

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：32713

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670389

研究課題名(和文) HPV組込とエピゲノムの次世代統合解析による食道癌の超早期診断・治療・予防一体化

研究課題名(英文) Integrated analysis of HPV integration and epigenome for early diagnosis, treatment and prevention of esophageal cancer

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000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、腫瘍において重要な役割を担う。食道扁平上皮癌におけるヒトパピローマウイルスの役割を明らかにするために、次世代シーケンサーに基づく組み込みウイルスゲノムのメチル化解析を行った。食道扁平上皮癌細胞株において、組み込まれたウイルスゲノムは、さまざまなDNAメチル化レベルを示した。動的なDNAメチル化変化が、機能的にウイルス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. However, the molecular details and clinical impact of HPV integration on either the human or human papilloma virus (HPV) epigenomes in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) are unknown. We used a next-generation sequencing-based method for structural methylation analysis of integrated viral genomes. We detected integrated HPV sequences in the genome of the ESCC cell line and found variable levels of methylation within the integrated HPV genomes. The observed dynamic changes in DNA methylation of the host and viral genomes may functionally affect the biological behavior of HPV.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：HPV 食道癌 ゲノム エピゲノム オミクス解析

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

食道扁平上皮癌に対する放射線化学療法 (Chemoradiation therapy: CRT) は、低侵襲かつ機能温存を可能とする治療法であるが、治療前に根治または治療効果が望める症例の予測は困難である。

放射線化学療法の効果予測が出来ないことは、食道扁平上皮癌における臨床的な問題点のひとつである。我々は食道扁平上皮癌の放射線化学療法の特徴である遺伝子二本鎖切断 Double Strand Break (DSB) に焦点をあてるとともに、臨床サンプルに適したメチル化異常を網羅的に解析する新たな手法: Hyper/Hypo Methylation Sensitive MCA-Micorarray (H/H-MCAM) 法を開発し、研究を進めてきた。

一方、食道扁平上皮癌の発生進展機序の解明も重要な研究課題である。我々は、ウイルス、細菌などの病原体のヒト癌への関わりを研究してきた。食道扁平上皮癌においては、ヒトパピローマウイルスの関与が示唆されているが、その機序は不明である。解明が進んでいる子宮頸癌などの解析では、ヒトパピローマウイルス感染にかかわる主要な発癌機序のひとつにヒトパピローマウイルスDNAのヒトゲノムへの組み込みがある。

これらに関連して、最近、我々は、今までのウイルス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、B型肝炎ウイルスでその有用性を明らかにした。

### 2. 研究の目的

食道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。本研究では、①ヒトパピローマウイルスのヒトゲノムへの全組み込みおよび、②ヒトパピローマウイルス組み込みに伴うヒトパピローマウイルスおよび宿主ゲノムのエピジェネティックな変化の全貌を明らかにし、まだら食道など背景因子も含めて、③ヒトパピローマウイルス関連食道癌の統合的分子病態の解明と臨床応用を目的とする。

本研究は食道扁平上皮癌の「診断・治療・予防」を大きく書き換えるものであり、臨床的にも意義が高い。

### 3. 研究の方法

(1) ヒトパピローマウイルス発現、viral load、physical status の解析

抗ヒトパピローマウイルス (16/18-E6 等) 抗体を用いた免疫染色、ヒトパピローマウイルス (16/18) DNA プローブ等を用いた In situ hybridization (ISH) を行う。リアルタイム PCR (ヒトパピローマウイルス-16、18、58 それぞれの E2 および E6/7) の結果より viral load (copies/cell)、E2 と E6/7 比から physical status (integration、mixed、episomal) を判定する。また、ヒトパピロー

マウイルス L1 遺伝子増幅用プライマー My09/11 あるいは GP5+/6+ を用いて PCR 解析する。さらに、ヒトパピローマウイルス型特異的プライマー例えば、ヒトパピローマウイルス 18 増幅用にヒトパピローマウイルス 18 E6 あるいはヒトパピローマウイルス 18 E6-E7 を用いて PCR 解析する。

(2) Amplification of papillomavirus oncogene transcripts (APOT) assay による HPV 組み込みの解析

APOT assay により、ヒトパピローマウイルス mRNA の検出ならびにそれが、episome 由来か組み込み由来かの鑑別を行う。

(3) ヒトパピローマウイルス組み込み部位の視覚化解析

ヒトパピローマウイルス感染食道扁平上皮癌細胞株を用い、ヒトパピローマウイルス配列に特異的なプローブの作成を行い、Two-color FISH法を用いて、組み込み部位の視覚化解析を行う。

