

平成 30 年 4 月 12 日現在

機関番号：13802  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2015～2017  
課題番号：15K08397  
研究課題名(和文) 腫瘍ゲノムにおけるトランスポジショナル変異の解析

研究課題名(英文) Analysis of transpositional mutation in tumors

研究代表者

華表 友暁 (Kahyo, Tomoaki)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：40416665

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：生物内の全遺伝情報がひとまとめになったものがゲノムである。ヒトゲノム内にあるヒト内在性レトロウイルス(HERV)はレトロトランスポゾンとして知られており、現在の外来性レトロウイルスの遺伝情報に似ている。本研究では、腫瘍組織内のHERV挿入変異の存在を検証した。次世代シーケンサー(NGS)の結果では、複数のHERV挿入変異の候補部位が同定されたが、長鎖PCRを用いた手法ではそれらを確認することはできなかった。個人間でHERVの遺伝情報量には違いがあり、それは挿入多型として知られているが、本研究の解析の過程で際立った特徴を持つHERV挿入多型が同定された。

研究成果の概要(英文)：A genome is the complete set of genetic information in an organism. Human endogenous retrovirus (HERV) within our genome is known as a retrotransposon and similar to present day exogenous retroviruses. In this study, the HERV insertional mutations in tumor were investigated. Next-generation sequencing analysis revealed some HERV insertional mutations in tumor, but they could not be validated using a long range PCR method. The number of HERVs is different between individuals, and it is known as an insertional polymorphism. In this study, some HERV insertional polymorphisms with prominent feature were found.

研究分野：がんゲノム

キーワード：腫瘍 HERV NGS 変異 多型 がんゲノム

### 1. 研究開始当初の背景

腫瘍化やその悪性化に至る過程に染色体異常や遺伝子変異といったゲノム不安定性が関与することが長らく指摘されてきた。我々の研究グループは、前者の染色体異常に関して、細胞分裂期に遺伝子の発現異常により染色体数の増減を伴うゲノム不安定性が起こること、及び細胞分裂異常を引き起こし得る細胞間現象について報告した (T. Kahyo et al. *Oncogene* 30:4453-63, 2011)。また、後者の遺伝子変異に関しては、FISH 解析によりリン酸化酵素遺伝子が胃癌組織で遺伝子増幅していることを報告した (S.I. Kiyose et al. *Pathol Int.* 62:477-84, 2012)。しかし、自身の研究グループによる報告も含めこれまでの疾患遺伝学研究では、遺伝子コード領域内で起こる染色体構造変化や一塩基変異、数塩基の挿入・欠損に重点が置かれ、検出技術の未発達もありそれ以外の配列変化が着目されることはほとんどなかった。

ヒトゲノムの約 45%が繰返し配列であるレトロトランスポゾン領域によって占められていること、それらトランスポゾン領域にはプロモーターやエンハンサーといった転写調節領域が高度に保存されていること、及び他部位にコピー配列を挿入するレトロトランスポゾン活性をレトロトランスポゾンが潜在的に有していることを考慮すれば、レトロトランスポゾンにこそこれまで未解明だった疾患との関連性が見出せるのではないかと考えた。しかし、繰返し配列のコピー数は数千~数百万箇所以上にもおよび、且つそれらの配列間で配列類似性の高いものが存在していることから、繰返し配列自体を調べてもそれがどの染色体のどの位置に存在するのかを知ることは困難であった。そこで、標的配列の隣接領域を増幅することのできる inverse PCR 法に着目し、繰返し配列の一つであるヒト内在性レトロウイルス配列 (HERV) に隣接する領域を増幅してクローニングすることで HERV 部位の同定を試みた結果、新規の HERV 挿入多型を同定することに成功し、その挿入多型と肺腺がん感受性との関連性を見出した (T. Kahyo et al. *Carcinogenesis* 34:2531-8, 2013)。このような新規 HERV 挿入多型は既存の参照ゲノム配列 (hg19 など) には登録されておらず、ヒトゲノムの情報基盤の強化という点で今後の症例対照研究をはじめとしたヒトゲノム多様性に関連する研究に貢献できると考えている。一方、正常組織には見られず腫瘍組織に特異的に検出される体細胞 HERV 挿入変異については、今尚その同定には至っていない。

