連しており、肝芽腫の多様性を紐解くための指標として DNA メチル化が重要と考えられた。

メチル化クラスター 3 群の中で特に F 群と E1/E2 群とが対照的であり、F 群は遺伝学的には *HNF4A*/*CEBPA* の結合領域の中等度メチル化、相対的に正常肝に近い遺伝子発現プロファイルを有しており、臨床的には高分化の胎児型の病理組織像を呈し予後良好であった。一方 E1/E2 群は遺伝学的には *HNF4A*/*CEBPA* の結合領域の高メチル化、胎児肝に近い遺伝子発現を有しており、臨床的には低分化の胎芽型/混合型の病理組織像を有し予後不良であった。また F 群と E1/E2 群との比較を基に、高リスク肝芽腫で重要な分子として *NQO1* と *ODCI* が同定された。肝芽腫細胞株を用いた実験により、それらの分子の阻害が抗がん剤抵抗性の改善や細胞増殖の抑制をもたらすことがわかり、治療標的としての有用性が示された。

考察

本研究は網羅的DNAメチル化解析と遺伝子発現解析を含むマルチオミックス解析の統合により、肝芽腫の臨床的多様性がどのような分子基盤に基づくのかを明らかにし、また高リスク肝芽腫における治療標的を明らかにした点に新規性を有する。本研究の結果を基に、肝芽腫の腫瘍発生と多様性に関する分子モデルを図 21 に示す。本研究コホートにおいて、 β カテニンの安定化をもたらす *CTNNB1* または *APC* の変異、構造異常は肝芽腫の全例に見られたことから、未熟な肝細胞に Wnt シグナルの異常亢進が加わって肝芽腫を発症するという機序は全例共通と考えられる。一方で、F 群と E1/E2 群との対比は *HNF4A*/*CEBPA* の結合領域の DNA メチル化の差に基づいているが、これは DNA メチル化関連遺伝子の変異が見られないことを考えると、F 群内、あるいは E1/E2 群内で全例共通に付加的なメチル化異常が加わった結果そのようになったとは考えにくく、それよりも *CTNNB1*、*APC* の異常が生じた起源となる細胞の分化度の差をそのまま反映していると考えるのが自然である。すなわち、E1/E2 群はより未熟な肝前駆細胞から発生し、それらの特徴である *HNF4A*/*CEBPA* の結合領域の高メチル化をそのまま引き継いでおり、それにより胎児肝に類似した遺伝子発現様式を呈する。そのため病理組織像はより低分化な胎芽型の成分を有し、また cell cycle 経路の亢進や *ODC1* の高発現を介して、より高度な細胞増殖を呈する。また *NQO1* のプロモーターの低メチル化による高発現は抗がん剤抵抗性に寄与し、それらが相まって予後不良な腫瘍の表現型を形成すると考えられる。一方で F 群は E1/E2 群の起源よりも成熟した肝芽細胞から発生し、*HNF4A*/*CEBPA* の結合領域の中等度メチル化という特徴をそのまま引き継ぎ、

