

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670375

研究課題名(和文) シークエンス解析による新規の肝炎・肝癌関連微生物の探索

研究課題名(英文) Pathogen detection in liver cancer by sequencing analysis

研究代表者

中川 英刀 (Nakagawa, Hidewaki)

独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：50361621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：240例の肝臓がんおよび肝炎組織のRNAシークエンス解析を行った。ヒトゲノム参照配列やヒトのRNA配列にアライメントされない配列についてde novo assemblingを行った。200塩基以上形成させた8300個のcontigに対して、NCBI Nucleotide Collectionのデータベースにあてはめ、Pseudomonasなどの細菌やHBV、HCVなどのウイルス由来のゲノム配列を複数同定し、PCRにて確認を行った。

研究成果の概要(英文)：We performed RNA-Seq analysis of 240 liver cancers. After excluding sequences aligned to the human reference genome and human transcriptome sequences, the unaligned sequences were de novo assembled by Abyss. By referring 200bp~ contigs to NCBI Nucleotide Collection, we identified some bacteria and virus sequences in liver cancer and hepatitis tissues. Pseudomonas, Lactobacillus, Flavobacterium, Acinetobacter, and Staphylococcus epidermidis were identified and we validated the presence of Pseudomonas by PCR. Furthermore, HBV, HCV, and AAV sequences were also identified.

研究分野：がんゲノム

キーワード：ゲノム 肝がん 病原体

1. 研究開始当初の背景

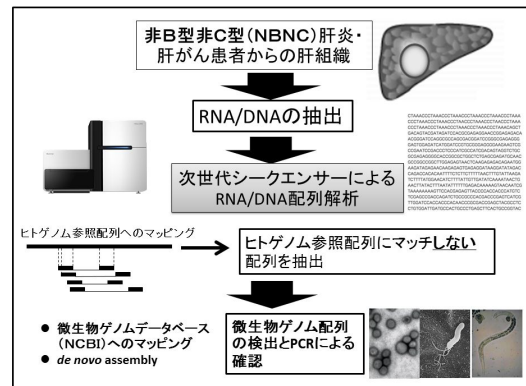
肝炎ウイルス感染からの肝臓がん、パピローマウイルス感染からの子宮頸がん、ピロリ菌感染からの胃がんなど、ウイルスや細菌などの微生物の感染は、世界的にみてがん発生の主要な原因であり、上咽頭がんや前立腺がんなど、他の様々なヒトの腫瘍についても、最近、未知や既知の微生物感染との関連の可能性が推測されている。B型肝炎ウイルス(HBV)およびC型肝炎ウイルス(HCV)の感染は、慢性肝炎から肝硬変、そして肝臓がんの発生の主要な原因であり、極めて重大な世界的健康リスクである。DNAウイルスであるHBVは、TERT遺伝子などへのヒトゲノムへの組み込みによって、その発がんの初期過程を形成することが、我々の肝臓がんの全ゲノムシーケンス解析によって明らかになった(Fujimoto A, Nakagawa H, et al. *Nature Genetics* 44: 760-4, 2012)。一方、HCVは、1989年にそれまで非A非B型肝炎と呼ばれていた患者さんから発見され、今日、日本の肝臓がん患者の約70%はHCV感染が観察される。HCVはRNAウイルスであって宿主ゲノムへの組み込みは報告されていないが、HCV自体の細胞増殖促進作用や慢性炎症がその主な発がん機序と考えられている。他の肝臓がんの原因としてアルコール摂取やアフラトキシン暴露があるが、日本においては頻度が低い。しかしながら、最近、HBV肝炎でもHCV肝炎でもアルコール関連でもないと考えられる肝炎から肝臓がんの発生が、日本で急激に増加しつつある。その多くは、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)というメタボリックシンドロームや糖尿病などの代謝性肝障害からの発がんであると考えられ、酸化ストレスやインシュリンなどのホルモンの作用などが主要な発生機序と考えられているが、詳細な機序は未だ不明である。そして、未知の微生物の感染による肝炎および発がんの可能性を完全に否定できるものではない。

今日、次世代シーケンサーを大量に保有する世界のゲノムセンターにおいては、腫瘍をはじめとする様々な原因不明の疾患組織のDNA/RNAシーケンス解析によって、その疾患組織中に存在する微生物を検出する研究プログラムが大規模に遂行されており、また、腸内細菌叢と疾患との関連を次世代シーケンサーで解析するメタゲノム解析も広く行われるようになり、微生物感染と様々な疾患との新たな関連が明らかになるものと期待されている。