そもそも、HERV はヒトの祖先種の生殖系細胞に感染した外来性レトロウイルスの RNA ゲノムが起源とされ、その後の進化の過程で起きた水平伝播による増幅でヒトゲノムの 8%を占めるに至り、数十万~数千万年といった長い年月の中で HERV 内に変異が蓄積したためにレトロトランスポゾン活性を失ってしまったと推測されている。しかし、intact な配列を有している HERV の存在に加え、上述したように今も新規の挿入多型が同定され続けていることから、レトロトランスポゾン活性を有する HERV の存在を完全に否定することはできない。そのため、解析対象となる症例の選択および実験手法に改良を加え、腫瘍組織における HERV 挿入変異 (トランスポジショナル変異) の同定と解析に焦点をあてた本研究計画を新たに立案するに至った。

### 2. 研究の目的

近年の高速 DNA シーケンサー (NGS) の普及により、網羅的な体細胞変異解析から腫瘍の原因遺伝子を同定しようとする研究が盛んに行われてきている。しかし、対象としている変異は遺伝子領域内における一塩基変異や数塩基の挿入・欠損、染色体レベルの構造変化が主であり、それ以外の変異について検出する技術の開発および情報は乏しいのが現状である。研究全体の構想としては、これまでのゲノム解析を補完し得る技術として長鎖配列の挿入変異解析を遺伝子診断等へ応用できるよう研究基盤を築き上げることを目指し、本研究課題では、ヒト腫瘍組織から抽出されたゲノム DNA を用いてヒト内在性レトロウイルス配列 (HERV) のトランスポジショナル変異を検出し、腫瘍化および腫瘍の特性に関する意義を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 罹患者数の多い肺がん、胃がん、大腸がんを主な解析対象とした。若年性のものや病理組織学上稀な表現系を示す症例を優先的に選択していった。

(2) 凍結腫瘍組織から DNA を抽出し、制限酵素にて消化して self-ligation により環状 DNA を生成させた後、高度に保存された LTR 領域内配列を標的にした inverse PCR を行った。HERV の中でも挿入多型が複数確認されている HML-2 の Long terminal repeat (LTR) 領域を標的配列とした。シーケンス用アダプターを連結させたプライマーを用い、MiSeq もしくは HiSeq (Illumina 社) にて 150bp $\times$ 2 ペアエンドシーケンスを行った。

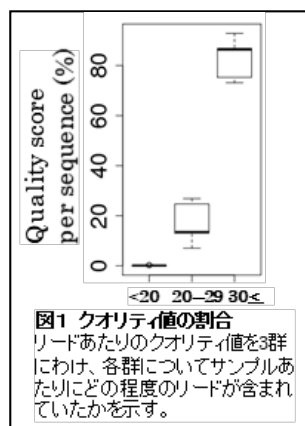
(3) リード上には LTR 自身の配列が含まれているため、その配列をトリミングしてから残った LTR 隣接配列をレファレンスゲノム (GRCh37/hg19) にマッピングした。マッピング箇所が複数のもの及び繰返し配列上にマッピングされその正確性が脆弱なものを除去し、データベース上から推定される既知のもの (多型を含む) と新規候補部位とに分類してリスト化した。その際、既知の LTR 情報を整理するために HERV の特徴である target site duplication の有無をゲノムワイドに調査した。

(4) 人工的に作成した“LTR+任意のゲノム配列”と既存の“LTR+隣接ゲノム配列”を教師データとして機械学習を行い、新規候補部位の中から信頼性の高いものを抽出した。

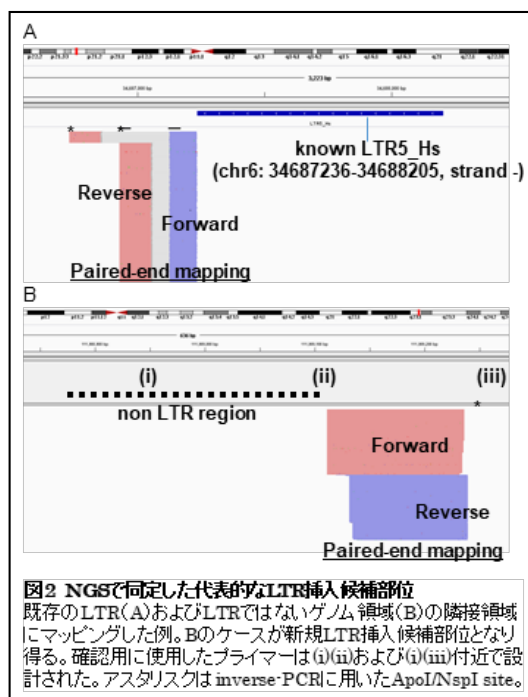
(5) 挿入部位の両側に設計されたプライマーを用いて長鎖 PCR を行い、高速シーケンサーにて検出された新規 HERV 挿入が実際に腫瘍ゲノム DNA で検出されるかを判定した。HERV 挿入が起きていれば、挿入のない増幅産物よりも約 10kbp 程大きい産物が検出される。更に、特異性を上げるために NGS にて解読された“LTR+ゲノム配列”の境界配列をプライマーとして用いた長鎖 PCR も行った。