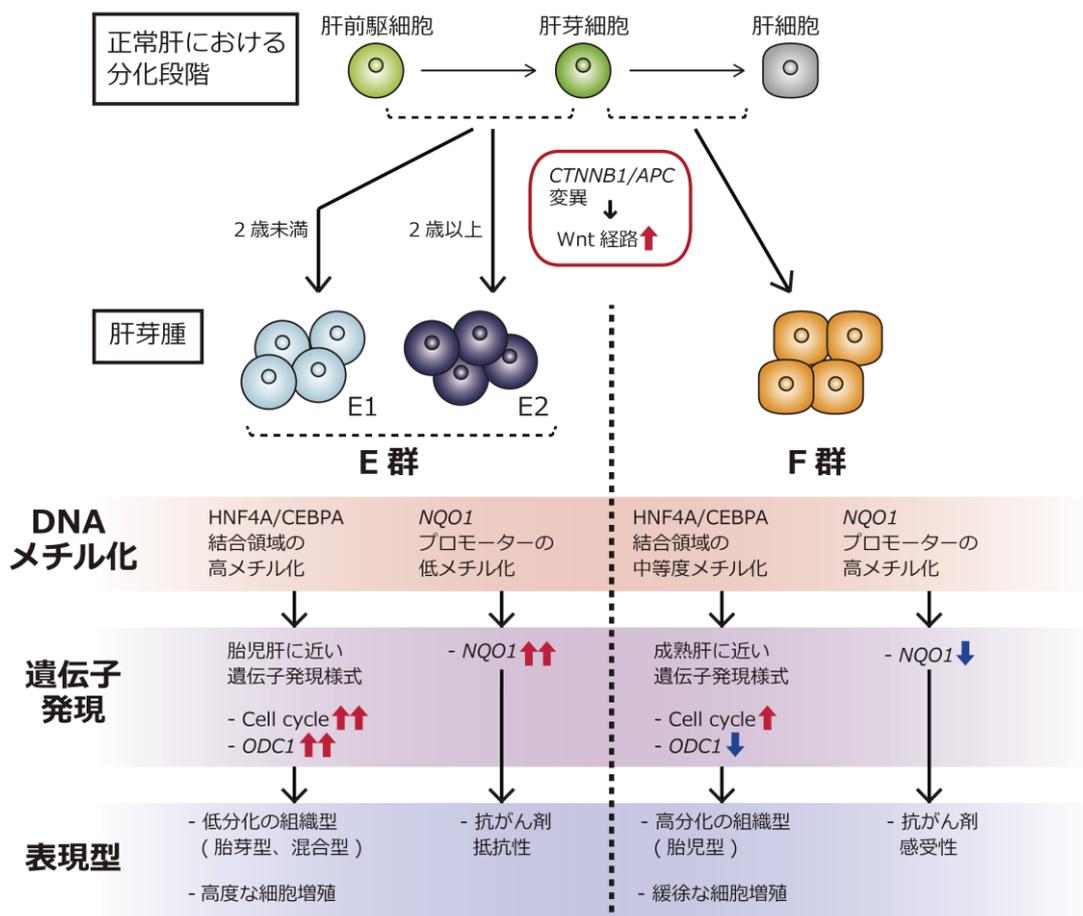


図 21. 肝芽腫の腫瘍発生と多様性を説明する新規モデル

肝芽腫はすべて未熟な肝細胞に *CTNNB1*、*APC* といった Wnt 関連遺伝子の変異が加わり、Wnt シグナル経路が異常亢進することで発生する。一方、肝芽腫の臨床的多様性は主として起源となる細胞の分化度の差によって生じる。F 群と E1/E2 群との間で起源の分化度、DNA メチル化、遺伝子発現、そして表現型にどのように差異が生じているか、図で段階的に示している。

E1/E2 群とは対照的な遺伝学的、臨床的特徴を呈すると考えられる。肝芽腫の生物学的特徴を考えるにあたって分化度が重要であることは過去の研究でも示唆されてきたが^{10,17}、本研究ではそれがどのような分子メカニズムを介して臨床的な表現型へと結びついているのかを明らかにしたという点が重要である。

本研究では F 群と E1/E2 群の比較に焦点を当てており、E1 群と E2 群の遺伝学的プロファイルの違いについてはあまり言及していない。この 2 群は DNA メチル化の違いによって区別され、臨床的には発症年齢や肝移植の頻度が異なるという違いを有してはいるものの、遺伝子発現のプロファイルは全体として類似しており、その群分けの意義については議論が分かれると思われる。正常組織においても年齢に伴う DNA メチル化の変化は見られるが^{39,40}、肝細胞においては加齢による DNA メチル化の変化が乏しいという報告もあり⁴¹、低年齢の E1 群と高年齢の E2 群の DNA メチル化の差の由来や、その生物学的意義については現時点でははっきりしない。しかしながら、高年齢であることが肝芽腫の重要な予後不良因子であることを考慮すると、今回の研究データでは明らかにできなかった E1 群と E2 群の違いが今後さらなるデータの蓄積によって明らかにされ、年齢による予後の違いを説明するための重要な要素になる可能性は十分にある。そのため E1、E2 群をまとめて 1 つとしてしまうのではなく、あえて分けたままで残すこととした。無論、メチル化クラスターが肝芽腫の分類としての妥当かどうかを検証するためには、別のコホートで再現性を確認する必要がある、それは今後の課題である。

