

令和元年6月25日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10701

研究課題名(和文)次世代シーケンサーによるHPV準種解析：子宮頸部発癌との関連について

研究課題名(英文) Analysis of HPV genome variations using next generation sequencer: in association with cervical carcinogenesis

研究代表者

小貫 麻美子 (ONUKI, MAMIKO)

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：20573744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：子宮頸癌とその前癌病変の原因であるヒトパピローマウイルス(HPV)には遺伝子配列の異なるバリエーションや準種と呼ばれる突然変異を多数生じる。HPV52/58型は日本人の子宮頸癌および前癌病変で多くみられる型で、これらを次世代シーケンサーで全遺伝子を解析しバリエーションの分布が両型で大きく異なることがわかった。HPV16型は子宮頸癌患者から最も多く検出される型で、特定のバリエーションで子宮頸癌との関連が強いことがわかった。さらに今までわかっていなかった新たなバリエーションを発見できた。また、子宮頸癌や前癌病変患者から採取したHPVに多くみられた遺伝子の塩基配列の変異がアポベック3蛋白と関連がある可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

持続感染してゆくためにウイルス遺伝子は変異しバリエーションや準種が存在すると考えられている。本研究では日本人女性の子宮頸癌やその前癌病変で多くみられるHPV16, 52, 58型を対象に、そのバリエーションや準種を解析・分類した。ウイルス遺伝子の配列には様々な臓器で発がんに関連するアポベック蛋白とも関係するものが多く含まれていることがわかった。さらにHPV 16陽性に限定し病変別に比較すると子宮頸癌に多く含まれる特定のバリエーションが存在した。これらは今後感染したHPV遺伝子を調べることで子宮頸癌や前癌病変になる可能性が予測できたり、このバリエーションに対する予防・治療を考える材料になり得る。

研究成果の概要(英文)：There are concomitant genetic changes in the HPV genome during viral infection, so-called "variant" or "quasispecies". Among the HPV52/58-positive specimens from Japanese women with CIN/ICC, the variant distributions were strongly biased toward lineage B for HPV52 and lineage A for HPV58 across histological categories. Among women with HPV16 positive lesion, sublineage A4 are dominant in cervical cancer patients. The relative risk of sublineage A4 for cervical cancer development was significantly higher compared to sublineages A1/A2/A3. We also found new sublineage, A5. Among the within-host variations, C-to-T transitions, a characteristic change mediated by cellular APOBEC cytosine deaminases, were predominantly detected throughout the whole viral genome, most strikingly in low-grade CIN lesions.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：ヒトパピローマウイルス 子宮頸癌 子宮頸部上皮内病変 全ゲノム解析

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

1. 研究開始当初の背景

ヒトパピローマウイルス (human papillomavirus, HPV) は子宮頸癌およびその前癌病変 (子宮頸部上皮内腫瘍: cervical intraepithelial neoplasia, CIN) の原因となる DNA ウイルスである。インフルエンザウイルスなどの RNA ウイルスでは感染した個体のなかでウイルスゲノムの複製エラーのために遺伝的に少しずつ異なる「ウイルス準種」と呼ばれる突然変異株を多数生じることが知られているが、最近我々のグループでは次世代シーケンサーによる網羅的配列解読系を用いることによって DNA ウイルスである HPV の感染においても低頻度 (0.5-5%) ながらウイルス準種が存在することを明らかにした。しかしながら、HPV 感染におけるウイルス準種の存在がその後の子宮頸部発癌にどのように関与しているかについてはまだ解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、我が国の子宮頸癌患者において高頻度に検出される HPV16、HPV18、HPV31、HPV52 および HPV58 を研究対象とし、各タイプのウイルス準種が子宮頸部発癌にどのように関与しているかを明確にすることを目的とした。

(1) 次世代シーケンサーによる網羅的塩基配列解読システムを用いることにより、実際に子宮頸癌関連 HPV のヒトでの感染において全ウイルスゲノム配列のどの部分がどのように変化し多様性 (ゲノム準種) を生じるのか、またその存在がどのように病態の進展に関連するかを検討する。

(2) 子宮頸癌で最も多く検出される HPV16 陽性検体を対象に次世代シーケンサーによる網羅的塩基配列解読システムを用いて、CIN および子宮頸癌検体を用いた横断的研究を行い、病態の進展において準種の多様性が増加または減少するかを比較検討する。

3. 研究の方法

PV ゲノム準種と病態進展との関連を明らかにするために、前癌病変 (CIN) 検体に含まれる HPV16 の全長ゲノム DNA を Long-PCR 法で増幅し、次世代シーケンサー (イルミナ、MiSeq) を用いて網羅的な配列解読を行った。解析材料として、様々なグレードの CIN 検体 (横断的解析) を用いた。得られた配列データから、HPV ゲノム部位ごとの変異を抽出して、臨床検体に含まれる準種のプロファイルを作成し、CIN のグレードで比較解析する。また子宮頸癌検体で HPV16 ゲノム配列の網羅的解読を行い、CIN での準種が反映されているか解析する。さらに HPV18、HPV52、HPV58 についても同様の準種解析を行い、型特異的な病態や癌化への進展リスクを説明できるか検討した。

4. 研究成果

(1) HPV52/58 の全ゲノム配列解析: 日本人女性の子宮頸癌及び CIN 病変に検出される HPV52/58 の全ゲノム配列を決定し、その配列多様性を解析した。臨床検体から抽出した DNA から PCR にて HPV52/58 の全ゲノム領域を増幅し、Nextera XT kit を用いてライブラリー化して、次世代シーケンサーによる配列解読を行った。その結果、HPV52/58 のバリエーション分布は、HPV52 で lineage B (50/52 検体)、HPV58 で lineage A (47/48 検体) に著しく偏っていた。また HPV52/58 間で異なるウイルス遺伝子産物内にアミノ酸残基の多様性が観察された。