#### 4. 研究成果

肺腺がん 10 例、胃がん 11 例、大腸癌 10 例に加え、喫煙歴がない肺扁平上皮がん、HTLV 陽性リンパ腫および肺にできた奇形種を各一例ずつ解析した。診断時年齢の平均は 57 歳 (15~81 歳) であった。シーケンス対象領域には反復配列である HML-2 配列が含まれているため、NGS 実施当初、単一のシーケンスプライマーで解読すると単調なシーケンスシグナルを生み出してシーケンスクオリティの低下を招いていた。そこで、アダプター配列と HML-2 標的プライマー配列との間に 4 種の長さが異なるリンカー配列を導入して解読サイクルをずらしてシグナルの多様性を確保したことで、シーケンスクオリティの著しい低下を防ぎ、十分なクオリティを得ることに成功した (図 1)。



リファレンスゲノムへのマッピングの結果、多数の既存 HERV 部位に加え、18 症例から新たな LTR 挿入箇所を 21 箇所同定した。同定された既存部位と新規挿入部位の代表例を図 2 に示す。新規挿入部位についてマッピング後の隣接ゲノム領域には LTR 配列は存在していないが (図 2B)、もともとのトリミ



ング前の forward リード側には LTR 配列が存在している。つまり、トリミング前の配列は“LTR+(リファレンスゲノム上では LTR とは隣接していない)ゲノム領域”ということになり、該当ゲノム領域に HERV が新たに挿入されたと推定される。しかしながら、長鎖 PCR による確認では何かしらの長鎖配列が挿入されたという結果を得ることはできなかった。特異性を高めることを目的に、解読された“LTR+ゲノム領域”の境界配列をプライマーとして用いたが、HERV 挿入を示す結果は得られなかった。NGS 解析は非常に高感度であり、さらに NGS を施行する前の段階で inverse-PCR による特異的増幅を行っていることから、通常の PCR では検出されない感度で極少数の細胞での挿入変異を検出した可能性がある。最近、NGS により高感度で検出された変異を別の手法で検証するために digital PCR (dPCR) のような高感度測定法が用いられてきている。実際、大腸ポリポーシスにおいて NGS で同定された APC 遺伝子の一塩基変異 (モザイク) を dPCR で検出することに成功した (発表論文 2)。今後は dPCR のような高感度測定法で HERV 挿入変異を検証することができれば、少なくともこれまで報告がなかった体細胞における HERV 挿入変異について検証することが可能になるのではないかと考える。

一方で、体細胞における挿入変異を絞り込む過程で挿入多型についてもデータ解析を行ったが、挿入多型の特徴である target duplication site の長さがこれまでのものよりも際立って長いものが複数新たに見つかった (発表論文 1)。このような挿入多型の新たな知見は、今後の HERV 挿入変異の解析にも役立つものになると期待できる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2件)

(1) Kahyo T, Yamada H, Tao H, Kurabe N, Sugimura H. Insertionally polymorphic sites of human endogenous retrovirus-K (HML-2) with long target site duplications. BMC Genomics. 2017 Jun 27;18(1):487. 査読有

(2) Kahyo T, Iwaizumi M, Yamada H, Tao H, Kurachi K, Sugimura H. Application of digital PCR with chip-in-a-tube format to analyze Adenomatous polyposis coli (APC) somatic mosaicism. Clin Chim Acta. 2017 Dec;475:91-96. 査読有

〔学会発表〕(計 3件)

(1) Kahyo T, Yamada H, Tao H, Inoue Y, Kurabe N, Shinmura K, Sugimura H. A comprehensive investigation of insertional variations of human endogenous retrovirus elements in tumor tissues. America Association for Cancer Research, 2015.4.20, Philadelphia, USA.

(2) Kahyo T. A frameshift germline mutation of *SMAD4* gene in massive gastric polyposis. 第75回日本学会学術総会, 2016.10.6, 横浜

(3) Kahyo T, Iwaizumi M, Yamada H, Tao H, Kurachi K, Sugimura H. Application of digital PCR with chip-in-a-tube format to analyze *Adenomatous polyposis coli (APC)* somatic mosaicism. 第40回日本分子生物学会年次会, 2017.12.6, 神戸

〔その他〕

ホームページ等

(1) HERVに関するゲノム解析ツールを公開  
<https://github.com/TKahyo/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

華表 友暁 (KAHYO TOMOAKI)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：40416665