

令和元年6月3日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05576

研究課題名(和文) 肺癌に関わる非コードゲノム制御領域のゲノム・エピゲノム統合解析

研究課題名(英文) Integrative genome and epigenome analysis of non-coding regulatory regions in lung cancer

研究代表者

村谷 匡史 (Muratani, Masafumi)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：50730199

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,900,000円

研究成果の概要(和文)：癌のゲノム解析において、タンパク質コード領域のシーケンシングを行うExome解析は世界的に大規模解析が行われ新規がん関連遺伝子の発見が相次いだ。非コード制御領域の変異解析は進んでいなかった。本研究では、プロモーターやエンハンサーなどのゲノム制御領域が特異的なヒストン修飾を受けていることを利用し、クロマチン免疫沈降(ChIP)シーケンシングを行うことで、制御領域のゲノム変異解析を行った。少数症例の解析で見つかった変異をより多くの検体のアンプリコン・シーケンシングで確認し、非コード制御領域の体細胞変異およびSNPを多数同定するとともに、複数症例で体細胞変異を持つ制御領域を見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

既知の癌関連遺伝子の近傍のゲノム制御領域に多数の体細胞変異が見つかったことは、癌のゲノム変異解析において未知の領域があることを示しており、それらの機能的意義の確立や多数症例での研究など、今後の研究の基礎となる結果が得られた。全ゲノム解析の情報に加え、癌特異的に変化する制御領域の位置情報とアレル特異的制御の情報を加えることで、多数の変異から機能的に重要なものを効果的にフィルタリングできることは今後の癌研究にも有用である。制御領域の変異をどのように臨床応用するかは今後の課題ではあるが、SNPによる疾患感受性の予測やクリプティック・プロモーターからの転写産物に対する創薬などが期待される。

研究成果の概要(英文)：Unlike coding mutations, extent of somatic mutations in non-coding regulatory regions remains largely unknown. In this study, we performed ChIP-sequencing analysis of lung cancer clinical tissue samples. Discovery of large number of somatic mutations in promoters and other regulatory regions indicates potential impact of non-coding mutations in cancer. ChIP-sequencing also identified allele-specific regulation of cancer-associated regulatory regions. Such information is highly useful to filter potential functional variants, and similar strategy could be applied to other clinical research including rare diseases. It is also important to develop method to utilize functional variants as diagnostic markers and as drug targets. Functional SNPs could be developed as a predictive marker for disease susceptibility, and somatic mutations could predict effect of drugs targeting certain transcriptional regulatory network.

研究分野：ゲノム生物学

キーワード：がんゲノム エピゲノム ヒストン修飾 非コード制御領域 臨床組織検体 肺癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本研究が計画された 2014 年当初には、すでに多種の癌でタンパク質コード領域の変異を網羅的に調べる Exome 解析の結果が発表されていた。しかし、コード領域は全ゲノムの 2%程度とされ、その他のゲノム領域の体細胞変異と疾患関連 SNP がどのように癌に関わるのかは詳しく解析されていなかった。ゲノム上には、エンハンサーやプロモーター領域を含むゲノムの非コード制御領域があり、これらの領域にも機能的に重要な体細胞変異や SNP が存在することが期待されていた。全ゲノムシーケンシングではシーケンシングコストが高く、また、変異の意味付け (アノテーション) に必要な臨床検体解析によるエピゲノム情報が欠けており、新しい研究アプローチの必要性が認識されていた。

