

学位論文題名

The methylation status of *RASSF1A* promoter predicts responsiveness to chemotherapy and eventual cure in hepatoblastoma patients

(肝芽腫における予後因子 *RASSF1A* メチル化の意義)

学位論文内容の要旨

【背景・目的】

肝芽腫は稀な小児悪性肝腫瘍である。近年外科的手術と化学療法との組み合わせにより予後は改善してきたが、今なお2~3割の症例は悲惨な結末をたどる。更なる治療成績の向上の為に、治療開始前に、治療に対する反応を予測し、患者をリスクにより層別化して治療することが重要である。しかしながら、現在までに、予後を正確に反映する分子生物学的マーカーは知られていない。

これまで肝芽腫ではβカテニン(*CTNNB1*)を除いて、癌遺伝子および癌抑制遺伝子の変異がほとんど見つかっていない。がんではDNAメチル化が癌抑制遺伝子を不活化させるエピジェネティックな異常として知られているが、我々は肝芽腫の発生や進展にメチル化異常が関与しているのではないかと考えた。本研究では肝芽腫における候補癌抑制遺伝子のメチル化異常を調べ、その臨床病理学的因子との関連から治療効果および予後を反映する有力な分子マーカーを確立することにある。それにより、化学療法に不応な腫瘍や治療後、再発・転移を生じる腫瘍を予知し、治療方針の決定に役立てることが目標である。

【対象・方法】

肝芽腫97例および正常肝8例の検体を用いて、*RASSF1A*, *SOCS1*, *CASP8*, *RUNX3*, *RIZ1*, *BLU*, *HOXA9*, *HOXB5*, *p16INK4*, *p14ARF*, *DCR2*, *RASSF2A*, *NORE1A*の13遺伝子につき、conventional methylation-specific PCR (MSP)法にてメチル化解析を行った。*RASSF1A*に関しては定量的メチル化解析 (Quantitative MSP 法)にてメチル化程度をより詳細に検討し、reverse-transcription (RT)-PCRによって発現との関連について調べた。また *CTNNB1* 変異を直接塩基配列決定法によって解析した。メチル化および *CTNNB1* 変異と臨床病理学的因子との関連について検討した。

【結果】

1. 13の癌候補抑制遺伝子についてそれぞれ20検体でメチル化を調べたところ、*RASSF1A*, *SOCS1*, *CASP8*に異常メチル化を認めた。その他の10遺伝子にはメチル化を認めなかった。次にこの3遺伝子について97検体を対象にしてメチル化解析をConventional MSPにて行った。*RASSF1A*, *SOCS1*, *CASP8*のメチル化は97例中30(30.9%)、32(33.0%)、15(15.5%)にそれぞれみられ、*RASSF1A*のメチル化は予後不良と相関したが($P<0.001$)、*SOCS1*, *CASP8*の両遺伝子についてはメチル化と予後との間に相関がなかった。多因子解析では病期のみが独立した予後予測因子となり、*RASSF1A*メチル化は有意な予後因子ではなかった。
2. *RASSF1A*メチル化の予後因子としての有効性を詳しく調べるために quantitative MSP法にて解析すると、完全メチルに対するメチル化程度が2.5%未満の症例が半数以上を占め、それ以上のメチル化程度を示す症例は比較的均等に分布していた。メチル化程度によって0-5%、5-30%、30%以上の3群に分類するとメチル化程度が上がるにつれ病期および予後の

増悪を認めた。RT-PCRによって、メチル化程度が11%を越える検体では *RASSF1A* の発現を認めず、1%未満の検体(正常肝含む)では明らかに発現がみられた。4%台の2検体では薄くバンドが描出される程度であり、*RASSF1A* のメチル化と発現消失の関係が示された。様々な異なるメチル化程度で2群に分け Kaplan-Meier 法にて予後との関係を検討すると、メチル化症例のカットオフ値を4.8%以上に設定することによって最も効果的に予後を反映することが分かった($P<0.00001$)。このカットオフ値に基づくと97例中43例(44.3%)がメチル化症例と分類された。これより後の *RASSF1A* メチル化と臨床病理学因子との解析はこの値を用いて行った。

