

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 23 日現在

機関番号：13802
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23790396
 研究課題名（和文） 高感受性個体に発生する腫瘍性疾患を対象としたゲノム不安定性の検出法確立と解析
 研究課題名（英文） Technological research and applied analysis of genomic instability in tumor-susceptible individuals
 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

研究成果の概要（和文）：

高感受性個体に発生する腫瘍性疾患を対象としたゲノム不安定性を評価する方法として、レトロトランスポゾンであるヒト内在性レトロウイルス（HERV）内で保存された LTR（long terminal repeat）領域を標的とした inverse PCR を試みた。その結果、LTR 単独領域の新規挿入多型を 2 箇所同定することができた。それら 2 箇所の新規 LTR 挿入多型の内 1p13.2 染色体領域に位置するものについては、非喫煙女性の肺腺癌に対して年齢層に依存した感受性の変化を示すという大変興味深い結果となった。今後 LTR 領域に起こるエピジェネティックな作用に着目して研究していく必要があると考える。

研究成果の概要（英文）：

The inverse PCR method targeting the long terminal repeat (LTR) region conserved among human endogenous retroviruses (HERVs) was performed to assess genomic instability in tumor-susceptible individuals. As a result, two novel insertional polymorphisms of solo LTR were identified. Interestingly, one of the two insertional polymorphisms, located on chromosome 1p13.2, was involved with the susceptibility to lung adenocarcinoma of female never-smokers in an age-dependent manner. Further study of epigenetic effects on the LTR region will be necessary.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

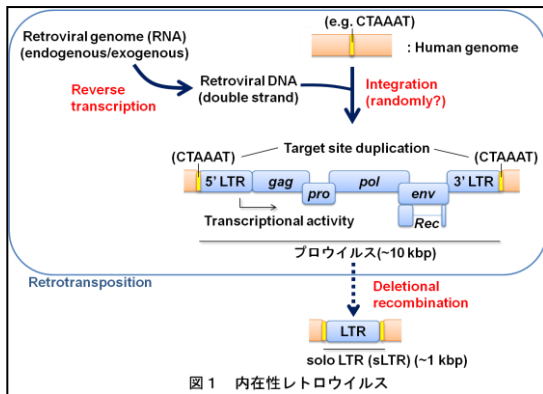
科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：分子病理・腫瘍

1. 研究開始当初の背景

ヒト内在性レトロウイルス（human endogenous retrovirus = HERV）は可動因子であるレトロトランスポゾンの一つであり、ヒトゲノム上では塩基数換算で約 8% を占め、そのコピー数は数万以上にもなることが知られている。HERV の基本構造については、プロモータ及びエンハンサー活性を有する LTR（long terminal repeat）配列が両端に存在し、その間に構造タンパク質をコードする *gag* や感染の際に宿主細胞の受容体に結

合して膜融合を誘導する *env* 等が存在する。外来性レトロウイルスがヒト及びヒトの祖先種の生殖系列細胞へ感染した後、ウイルスゲノム RNA 自身がコードする逆転写酵素とインテグラーゼの作用によってゲノム RNA が DNA に変換され、核内に移行した後宿主ゲノムに挿入され得る（図 1 参照）。その挿入されたウイルスゲノム DNA（プロウイルス）が次世代に垂直伝播されることで内在化し、ヒトにおいて HERV と認識されるようになる。



一度挿入されたプロウイルスは転写を介して他部位に再度挿入すること（水平伝播）が理論上可能であり、そのようなシステムを介して宿主ゲノム内でコピー数を増幅させていったと考えられている。しかし、我々のヒトゲノムに現存している大半の HERV は数千万年の間に変異が蓄積してしまったために転写を介した水平伝播が起こらない不活性型となったと考えられており、1981年に初めて HERV がクローニングされて以来、ヒト個体内（体細胞）で HERV が水平伝播することは未だ示されていない。

