

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 4 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02680

研究課題名(和文) 長鎖シークエンス技術を用いた肝癌の転写異常の包括的解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of full-length transcripts reveal novel splicing abnormalities and oncogenic transcripts in liver cancer

研究代表者

藤本 明洋 (Fujimoto, Akihiro)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・教授

研究者番号：30525853

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、長鎖シークエンスデータの解析を目的として、全ゲノムシークエンスの解析手法(CAMPORソフトウェア)、トランスクリプトームの解析手法(SPLICEソフトウェア)を開発した。また、この方法を用いて肝癌11ペア(癌部と非癌部肝臓 計22サンプル)の全ゲノムシークエンス、42ペア(癌部と非癌部肝臓 計84サンプル HBV陽性は16ペア 32サンプル)のトランスクリプトームシークエンスを行った(1, 2)。これらの研究により、肝癌の複雑な構造異常、B型肝炎ウイルス(HBV)のゲノムへの組み込み箇所、肝癌で発現変化した転写産物や融合遺伝子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝癌は、世界の癌死の第3位に挙げられる予後不良の癌であり、有効な治療法の確立が急務である。これらの疾患の発症機序解明や治療ターゲットの発見のために、多くのゲノム、転写産物の研究が行われてきた。しかし、それらの先行研究は、短鎖(リード長が短い)の次世代シークエンサー(NGS)を用いて行われており、リピートを介した構造異常の検出や、転写産物の全長の解析が不可能であった。本研究は、長鎖シークエンサーを用いた初の肝癌のトランスクリプトーム研究であり、発癌に寄与する遺伝子候補が多数同定された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed an analysis pipeline named SPLICE and analyzed cDNA sequences from 42 pairs of hepatocellular carcinoma (HCC) and matched non-cancerous liver with Oxford Nanopore sequencer. Our analysis detected 46,663 transcripts from the protein-coding genes in the HCCs and the matched non-cancerous livers, of which 5,366 (11.5 %) were novel. Comparison of expression levels identified 9,933 differentially expressed transcripts (DETs) in 4,744 genes. Interestingly, 746 genes with DETs, including LINE1-MET transcript, were not found by the gene-level analysis. We also found that fusion transcripts of transposable elements and hepatitis B virus (HBV) were overexpressed in HCCs. In vitro experiments on DETs showed that LINE1-MET and HBV-human transposable elements promoted cell growth. Furthermore, fusion gene detection showed novel recurrent fusion events, which have not been detected short-reads.

研究分野：人類遺伝学

キーワード：長鎖シークエンサー 肝癌 転写産物の全長 HBV

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎は、B型肝炎ウイルス (HBV) の感染によって生じ、持続することにより慢性肝炎から肝硬変、肝癌へ進行しうる重篤な疾患である。肝癌は、世界の癌死の第3位に挙げられる予後不良の癌であり、有効な治療法の確立が急務である。これらの疾患の発症機序解明や治療ターゲットの発見のために、多くのゲノム、転写産物の研究が行われてきた。申請者らも、国際がんゲノムコンソーシアムの研究に参加し、肝癌の全ゲノムシーケンスを行ってきた(1, 2, 3, 4)。これらの研究により、肝癌の変異や転写産物が包括的に明らかとなり、肝癌のドライバー遺伝子、HBVゲノムのヒトゲノムへの挿入、HBVとヒトの融合遺伝子などが発見されてきた。しかし、それらの先行研究は、短鎖(リード長が短い)の次世代シーケンサー(NGS)を用いて行われており、リピートを介した構造異常の検出や、転写産物の全長の解析が不可能であった。

2. 研究の目的

長鎖シーケンサーはNGSと比べ、長い塩基配列の決定が可能(10kbp以上)であるが、エラー率が高い(10%程度)欠点がある。この研究は、長鎖シーケンサーのデータを解析し、転写産物全長を明らかにするためのソフトウェアを開発し、肝癌の転写産物を解析することで肝発癌の原因遺伝子を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

申請者らは、長鎖シーケンスデータの解析を目的として、全ゲノムシーケンスの解析手法(CAMPHORソフトウェア)、トランスクリプトームの解析手法(SPLICEソフトウェア)を開発した。また、この方法を用いて肝癌11ペア(癌部と非癌部肝臓計22サンプル)の全ゲノムシーケンス、42ペア(癌部と非癌部肝臓計84サンプル HBV陽性は16ペア 32サンプル)のトランスクリプトームシーケンスを行った。

4. 研究成果

申請者らは、すでに長鎖シーケンスを用いたトランスクリプトームの解析手法(SPLICEソフトウェア)を開発し、肝癌および非癌部肝臓42ペア(そのうちHBV陽性16ペア)の転写産物の解析を終了している。