3. 97例中19例(19.6%)に *CTNNB1* の点変異ないし欠失を認め、異常部位は全例がアミノ酸32から45番目までのリン酸化部位を含んでいた。

4. 97例の肝芽腫について臨床病理学的因子と予後との関連を単因子解析にて調べると、年齢2歳以上($P<0.001$)、non fetal-type ($P=0.044$)、PRETEXT 4 ($P=0.003$)、3B・4病期 ($P<0.001$)、シスプラチン(CDDP)抵抗例 ($P=0.011$)、*RASSF1A* メチル化 ($P<0.001$)、*CTNNB1* 変異 ($P=0.030$)はいずれも予後不良因子であった。

5. 予後不良である3B・4病期の33例に限定し Kaplan-Meier 法にて解析した場合にも *RASSF1A* メチル化は予後予測因子として有用であった。更に予後良好である1-3A病期の64例に限定した場合にも予後不良例を反映することが分かった。

6. *RASSF1A* メチル化および *CTNNB1* 変異とさまざまな臨床病理学的因子との関連について分析すると、*RASSF1A* メチル化は年齢2歳以上、3B・4病期、シスプラチン抵抗性、予後不良、*CTNNB1* 変異ありの症例と有意に相関を示したが、組織型、PRETEXT との関連はみられなかった。*CTNNB1* 変異は予後不良および *RASSF1A* メチル化とのみ相関を示した。多変量解析において病期($P=0.002$; Relative risk (RR) 7.67)、*RASSF1A* メチル化($P=0.043$; RR 9.39)はいずれも独立した予後予測因子となることが分かった。*CTNNB1* 変異は多変量解析において有意な予後因子ではなかった。

【考察】

肝芽腫の治療は完全切除に持ち込めるかどうかが予後を決める最も重要なファクターである。CDDP ベースの化学療法と外科的手術の組み合わせにより予後は改善されてきたが、今なお転移、再発のみられる症例では満足のいく結果が得られていない。治療効果を予知可能な分子マーカーが確立されればより効果的な治療方針の選択が可能となり、更なる予後の改善につながると期待される。今回解析を行った13の候補癌抑制遺伝子のうちメチル化を認めたのは *RASSF1A*、*SOCS1*、*CASP8* の3遺伝子であり、そのうち *RASSF1A* のみが予後との関連を示した。*RASSF1A* は3p21に位置する癌抑制遺伝子であり、多くの癌で異常メチル化により不活化していることが知られている。この研究では肝芽腫において *RASSF1A* のメチル化を定量的に解析することによりメチル化が様々な予後不良因子と有意に相関し、また多変量解析においても独立した予後予測因子であることが証明された。進行した3B・4病期に限定した解析でも *RASSF1A* メチル化症例は予後予測に有用であり、更にメチル化症例はCDDP ベースの化学療法に対して抵抗性を示すことから、進行肝芽腫のうち *RASSF1A* メチル化を呈する症例に関しては現在1stラインとして行われているCDDP ベースの化学療法を早期より他のレジメンに変更することによって予後を改善できるのではないかと考える。

【結論】

RASSF1A メチル化は、特に3B・4病期患者の治療法の選択に有用なマーカーとなる可能性がある。今後臨床試験にて prospective に *RASSF1A* のメチル化を解析し予後因子としての有用性を確認した上で、患者の層別化に用い、メチル化例には新規の治療方針を試みるべきである。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 有 賀 正
副 査 教 授 畠 山 鎮 次
副 査 教 授 佐々木 文 章
副 査 教 授 藤 堂 省

学 位 論 文 題 名

The methylation status of *RASSF1A* promoter predicts responsiveness to chemotherapy and eventual cure in hepatoblastoma patients

(肝芽腫における予後因子 *RASSF1A* メチル化の意義)