またもう一つの重要な点として、これまで肝芽腫の遺伝子変異の少なさゆえに特異的な治療標的は見出されてきていなかったが、本研究では遺伝子発現解

析と DNA メチル化解析を組み合わせることで *NQO1*、*ODCI* という新規の治療標的候補を明らかにした。

NQO1 に関しては、その高発現が肝芽腫を含む種々の癌腫において予後不良因子である可能性は既に指摘されている^{11,36,37}。一方で、*NQO1* の酵素活性を大きく低下させる SNP (rs1800566、C609T) を持つことは、乳がんや非小細胞肺癌において予後不良因子であることが指摘されており^{42,43}、一見すると *NQO1* 高発現が予後不良因子であるという報告と矛盾するようにも見える。その機序として、*NQO1* は TP53 タンパクを安定化させる機能も有しており^{44,45}、C609T 多型を有する症例においては *NQO1* の機能低下によって TP53 が不安定化し、ゲノム不安定性や化学療法抵抗性を来すという可能性が指摘されている。以上から、腫瘍において *NQO1* の機能は高い場合も低い場合も予後不良因子となりうること、*NQO1* のステータスが予後にどう影響するかは癌腫や治療内容によって変わりうるということがわかる。肝芽腫においては過去の報告と本研究との再現性から、*NQO1* 高発現が予後不良であることは正しいと思われる、一方で、C609T 多型のステータスによる予後の差は本コホートでは検出されなかった (図 22)。

NQO1 の高発現のメカニズムについては、*NQO1* の上流の転写因子である *NFE2L2* の活性化型変異 (肝芽腫の 5%程度で見られるとされる¹²) 以外の機序はわかっていなかった。今回の研究により、*NFE2L2* の活性化型変異を持たない症例においても、*NQO1* のエンハンサーである *NQO1*-ARE の低メチル化によって *NQO1* が高発現となりうることが示された。また *NQO1* 阻害によって抗がん剤抵抗性の改善が見られることが、複数種類の肝芽腫細胞株と阻害方法によって示された。肝芽腫において重要である Wnt シグナル経路の亢進と *NQO1* との

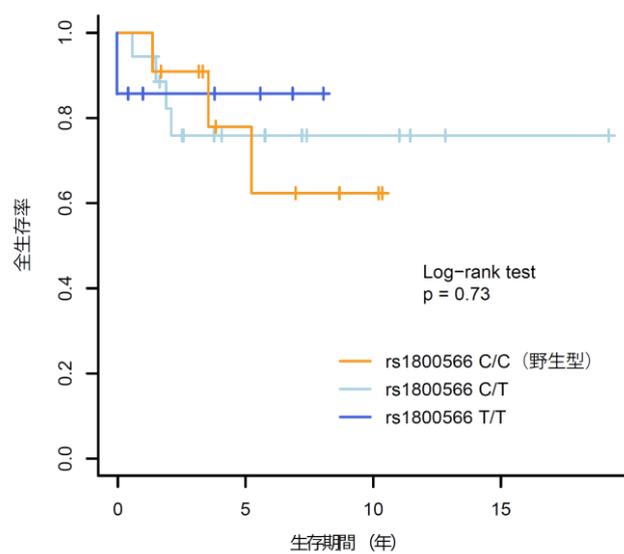


図 22. *NQO1* の C609T 多型と肝芽腫の予後

NQO1 の C609T 多型のステータスごと (C/C、C/T、T/T) の肝芽腫の全生存率を示す Kaplan-Meier 曲線。群間の生存率の差に対する Log-rank 検定の p 値が示されている。

関連についても検討したが、Rada は肝細胞において *WNT3A* が *NQO1* 上流の *NFE2L2* を亢進させるものの、 β カテニンを介する機序ではないと報告している⁴⁶。肝芽腫における Wnt シグナル経路亢進の機序が *WNT3A* よりも下流の β カテニンの蓄積であることを踏まえると、Rada らの報告する機序を肝芽腫における *NQO1* 高発現に直接当てはめることはできず、その関連は現時点では不明である。

