

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462539

研究課題名(和文) HPV組込み解析とエピゲノム解析による子宮頸がん発症機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism for the onset of cervical cancer by analysis of HPV integration and DNA methylation

研究代表者

鈴木 直 (Suzuki, Nao)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：90246356

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルス感染は様々なヒト悪性腫瘍の共通の危険因子である。ヒトパピローマウイルス(HPV)の染色体への組込みは、子宮頸がんの原因となる。我々はハイスループットウイルス組込み検出により、HPV DNA組込み部位を配列決定するため次世代シーケンスに基づいた方法を実施した。我々は5つの子宮頸がん細胞株において12のHPV組込みブレイクポイントを同定し、組込まれたHPVゲノム内の様々なレベルのDNAメチル化を見出した。我々の研究は、ハイスループットのウイルス組込み検出法を用いて子宮頸がん細胞におけるHPV組込み部位を正確に評価し、HPV組込みが駆動する子宮頸がん発症の基礎的な証拠を提供する。

研究成果の概要(英文)：Viral integration into the human genome upon infection is an important risk factor for various human malignancies. Human papilloma virus (HPV) integration is a key genetic event in cervical carcinogenesis. We performed a next-generation sequencing-based method for sequencing the HPV DNA integration sites, by high-throughput viral integration detection. We identified 12 HPV integration breakpoints in five cervical cancer cell lines and found variable levels of DNA methylation within the integrated HPV genomes. Our study accurately evaluated HPV integration sites in cervical cancer cells using high-throughput viral integration detection method providing basic evidence for HPV integration-driven cervical carcinogenesis.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：子宮頸がん ヒトパピローマウイルス ウイルス組込み

### 1. 研究開始当初の背景

我が国で最も多い婦人科悪性腫瘍である子宮頸がんは、その発症にヒトパピローマウイルス (HPV) が関与することが確定しており、子宮頸がんの 90%以上に HPV の感染が確認される。HPV は、約 8000 塩基対の環状 DNA をゲノムとし、正二十面体のキャプシド構造を外角とする小型の DNA ウイルスである。性交渉の開始に伴い約 80%の女性が HPV 感染を経験するが、通常約 1 年以内にウイルスは排除され、感染により生じた子宮頸部の軽度異形成・子宮頸部上皮内腫瘍性病変も約 3 年以内に自然消退する。しかし、感染者の約 10%では 3 年以上の持続感染が成立し、さらにその一部では数年から数十年の経過を経て子宮頸がんが発生すると考えられている。現在、子宮頸がんは全世界の女性がん患者の死亡原因では、乳がんに次いで第 2 位に位置しており、特に 20~30 代の女性においては発症する全てのがんの中で死亡原因の第 1 位となっている。また、日本では 2004 年に子宮頸がん検診の対象年齢を引き下げたことから子宮頸がんの増加と若年化が新たな問題となっている。

一方、HPV ゲノムは複製起点やプロモーター配列を含む long control region (LCR) と呼ばれる制御領域、初期遺伝子領域、後期遺伝子領域より構成されており、全ての遺伝子は片方の DNA 鎖上に存在している。HPV 遺伝子領域のなかでも E6、E7 遺伝子は発がんに関与し、それぞれ p53、pRB がん抑制遺伝子産物の分解促進による不活性化をまねく。90%以上の子宮頸がんでは E6、E7 遺伝子が必ず発現しており、細胞の不死化からがん化に至る多くの過程に関与していることや、E6 と E7 を高発現しているがん細胞では、HPV DNA の染色体への組み込みや増幅、E2 の発現消失と E6、E7 プロモーターの変異などが見られることが明らかとなってきた。HPV ゲノムの組み込まれ方には共通の特徴があり、E6、E7 遺伝子とそのプロモーターは必ず存在し、同じプロモーターから転写され、E6、E7 の安定高発現はがん化への進行のみならず、がん形質の維持に必要であると示唆される。このような E6 と E7 の安定高発現をもたらす偶発的な染色体への組み込みイベントが、がん化における実質的な律速段階となっており、染色体への“組み込まれ易さ”が宿主側のリスク因子となりうる。これらのことから E6 と E7 は、子宮頸がん発生における責任遺伝子であり、HPV 組み込みによる安定高発現が子宮頸がん発症の唯一の原因と捉えられる。

### 2. 研究の目的

HeLa や SiHa のような子宮頸がん由来の細胞株では、HPV-18 や HPV-16 の E6 および E7 タンパク質の発現が続いており、その発現をアンチセンス RNA や siRNA を使って特異的に抑制すると細胞増殖が抑制されることから、これらの細胞の増殖能はがん化の後も E6、E7

