

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870298

研究課題名(和文) 腫瘍組織におけるゲノム不安定性に寄与する可動因子の同定

研究課題名(英文) Identification of retrotransposons involved with genomic instability in tumors

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：可動因子であるヒト内在性レトロウイルス(HERV)の挙動を調べることで腫瘍組織のゲノム不安定性を議論することは、その反復配列としての性質上技術的に困難であった。本研究では、HERVに隣接する領域を inverse PCR法で増幅させて高速DNAシーケンサーで解読することで、効率的にHERV部位を同定する手法を開発した。HML2グループのLTR領域を標的とした解析では、既知LTR領域の約50%を再現性高く同定することができた。また、腫瘍ゲノムにおいて新規LTR部位と推定される部位も複数同定することに成功し、これまで報告のなかった活性型HERVの存在と機能を解明する重要な手がかりを得ることができた。

研究成果の概要(英文)：None has linked the retrotransposition of human endogenous retrovirus elements (HERVs) and genomic instability in tumors due to the technical difficulty to analyze repetitive sequences. In this study, we have developed the technology using the inverse PCR and high throughput sequencing methods, in which the flanking regions of HERVs were amplified and sequenced. In the analysis targeting HML-2, a group of HERV, approximately 50% of HML-2_LTR sites were reproducibly detected. Furthermore, multiple candidates of novel HML-2_LTR sites were also identified in tumor genomes. This result will help to reveal presence and functions of HML-2 retrotranspositions tumor genomes.

研究分野：がんゲノム

キーワード：がん ゲノム 遺伝性疾患 内在性レトロウイルス 高速DNAシーケンス レトロトランスポゾン 変異

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 8.3% を占める。また、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 の基本構造は、プロモータ活性を有する LTR (long terminal repeat) 配列が両端に存在し、その間に *gag* や *env* 等が位置する構造をとる。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に感染した後、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 に変換されて宿主ゲノムに挿入されることでプロウイルスとなる。さらに、そのプロウイルスが次世代に垂直伝播されてヒトゲノムに内在化したものが HERV と考えられている。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だと考えられており、他の生物種の内在性レトロウイルスでは実際に水平伝播を起こす活性型の報告があるものの、1981 年に初めて HERV がクローニングされて以来、ヒト個体内で HERV が水平伝播することは未だ示されていない。

近年、腫瘍ゲノムに起こる変異や染色体不安定性が明らかになりつつある。このようなゲノム不安定性は再発や転移、薬剤耐性化といった腫瘍の悪性化に繋がる要因だと考えられている。そこで HERV の中にはまだ水平伝播能力を有しているものが存在し、そのランダムな水平伝播能力による他部位、とりわけ腫瘍関連遺伝子の周辺領域もしくは遺伝子領域内へ挿入変異を起こしている可能性

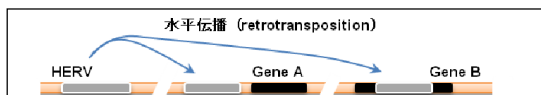


図 1: HERV の水平伝播がゲノムに与える影響
Gene A の周辺に HERV が挿入されることで Gene A の発現が変化する可能性がある。また Gene B 領域内に HERV が挿入されることにより Gene B は機能しなくなる可能性がある。

を検証するため (図 1) HERV 挿入部位の同定技術を開発してきた (平成 23~24 年度若手研究 B)。その開発過程で、これまで十数個程度しか報告されてこなかった挿入多型 (germline で起きた挿入であり個人間で挿入の有無の差が認められる) を HERV の挿入部位同定に最適化させた改良型 inverse PCR 法により新たに 2 つ同定した。しかし、これまでに報告がない HERV の水平伝播による体細胞挿入変異 (同一個体内の細胞間で挿入の

有無の差が認められる) については検出することはできなかった。その要因の一つとして、低頻度の体細胞挿入変異を検出する手段として従来のクローニング技術では限界があったことが挙げられ、その課題を克服する技術開発が望まれていた。

2. 研究の目的

本研究では、高速 (次世代) DNA シーケンサーと改良型 inverse PCR 法とを組み合わせることで、より多くの検体について低頻度な変異をカバーしつつ網羅的に HERV 挿入部位を調べることのできる技術を開発することを目的とする。この技術を活用すれば、これまで報告のなかった水平伝播能力を有する活性型 HERV の存在を検証することが可能となり、将来的には診断および腫瘍の悪性化の抑制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) サンプルの選択