DNA メチル化は癌抑制遺伝子を不活化させるエピジェネティックな異常として癌との深い関わりが知られており、肝芽腫においてもその発生や進展にメチル化異常が関与していると考えられる。本研究では肝芽腫における候補癌抑制遺伝子のメチル化異常を調べ、その臨床病理学的因子との関連から治療効果および予後を反映する有力な分子マーカーを確立することにある。肝芽腫 97 例および正常肝 8 例の検体を用いて、Conventional methylation-specific PCR (MSP)法にてメチル化解析を行ったところ、13 の候補癌抑制遺伝子のうち *RASSF1A*、*SOCS1*、*CASP8* に異常メチル化を認めた。*RASSF1A* のメチル化は予後との相関を認めたが、*SOCS1*、*CASP8* はともにメチル化と予後との間に関連がなかった。多因子解析では病期のみが独立した予後予測因子となり、*RASSF1A* メチル化は有意差を認めなかった。*RASSF1A* メチル化の予後因子としての有効性を詳しく調べるために Quantitative MSP 法にて解析すると、完全メチルに対するメチル化率が 2.5%未満の症例が半数近くを占め、それ以上のメチル化率を示す症例は比較的均等に分布していた。Reverse-transcription (RT)-PCR によって *RASSF1A* メチル化と発現との間に逆相関を認めた。メチル化のカットオフ値を 4.8%に設定することによって最も効果的に予後を反映することが分かり($P < 0.00001$)、それに基づく 97 例中 43 例 (44.3%)がメチル化症例と分類された。*RASSF1A* メチル化は予後不良因子である年齢 2 歳以上、3B・4 病期、シスプラチン抵抗性、*CTNNB1* 変異ありの症例と有意に相関を示した。多因子解析において病期($P = 0.002$; Relative risk (RR) 7.67)、*RASSF1A* メチル化($P = 0.043$; RR 9.39)はいずれも独立した予後予測因子となることが分かった。予後不良である 3B・4 病期の 33 例に限定し Kaplan-Meier 法にて解析した場合にも *RASSF1A* メチル化は予後予測因子として有用であった。更に予後良好である 1-3A 病期の 64 例に限定した場合にも予後不良例を反映することが分かった。メチル化率によって 0-5%、5-30%、30%以上の 3 群に分類するとメチル化率が上がるにつれ

病期および予後の増悪を認めた。以上より *RASSF1A* のメチル化は病期に関わらず予後予測因子として有用であり、メチル化症例ではシスプラチン抵抗性を示すことから、メチル化がみられる場合にはシスプラチン以外のレジメンを早期より考慮する必要性が示唆される。今後 clinical trial にて prospective に *RASSF1A* のメチル化を解析し予後因子としての有用性を確認した上で、患者の層別化に用い、メチル化例には新規の治療方針を試みるべきである。

公開発表後、まず副査の畠山教授より①13の候補癌抑制遺伝子を選んだ理由、②転写レベルで抑制されているが蛋白レベルではどうか、③*RASSF1A* がどのような機序で癌の悪性度の増幅に関わっているのか、④βカテニンの変異について質問があった。以上に対し①他の小児癌(神経芽腫、Wilms'腫瘍)や大人の癌で異常メチル化がみられる癌抑制遺伝子であり、特に肝芽腫のアレル異常が起きやすい領域に存在していれば優先的に選択した。②蛋白レベルでの解析は行っていないが、*RASSF1A* はほぼ全ての組織で発現しており、メチル化によって蛋白レベルでの発現抑制が起きることが報告されている。③*RASSF1A* の作用機序としてアポトーシス、細胞周期の制御、微小管の安定化が知られており、特にアポトーシスや細胞周期制御の破綻は直接癌の悪性度に関わりうる。④βカテニンは degradation 部位の in-frame shift 変異を受け、分解されないで細胞内に蓄積する gain of function mutation である、と回答した。次に佐々木教授から①βカテニン変異と *RASSF1A* メチル化との関係について、②シスプラチン抵抗性となる機序についての質問があった。これらに対し①βカテニン変異が先に起こると思われること、②直接の機序については分からないが同じく germ cell tumor でも *RASSF1A* メチル化とシスプラチン抵抗性との関連が報告されており共通した機構が存在すると思われることと返答した。次に主査の有賀教授より化学療法によるメチル化への影響について質問があったが実際に術前化学療法を施行した群と施行していない群との間でメチル化症例の頻度が変わっていないことからその影響は考えなくてもよいと思われることと説明した。有賀教授からは stage に関わらず *RASSF1A* のメチル化が分子学的マーカーとして有用であることは非常に意義深い、とのコメントをいただいた。最後に藤堂教授より今後臨床的に役立たせるためにメチル化を調べる意義についてのコメントがなされ、網羅的なメチル化の解析を行い明らかにメチル化の頻度が高い症例を選別できれば脱メチル化剤を使用するテーラーメイド的な治療法の選択につながられる可能性があることを意見として述べた。いずれの質問に対しても、申請者は概ね妥当に回答した。

RASSF1A のメチル化は肝芽腫の予後予測因子として有用であり、治療方法の選択基準のひとつとして今後臨床に役立つ可能性が示唆された。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や単位取得なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。