

令和元年11月7日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462624

研究課題名(和文) 子宮頸癌感受性遺伝子のゲノムワイド探索による発症機序解明

研究課題名(英文) Genome-wide association study of cervical cancer

研究代表者

竹内 史比古 (Takeuchi, Fumihiko)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・室長

研究者番号：50384152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：子宮頸癌発症にヒトの遺伝的要因があることは、疫学的に示唆されていたが、どの遺伝子かその要因を担っているか未解明であった。本研究の目的は、ゲノムワイド関連解析により子宮頸癌感受性遺伝子を同定することである。国内外の子宮頸癌コホートとの共同研究により、罹患群2609名と対照群4712名でゲノムワイド関連解析を行い、罹患群1461名と対照群3295名で追試したところ、有意な新規遺伝子座を5q14と7p11に同定できた。5q14のARRDC3遺伝子をHeLa細胞でノックダウンしたところ、HPV16偽ウイルス粒子感染が低下した。この成果は、発症機序解明・治療法開発を進める重要な一歩となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮頸癌により全世界で年間266,000名が亡くなっており、女性の生涯リスクは0.8%である。子宮頸癌発症にヒトの遺伝的要因があることは、疫学的に示唆されていたが、どの遺伝子かその要因を担っているか未解明であった。本研究は、ヒトゲノム全体にわたって子宮頸癌発症遺伝子を探索する研究として、東アジア人で最大規模であり、新たに2箇所の遺伝子座を同定できた。この発見は、子宮頸癌の発症機序解明・治療法開発を進めるための重要な一歩となる。

研究成果の概要(英文)：Epidemiological studies suggested that cervical cancer susceptibility is heritable, but actual causal genes in human were unknown. The objective of this study was to identify cervical cancer susceptibility genes by genome-wide association study (GWAS). Collaborating with other East Asian cervical cancer cohorts, we performed GWAS involving 2609 cases and 4712 controls, followed up by testing 1461 cases and 3295 controls. We identified significant associations at 5q14 and 7p11. In our functional studies, ARRDC3 knockdown in HeLa cells caused significant reductions in susceptibility to HPV16 pseudovirion infection. This finding is an important step towards elucidating disease etiology and developing treatment of cervical cancer.

研究分野：遺伝統計学

キーワード：ゲノムワイド関連解析 子宮頸癌

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

(1) 子宮頸癌は、ヒトパピローマウイルス (HPV) 感染を発端に発症するが、浸潤癌への進展には 10 年以上の年月を要し、発症するのはウイルス感染した人のうちの 0.15% に過ぎない。子宮頸癌発症には、ウイルスとヒトの双方の遺伝的要因があると考えられている。ウイルスについては、特定の遺伝子型の HPV (16, 18 型など) に高い発癌リスクがあることが分かっている。ヒトの遺伝的要因があることは、罹患者の第一度近親 (姉妹・母娘) では罹患リスクが 1.9 倍になることから示唆されていたが [Nature (1999) 400:29]、具体的にどの遺伝子とその要因を担っているのかは未解明であった。

(2) 子宮頸癌感受性遺伝子を見つけるために、HLA や癌遺伝子の幾つかについて関連解析が行われてきたが、再現性のある確実な関連は見つかっていなかった。感受性遺伝子は、発症過程で主要な役割を果たすヒト遺伝子のはずである。感受性遺伝子の未発見は、発症過程の解明が限定的であることの反映でもある。子宮頸癌の発症過程、即ち HPV 感染・潜伏・増殖・発癌において、HPV の遺伝子が果たす機能はかなり解明されてきた。一方で HPV のライフサイクルを支えるヒト遺伝子については、近年 HPV タンパク質に結合する細胞タンパク質群のプロテオミクス解析がなされているものの、感染受容体や病態進展に関わる因子などの重要なものがまだ同定されていない。

(3) 疾患感受性遺伝子同定に革命をもたらしたのは、2007 年頃から行われているゲノムワイド関連解析である。これまでに、数百の疾患や形質に関連する、数千の DNA 多型が見つかった (<http://www.ebi.ac.uk/gwas/>)。ゲノムワイド関連解析では、全ゲノムに渡って数百万個の一塩基多型 (SNP) を解析し、罹患者と対照群で遺伝型頻度の異なる SNP を統計的に絞り込むことにより、関連 SNP を同定する。この手法の長所は、ヒトの全遺伝子から網羅的に感受性遺伝子を探索できることである。実際、ゲノムワイド関連解析で見つかった感受性遺伝子の多くは、疾患への関与が想定されていなかった。同定された感受性遺伝子について、RNAi やノックアウトマウスによる機能解析が行われ、疾患メカニズムの解明が進んでいる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、子宮頸癌感受性遺伝子を同定することである。具体的な目的は以下の通り。