(2) 次世代シーケンサーを用いた HPV ゲノムの多様性解析

患者体内での HPV ゲノム配列の多様性を次世代シーケンサーで解析することを目的に臨床検体(から DNA を抽出、HPV ジェノタイピングの後、HPV16/52/58 陽性の検体から long PCR にて全長 HPV ゲノムを増幅した。得られた PCR 産物を Nextera XT kit を用いてライブラリー化し、次世代シーケンサーによる配列解析を行った。その結果、151 検体 (CIN1, $n = 56$; CIN2/3, $n = 68$; 子宮頸癌, $n = 27$) 中 1052 か所で 0.5%以上の頻度で多様性を示すゲノム配列部位が多数見出された。その大部分が C to T または C to A 置換変異であったことから APOBEC3 蛋白質の関与が示唆された。C to T 置換変異は CIN 1 に最も多くみられたが、CIN が進行するにすれその頻度は減少し、子宮頸癌では C to A 置換変異の頻度が上昇した。

(3) HPV16型のバリエーション分布および新規バリエーションの同定：HPV16型のバリエーション分布を細胞診正常者、CIN1, CIN2/3, 子宮頸癌患者でそれぞれ比較検討した。

lineage A が大部分を占め、特に A4 バリエーションが子宮頸癌への関連が有意に高いことを示した。また本研究で lineage A の中で独立したクラスターを作り E7、E2、L2 蛋白質に特徴的なアミノ酸置換を有するバリエーションを新たに A5 バリエーションとして同定した。

(4) HPV16型陽性子宮頸癌患者の型別・進行期別の予後：HPV16陽性進行子宮頸癌患者で予後が良好であった。この特徴は III 期、IV 期で顕著にみられたことから、放射線・抗癌剤の感受性の違いが原因として考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Hirose Yusuke, Onuki Mamiko, Kukimoto Iwao, Whole-Genome Analysis of Human Papillomavirus Type 16 Prevalent in Japanese Women with or without Cervical Lesions, *Viruses*, Vol.11, 査読有, 2019, pp. 350, DOI: 10.3390/v11040350

Onuki Mamiko, Human papillomavirus genotype and prognosis of cervical cancer: Favorable survival of patients with HPV16-positive tumors, *Papillomavirus Research*, 査読有, Vol. 6, 2018, pp.41-45, DOI: 10.1016/j.pvr.2018.10.005

Hirose Yusuke, Onuki Mamiko, Kukimoto Iwao, Within-Host Variations of Human Papillomavirus Reveal APOBEC-Signature Mutagenesis in the Viral Genome, *Journal of Virology*, 査読有, Vol. 92, No. 12, 2018, JVI.00017~18, DOI:10.1128/JVI.00017-18

小貫麻美子他、子宮頸がん HPV ゲノム変異、*臨床婦人科産科*、査読無、Vol. 72, No.3, 2018, pp387-393,

Tenjimabayashi Yuri, Onuki Mamiko, Kukimoto Iwao, Whole-genome analysis of human papillomavirus genotypes 52 and 58 isolated from Japanese women with cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer, *Infectious Agents and Cancer*, 査読有, Vol.12, 2017, DOI: 10.1186/s13027-017-0155-4

Onuki M, Posttreatment human papillomavirus testing for residual or recurrent high-grade cervical intra-epithelial neoplasia: a pooled analysis, *Journal of Gynecologic Oncology*, 査読有, Vol.27, 2016, e3, DOI: 10.3802/jgo.2016.27.e3

〔学会発表〕(計 9件)

天神林友梨、小貫麻美子、柊元巖、Analysis of biological differences of human papillomavirus 58 E7 variants、第77回日本癌学会学術総会、2018

廣瀬佑輔、小貫麻美子、柊元巖、APOBEC signature mutagenesis in the genome of human papillomavirus and its relevance to cervical carcinogenesis、第77回日本癌学会学術総会、2018

Y.Hirose, M. Onuki, I. Kukimoto, APOBEC signature mutagenesis in HPV16/52/58 genomes and its relevance to cervical carcinogenesis, 32ND international papillomavirus conference, 2018

Y. Tejimbayashi, M. Onuki, I. Kukimoto, Whole-genome analysis of HPV52/58 isolated from Japanese women with cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer, 32ND international papillomavirus conference, 2018

Mamiko Onuki, Human papillomavirus genotype and prognosis of cervical cancer: favorable survival of patients with HPV16-positive tumors, 32ND international papillomavirus conference, 2018

Onuki M, Post-treatment human papillomavirus testing for residual or recurrent high-grade cervical neoplasia: a pooled analysis, 第70回日本産科婦人科学会学術講演会、2018

天神林 友梨、小貫 麻美子、柊元 巖、日本人女性から検出される HPV52/58 の全ゲノム解析、第76回日本癌学会、2017

廣瀬 佑輔、小貫 麻美子、柊元 巖、次世代シーケンサーによるヒトパピローマウイルスゲノムの患者内多様性の解析、第76回日本癌学会、2017

Mamiko Onuki, HPV16 positivity is a possible prognostic factor for favorable survival in advanced cervical cancer. The 16th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society (IGCS 2016), 2016

〔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:

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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：柗元 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

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

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。