

平成30年5月31日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04304

研究課題名(和文) G-NaVI法によるHBV全組込とエピゲノム変化の時空間的解明による肝発癌の制御

研究課題名(英文) Suppression of hepatocarcinogenesis based on the elucidation of HBV integration and epigenome alterations analyzed by G-NaVI

研究代表者

伊東 文生 (Itoh, Fumio)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：90223180

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：DNAウイルスのヒトゲノムへの組み込みは、B型肝炎ウイルス(HBV)関連肝細胞癌を含め、さまざまな腫瘍において重要な役割を担っている。肝細胞癌におけるB型肝炎ウイルスDNA組み込みの役割を明確にするために、HBV組み込みとヒトおよびHBVのエピゲノム異常の分子機構や臨床的意義を明らかにした。さらに1分子リアルタイムシーケンスに基づくHBV組み込み体の解析法の開発に成功した。肝細胞癌のジェネティック、エピジェネティックな異常および動的なDNAメチル化変化が、機能的にHBV関連肝細胞癌の生物学的動態に影響することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Integration of DNA viruses into the human genome plays an important role in various types of tumors, including hepatitis B virus (HBV)-related hepatocellular carcinoma. To gain clearer insights into the roles of HBV DNA integration in HCC, we have characterized the molecular details and clinical impact of HBV integration on the epigenomes of human cells and HBV. We have also successfully developed a single-molecule, real-time sequencing-based method for structural analysis of integrated HBV genomes. The observed dynamic changes in DNA methylation of the host and viral genomes as well as genetic and epigenetic alterations in HCC may functionally affect the biological behavior of HBV-related HCC.

研究分野：消化器内科学

キーワード：エピゲノム HBV 肝癌 DNA組み込み DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス(HBV)関連肝細胞癌は現在も減少しておらずその発生機序の解明は重要な課題である。HCVとは異なり、HBVはウイルスの肝細胞からの排除が難しいためと推測される。我が国では100-130万人、世界の約4億人がHBVに持続感染していると推定されている。HBV感染症の場合には、仮に肝硬変が存在しなくても無症候性HBVキャリアからでも肝発癌が起こり得ることが報告されており、慢性炎症だけでは説明がつかない。

2. 研究の目的

HBV関連肝細胞癌の発生進展機序の解明は重要な課題である。HBV感染にかかわる主要な発癌機序のひとつにHBV DNAのヒトゲノムへの組み込みがある。今までのHBV DNA組み込み解析法では実現できなかった全組み込み解析を可能とすべく、Genome capture法併用次世代シーケンサーによるウイルスDNA全組み込み解析法(G-NaVI法)を考案した。HBV DNAのヒトゲノムへの全組み込みおよびHBV組み込みに伴うHBVおよび宿主ゲノムのエピジェネティックな変化を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) HBV DNAのヒトゲノムへの組み込みとHBVおよび宿主ゲノムのエピジェネティックな変化の分子病態解析

① HBV DNA組み込みとCpGアイランドおよびCpG密度との関連をDNAメチル化解析法であるパイロシーケンス法にて解析する。パイロシーケンス法は、Qiagen社製PyroMark Q24 Advanced機器を用いて行う。

② HBV DNA組み込み部位におけるクロマチン構造をBanderソフトウェアを用いて解析し、周辺のクロマチン構造との比較を行う。

③ メチル化HBVと非メチル化HBVで組み込み部位におけるクロマチン構造の差異をBanderソフトウェアを用いて解析する。

④ 非メチル化HBVと5-hydroxymethylationとの関連をTet-assisted Bisulfite法を用いて解析する。

⑤ HBVプロモーターを用いたレポーターアッセイにより、肝癌細胞株において転写との関連を解析する。

⑥ HBV DNA組み込み配列(長さ、繰り返し配列など)とメチル化の関連を解析する。繰り返し配列は、RepeatMaskerソフトを用いて

行う。

⑦ HBV DNA組み込みとDNAメチル化に関連して、ヒストンメチル化などをChIP assayを用いて解析する。また、ヒストン修飾をゲノムワイドに解析する。

(2) HBV DNAのヒトゲノムへの組み込みとHBVおよび宿主ゲノムのDNAメチル化同時解析

1 分子ロングリード次世代シーケンサーによるHBV DNA組み込みおよびDNAメチル化の同時解析法を開発し、さらに至適化する。

(3) HBV関連肝細胞癌のゲノム異常の解析
遺伝子変異解析(MassARRAYシステムやIon PGM シークエンサーを用いた多サンプルの多領域の同時スクリーニング)、DNAメチル化解析(MCA microarray等による網羅的解析、Bisulfite-pyrosequence)、エピゲノム異常の解析(高速次世代シーケンサーを用いたMCA シークエンス法等)、マイクロRNA異常の解析(TaqMan qPCRの他に、microarray、次世代シーケンサー、ChIP-seq等を用いた網羅的な解析)を行い、上記、HBV DNA組み込みに伴う変化との関連を明らかにする。