(4) ヒトパピローマウイルス組み込み部位と LINE、Alu (Yb8) の DNA メチル化との関連の比較検討

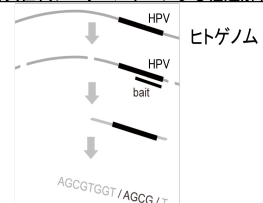
ヒトパピローマウイルス感染食道扁平上皮癌細胞株における LINE、Alu (Yb8) 領域の DNA メチル化解析を定量的メチル化解析法であるパイロシーケンス法にて行い「ヒトパピローマウイルス DNA 組み込み部位」との関係を比較検討する。

(5) ヒトパピローマウイルスの組み込み配列が存在するヒトゲノム断片のみの回収

ヒトパピローマウイルス感染食道扁平上皮癌細胞株の DNA をアコースティックソルビライザー Covaris を用いて裁断化し (図1-2)、カスタム作成した Genome capture 用のヒトパピローマウイルス bait primer を用いて、ハイブリダイズさせ、ヒトパピローマウイルスの組み込み配列が存在するヒトゲノム断片のみを回収する (図1-3, 4)。

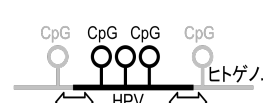
#### G-NaVI法 Genome capture法併用次世代シーケンサーによる組込解析

1. DNA抽出
2. DNA裁断化
3. HPV特異的ゲノムキャプチャー
4. HPV組み込みヒトDNAの回収
5. Baitsの除去
6. de novoシーケンス



#### HPV組み込みに伴うエピゲノム変化

1. 次世代パイロシーケンサー解析
2. アレル特異的DNAメチル化解析



(6) 次世代シーケンサーによるすべてのヒトパピローマウイルスの組み込み部位確認

得られたヒトパピローマウイルス組み込み配列の断片が含まれるヒトゲノムのみを de

novo配列解析が可能な次世代シーケンサーを用いて全配列を解析し、すべての組み込み部位を確認する(図1-6)。Genome captureにより、ヒトパピローマウイルス組み込み配列の含まれるDNA断端のみであるため、ゲノムシーケンス断片量は非常に少なく、十分量の解析depthを確保することが可能である。

(7)ヒトパピローマウイルス関連食道扁平上皮癌の遺伝子異常の次世代統合オミクス解析  
①遺伝子変異解析：MassARRAYシステムやIon PGMシーケンサーを用いて多サンプルの多領域を同時にスクリーニングする。

②DNAメチル化解析：MCAマイクロアレイ等による網羅的解析、バイサルファイト-パイロシーケンスを行う。

③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シーケンス法等を用いる。

④マイクロRNA異常の解析：TaqMan qPCR、マイクロアレイ、次世代シーケンサー、ChIP-on-chip等を用いて網羅的な解析も行う。

(8)組み込み部位におけるヒトパピローマウイルス遺伝子のメチル化レベルの解析

組み込み部位におけるヒトパピローマウイルス遺伝子のメチル化レベルをカスタム合成したprimerを用いて解析を行い、各サンプルごとの関連アルゴリズムを合成し、発癌にかかわる組み込み先を同定解析する。de novo配列を特殊プログラムを用いて決定する。

(9)組み込み部位のシーケンスの検証試験

得られた組み込み部位情報を用い、組み込み部位の検証試験をダイレクトシーケンス法にて行う。

(10)組み込まれた遺伝子の発現への影響および組み込みにより影響する融合蛋白の解析

組み込まれた部位が転写領域である場合には、組み込まれた遺伝子の発現への影響をreal-time PCRおよびWestern Blottingにて解析するとともに、組み込みにより影響する融合蛋白に関する解析を行う。

(11)各組み込み部位におけるヒトパピローマウイルス及びヒトゲノム側のメチル化レベル解析

各組み込み部位におけるエピジェネティックな不活化制御機構(とくにDNAメチル化)を確認する目的から、各組み込み部位特異的なビオチン化primerを作成し(F-Primer:ヒトパピローマウイルス側、R-Primer:組み込まれたヒトゲノム側)、ヒトパピローマウイルス側のメチル化レベルを測定する。また組み込まれたヒトゲノム側(組み込み領域両脇のヒトゲノム)のメチル化レベルも併せて測定する。本検討には、比較的長い領域をメチル化解析することが求められることから、次世代パイロシーケンサーを用いて行う。