2. 研究の目的

本研究では、次世代シーケンサーとDNA配列情報解析技術を駆使して、肝臓がんおよび非がん部の肝炎組織から抽出したRNAまたはDNAに対してシーケンス解析を行い、肝炎または肝がんの発生に関連する新規の微生物(ウイルス、細菌、寄生虫)の探索を行って、

肝臓がんや肝炎の原因の一端の解明を行うことを目的とする。



3. 研究の方法

これまで250例以上の肝臓がんの外科切除凍結サンプルを収集し、それらから高品質のDNAおよびRNAを抽出して、次世代シーケンサーを用いてゲノム解析を行ってきた(<http://www.icgc.org/>)。収集した肝臓がん臨床サンプルの中の約10%の症例は、血清学的検査にてHBVとHCVの持続感染を示唆する所見が無い症例(HBsAg陰性、抗HCV抗体陰性、Hbc抗体高力価陽性者は除く)であり、病理学的には慢性炎症や肝組織の線維化が観察されており、非B型非C型肝炎(NBNC)からの肝臓がんとして定義される。本研究は、このようなHBVとHCVの持続感染は陰性だが、肝障害・肝炎の所見のある患者さんから採取した(NBNC)肝臓がん特に注目しRNAシーケンス解析をおこなった。RNAシーケンスデータを、東大医科研のスーパーコンピュータを用いて、ヒトの転写配列カタログ(UCSC)に対してアライメントを行い、ヒトの転写RNA発現プロファイルを作成した。ヒトの転写配列カタログにアライメントされなかった配列について、BLASTアルゴリズムを用いてヒトゲノム参照配列(hg19)へのアライメントを行い、プライミング、融合遺伝子、新規のヒト転写産物の同定と定量化を行って、がんと非癌部の発現を比較する。これらのアルゴリズムにてヒトゲノムとの相関性がみつからず、またシーケンス配列の質がQ30以上の高品質の配列について、AbySSのアルゴリズムを用いて、*de novo assembly*解析を行った。200塩基以上の長さが得られたcontigを、NCBIゲノムデータベース中の4,000種以上のウイルスと3,000種以上の細菌の参照ゲノム配列に対してアライメントを行い、細菌やウイルスの同定を試みた。

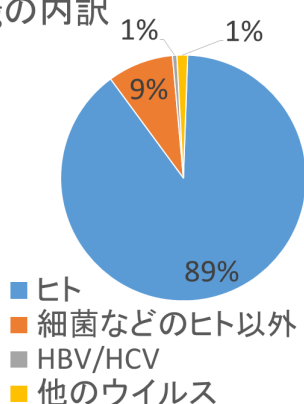
また、NBNC肝臓がんから抽出したDNAを用いて、全ゲノムシーケンス解析を行い、HBVのゲノム配列および新規の微生物のDNAゲノム配列の探索を行った。NBNC肝臓がんの中の10-20%には、いわゆる“Occult”B型肝炎が含まれていると考えられる。血清中にHBV

ゲノムが検出されなくとも、HBV 感染が発がんの直接の原因であり、HBV ゲノムが腫瘍細胞のゲノム内に挿入されていれば、肝がん細胞のクロ ナルな増殖に伴い比較的多くのコピー数が存在すると考えられる。その場合、ヒトゲノムへの挿入部位の breakpoint も配列も含めて、HBV ゲノムも検出されることが予測される。

4 . 研究成果

240 例の肝臓がんおよび肝炎組織の RNA シークエンス解析を行い、ヒトゲノム参照配列やヒトの RNA 配列にアライメントされない配列について de novo assembling を行った。200 塩基以上の長さの contig が 8300 個形成された。これらに対して、NCBI Nucleotide Collection のデータベースにあてはめ、細菌とウイルスのゲノム配列の検出を行った。その結果、89%の 7400 個はヒトゲノムにアライメントされ、9%の 724 個はヒト以外の生物のゲノムにアライメントされた。そのうち *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Flavobacterium*, *Acinetobactor*, *Staphylococcus epidermidis* といった細菌のゲノムが検出された。これらの細菌ゲノムのうち *Pseudomonas* については、元の DNA において PCR およびシークエンス解析にて、その存在を確認できた。*Pseudomonas* は、消化器外科の術後感染の主な原因となる細菌であり、肝臓内に存在しているものと考えられる。また、ウイルスに関しては、HBV、HCV のゲノム contig は 49 個が検出され (1%)された。NBNC 肝がんのうち、約 10%の症例で HBV のゲノム配列および HBV ゲノムの挿入が確認され、Occult B 型肝炎からの肝がんの発生と考えられた。他のウイルスにはアライメントされた contig は 117 個であった。その中で AAV ウイルス由来のゲノム配列を 2 例について検出し、PCR にてその存在を確認することができた。コンタミネーションの可能性もあり、この意義については不明である