一方 *ODCI* に関して、阻害剤である DFMO が肝芽腫細胞株に対して 0.1-0.5 mM の濃度で細胞増殖抑制効果を示した。この濃度は、過去の研究で神経芽腫細胞株に対して使用された濃度よりも低い濃度であった⁴⁷。現在、臨床試験の段階ではあるものの DFMO が再発、難治の神経芽腫に対する治療オプションの一つとなっていることを考慮すると、肝芽腫に対しても同様に選択肢の一つたりうることが示唆される。

当然ながら、*NQO1* や *ODCI* の阻害剤をヒトの肝芽腫での使用に近付けるためには、動物実験でその効果や安全性を検証することが必須である。また *NQO1* や *ODCI* が実際にどのように薬剤抵抗性や細胞増殖に寄与しているかに関しては、それらの強制発現や阻害によって細胞にどのような変化が起きているのか、より詳細に検討する必要がある、それらは今後の課題である。

結論

肝芽腫の統合的マルチオミックス解析により、DNAメチル化のプロファイルに基づく分類（F群、E1群、E2群）が肝芽腫の疾患内多様性を遺伝学的に説明しうることが見出された。特にF群とE1/E2群との間にある、腫瘍の起源となる細胞の分化度の差が、最も大きな肝芽腫の多様性の由来であることが示された。また予後不良群において*NQO1*、*ODC1*の高発現が特徴的であり、それらが抗がん剤抵抗性や細胞増殖に寄与していること、そして治療標的として有用であることが細胞実験により示された。

謝辞

まず本研究の遂行におきまして、ご指導いただきました京都大学小児科の滝田順子先生、東京大学小児科の岡明先生、関正史先生に深謝いたします。

また実験、解析等に関してご指導、ご支援いただきました京都大学腫瘍生物学講座の小川誠司先生、吉田健一先生、南谷泰仁先生、鈴木啓道先生、東京大学小児科の樋渡光輝先生、磯部知弥先生、渡邊健太郎先生、佐藤亜以子先生、久保田泰央先生、松村雅代様、殷毅様、斎藤文江様、同小児外科の星野論子先生、同泌尿器科の佐藤悠佑先生、藤井陽一先生、同神経内科の辻省次先生、三井純先生、竹山未央様、同医科学研究所の宮野悟先生、田中洋子先生、国立がん研究センターの片岡圭亮先生、白石友一先生、千葉健一先生、国立成育医療研究センターの秦健一郎先生、河合智子先生、広島大学小児科の木村俊介先生、名古屋大学大学院医学系研究科システム生物学分野の島村徹平先生、上武大学の林泰秀先生、名古屋医療センターの真田昌先生、日本医科大学生化学・分子生物学教室の塩澤裕介先生に深謝いたします。

また、貴重な検体及び臨床情報収集にご助力いただきました国立成育医療研究センターの加藤元博先生、松本公一先生、白井了太先生、菱木知郎先生、金森豊先生、笠原群生先生、東京大学小児科の吉田美沙先生、九州大学小児外科の田口智章先生、宗崎良太先生、埼玉県立小児医療センターの康勝好先生、荒川ゆうき先生、また腫瘍検体の詳細な病理学的レビューをしてくださった神奈川県立こども医療センターの田中祐吉先生、国立成育医療研究センターの義岡孝子先生、九州大学形態機能病理学教室の孝橋賢一先生に深謝いたします。