(4) 統合バイオインフォマティクス解析
上記の結果を、統合バイオインフォマティクス解析し、HBV肝発癌メカニズムの根幹を明らかにするとともに診断に最適な遺伝子の特定、創薬のターゲットとなるメチル化異常を同定する。

4. 研究成果

(1) HBV DNAのヒトゲノムへの組み込みとHBVおよび宿主ゲノムのエピジェネティックな変化の分子病態解析

① HBV DNA組み込みとCpGアイランドおよびCpG密度との関連を解析した。
HBV DNAがCpGアイランドメチル化の著しいヒトゲノム領域へ組み込まれた場合、HBV DNAもメチル化を受け不活化すると考えられた。一方、HBV DNAがCpGアイランドメチル化の乏しいヒトゲノム領域(プロモーター領域など)へ組み込まれた場合、HBV DNAはメチル化を受けにくいと考えられた。ヒトゲノム側のCpGアイランドのメチル化状態とは異なり、CpG密度は、HBV DNAメチル化状態と一定の関連を認めなかった。

② HBV DNA組み込み部位におけるクロマチン構造を解析し、周辺のクロマチン構造との比較を行ったところ、タイトなヘテロクロマチン構造に比べ、ユークロマチン構造に組み込みが起こりやすいという結果は得られなかった(Giemsa染色レベルから想定されるヘテロクロマチン 46% vs ユークロマチン

54%)。

③ メチル化 HBV と非メチル化 HBV で組み込み部位におけるクロマチン構造の差異を解析したが、HBV のメチル化の有無とクロマチン構造の有意な関連を認めなかった (Giemsa 染色レベル: メチル化 HBV 1.9 ± 1.0 vs 非メチル化 HBV 2.1 ± 0.8)。

④ 非メチル化 HBV と 5-hydroxymethylation との関連を、Tet-assisted Bisulfite 法を用いて、5-hydroxy メチル化シトシン (5-hmC) と 5-mC を区別することにより解析したが、一定の傾向を認めなかった。

⑤ HBV プロモーターを用いたレポーターアッセイにより、転写との関連を解析した。メチル化 HBV プロモーターでは、転写活性の低下 (メチル化 HBV プロモーター 3.9 ± 1.8 vs 非メチル化 HBV プロモーター 10.2 ± 2.3 , $P < 0.05$) を認めた。

⑥ HBV DNA 組み込み配列 (長さ、繰り返し配列など) とメチル化の関連では、HBV DNA 組み込み配列の長さや繰り返し配列の有無とメチル化の程度との一定の関連は認めなかった (組み込み配列の長さ: メチル化 HBV 423 ± 130 vs 非メチル化 HBV 381 ± 150)。

⑦ HBV DNA 組み込みと DNA メチル化に関連して、ヒストンメチル化などを ChIP assay を用いて解析した。ヒストンメチル化の動態は、さまざまであり、HBV DNA 組み込みと一定の関連は認めなかった。より網羅的なゲノムワイドなヒストン修飾解析においても同様の結果であった。

(2) HBV DNA のヒトゲノムへの組み込みと HBV および宿主ゲノムの DNA メチル化同時解析

1分子ロングリード次世代シーケンサーによる HBV DNA 組み込みおよび DNA メチル化の同時解析法の開発および至適化に成功した。得られたリード長、平均リードクオリティ、正確性において、十分な結果を得ることができた。従って、解析を進め、HBV DNA 組み込みおよび DNA メチル化動態の多様性を明らかにした。つまり、組み込まれた HBV DNA のサイズの多様性やヒト側の組み込み部位 (繰り返し配列など) の多様性を明らかにした。複数の検体において組み込みがみられる標的遺伝子候補も明らかにしたが、組み込みパターンはさまざまであった。

(3) HBV 関連肝細胞癌のゲノム異常の解析

HBV 関連肝細胞癌の統合的分子病態の解明として検体から DNA、mRNA、miRNA を抽出した。ジェネティックな変化として遺伝子変異解析、エピジェネティックな変化としてパイ

サルファイト処理 DNA を用いて腫瘍関連遺伝子の DNA メチル化解析、さらに、miRNA 発現解析を行った。遺伝子変異、DNA メチル化、miRNA 発現と HBV DNA 組み込みとの関連を解析した。

遺伝子変異では、TERT 遺伝子プロモーター (TERTp) 変異を半数の症例で検出した。TERTp 変異陽性例では、TERT 遺伝子プロモーター領域への HBV DNA 組み込みを認めなかった。つまり、TERT プロモーター領域への HBV DNA 組み込みによる TERT 発現増加があれば、新たに TERTp 変異は必要ないと考えられ、改めて、HBV DNA の組み込みの機能的意義が示唆された。HBV DNA の組み込みや TERTp 変異など活性化分子機構に違いを認めるものの、標的遺伝子としての TERT 遺伝子の重要性が示唆された。

HBV DNA の組み込みを認めた遺伝子つまり、UNC5D、SNX15、MVK、CLEC18A、CCDC57、EVA1A、AUTS2、BICC1、PAK3、DNAH8、COLGA8F、SLC6A13 遺伝子 (癌で検出)、AK026965、CALN1、FN1、KLF13 遺伝子 (非癌部で検出) に関して、同様に解析したところ、有意な変異を検出しなかった。