- (1) ゲノムワイド関連解析を行って、子宮頸癌と強く関連する SNP を全ゲノムから網羅的に探索する。
- (2) その関連 SNP が、どの遺伝子にどのような変化をもたらすかを予測する。
- (3) その感受性遺伝子が、子宮頸癌発症のどのステップにどのように関与するかを解明する。

3. 研究の方法

(1) ゲノムワイド関連解析: 共同研究を行っている HERPACC・千葉県がんセンターから提供された 144 名の子宮頸癌罹患者正常組織 DNA についてゲノムワイドに SNP の遺伝型決定を行った。本研究以前に遺伝型決定を行っていた 96 名の子宮頸癌罹患者、HERPACC で遺伝型決定された 699 名の非がん女性対照群も加えてゲノムワイド関連解析を行った。不良検体を除外し、各 SNP について、罹患者 235 名と対照群 691 名での遺伝型頻度の違いを統計的に検定した。

(2) ゲノムワイド関連解析の拡大: 国内外の子宮頸癌コホートと共同研究を行った。合わせて

罹患群 2609 名と対照群 4712 名のメタ解析になった。メタ解析は METAL ソフトウェアを使用した。有望な関連が複数発見できた。これらの関連を外国の別のコホートの罹患群 1461 名と対照群 3295 名で追加タイピングした。

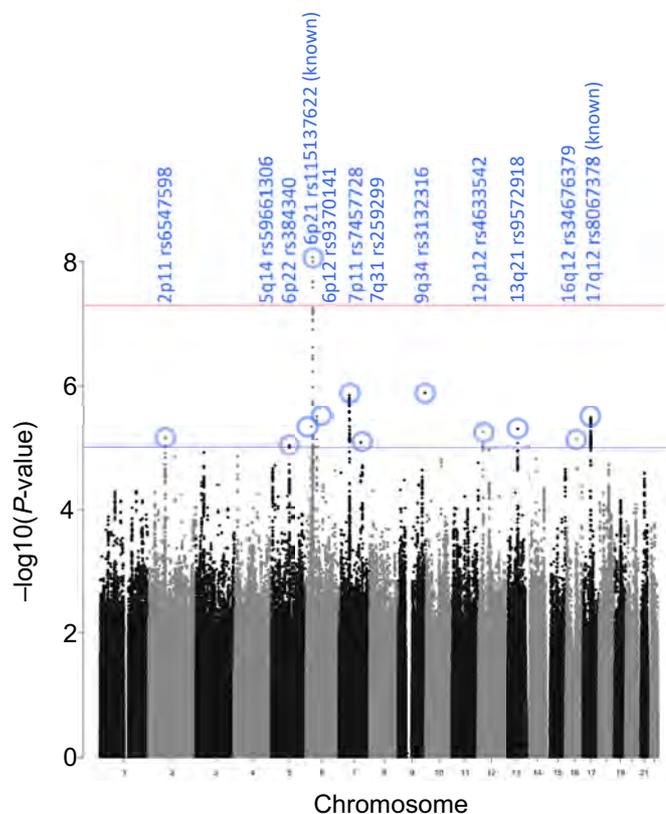
(3) *in silico* 遺伝子機能解析: SNP がタンパク遺伝子中に位置する場合は、アミノ酸配列やスプライシングの変化を予測した。SNP が non-coding RNA 中、あるいは遺伝子間の転写調節領域に位置する場合には、他の遺伝子の転写にもたらす変化を予測した。

(4) *in vitro* 遺伝子機能解析: 目標とする遺伝子を RNAi によりノックダウンして HPV の実験を行うことにより、HPV の感染、潜伏、増殖、癌化のいずれのステップで遺伝子が関与しているかを明らかにした。