本研究の目的である腫瘍組織における HERV 体細胞挿入変異の同定を可能にする技術開発を遂行するため、ケースサンプルとして主に肺腺癌、胃癌、大腸癌組織からゲノム DNA を抽出して用いた。尚、浜松医科大学ゲノム倫理審査委員会の承認の下収集された検体を用いている。

(2) Inverse PCR によるライブラリー調整

制限酵素によってゲノム DNA を断片化し、環状化形成のためにセルフライゲーションを行った。Inverse PCR の標的配列として、最近 (3,000 万年前~10 数万年前) になってヒトゲノムに挿入されたと推測される HML-2 グループの内、挿入多型を示すものに限定して末端領域である LTR 領域内で高度に保存された配列を選択した。PCR は特異性を上げるために nested PCR を行い、多検体を同時に処理する場合には、マルチプレックスシーケンスのためのインデックス配列をプライマーに付与した。効率的にシーケンスを行うために、適切な断片長 (約 200~1500bp) になるようサイズセレクションして精製したものをライブラリー調整サンプルとした。

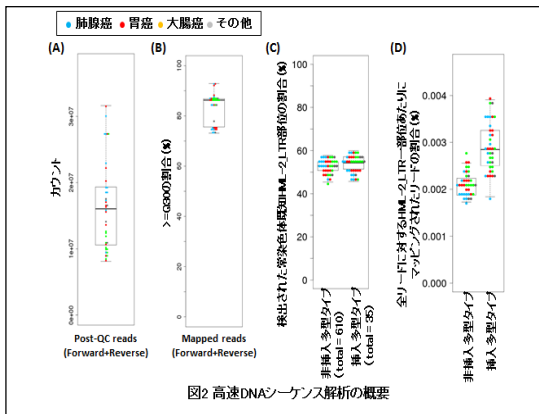
(3) シーケンシングおよび解析

高速 DNA シーケンサー (MiSeq/HiSeq) により解読し、fastq データを取得した。取得リードのクオリティコントロールを行った後、inverse PCR による増幅条件を満たすリードだけを選択して、HML-2_LTR に隣接する配列だけになるよう LTR 配列はトリミングして除いた。その後、single-end もしくは pair-end マッピングを行い、マッピングされた配列が既知 HML-2_LTR に隣接するものとそうでないものとに振り分け、既知 HML-2_LTR に隣接しないものは独自に設定したフィルターに通して新規 LTR 部位の候補とした。新規 LTR 部位候補については、腫瘍組織ゲノム DNA および同一個体の非腫瘍部組織から抽出

したゲノム DNA を用いて HML-2 全長を増幅することで germline に存在しているかどうかを判定し、同時にサンガー法にて全長配列を解読した。

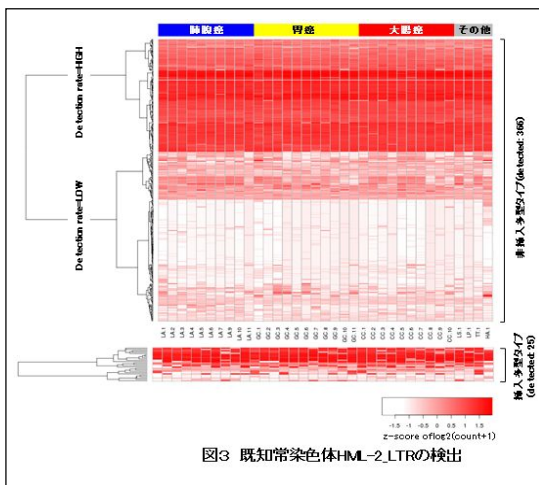
4. 研究成果

解析対象として、肺腺癌 10 症例、胃癌(組織型:管状腺癌および低分化腺癌) 11 症例、大腸癌(進行度:ステージ III および IV) 10 症例、肺扁平上皮癌 1 症例、リンパ腫(HTLV陽性) 1 症例、奇形種 1 症例、肝細胞腺腫 1 症例の計 35 症例を一部マルチプレックスに



