

審査の結果の要旨

氏名 関口 昌央

本研究では、小児肝芽腫の臨床的多様性を説明する分子遺伝学的基盤の解明、及び高リスク肝芽腫における新規治療標的の同定を目的として、肝芽腫検体を計 59 例収集し、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マルチオミックス解析を行った。それにより下記の結果を得ている。

1. 遺伝子変異とコピー数異常の全体像として、*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、また 59 例中 18 例で 11 番染色体短腕の片親性ダイソミー／トリソミーが認められた。
2. 肝芽腫の臨床的多様性を遺伝学的に紐解くため、DNA メチル化プロファイルに着目したところ、生検検体 39 例の DNA メチル化データに対するコンセンサスクラスタリングにより、肝芽腫は大きく 3 つのクラスター (F 群、E1 群、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診断時年齢を含め、臨床的特徴と強く相関しており、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るという特徴を有していた。
3. RNA シーケンスによる発現プロファイリングを行ったところ、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組織に近いプロファイルを有していた。パスウェイ解析の結果、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。このことより、肝芽腫の多様性を見るにあたっては、大きく F 群と E1、E2 群との対比が重要であることが示唆された。
4. F 群と E1/E2 群の対比をより詳細に見るため、DNA メチル化変動領域をデータベース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転写因子であることから、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、遺伝子発現プロファイルを比較しても、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。

5. 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。
6. 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。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、本論文は肝芽腫が Wnt シグナル経路の異常亢進をドライバーとして発生しつつ、その臨床的多様性が主として腫瘍の分化度の差によって生じることを示した。また高リスク肝芽腫を規定する分子として *NQO1* や *ODC1* を同定し、これらが治療標的たりうることを細胞実験により示した。本研究はこれまで明確でなかった肝芽腫の分子基盤の全体像を明らかにすると共に、高リスク肝芽腫の克服に必要な標的治療の可能性を提供しており、今後の肝芽腫の基礎及び臨床研究に向けて大きな貢献を成すと考えられる。

よって本論文は博士（医学）の学位請求論文として合格と認められる。