に依存している。このように、E6 と E7 の安定高発現をもたらす最大の原因である HPV ゲノムの染色体への組み込みは、HPV 感染後の発がん過程におけるトリガーとなることから、今後詳細な機構解析が必要である。また染色体への組み込み時期は高度異形成への進展時とほぼ一致することから、染色体内に組み込まれた HPV DNA を効率よく検出することは信頼性の高い診断技術を確認する上で有効となりうる。しかしながら、これまでの組み込み解析では、FISH 法やレトロトランスポゾンに由来する Alu 反復配列を利用した PCR 法などにより解析が行われてきたが、これらの方法ではおおまかな染色体上の位置や Alu 反復配列近傍に由来する部位の特定に留まり、全ての組み込み部位を塩基レベルで捉えることは不可能であった。また一般的には、ウイルスの組み込みが起こると DNA のメチル化やヒストン修飾を介したクロマチン構造などのエピジェネティクス制御機構による不活性化制御がなされることから、組み込みが起きた HPV E6、E7 遺伝子はこの抑制機構をまねがれ安定高発現をもたらしていると考えられるものの、塩基レベルでの組み込み部位の同定が困難であったことから特にヒトゲノム側のエピゲノム状態の報告は研究開始当初は皆無であった。

そこで本研究は、HPV プローブによるゲノムキャプチャー技術と次世代シーケンス解析技術を組み合わせることで子宮頸がん発症に関わる全ての HPV 組み込み部位と E6、E7 遺伝子発現制御におけるエピジェネティクス制御機構を解明することを目的とした。具体的には以下の 3 点を中心に研究を進めた。

(1) 塩基レベルでの全 HPV 組み込み部位の同定 HPV 組み込み部位のみを濃縮するゲノムキャプチャーと次世代シーケンス解析にて同定。

(2) HPV 組み込み部位におけるエピゲノム状態の解析による E6、E7 遺伝子発現制御機構の解明

決定された各組み込み部位について Bisulfite sequencing 法および ChIP アッセイによりエピゲノム状態を解析し、E6、E7 発現におけるエピジェネティクス制御機構の解明。

(3) HPV 組み込みパターンの解明

正常子宮頸部細胞への HPV DNA 導入によりがんの発生に重要な組み込みパターンの検討。

### 3. 研究の方法

(1) 子宮頸がんにおける HPV 組み込み部位の同定

次世代シーケンス解析を応用した HPV 組み込み部位の同定

高リスク型 HPV の全配列を網羅したプローブを用いたゲノムキャプチャーによる標的 DNA の濃縮と次世代シーケンサーによる全濃縮 DNA の解読を行うことにより、ヒトゲノム中の HPV 組み込み先を全て同定する。ヒト子宮

頸がん由来培養細胞ゲノム DNA は、アコースティックソルビライザーを用いて細断化した。細断化したヒトゲノムは HPV の全配列を網羅した DNA プローブとハイブリダイズさせ、HPV の配列が存在する DNA 断片のみを濃縮・精製した。精製された HPV 配列を含むヒトゲノム断片は、末端に標識のためのアダプターをライゲーションさせた。こうして作製した DNA ライブラリーをアダプター相補配列が固定化されたビーズと混合させエマルジョン PCR を行い、増幅の起こったビーズを Pico Titer Plate の小孔に 1 ビーズずつ入った状態でシーケンスを行った。本研究では、次世代シーケンサーに Roche の GS FLX+システムを用いた。本システムは、1 リード当たりの解析塩基の最頻長が約 700 bp と長く、解読データの質も非常に高いという長所があり、本研究に適していると考えた。またゲノムキャプチャーにより HPV 含有配列を濃縮することにより、次世代シーケンス解析におけるデータ信頼度の点で重要となる十分な解析 depth を確保することが可能となった。解読データは、HPV 配列とヒトゲノム配列をリファレンスとした独自プログラムにより、塩基レベルにおける全 HPV 遺伝子組み込み部位ならびに組み込みパターン、コピー数を決定した。

#### (2) HPV 各組み込み部位のエピゲノム状態の解析と E6, E7 遺伝子の発現制御機構の解明

HPV 組み込み部位のダイレクトシーケンスによる検証

HPV 組み込み解析の結果をゲノム PCR とダイレクトシーケンス解析により検証した。

HPV 組み込み部位におけるエピゲノム状態の解析

決定された各組み込み部位における HPV DNA およびヒトゲノムの DNA メチル化状態を Bisulfite sequencing 法により解析した。

#### E6, E7 遺伝子発現制御機構の解明

HPV DNA の組み込みに由来する E6, E7 遺伝子発現はどの部位から発現しているのか明らかにした。さらに *in vitro* で脱メチル化させた場合の転写活性についても同様に検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 次世代シーケンス解析を応用した HPV 組み込み部位の同定