### 2. 研究の目的

プロモーターやエンハンサー領域は、特異的なヒストン修飾を受けていることが知られており、本研究ではこれらの修飾を指標にゲノム制御領域 DNA を濃縮、シーケンシングすることで (ChIP シーケンシング解析) 非コード制御領域のゲノム・エピゲノム統合解析を行うことを目的とした。ゲノム情報としては、ヒストン修飾を受けているゲノム領域の塩基配列を ChIP シーケンシングのリードを用いて解析し、SNP および体細胞変異を検出すること。エピゲノム情報としては、ChIP シーケンシングによるプロモーター及びエンハンサー領域の活性化状態を癌部と正常組織で比較することにより、癌特異的な変化を受ける領域を発見すること。また、リードのアレル頻度のバイアスを解析することにより、バリエーションを含むアレルがアレル特異的ヒストン修飾を受けているか、すなわち塩基置換変異により DNA 領域の機能に差が生じているかを検討することを目的とした。これらのゲノム・エピゲノム統合解析を最初に少数の症例で行うことで、体細胞変異による癌特異的な非コード制御領域の機能変化があるかを予測し、さらに、多数症例のターゲット・シーケンシング解析により、非コード制御領域の体細胞変異に複数症例で Recurrent に起きるものがあるかを検討した。このパイロット研究をもとに、多数症例で ChIP シーケンシング解析を行えば癌の予防や治療に有用な情報が得られるのかどうかを検討し、大規模プロジェクトへの発展性や問題点を判断することを本研究の目標とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、筑波大学診断病理学研究室、およびつくばヒト組織バイオバンクセンターに保管されていた肺癌とマッチング正常組織検体から、腺癌と扁平上皮癌、合わせて 250 症例以上を対象とした。癌臨床検体のエピゲノム解析では、組織検体に含まれる癌細胞以外の細胞種からも RNA およびヒストン修飾のシーケンシングリードが混ざるため、癌細胞部分の切り出しが必要である。そのため、本研究ではレーザーマイクロダイセクションによる検体採取を組み合わせ、RNA シーケンシングも同一組織の連続切片を用いて行うことで、RNA 発現変化とゲノム制御領域の変化を関連付けて検討できるよう計画した。

### 4. 研究成果

#### (1) レーザーマイクロダイセクションを用いた検体採取とエピゲノム解析

病理標本の観察において癌細胞の占める切片上の面積が大きい症例であっても、ChIP シーケンシングのシグナルとなる核の数で癌細胞が占める割合が 5 割を超えるような症例は稀であった。一方で、組織の薄切と染色後にレーザーマイクロダイセクションを行う場合、ChIP 解析に必要な検体の品質を保持し、さらにシーケンシング解析に十分な DNA と RNA を得るには複雑な作業が必要となり、ヒストン H3 リジン 4 トリメチル化 (H3K4me3、プロモーター) および H3 リジン 27 アセチル化 (H3K27ac、活性化制御領域) に特異的な抗体を用いた ChIP シーケンシング解析と RNA シーケンシングを行った症例は 20 症例程度にとどまった。このうち、検体の品質が良好で、最も改良された微量 DNA の増幅法を用いた 6 症例 (腺癌 3 症例、扁平上皮癌 3 例) について、正常組織と癌組織のロングリードのシーケンシングを行い、制御領域の SNP、体細胞変異解析のデータを得た。

ロングリードに用いなかった ChIP シーケンシング解析症例を用いて、過去の胃癌組織の研究 (引用文献) と同様の解析も行った。ポリコム複合体の結合標的における癌特異的なプロモーターの活性化、および、データベースに収録された標準的な遺伝子プロモーター以外の「クリプティック・プロモーター」の活性化を見出すことができ、肺癌と胃癌で共通するエピゲノム変化が見られることを確認した。

#### (2) ChIP シーケンシングを用いたバリエーションコール

ChIP シーケンシングを用いたバリエーションコールは胃癌組織のエピゲノム解析と同様の手法を用いた。dbSNP データベースに見つからない生殖系列変異のうち、さらに大部分は東北メガバンクデータベースで公開されていないバリエーションであったため、正常組織のリードを用いることでさらに SNP をフィルタリングした。ここで残った ChIP シーケンシングの癌特異的な変化を受けるピーク領域に限って体細胞変異候補を絞り込み、55 箇所をアンプリコン・シーケンシングでの確認サイトとした。

### (3) カスタムパネルの作成とアンプリコン・シーケンシング

研究開始当初はカスタムキャプチャーパネルの利用を計画していたが、試薬が高価なことと多数の検体の解析では前処理作業も複雑さが増すことから、アンプリコンプライマーのデザインを行った。55 箇所確認サイトの 92% でプライマーのデザインが可能で、そのうち 70% は ChIP シーケンシング解析による塩基置換のコールが正しいことが確認できた。さらに 77% が体細胞変異であることが確認できた。アンプリコンのうちか所については複数検体で体細胞変異が検出された。