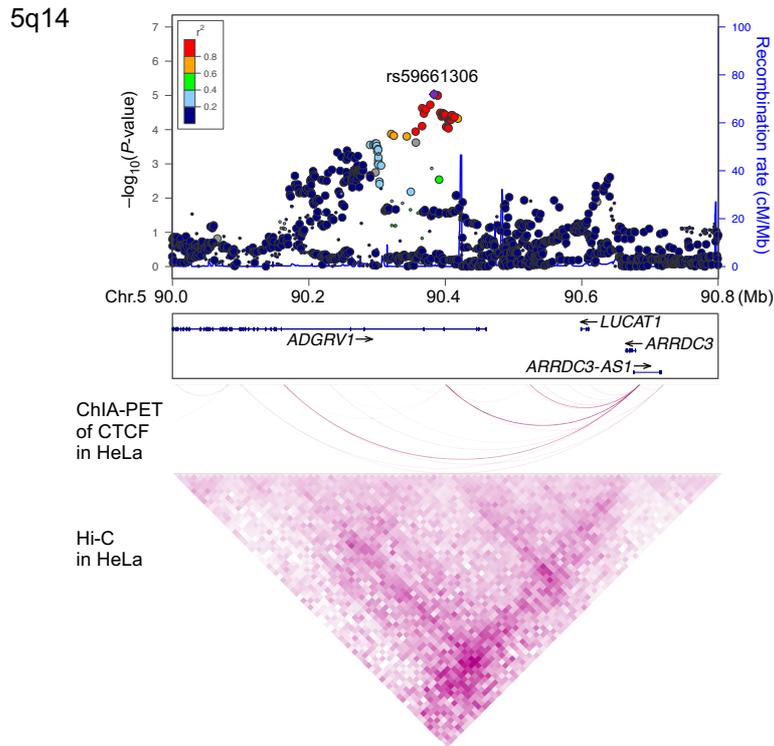
4. 研究成果

(1) ゲノムワイド関連解析: 本研究費で遺伝型決定をした罹患群 235 名と対照群 691 名でのゲノムワイド関連解析を先ず行った。残念ながら、ゲノムワイドに有意な SNP ($P < 5 \times 10^{-8}$) は見つからなかった。

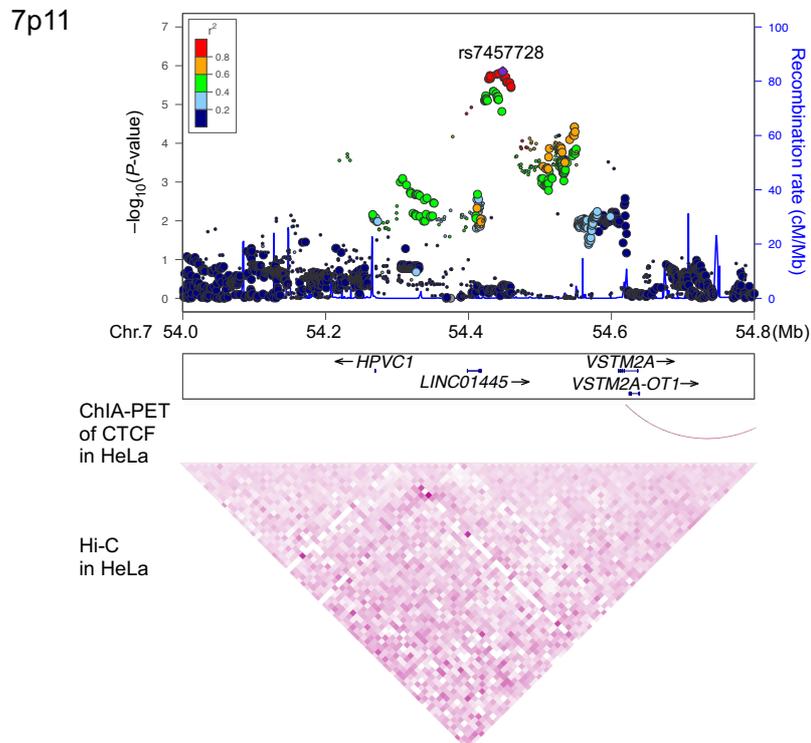
(2) ゲノムワイド関連解析の拡大: 国内外の子宮頸癌コホートと共同研究を行った。合わせて罹患群 2609 名と対照群 4712 名のメタ解析になった。有望な関連が複数発見できた(下図)。これらの関連を外国の別のコホートの罹患群 1461 名と対照群 3295 名で追加タイピングした。ゲノムワイドに有意な新規遺伝子座を 5q14 と 7p11 の 2 箇所同定できた。



(3) 5q14 遺伝子座においては、P 値最小の SNP rs59661306 は *GPR98* 遺伝子のイントロンに位置していた（下図）。クロマチンの 3 次元構造を調べたところ、疾患と関連する SNPs が *ARRDC3* 遺伝子のプロモータと接触していることが分かった。