引用文献

1. Pizzo, P.A., Poplack, D.G., Adamson, P.C., Blaney, S.M. & Helman, L. *Principles and practice of pediatric oncology*, xxiv, 1296 pages (Wolters Kluwer, Philadelphia, 2016).
2. Zsiros, J. *et al.* Dose-dense cisplatin-based chemotherapy and surgery for children with high-risk hepatoblastoma (SIOPEL-4): a prospective, single-arm, feasibility study. *Lancet Oncol* **14**, 834-42 (2013).
3. Czauderna, P. *et al.* 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 (2016).
4. Koch, A. *et al.* Elevated expression of Wnt antagonists is a common event in hepatoblastomas. *Clin Cancer Res* **11**, 4295-304 (2005).
5. Kurahashi, H. *et al.* Biallelic inactivation of the APC gene in hepatoblastoma. *Cancer Res* **55**, 5007-11 (1995).
6. Koch, A. *et al.* Childhood hepatoblastomas frequently carry a mutated degradation targeting box of the beta-catenin gene. *Cancer Res* **59**, 269-73 (1999).
7. Takayasu, H. *et al.* Frequent deletions and mutations of the beta-catenin gene are associated with overexpression of cyclin D1 and fibronectin and poorly differentiated histology in childhood hepatoblastoma. *Clin Cancer Res* **7**, 901-8 (2001).
8. Taniguchi, K. *et al.* Mutational spectrum of beta-catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. *Oncogene* **21**, 4863-71

- (2002).
9. Aretz, S. *et al.* Should children at risk for familial adenomatous polyposis be screened for hepatoblastoma and children with apparently sporadic hepatoblastoma be screened for APC germline mutations? *Pediatr Blood Cancer* **47**, 811-8 (2006).
 10. Cairo, S. *et al.* Hepatic stem-like phenotype and interplay of Wnt/beta-catenin and Myc signaling in aggressive childhood liver cancer. *Cancer Cell* **14**, 471-84 (2008).
 11. Eichenmuller, M. *et al.* The genomic landscape of hepatoblastoma and their progenies with HCC-like features. *J Hepatol* **61**, 1312-20 (2014).
 12. Sumazin, P. *et al.* Genomic analysis of hepatoblastoma identifies distinct molecular and prognostic subgroups. *Hepatology* **65**, 104-121 (2017).
 13. Grobner, S.N. *et al.* The landscape of genomic alterations across childhood cancers. *Nature* **555**, 321-327 (2018).
 14. Surrey, L.F., Luo, M., Chang, F. & Li, M.M. The Genomic Era of Clinical Oncology: Integrated Genomic Analysis for Precision Cancer Care. *Cytogenet Genome Res* **150**, 162-175 (2016).
 15. Arai, Y. *et al.* Genome-wide analysis of allelic imbalances reveals 4q deletions as a poor prognostic factor and MDM4 amplification at 1q32.1 in hepatoblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* **49**, 596-609 (2010).
 16. Jia, D. *et al.* Exome sequencing of hepatoblastoma reveals novel mutations and cancer genes in the Wnt pathway and ubiquitin ligase complex. *Hepatology* **60**, 1686-96 (2014).
 17. Maschietto, M. *et al.* DNA methylation landscape of hepatoblastomas reveals

- arrest at early stages of liver differentiation and cancer-related alterations. *Oncotarget* **8**, 97871-97889 (2017).
18. Shiraishi, Y. *et al.* An empirical Bayesian framework for somatic mutation detection from cancer genome sequencing data. *Nucleic Acids Res* **41**, e89 (2013).
 19. Yamamoto, G. *et al.* Highly sensitive method for genomewide detection of allelic composition in nonpaired, primary tumor specimens by use of affymetrix single-nucleotide-polymorphism genotyping microarrays. *Am J Hum Genet* **81**, 114-26 (2007).
 20. Nannya, Y. *et al.* A robust algorithm for copy number detection using high-density oligonucleotide single nucleotide polymorphism genotyping arrays. *Cancer Res* **65**, 6071-9 (2005).
 21. Tian, Y. *et al.* ChAMP: updated methylation analysis pipeline for Illumina BeadChips. *Bioinformatics* **33**, 3982-3984 (2017).
 22. Wilkerson, M.D. & Hayes, D.N. ConsensusClusterPlus: a class discovery tool with confidence assessments and item tracking. *Bioinformatics* **26**, 1572-3 (2010).
 23. Sheffield, N.C. & Bock, C. LOLA: enrichment analysis for genomic region sets and regulatory elements in R and Bioconductor. *Bioinformatics* **32**, 587-9 (2016).
 24. Love, M.I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **15**, 550 (2014).
 25. Luo, W., Friedman, M.S., Shedden, K., Hankenson, K.D. & Woolf, P.J. GAGE: generally applicable gene set enrichment for pathway analysis. *BMC*