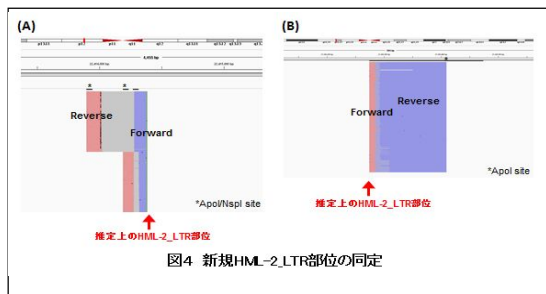
よるシーケンシングを行いつつ解析した。高速 DNA シーケンスによって得られたクオリティコントロール後リード数は 1 症例あたり約 800 万~3,000 万リードであり(図 2A)、一リードあたりの平均クオリティ値が一定値以上(>=Q30)のものが全リードに占める割合は約 73~93%であった(図 2B)。常染色体上にある 610 箇所の既知非挿入多型タイプの HML-2_LTR および 35 箇所の既知 H 挿入多型タイプの ML-2_LTR に関して、両タイプとも約半分にあたる 45%~60%の LTR 部位が検出された(図 2C)。検出された HML-2_LTR 一部位あたりのマッピングリード数は非挿入多型タイプよりも挿入多型タイプの方が全体的に高かった(図 2D)。これは挿入多型タイプの HML-2_LTR 内で高度に保存された配列を PCR の標的としていることに矛盾しない結果である。

図 3 に症例ごとに検出され各 HML-2_LTR へマッピングされたリード数について zスコア



値に変換したものをヒートマップで示す。ほとんどの非挿入多型タイプについては、マッピングリード数(=検出されやすさ)は症例間で同程度であったが、一部の HML-2_LTR については挿入多型タイプと同様症例間で大きなバラつきが見られた。これは非挿入多型タイプとみなされていた HML-2 部位が実際には挿入多型である可能性、もしくはこの HML-2 部位を含む広範囲な領域が copy number variation (CNV) である可能性を示唆するものであり、新しい知見である。

新規 HML-2_LTR 部位について解析を行った結果、複数の症例から複数の候補部位が得られた。図 4 にそのマッピング例を 2 つ示す。



これら推定上の LTR 隣接領域はヒトゲノム (hg19) 上でユニークな存在であり、トリミング前のリード上で見られる LTR との境目配列(30 塩基)についてはヒトゲノム上では確認されず、新規 LTR 部位である可能性が非常に高いと考えられた。実際、図 4A に関しては、腫瘍組織および同一個体の非腫瘍組織のゲノム DNA から HML-2_LTR 全長とその周辺領域を PCR にて増幅することに成功し、新規の HML-2 挿入多型であることがわかった。一方、図 4B の新規 HML-2_LTR 部位候補については、腫瘍部と非腫瘍部のゲノムを用いた PCR で HML-2 配列の増幅は確認されなかった。この原因については、1 万塩基対にもなるプロウイルス全長が低頻度で他部位に挿入された場合、通常の PCR による増幅は困難であることが推測されるため、今後全長増幅の手法を改善していく必要があるが、このような増幅困難なケースは多型ではなく低頻度の体細胞挿入変異の可能性が高いと考えられるため、今後も本研究を継続して推進していく意義が大いにあると考える。

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)

[雑誌論文](計 1 件)

(1) Kahyo T, Tao H, Shinmura K, Yamada H, Mori H, Funai K, Kurabe N, Suzuki M, Tanahashi M, Niwa H, Ogawa H, Tanioka F, Yin G, Morita M, Matsuo K, Kono S, Sugimura H. Identification and association study with lung cancer for novel insertion polymorphisms of human endogenous retrovirus. *Carcinogenesis*. 2013 34:2531-8. 査読有

〔学会発表〕(計 5件)

(1) Kahyo T. Analysis of novel insertion polymorphisms of human endogenous retrovirus in lung cancer patients. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2013. 2013年4月7日、Washington DC (USA)

(2) 華表友暁、「NGS初心者が挑む内在性レトロウイルス部位の同定」、NGS現場の会第三回研究会、2013年9月4日、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

(3) 華表友暁、「腫瘍性疾患における内在性レトロウイルス配列の同定と解析」、公開シンポジウム『ゲノムを支える非コードDNA領域の機能』、2014年1月9日、東京大学(東京都・文京区)

(4) 華表友暁、“Genome-wide investigation of insertional variations of human endogenous retrovirus”、第73回日本癌学会学術総会、2014年9月26日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

(5) 華表友暁、「高速DNAシーケンス技術を用いた腫瘍組織におけるヒト内在性レトロウイルス配列の同定」、第37回日本分子生物学会年会、2014年11月25日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

〔その他〕

報道関連情報

(1) 静岡新聞(2013年10月29日)に研究成果(論文1)関連記事掲載

6. 研究組織

(1) 研究代表者

華表 友暁 (KAHYO TOMOAKI)

浜松医科大学・腫瘍病理学講座・助教

研究者番号：40416665