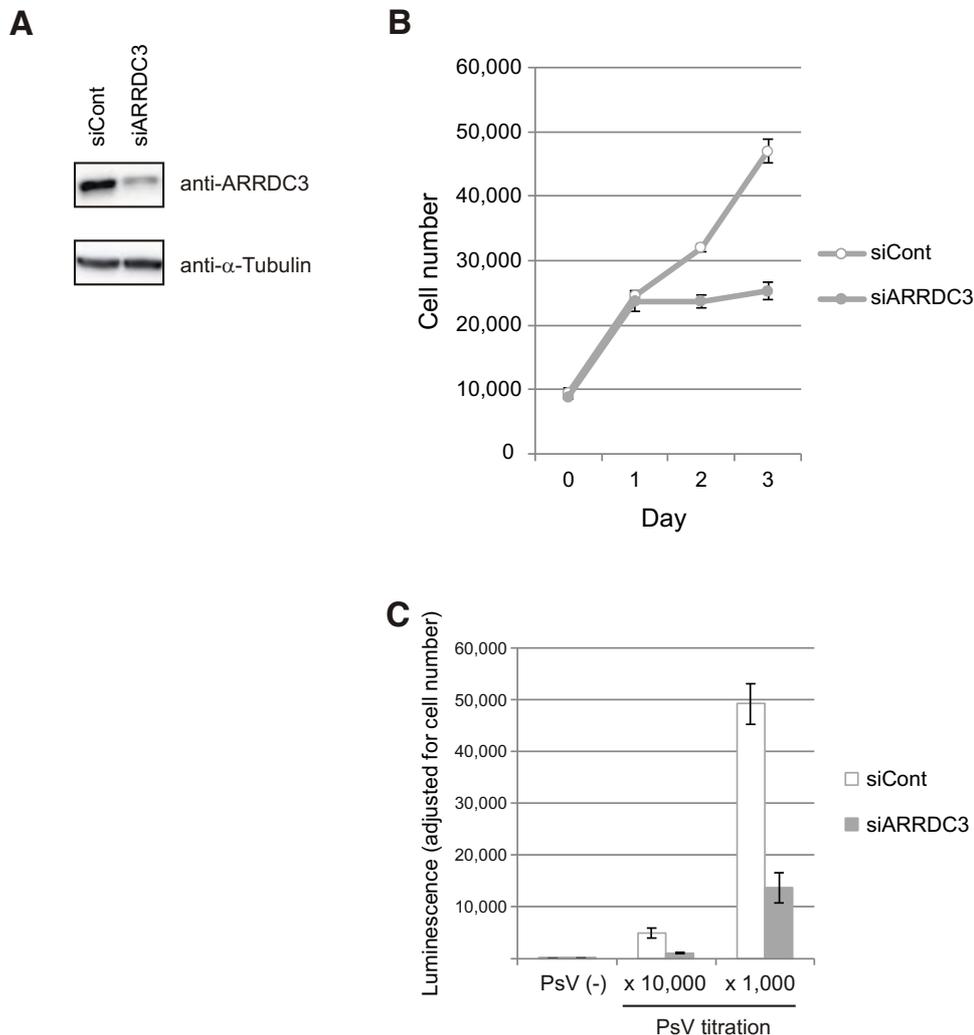


(4) 7p11 遺伝子座においては、疾患と関連する SNP rs7457728 の領域に ncRNA 遺伝子 *HPVC1*, *LINC01445* とタンパク遺伝子 *VSTM2A* が存在した（下図）。



(5) *GPR98* 遺伝子の *in vitro* 機能解析を行ったが、HPV 感染には影響していなかった。

(6) *ARRDC3* 遺伝子を HeLa 細胞でノックダウンしたところ、細胞増殖能が低下し、また HPV16 偽ウイルス粒子感染が低下した (下図)。このことは、HPV の細胞感染に *ARRDC3* が関与していることを示唆している。



(7) 本研究は、子宮頸癌のゲノムワイド関連解析として、これまでで最大であり、2箇所の新規関連遺伝子座を同定できた。この発見は、子宮頸癌の発症機序解明・治療法開発を進めるための重要な一歩となる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1件)

Takeuchi F, Kukimoto I, Li Z, Li S, Li N, Hu Z, Takahashi A, Inoue S, Yokoi S, Chen J, Hang D, Kuroda M, Matsuda F, Mizuno M, Mori S, Wu P, Tanaka N, Matsuo K, Kamatani Y, Kubo M, Ma D, Shi Y.

Genome-wide association study of cervical cancer suggests a role for *ARRDC3* gene in human papillomavirus infection.

Human Molecular Genetics, 2019, Vol. 28, No. 2, pp. 341-348, 査読有り

DOI:10.1093/hmg/ddy390

[その他]

ホームページ等

<https://ega-archive.org/studies/EGAS00001003199>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名： 終元 巖

ローマ字氏名： KUKIMOTO, Iwao

所属研究機関名： 国立感染症研究所

部局名： 病原体ゲノム解析研究センター

職名： 室長

研究者番号 (8 桁)： 70291127

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。