### (4) 非コード制御領域の体細胞変異及び SNP 解析

体細胞変異とコールされたが実際には SNP だったサイトについては、正常組織のリードが浅かったため、SNP を十分にフィルタリングできていなかったことで誤って体細胞変異と判定されていた。また、これらの SNP サイトは東北メガバンクのデータベースにもアレル頻度の情報が無く、「Private SNPs」のようなサイトが非コード制御領域にも存在することを示唆している。これらの希少な SNP が疾患の個人差に影響するかは興味深い。体細胞変異と異なり、発癌前に疾患のリスクや性質が予測できれば有用であり、今後の大規模研究の対象として期待できる。

本研究では非コード制御領域の体細胞変異が見出されたが、アレル特異的ヒストン修飾により機能的な変異であることが示唆されたものの、Exome 解析で見いだされるアミノ酸置換変異に比べてそのメカニズムを確立することは難しく、転写因子結合サイトの変化によるものと推定した。

### (5) 本研究で確立された解析手法の有用性

全ゲノムシーケンスを行うアプローチに比べ低コストで、エピゲノムプロファイルも加えたゲノム・エピゲノム統合解析が行える点は、ChIP シーケンシング解析を用いた統合解析は有用と考えられる。今後も様々な臨床検体解析に応用できる十分な知見と、肺癌においては新規の疾患関連 SNP および体細胞変異が発見できた。特に、1 検体あたり数万個を超える SNP および体細胞変異から、癌特異的に変化する ChIP シーケンシングピーク領域とのオーバーラップ、アレル特異的ヒストン修飾、増幅・欠失候補領域の除外の複数段階のフィルタリングを用いることで、各症例につき数十か所の SNP および体細胞変異候補まで機能的変異の候補が絞り込めることは、多数の症例を用いた統計的解析に依存せずに 1 症例から得られる情報のみで、アレル特異性を用いたゲノム変異のフィルタリングを可能にする。この手法は、特に研究対象となる症例数が少ない希少疾患の研究への応用が期待できる。

バイオバンク検体の ChIP シーケンシング解析での利用は、検体の採取や処理条件の検討で困難もあったが、普通にバンキングされる新鮮凍結検体を用いて高品質のデータが得られるようなプロトコルを完成できた。H3K4me3 でマークされた遺伝子プロモーター領域や H3K27ac マークのある非コード制御領域におけるアレル特異的制御と対応する SNP、および、体細胞変異、また、ゲノム変異とは見かけ上関係なくエピゲノム制御によって癌特異的に発現している non-canonical exon についても、引き続き機能解析やバイオマーカーとしての知財化と論文発表、研究開発を行う。

### < 引用文献 >

Muratani M, Deng N, Ooi WF, Lin SJ, Xing M, Xu C, Qamra A, Tay ST, Malik S, Wu J, Lee MH, Zhang S, Tan LL, Chua H, Wong WK, Ong HS, Ooi LL, Chow PK, Chan WH, Soo KC, Goh LK, Rozen S, Teh BT, Yu Q, Ng HH, Tan P. Nanoscale chromatin profiling of gastric adenocarcinoma reveals cancer-associated cryptic promoters and somatically acquired regulatory elements. *Nature Communications*. 5:4361. (2014)

### 5 . 主な発表論文等

#### [ 雑誌論文 ] (計 1 件)

Kim Y, Shiba-Ishii A, Ramirez K, Muratani M, Sakamoto N, Iijima T, Noguchi M. Carcinogen-induced tumors in SFN-transgenic mice harbor a characteristic mutation spectrum of human lung adenocarcinoma. *Cancer Sci*. 査読有, (2019) doi: 10.1111/cas.14081.

#### [ 学会発表 ] (計 3 件)

Sakashita S, Novel Somatic Gene Mutation of SLC17A9, Detected in Early-Stage Lung Adenocarcinoma, World Conference on Lung Cancer, 2018

Muratani M, Integrative genome and epigenome analysis of gene regulatory regions in human lung cancer cells isolated by laser-micro-dissection, Human Genome Meeting, 2018

Sakashita S, Site-Selected Chromatin-Immunoprecipitation (ChIP) Analysis by Laser Captured Microdissection, World Conference on Lung Cancer, 2015

#### [ 図書 ] (計 0 件)

#### [ 産業財産権 ]

出願状況 (計 0 件)

取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ：[http://www.md.tsukuba.ac.jp/tmrc/foundation\\_core/gb/genome-biology.html](http://www.md.tsukuba.ac.jp/tmrc/foundation_core/gb/genome-biology.html)

6．研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：野口 雅之

ローマ字氏名：Noguchi Masayuki

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。