contigの内訳



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Nakagawa H, Wardell CP, Furuta M, Taniguchi H, and Fujimoto A. Cancer whole genome sequencing: present and future. *Oncogene* (2015) in press. doi: 10.1038/onc.2015.90 (査読有)
Fujimoto A, Furuta M, Shiraishi Y, Gotoh K, Kawakami Y, Arihiro K, Nakamura T, Ueno M, Ariizumi S, Nguyen HH, Shigemizu D, Abe T, Boroevich KA, Nakano K, Sasaki A, Kitada R, Maejima K, Yamamoto Y, Tanaka H, Shibuya T, Shibata T, Ojima H, Shimada K, Hayami S, Shigekawa Y, Aikata H, Ohdan H, Marubashi S, Yamada T, Kubo K, Hirano S, Ishikawa O, Yamamoto M, Yamaue H, Chayama K, Miyano S, Tsunoda T and Nakagawa H. Whole-genome mutational landscape of liver cancers displaying biliary phenotype reveals hepatitis impact and molecular diversity. *Nat Commun* 6: 6120, 2015.

doi: 10.1038/ncomms7120 (査読有)
Shiraishi S, Fujimoto A, Furuta M, Tanaka T, Chiba K, Boroevich KA, Abe T, Kawakami Y, Ueno M, Gotoh K, Ariizumi S, Shibuya T, Nakano K, Sasaki A, Maejima K, Kitada R, Hayami S, Shigekawa Y, Marubashi S, Yamada T, Ishikawa O, Aikata H, Arihiro K, Ohdan H, Yamamoto M, Yamaue H, Kubo M, Chayama K, Tsunoda T, Miyano S, and Nakagawa H. Integrated analysis of whole genome and transcriptome sequencing reveals diverse transcriptomic aberrations driven by somatic genomic changes in liver cancers. *PLoS ONE* 9: e114263, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0114263 (査読有)

〔学会発表〕(計 4 件)

Hidewaki Nakagawa, Decoding liver cancer genome by whole genome sequencing, 14th Japanese-German Cancer Workshop, November 14, 2014, Berlin, Germany

Hidewaki Nakagawa, Whole genome pictures of live cancers and personalized medicine, American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting 2014, Major Symposium, April 8, 2014, San Diego, USA

中川英刀 第 5 0 回日本肝癌研究会、基調講演 2014 年 6 月 5 日 京都国際会

議場

中川英刀 Whole genome sequencing analysis of liver cancer and its interpretation. 第72回日本癌学会総会 シンポジウム 2013年10月5日 パシフィコ横浜

〔図書〕(計2件)

中川英刀 肝臓がんゲノムのシーケンス解析による解読 個別化医療を拓くがんゲノム研究 肝臓がんゲノムのシーケンス解析による解読 実験医学 2014 p33-p38

中川英刀 ゲノムからみた肝臓 - 最新情報 肝疾患 2014-2015 Review 日本メディカルセンター 2014 p163-169

〔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：
出願年月日：
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

中川英刀 (NAKAGAWA Hidewaki)
独立行政法人理化学研究所・統合生命医
科学研究センター・チームリーダー
研究者番号：50361621

(2) 連携研究者

白石友一 (SHIRAIISHI Yuichi)
東京大学・医科学研究所・助教
研究者番号：70516880

(3) 連携研究者

藤本明洋 (FUJIMOTO Akihiro)
独立行政法人理化学研究所・統合生命医

科学研究センター・副チームリーダー
研究者番号：30525853

(4) 連携研究者

古田繭子 (FURUTA Mayuko)
独立行政法人理化学研究所・統合生命医
科学研究センター・特別研究員
研究者番号：00647183