- Bioinformatics* **10**, 161 (2009).
26. Kanehisa, M. & Goto, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* **28**, 27-30 (2000).
 27. Bonder, M.J. *et al.* Genetic and epigenetic regulation of gene expression in fetal and adult human livers. *BMC Genomics* **15**, 860 (2014).
 28. Camp, J.G. *et al.* Multilineage communication regulates human liver bud development from pluripotency. *Nature* **546**, 533-538 (2017).
 29. Traver, R.D. *et al.* Characterization of a polymorphism in NAD(P)H: quinone oxidoreductase (DT-diaphorase). *Br J Cancer* **75**, 69-75 (1997).
 30. Kuehl, B.L., Paterson, J.W., Peacock, J.W., Paterson, M.C. & Rauth, A.M. Presence of a heterozygous substitution and its relationship to DT-diaphorase activity. *Br J Cancer* **72**, 555-61 (1995).
 31. Kodama, Y. *et al.* The DDBJ Japanese Genotype-phenotype Archive for genetic and phenotypic human data. *Nucleic Acids Res* **43**, D18-22 (2015).
 32. Iwao, K. *et al.* Activation of the beta-catenin gene by interstitial deletions involving exon 3 in primary colorectal carcinomas without adenomatous polyposis coli mutations. *Cancer Res* **58**, 1021-6 (1998).
 33. Si-Tayeb, K., Lemaigre, F.P. & Duncan, S.A. Organogenesis and development of the liver. *Dev Cell* **18**, 175-89 (2010).
 34. Wang, X. *et al.* Identification of polymorphic antioxidant response elements in the human genome. *Hum Mol Genet* **16**, 1188-200 (2007).
 35. Siegel, D., Yan, C. & Ross, D. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in the sensitivity and resistance to antitumor quinones. *Biochem Pharmacol* **83**, 1033-40 (2012).

36. Li, Z. *et al.* NQO1 protein expression predicts poor prognosis of non-small cell lung cancers. *BMC Cancer* **15**, 207 (2015).
37. Yang, Y. *et al.* Clinical implications of high NQO1 expression in breast cancers. *J Exp Clin Cancer Res* **33**, 14 (2014).
38. Asher, G., Bercovich, Z., Tsvetkov, P., Shaul, Y. & Kahana, C. 20S proteasomal degradation of ornithine decarboxylase is regulated by NQO1. *Mol Cell* **17**, 645-55 (2005).
39. Wilson, V.L., Smith, R.A., Ma, S. & Cutler, R.G. Genomic 5-methyldeoxycytidine decreases with age. *J Biol Chem* **262**, 9948-51 (1987).
40. Bjornsson, H.T. *et al.* Intra-individual change over time in DNA methylation with familial clustering. *JAMA* **299**, 2877-83 (2008).
41. Tawa, R. *et al.* Methylated cytosine level in human liver DNA does not decline in aging process. *Mech Ageing Dev* **62**, 255-61 (1992).
42. Fagerholm, R. *et al.* NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 NQO1*2 genotype (P187S) is a strong prognostic and predictive factor in breast cancer. *Nat Genet* **40**, 844-53 (2008).
43. Kolesar, J.M. *et al.* The NQO1*2/*2 polymorphism is associated with poor overall survival in patients following resection of stages II and IIIa non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* **25**, 1765-72 (2011).
44. Anwar, A. *et al.* Interaction of human NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) with the tumor suppressor protein p53 in cells and cell-free systems. *J Biol Chem* **278**, 10368-73 (2003).
45. Asher, G., Lotem, J., Kama, R., Sachs, L. & Shaul, Y. NQO1 stabilizes p53 through a distinct pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 3099-104 (2002).

46. Rada, P. *et al.* WNT-3A regulates an Axin1/NRF2 complex that regulates antioxidant metabolism in hepatocytes. *Antioxid Redox Signal* **22**, 555-71 (2015).
47. Koomoa, D.L. *et al.* DFMO/eflornithine inhibits migration and invasion downstream of MYCN and involves p27Kip1 activity in neuroblastoma. *Int J Oncol* **42**, 1219-28 (2013).