5 つのヒト子宮頸がん由来培養細胞株のゲノム DNA を用いて Roche の GS FLX+システムにより HPV の組み込み部位の網羅的解析を行った。本システムは、1 リード当たりの解析塩基の最頻長が約 700 bp と長く、解読データの質も非常に高いという長所があり、本研究に適していると考えた。またゲノムキャプチャーにより HPV 含有配列を濃縮することにより、次世代シーケンス解析におけるデータ信頼度の点で重要となる十分な解析 depth を確保することが可能であった。解読データは、

HPV 配列とヒトゲノム配列をリファレンスとした独自プログラムにより、塩基レベルにおける全 HPV 遺伝子組み込み部位ならびに組み込みパターン、コピー数を決定した。HPV の組み込み部位の網羅的解析の結果、5 つの細胞株それぞれにおける HPV 組み込み候補部位を示す数千リードの配列データを得た。これらの配列データを専用の塩基配列解析ソフトによって DNA 配列のアセンブリを行い、候補配列を数百にまで絞った。アセンブリされた候補配列において HPV 組み込み部位をまたぐようにヒトゲノム、HPV ゲノムそれぞれにアニールするようなプライマーを設計した後、ゲノム PCR による候補配列の検証を行い、最終的な HPV 組み込み部位をそれぞれの細胞株において同定した。

### (2) HPV 各組み込み部位のエピゲノム状態の解析と E6, E7 遺伝子の発現制御機構の解明

HPV 組み込み部位のダイレクトシーケンスによる検証

HPV 組み込み解析の結果、最終的に同定された配列をダイレクトシーケンス解析により検証した。シーケンス解析により HPV 組み込み部位の塩基配列を全て正確に解読し、データベースとの相同性を確認した。このステップで擬陽性を排除し、確実に組み込みが起きている部位のみを抽出した。

HPV 組み込み部位におけるエピゲノム状態の解析

決定された各組み込み部位における HPV DNA およびヒトゲノムの DNA メチル化状態を Bisulfite sequencing 法により解析した。その結果、正常アレルと比較し、HPV 組み込みアレルにおいてメチル化が上昇するグループとメチル化が低下するグループの両方が存在することが明らかとなった。

これまで HPV DNA における DNA メチル化解析の報告は存在するものの、ヒトゲノム側のメチル化状態は不明であった。さらに HPV は複数の組み込みが起こることからもこれまでの報告では、複数部位の平均的なメチル化状態しか把握できていないことが最大の問題と考えられていた。本研究では塩基レベルでの HPV 組み込み部位の解析が出来ることから、それぞれの組み込み部位における HPV およびヒトゲノム側のエピゲノム状態の検討が可能となり、E6, E7 遺伝子発現制御における重要な DNA メチル化状態を知ることが出来た。

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

(1) 戸澤晃子、永澤侑子、横道憲幸、細沼信

示、吉岡範人、大原樹、大熊克彰、前田一郎、木口一成、鈴木直  
ASC-USにおけるHPV-DNA検査の有用性と臨床上の留意点  
第58回日本臨床細胞学会総会  
2017.5.28、大阪国際会議場（大阪）

(2) 上川篤志、戸澤晃子、横道憲幸、鈴木直  
子宮頸がん細胞株のHPV遺伝子E6、E7を標的としたゲノム編集による細胞周期関連因子の変動  
第68回日本産科婦人科学会学術講演会、  
2016.4.24、東京国際フォーラム（東京都）

(3) 戸澤晃子、上川篤志、竹内淳、山中弘之、秦ひろか、近藤亜未、三浦彩子、横道憲幸、大原樹、近藤春裕、鈴木直  
次世代シーケンス解析を用いた子宮頸がん細胞におけるヒトパピローマウイルス組込み部位の同定  
第68回日本産科婦人科学会学術講演会  
2016.4.24、東京国際フォーラム（東京都）

〔図書〕（計 0件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 直 (SUZUKI, Nao)  
聖マリアンナ医科大学・医学部・教授  
研究者番号：90246356

### (2) 研究分担者

上川 篤志 (UEKAWA, Atsushi)  
聖マリアンナ医科大学・医学部・研究技術

員  
研究者番号：60534253

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：

(4) 研究協力者  
( )