- (1) 推定された発現量は、NGSによる発現解析の結果と高い相関を示した。また、予測された新規転写産物や融合遺伝子はRT-PCR法により増幅可能であった。このことから、我々の手法は精度が高いと考えた。
- (2) 肝癌において融合遺伝子が146個検出された。また、NGSによるRNAseqの結果と比較したところ、共通して検出された融合遺伝子は10%程度であり、長鎖シーケンス法により新たな融合遺伝子が多数検出されると考えられた。
- (3) 肝癌組織から60,011種類、非癌部肝臓から51,506種類の転写産物を同定した。それらのうち約7%はデータベースに記載がない新規転写産物であった。
- (4) HBV由来の転写産物を同定した。癌部と非癌部肝臓でHBVの転写開始点の違いが観測された。
- (5) B型肝炎ウイルスとヒトの融合転写産物を同定した。非癌部肝臓より、HBV-*FVI*遺伝子の融合遺伝子が高い頻度で同定された。また、癌部では、ヒトのトランスポゾン(TE; transposable element)とHBx(HBVの遺伝子であり、発癌に関与するとされる)の融合遺伝子が検出された。
- (6) 細胞株を用いて過剰発現およびノックダウン実験を行った結果、HBV-ヒトTE、癌遺伝子*MET*-ヒトTE、がん抑制遺伝子*HRHI*-ヒトTEなどの融合転写産物は、細胞増殖活性に影響することが明らかになった。