一方、個人間の差（HERVの有無）として認識される HERV の挿入多型については、現在まで 11 箇所報告されてきたが、この数値は他のレトロトランスポゾン（L1, Alu）と比較して非常に低い。また、HERV 挿入多型と腫瘍性疾患に関連性があることを示した報告はこれまでにない。したがって、ヒトゲノム上における新規 HERV 挿入多型の同定及び HERV 挿入多型と腫瘍性疾患との関連を調査する研究が今後ゲノム腫瘍学の中で重要な意味を持つことが期待される。

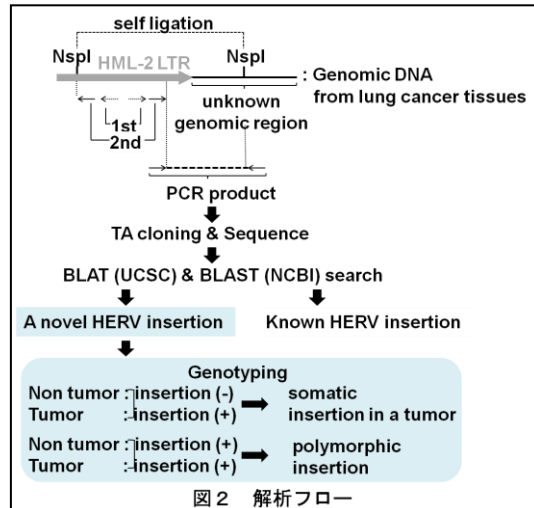
2. 研究の目的

研究全体の構想として、腫瘍性疾患のゲノム不安定性を検出する方法を確立し、予防と治療に役立つ解析手法の開発を目的とする。本研究課題における具体的な目的は、腫瘍組織と同一個体内の非腫瘍部を用いることで、レトロトランスポゾンである HERV の腫瘍組織特異的なヒトゲノム内での水平伝播もしくは新規挿入多型を検出する技術を確立し、その技術をもって新規 HERV 部位を実際に同定することにある。この本研究課題の目的を達成することで、新規 HERV 挿入部位の周辺領域に位置する遺伝子と腫瘍化との関わりについての研究に発展させることができ、予防と治療に役立つ知見が得られることが期待される。

3. 研究の方法

(1) 新規性の判定

LTR 及び LTR に隣接するゲノム領域を増幅させるため、inverse PCR 法を肺癌組織から抽出したゲノム DNA を用いて行った。inverse PCR にて用いたプライマーについては、ヒトゲノムに最も最近に挿入された HERV グループである HML-2 の LTR 内で高度に保存された領域をもとに作製した。増幅断片をクローニングした後、配列を解読してデータベース上に存在する既知の LTR 部位と照合し、その新規性を判定した（図 2 参照）。



(2) 体細胞挿入変異/多型の判定

新規のものであった場合、同一個体の非腫瘍部から抽出したゲノム DNA を用いてジェノタイピングを行い、水平伝播によるものなのか挿入多型によるものなのかを判定した。

(3) 変異/多型解析

- ① 水平伝播による挿入変異であった場合、HERV 全長のクローニング及び配列解読を実施し、どの部位の既存 HERV が活性化して水平伝播したのかを同定する。
- ② 挿入多型であった場合は腫瘍性疾患群と非腫瘍対照群とを用いたコホート研究を実施し、挿入多型の腫瘍性疾患に対する感受性の評価を行う。

4. 研究成果

(1) 挿入部位の同定

8 検体の肺癌組織から抽出したゲノム DNA を用いて inverse PCR 法を実施し、176 個のクローンを得た。その内、170 クローンは 29 箇所の既知 HERV 部位に由来するものであった。残り 6 クローンはデータベース上にない 3 箇所の HERV 部位に由来する新規のものであったが、3 箇所の内 1 箇所については増幅した LTR 隣接領域の長さが短く、ゲノムのどこに位置するのかを決定するのにはできなかった。一方、他の 2 箇所については 1p13.2 (accession number AB728590)