DNA メチル化では、Wnt など様々なシグナルに関連する遺伝子、RASSF1A、p16、SOCS1、RIZ1、KLHL35、SPDYA 遺伝子等のメチルを検出したが、HBV DNA 組み込みと関連する特定のメチル化変化は認めなかった。

miRNA 発現では、増殖、アポトーシス、細胞周期、転移等に関わるさまざまな miRNA 発現の変化を検出したが、HBV DNA 組み込みと関連する特定の miRNA 発現変化は認めなかった。

(4) 統合バイオインフォマティクス解析

HBV DNA のヒトゲノムへの組み込みと HBV および宿主ゲノムのエピジェネティックな変化と次世代統合オミクス解析の結果を統合解析した。

HBV ゲノムの組み込みによる発癌への影響として、ヒトゲノムの染色体不安定性の惹起、組み込み近傍の遺伝子発現制御、組み込み近傍の遺伝子と HBV の融合蛋白の産生の関連などを明らかにした。

HBV DNA 組み込みには、HBV DNA 側、ヒトゲノム側ともにバリエーションが多く、また、癌に蓄積している遺伝子変異、DNA メチル化、miRNA 異常もさまざまであった。従って、HBV DNA 組み込みに伴う、肝発癌リスク診断の指標となる遺伝子の同定には至らなかった。

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 2 件)

① 山本博幸, 渡邊嘉行, 及川律子, 末永大介, 辻 顕介, 重福隆太, 渡邊綱正, 伊東文生.

HBV 挿入ゲノムのメチル化と発癌. 肝胆膵, 査読無, 76, 2018, 873-879.

<http://arcmedium.co.jp/publication02-backno.php>

- ② Kato M, Hamada-Tsutsumi S, Okuse C, Sakai A, Matsumoto N, Sato M, Sato T, Arito M, Omoteyama K, Suematsu N, Okamoto K, Kato T, Itoh F, Sumazaki R, Tanaka Y, Yotsuyanagi H, Kato T, Kurokawa MS. Effects of vaccine-acquired polyclonal anti-HBs antibodies on the prevention of HBV infection of non-vaccine genotypes. J Gastroenterol, 査読有, 52, 2017, 1051-1063.
DOI: 10.1007/s00535-017-1316-3

[学会発表] (計 13 件)

- ① 渡邊嘉行 他. NGS 解析を応用した宿主側及び HBV 側要因からみた肝臓がん組み込み部位とメチル化異常の検討. 第 114 回日本内科学会総会・講演会, 2017.
- ② 渡邊嘉行 他. Epigenetic alteration at HBV integrants is associated with methylation at flanking human genome. The 107th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, 2017.
- ③ 渡邊嘉行 他. G-NAVI 法による宿主側及び HBV 側要因からみた組み込み部位とメチル化異常の検討. 第75回日本癌学会学術総会, 2016.
- ④ 山本博幸 他. A next-generation sequencing-based G-NAVI method revealed that DNA methylation in the integrated HBV genome is related to the methylation status of the integration sites within the human genome. DDW2016, 2016.
- ⑤ 山本博幸 他. 次世代シーケンサーによるB型肝炎ウイルスDNA全組み込み解析に基づく発癌機構解明. 第53回日本臨床分子医学会学術集会, 2016.
- ⑥ 山本博幸 他. がんゲノム解析の臨床応用と個別化・先制医療への展開. 第53回日本臨床分子医学会学術集会, 2016.
- ⑦ 山本博幸 他. B 型肝炎ウイルス全組み込みとエピゲノム変化の解析による肝発癌のリスク診断. 日本癌治療学会, 2015.
- ⑧ 渡邊嘉行 他. G-NAVI 法による宿主側及びウイルス側要因からみた HBV 肝発がんメカニズムの検討. 日本消化器病学会, 2015.
- ⑨ 山本博幸 他. B 型肝炎ウイルス組み込み

体の DNA メチル化と隣接するヒトゲノム配列のメチル化の相関. 日本癌学会, 2015.

- ⑩ 伊東文生 他. B型肝炎ウイルスDNA組み込みによる発癌とその解析法の開発. 日本電気泳動学会, 2015.
- ⑪ 伊東文生 他. 消化器癌のバイオマーカーと DDS. 日本 DDS 学会, 2015.
- ⑫ 山本博幸. B 型肝炎ウイルス全組み込みとエピゲノム変化の解析による肝発癌のリスク診断 ライフサイエンスワールド 2015・アカデミックフォーラム, 2015.
- ⑬ 伊東文生 他. DNA メチル化解析による消化器癌のテーラーメイド医療の新展開. 日本消化器病学会, 2015.

[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
<http://www.marianna-u.ac.jp/gastro/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊東 文生 (ITOH, Fumio)
聖マリアンナ医科大学・医学部・教授
研究者番号: 90223180

(2) 研究分担者

山本 博幸 (YAMAMOTO, Hiroyuki)
聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 40332910

渡邊 嘉行 (WATANABE, Yoshiyuki)
聖マリアンナ医科大学・医学部・講師
研究者番号: 90329243