論文は投稿中 (Kiyose et al. (査読中)) である。また、この方法で開発した手法を用いてさらに多くの肝癌サンプルや他のがんの研究を行なっている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計17件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 5件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Fujita Masashi, Yamaguchi Rui, , Fujimoto Akihiro, , Nakagawa Hidewaki	4. 巻 53
2. 論文標題 Classification of primary liver cancer with immunosuppression mechanisms and correlation with genomic alterations	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 EBioMedicine	6. 最初と最後の頁 102659 ~ 102659
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ebiom.2020.102659	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Fujimoto Akihiro, Fujita Masashi, Hasegawa Takanori, Wong Jing Hao, Maejima Kazuhiro, Oku-Sasaki Aya, Nakano Kaoru, Shiraishi Yuichi, Miyano Satoru, Yamamoto Go, Akagi Kiwamu, Imoto Seiya, Nakagawa Hidewaki	4. 巻 30
2. 論文標題 Comprehensive analysis of indels in whole-genome microsatellite regions and microsatellite instability across 21 cancer types	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genome Research	6. 最初と最後の頁 334 ~ 346
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/gr.255026.119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 The ICGC/TCGA Pan-Cancer Analysis of Whole Genomes Consortium.	4. 巻 578
2. 論文標題 Pan-cancer analysis of whole genomes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 82-93
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-020-1969-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Mizuno K, Akamatsu S, Sumiyoshi T, Wong J1. Mizuno K, Akamatsu S, Sumiyoshi T, Wong JH, Fujita M, Maejima K, Nakano K, Ono A, Aikata H, Ueno M, Hayami S, Yamaue H, Chayama K, Inoue T, Ogawa O, Nakagawa H and Fujimoto A	4. 巻 9
2. 論文標題 eVIDENCE: a practical variant filtering for low-frequency variants detection in cell-free DNA.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 15017
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-51459-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wong JH, Shigemizu D, Yoshii Y, Akiyama S, Tanaka A, Nakagawa H, Narumiya S, Fujimoto A	4. 巻 11
2. 論文標題 Identification of intermediate-sized deletions and inference of their impact on gene expression in a human population	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genome Medicine	6. 最初と最後の頁 44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13073-019-0656-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sumiyoshi T, Mizuno K, Yamasaki T, Miyazaki Y, Makino Y, Okasho K, Li X, Utsunomiya N, Goto T, Kobayashi T, Terada N, Inoue T, Kamba T, Fujimoto A, Ogawa O, Akamatsu S	4. 巻 9
2. 論文標題 Clinical utility of androgen receptor gene aberrations in circulating cell-free DNA as a biomarker for treatment of castration-resistant prostate cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 4030
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-40719-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nguyen DT, Nguyen HH, Nguyen TD, Nguyen TTH, Nakano K, Maejima K, Sasaki-Oku A, Nguyen VB, Nguyen DB, Le BQ, Wong JH, Tsunoda T, Nakagawa H, Fujimoto A*, Nong VH	4. 巻 15
2. 論文標題 Whole Genome Sequencing of a Vietnamese Family from a Dioxin Contamination Hotspot Reveals Novel Variants in the Son with Undiagnosed Intellectual Disability.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Environ Res Public Health	6. 最初と最後の頁 2629
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijerph15122629	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ton ND, Nakagawa H, Ha NH, Duong NT, Nhung VP, Hien LTT, Hue HTT, Hoang NH, Wong JH, Nakano K, Maejima K, Sasaki-Oku A, Tsunoda T, Fujimoto A*, Van Hai N.	4. 巻 10
2. 論文標題 Whole genome sequencing and mutation rate analysis of trios with paternal dioxin exposure	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Hum Mutat.	6. 最初と最後の頁 1384-1392
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/humu.23585	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Shigenizu D, Miya F, Akiyama S, Okuda S, Boroevich KA, Fujimoto A, Nakagawa H, Ozaki K, Niida S, Kanemura Y, Okamoto N, Saitoh S, Kato M, Yamasaki M, Matsunaga T, Mutai H, Kosaki K, Tsunoda T	4. 巻 8
2. 論文標題 IMSindel: An accurate intermediate-size indel detection tool incorporating de novo assembly and gapped global-local alignment with split read analysis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 10367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-23978-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Taniguchi H, Fujimoto A, Kono H, Furuta M, Fujita M, Nakagawa H	4. 巻 25
2. 論文標題 Loss-of-function mutations in Zn-finger DNA-binding domain of HNF4A cause aberrant transcriptional regulation in liver cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 26144-26156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.25456	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 藤本明洋	4. 巻 増刊号
2. 論文標題 進化遺伝学とがんゲノム解析	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 105-109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 藤本明洋	4. 巻 58
2. 論文標題 ゲノムシーケンスデータの情報解析	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生物物理	6. 最初と最後の頁 001-003
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 藤本明洋	4. 巻 8月4日
2. 論文標題 肝癌の全ゲノムシーケンス解析	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 399-404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujimoto Akihiro, Wong Jing Hao, Yoshii Yukiko, Akiyama Shintaro, Tanaka Azusa, Yagi Hitomi, Shigenizu Daichi, Nakagawa Hidewaki, Mizokami Masashi, Shimada Mihoko	4. 巻 13
2. 論文標題 Whole-genome sequencing with long reads reveals complex structure and origin of structural variation in human genetic variations and somatic mutations in cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genome Medicine	6. 最初と最後の頁 65 ~ 65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13073-021-00883-1	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ashouri Saeideh, Wong Jing Hao, Nakagawa Hidewaki, Shimada Mihoko, Tokunaga Katsushi, Fujimoto Akihiro	4. 巻 140
2. 論文標題 Characterization of intermediate-sized insertions using whole-genome sequencing data and analysis of their functional impact on gene expression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Human Genetics	6. 最初と最後の頁 1201 ~ 1216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00439-021-02291-2	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takeda Haruhiko, Takai Atsushi, Kumagai Ken, Iguchi Eriko, Arasawa Soichi, Eso Yuji, Shimizu Takahiro, Ueda Yoshihide, Taura Kojiro, Uemoto Shinji, Kita Ryuichi, Haga Hironori, Marusawa Hiroyuki, Fujimoto Akihiro, Seno Hiroshi	4. 巻 252
2. 論文標題 Multiregional whole genome sequencing of hepatocellular carcinoma with nodule in nodule appearance reveals stepwise cancer evolution	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 398 ~ 410
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/path.5533	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mizuno Kei, Sumiyoshi Takayuki、.....i、Fujimoto Akihiro、Ogawa Osamu、Akamatsu Shusuke	4. 巻 27
2. 論文標題 Clinical Impact of Detecting Low-Frequency Variants in Cell-Free DNA on Treatment of Castration-Resistant Prostate Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 6164 ~ 6173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1078-0432.CCR-21-2328	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 藤本明洋
2. 発表標題 Identification of structural variations and analysis of their functional roles
3. 学会等名 日本進化学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤本明洋
2. 発表標題 Identification of structural variations and analysis of their functional roles
3. 学会等名 日本癌学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akihiro Fujimoto
2. 発表標題 Identification of structural variations and analysis of their functional roles
3. 学会等名 InCoB (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akihiro Fujimoto
2. 発表標題 Population Genetics
3. 学会等名 InCoB (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤本 明洋
2. 発表標題 Comprehensive Analysis of Indels in Whole-genome Microsatellite Regions and Microsatellite Instability across 21 Cancer Types
3. 学会等名 アメリカ人類遺伝学会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤本 明洋
2. 発表標題 ヒトのゲノム配列の解析と今後の課題；ゲノム解析の基礎、がんゲノム研究、リキッドバイオプシーの個別化医療への応用
3. 学会等名 薬物動態談話会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤本 明洋
2. 発表標題 Identification of structural variations and analysis of their functional roles
3. 学会等名 日本分子生物学会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤本 明洋
2. 発表標題 ヒト肝癌のゲノム異常の包括的解析と今後の課題
3. 学会等名 関西肝癌局所療法研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kiyose
2. 発表標題 Full-length transcriptome analysis of liver cancer using a long-read sequencing technology
3. 学会等名 AJHG（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京大学大学院医学系研究科国際保健学専攻人類遺伝学教室 http://www.humgenet.m.u-tokyo.ac.jp/publication.html</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中川 英刀 (Nakagawa Hidewaki) (50361621)	国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・ チームリーダー (82401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------