及び 19q12 (accession number AB728591) 領域に位置すると決定することができた (平成 23 年度、図 3 参照)。

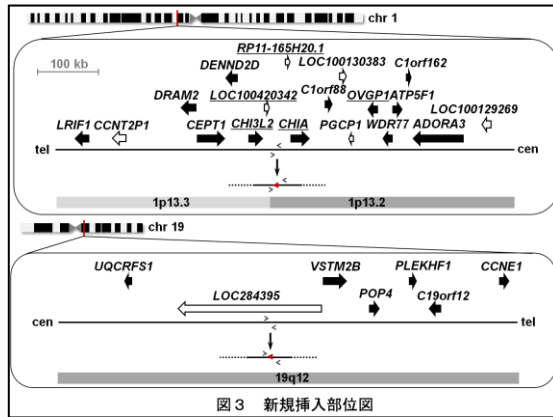


図 3 新規挿入部位図

これら 2 箇所の新規 LTR 挿入部位は、同一個体の非腫瘍部及び他個体にも検出されたことから挿入多型であるといえる (図 4 参照)。

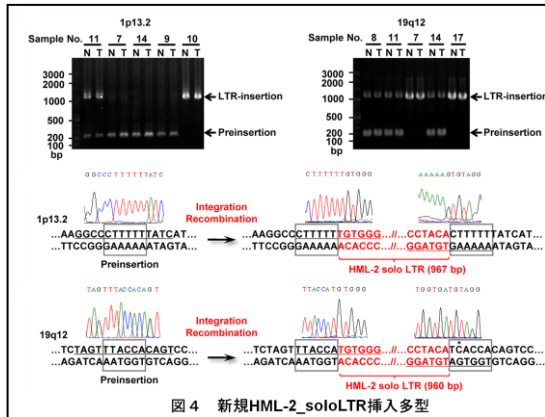


図 4 新規HML-2_soloLTR挿入多型

更に塩基配列の解釈により、これらの挿入配列は 2 箇所とも全長のプロウイルスではなく LTR 単体領域であることが判明した。以上の結果から、本研究にて同定された新規挿入部位は HML-2 の soloLTR の挿入多型であると結論づけ、1 番染色体及び 19 番染色体で同定された 2 箇所の HERV 部位を、HML-2_sLTR(1p13.2) と HML-2_sLTR(19q12)と各々命名した。このように inverse PCR 法により HML-2 の LTR に隣接する領域を増幅させてクローニングする手法は新規 HML-2 挿入箇所を同定するのに有効なものであることが示された。今後、高速 DNA シーケンサーの併用により更に多くの HERV 挿入箇所を同定することが可能であると考える。また今回は同定できなかったが、病変組織特異的な HERV の挿入変異といったこれまでに報告がないような変異を同定する手段としても大いに期待できる。

(2) 肺癌感受性に関する研究

同定した 2 箇所の新規 LTR 挿入多型について、両アレルに挿入がある場合 (LTR/LTR) とそれ以外の場合 (両アレルに挿入が無い場合: PRE/PRE) 及び片アレルにだけ挿入がある場合: PRE/LTR) の二つに分類し、60 歳以上の肺癌患者 (医療機関所在地: 静岡県西部) を対象とした症例対照研究を実施した (平成 24 年度)。その結果、対照群 (喫煙歴及び肺癌罹患歴共にない女性) と比較して喫煙歴のない女性肺腺癌患者に 1p13.2 領域の LTR/LTR 型が有意に多かった (オッズ比 1.97、95%信頼区間 1.02-3.81)。

表 1 肺扁平上皮がん及び肺腺癌を対象としたHML-2_sLTR(1p13.2)とHML-2_sLTR(19q12)における性別及び喫煙歴別のオッズ比 (OR)と95%信頼区間 (95%CI)

