

## 論文の内容の要旨

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

氏名 関口 昌央

肝芽腫は小児に発生する肝悪性腫瘍の中で最多のものであり、日本での年間発症者数は40-60例程度である。肝芽腫の5年全生存率は70-80%程度と近年向上してきているが、肝芽腫の臨床像は多様であり、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。高リスク肝芽腫の治療成績向上のためには、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、*CTNNB1*、*APC*、*AXIN1/2*の変異や欠失によるβカテニンタンパクの細胞内蓄積、それによるWntシグナル経路の亢進がよく知られている。一方で、それ以外の遺伝子変異は極めて少なく、肝芽腫の臨床的多様性を説明するには遺伝子変異以外の側面に目を向ける必要がある。しかしながら、これまで分子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、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り、その意義は確立していない。

また、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。唯一高頻度に見られるのが前述したWntシグナル経路の活性化変異であるが、肝芽腫に対するWnt阻害剤の効果は示されていない。そのため、肝芽腫に対する有効な標的治療はいまだに見出されていないのが現状である。

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。

そこで本研究では、肝芽腫の分子基盤の解明、そして高リスク群の規定因子や治療標的候補の同定を目的として、肝芽腫計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。具体的には、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行った。さらに同定された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。

まず遺伝子変異とコピー数異常の全体像に関しては、*CTNNB1*の点変異またはインフレーム欠失が59例中55例、*APC*の機能喪失変異が59例中4例に見られ、合わせると全例にWntシグナル経路の亢進を来す遺伝子異常が同定された。一方で、その他の遺伝子変異

は極めて少数であった。コピー数異常に関しては、染色体の腕単位でのコピー数増加がほとんどを占めており、限局した領域でのコピー数変化は極めて少なかった。これらのプロファイルは過去の報告と傾向を同じくするものであったが、これらの情報だけでは肝芽腫の臨床的多様性を説明することはできず、さらなる解析が必要であった。

そこで肝芽腫の多様性を紐解くため、DNAメチル化プロファイルに注目した。生検検体39例のDNA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、肝芽腫はまず大きく2つのクラスターに分類された。一方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たことから、これらをF群及びE群と呼ぶこととした。さらにE群は第2段階のコンセンサスクラスタリングによりさらに2つのクラスターに分類され、診断時年齢が年少のE1群と年長のE2群に分類された。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おり、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。そのためこれらのクラスターは異なる生物学的メカニズムを有すると考えられた。

メチル化クラスターの遺伝学的特徴付けのため、RNAシーケンスによる発現プロファイルリングを行った。するとE1、E2群は互いに類似したプロファイルを示したのに対し、F群はそれらと比較して一部の遺伝子発現について正常肝に近いプロファイルを有することがわかった。パスウェイ解析の結果を見ても、F群はE1、E2群と比較して正常肝機能に関連するパスウェイ (チトクロムP450関連経路など) が相対的に亢進している一方、E1、E2群ではCell cycle経路などの腫瘍関連経路が亢進していた。以上の結果はE1、E2群が予後不良である一因を示しており、また肝芽腫の多様性を見るにあたってはF群とE1/E2群との比較が第一に重要であることが示唆された。

そのため、F群とE1/E2群の比較をより詳細に見るため、DNAメチル化変動領域をゲノム上のゲノム領域と比較し、Region set enrichment analysisを行った。するとE1/E2群において有意に高メチル化となっているCpGプローブ群は、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) のピーク領域と最も有意にオーバーラップしていた。HNF4AとCEBPAが肝の分化に必須のマスターレギュレーターであることから、E1/E2群におけるこれらの結合領域の高メチル化は、分化の抑制に寄与していると考えられた。実際、正常な胎児肝、成人肝の遺伝子発現プロファイルと比較しても、E1/E2群は未熟な胎児肝で高発現の遺伝子をより強く発現しており、より高分化なF群との分化度の差が確認された。

またDNAメチル化と遺伝子発現の関係を見るため、F群とE1/E2群のメチル化変動、及び発現変動の解析結果を統合したところ、予後不良のE1/E2群において最もプロモーターの低メチル化によって高発現となっていると考えられた遺伝子はNQO1であった。これ

は酸化ストレス応答や、アントラサイクリンなどキノン類の解毒に関与する遺伝子であることから、E1/E2 群の予後不良の一因として、*NQO1* の高発現がアントラサイクリン抵抗性に寄与している可能性が考えられた。実際に肝芽腫細胞株を用いた抗がん剤感受性アッセイにおいて、*NQO1* を siRNA や阻害剤（ジクマロール）で阻害したところ、アントラサイクリン感受性が亢進したことから、*NQO1* の抗がん剤抵抗性における重要性が示唆された。

さらに、上記実験において *NQO1* 阻害単独でも細胞増殖抑制が見られたこと、また *NQO1* にはポリアミン合成、細胞増殖に関わる重要分子である *ODC1* を安定化させる機能があることから、*NQO1* 阻害時の増殖抑制は *ODC1* の不安定化が原因と推測された。また *ODC1* は *NQO1* と同様、高リスク肝芽腫において高発現となっており、高リスク群の遺伝学的な規定因子の一つと考えられた。実際、肝芽腫細胞株を用いた増殖アッセイにおいて、siRNA や阻害剤（DFMO）を用いて *ODC1* を阻害したところ、有意な細胞増殖抑制が見られた。

以上の結果より、肝芽腫の多様性を説明する最も重要な因子は腫瘍の分化度の差であると考えられた。高分化な F 群と比較してより低分化な E1/E2 群は、肝の分化のマスターレギュレーターである HNF4A/CEBPA の結合領域の高メチル化、それに伴う未分化な胎児肝に類似した遺伝子発現様式、Cell cycle 経路の亢進、そして *NQO1* や *ODC1* の高発現といった分子遺伝学的特徴を有しており、それらの要素が合わさることで E1/E2 群は高度の細胞増殖、抗がん剤抵抗性といった予後不良の表現型を呈すると考えられた。そして *NQO1* や *ODC1* は高リスク群の規定因子であると共に、治療標的候補たりうることで細胞実験により示された。

結論として、DNA メチル化プロファイルに基づく肝芽腫の分類（F 群、E1 群、E2 群）は、肝芽腫の疾患内多様性を説明するために有用であった。特に高分化な F 群と低分化な E1/E2 群との対比が最も重要であり、その群間比較やマルチオミックス情報の統合によって、分子遺伝学的な高リスク肝芽腫の規定因子や、新規治療標的を同定することが可能であった。