(12)アレル特異的DNAメチル化解析

上記に引き続き、ヒトパピローマウイルス組み込み有りとなしとのそれぞれのアレル特異的DNAメチル化解析を行う。

#### 4. 研究成果

(1)抗ヒトパピローマウイルス(16/18-E6等)抗体を用いた免疫染色、ヒトパピローマウイルス(16/18)DNAプローブ等を用いたISH解析を行った。リアルタイムPCR(ヒトパピローマウイルス-16、18、58それぞれのE2およびE6/7)の結果よりviral load(copies/cell)、E2とE6/7比からphysical status(integration、mixed、episomal)を判定できる系を確立し、系統的にデータを得た。

また、ヒトパピローマウイルスL1遺伝子増幅用プライマーMy09/11あるいはGP5+/6+を用いたPCR解析の至適化に成功した。

さらに、ヒトパピローマウイルス型特異的プライマー例えば、ヒトパピローマウイルス18増幅用にヒトパピローマウイルス18 E6あるいはヒトパピローマウイルス18 E6-E7を用いたPCR解析の至適化に成功した。

また、APOT assayにより、ヒトパピローマウイルス mRNAの検出ならびにそれが、episome由来か組み込み由来かを鑑別できる系を確立した。

(2)次世代シーケンサーによるヒトパピローマウイルスDNA全組み込み解析の基礎実験において、多数のprimersを設計し遺伝子増幅を試み、増幅不良などによりprimersの再設計・再増幅等を要したが、解析系を確立した。

G-NaVI法による解析の至適化の結果、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、ヒトパピローマウイルスDNA組み込みの多様性を明らかにした。

つまり、組み込まれたヒトパピローマウイルス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。複数の食道扁平上皮癌細胞株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。

上記の実績を踏まえ、次のステップとなるDNAメチル化解析(パイロシーケンス法)を至適化した。ヒトパピローマウイルスDNA組み込みの多様性から、DNAメチル化解析に必要なprimerの設計等も複雑になったが、パイロシーケンス法がワークしていることを確認できた。

(3)ヒトパピローマウイルス関連食道癌の遺伝子異常の次世代統合オミクス解析

遺伝子変異解析として、MassARRAYシステムやIon PGMシーケンサーを用いて多遺伝子の多領域を同時にスクリーニングする系の確立を行った。DNAメチル化解析として、MCAマイクロアレイ等による網羅的解析とともにバイサルファイト-パイロシーケンス解析の

条件設定を行い系を確立した。エピゲノム異常の解析として、高速次世代シーケンサーを用いた MCA シークエンス法の確立も行った。マイクロ RNA 異常の解析として、マイクロアレイを用いた網羅的な解析とともに TaqMan qPCR の系を確立した。

ヒトパピローマウイルス関連食道扁平上皮癌細胞株の遺伝子異常の次世代統合オミクス解析の結果として、さまざまな遺伝子変異、DNA メチル化異常、エピゲノム異常、マイクロ RNA 異常を明らかにした。それぞれ、網羅的解析ののち、結果の検証を行った。例えば、マイクロ RNA 異常に関しては、マイクロアレイ解析による網羅的な解析で、重要なマイクロ RNA 発現変化と考えられたマイクロ RNA に関して、TaqMan qPCR で検証することができた。

さらにヒトパピローマウイルス DNA 組み込みと、ヒトパピローマウイルス関連食道扁平上皮癌の遺伝子異常の関連を明らかにすることができた。

(4)次世代シーケンサーによるヒトパピローマウイルスDNA全組み込み解析において、精度の高い解析法を確立した。ヒトパピローマウイルスDNA組み込みとともにDNAメチル化の多様性を明らかにした。本法を今後、応用することにより、食道扁平上皮癌の発癌におけるヒトパピローマウイルスDNA組み込みの役割が明確になるものと期待できる。

ヒトパピローマウイルス関連食道扁平上皮癌細胞株は、さまざまな遺伝子変異、DNAメチル化異常、エピゲノム異常、マイクロRNA異常を示した。今後、ドライバーとなる遺伝子異常の解明およびヒトパピローマウイルスDNA組み込みに関連したドライバー遺伝子異常の解明に結びつく意義のある研究成果であると考えられる。

得られた研究成果の国内外におけるインパクトは大きいと考えられる。今後、ヒトパピローマウイルスが関わる他の癌種やさらには、ヒトパピローマウイルス以外のウイルスDNAのヒト発癌における役割の解明につながることから今後の展望も多いに期待できる。

## 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 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

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

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