Sex	Smoking history	Genotype#	Squamous cell carcinoma		Adenocarcinoma		
			N*	OR (95% CI)†	N*	OR (95% CI)†	
Men	1p13.2	Never smoking	PP+PL	0/39	n.d.	5/39	n.d.
		LL	0/12	n.d.	0/12	n.d.	
	Smoking	PP+PL	51/264	1.00 (reference)	58/264	1.00 (reference)	
		LL	13/68	0.99 (0.51-1.92)	12/68	0.80 (0.41-1.58)	
	19q12	Never smoking	PP+PL	0/42	n.d.	5/42	n.d.
		LL	0/9	n.d.	0/9	n.d.	
Smoking	PP+PL	50/265	1.00 (reference)	49/265	1.00 (reference)		
	LL	14/67	1.11 (0.58-2.12)	21/67	1.70 (0.95-3.02)		
Women	1p13.2	Never smoking	PP+PL	0/149	n.d.	48/149	1.00 (reference)
		LL	1/30	n.d.	19/30	1.97 (1.02-3.81)	
	Smoking	PP+PL	2/23	n.d.	2/23	n.d.	
		LL	1/2	n.d.	1/2	n.d.	
	19q12	Never smoking	PP+PL	1/146	n.d.	55/146	1.00 (reference)
		LL	0/33	n.d.	12/33	0.97 (0.47-2.00)	
Smoking	PP+PL	2/23	n.d.	3/23	n.d.		
	LL	1/2	n.d.	0/2	n.d.		

#P, preinsertion; L, solo LTR.
*Number of cases/controls.
†OR, odds ratio; CI, confidence interval; age ≥ 60 years; the west area of Shizuoka Prefecture; n.d., not determined.

更に、喫煙歴のない女性肺腺癌患者についての追加症例対照研究 (医療機関所在地: 愛知県) でも有意差はなかったものの、60 歳以上については同様の傾向を示す結果が得られた (60 歳以上、オッズ比 2.03、95%信頼区間 0.96-4.29)。その一方で、この追加症例対照研究において 60 歳未満については全く反対、即ち喫煙歴のない女性肺腺癌患者に LTR/LTR 型が少ないという結果となった (オッズ比 0.31、95%信頼区間 0.11-0.94)。

表 2 肺腺癌を対象としたHML-2_sLTR(1p13.2)における性別及び喫煙歴別のオッズ比 (OR)と95%信頼区間 (95%CI)

Age	Genotype#	N*	OR (95% CI)†
Overall	PP+PL	103/204	reference
	LL	22/44	0.99 (0.56-1.74)
< 60	PP+PL	50/85	reference
	LL	4/23	0.31 (0.11-0.94)
≥ 60	PP+PL	53/119	reference
	LL	18/21	2.03 (0.96-4.29)

#P, preinsertion; L, solo LTR.
*Number of cases/controls.
†OR, odds ratio; CI, confidence interval; adjusted for age; female never smokers in Aichi Prefecture.

女性肺腺癌に対しては年齢層によって異なる感受性を示すという興味深い結果となった。腫瘍性疾患に対する感受性と HERV 挿入多型との間で関連性が示されたのは初めてであり、今後腫瘍性疾患の感受性研究分野において HERV 挿入多型が新たな研究対象となることが期待される。

LTR 領域はメチル化が起きることが知られており、近年その LTR 領域のメチル化が加齢によって変化するという報告もなされ

ている。そのため、今後 LTR 領域に起こるエピジェネティックな作用に着目して肺腺癌に対する感受性と 1p13.2 領域の LTR/LTR 型との関連性を探索していく必要があると考える。

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)

[学会発表] (計 4 件)

①発表代表者：Tomoaki Kahyo *et al.*

発表演題：Identification and analysis of novel polymorphic insertions of human endogenous retroviruses in lung cancers

学会等名：第 34 回日本分子生物学会年会

発表年月日：2011 年 12 月 14 日

発表場所：横浜

②発表代表者：Tomoaki Kahyo *et al.*

発表演題：肺がんおよび大腸がん患者における新規 HERV 挿入多型の解析

学会等名：平成 24 年度がん若手研究者ワークショップ

発表年月日：2012 年 9 月 5 日

発表場所：茅野

③発表代表者：Tomoaki Kahyo *et al.*

発表演題：肺がんおよび大腸がん患者における新規 HERV 挿入多型の同定と解析

学会等名：第 71 回日本癌学会学術総会

発表年月日：2012 年 09 月 21 日

発表場所：札幌

④発表代表者：Tomoaki Kahyo *et al.*

発表演題：Analysis of novel insertion polymorphisms of human endogenous retrovirus in lung cancer patients

学会等名：American Association for Cancer Research Annual Meeting 2013

発表年月日：2013 年 4 月 6 日

発表場所：Washington D.C. (米国)

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