

## ウイルス・細菌遺伝子のヒト遺伝子への組み込みの解明と 組み込みによる発癌機序の解明

森山光彦<sup>1)</sup>, 楡井和重<sup>1)</sup>, 松本直樹<sup>1)</sup>, 中島典子<sup>1)</sup>,  
山本樹生<sup>2)</sup>, 黒田和道<sup>3)</sup>, 小森谷友絵<sup>4)</sup>, 高山忠利<sup>5)</sup>

### Analysis of rearrangement of viral integration in patients with gastric, liver, pancreas, colon, uterus cancer and its participant of development of these cancers

Mitsuhiko MORIYAMA<sup>1)</sup>, Kazushige NIREI<sup>1)</sup>, Naoki MATSUMOTO<sup>1)</sup>,  
Noriko NAKAJIMA<sup>1)</sup>, Tatsuo YAMAMOTO<sup>2)</sup>, Kazumichi KURODA<sup>3)</sup>,  
Tomoe KOMORIYA<sup>4)</sup>, Tadatoshi TAKAYAMA<sup>5)</sup>.

#### 要旨

微生物ゲノムの発癌例のヒトゲノムへの組み込み様式を解析した。方法は、癌切除組織を用いて、CMV, HPV16, HBV, HCVおよびHPのゲノム全長に対するprobeを合成しhybridizationを行い、得られた産物をNGSにて微生物由来ゲノムのPLC細胞およびヒトゲノムへの組み込みを検出した。この結果、シークエンスキャプチャー法は、目的ゲノムの組み込み様式の解析に有用であった。ヒトB型肝炎では、様々な部位にHBVゲノムの挿入が認められた。非癌部においてもHBVゲノムの挿入が認められた。以上よりHBVゲノムのヒト染色体上への組み込みは、HBVのreactivationおよび肝発癌に関与していることが推測された。

#### 1. はじめに

わが国における癌死亡は年間30万人を超え、高齢化社会を背景として高齢者の発癌例の増加と共に疾患死亡率は増加傾向にある。したがって癌発生予知・抑止は重要な課題である。

癌はゲノム・エピゲノム異常が蓄積することによって多段階に発生・進行する遺伝子の疾患と現在では考えられている。2000年にヒトゲノム解析が終了し、その後登場した次世代シークエンサーによる急激なコストダウンとバイオインフォマティクスの発達によりゲノム解析技術が飛躍的に向上し、大規模で体系的な遺伝子の探索が可能となっている。

各臓器についてのゲノム解析は、米国癌ゲノムアトラス (TCGA) および国際癌ゲノムコンソーシアム (ICGC) により多数検体による報告がなされている。さらに各癌種のシークエンスデータを集積して

横断的な解析を行うことにより得られる統計パワーを利用して高感度なゲノム解析を行い、それらを比較解析することにより癌種を超えた癌サブタイプ分類についての知見を得ることが可能となっている。これらの機器を駆使した新しい概念と方法論により、様々な発癌要因の解析が進んでいる。その一方で、これらのビッグデータについては多数の施設より検体を収集するため連結不可能な匿名化がなされており、詳細な臨床情報と連結して変異シグネチャーなどのゲノム変化と癌の原因を検索することが困難であることも少なくない。

我々は、この発癌要因の一つとして、細菌および微生物ゲノムのヒト染色体上ゲノムへの組み込みによる、ヒト染色体上のゲノムの不安定性が、発癌へのプロセスとして重要であると考えている。

5大癌である乳癌・肺癌・胃癌・肝癌・大腸癌の

1) 日本大学医学部内科学系消化器肝臓内科学分野  
2) 日本大学医学部産婦人科学系産婦人科学分野  
3) 日本大学医学部病態病理学系微生物学分野  
4) 日本大学生産工学部応用分子化学科  
5) 日本大学医学部外科学系消化器外科学分野  
森山光彦: moriyama.mitsuhiko@nihon-u.ac.jp

うち、細菌およびウイルスの感染が発癌の原因のひとつと考えられている癌は、肝癌・胃癌・大腸癌や5大癌以外で膵癌・子宮頸癌などが挙げられる。これらの発癌に関与する微生物は、hepatitis B virus (HBV), Epstein-Barr virus (EBV), cytomegaro virus (CMV), human papilloma virus (HPV), Helicobacter pylori (HP)などが推定されている。これらの感染症により発癌が励起される癌の場合、発癌の要因として感染源のゲノムのヒトゲノムへの組み込みによる種々の発癌に関与する遺伝子の不安定性が関与することが報告されている。現在までのところ、発癌の予防・予知にゴールドスタンダードとされる遺伝子やSNPは確認されていない。我々は、肝癌においてHBVゲノムの組み込みがヒトゲノムにランダムに観察されることを確認している。

本研究では、肝癌・胃癌・大腸癌・膵癌および子宮頸癌発生に関与しているとの報告がなされているHP, HBV, Hepatitis C virus (HCV), EBV, HPV, CMVについて、個々のゲノムの発癌例のヒトゲノムへの組み込み様式とその部位を、最近開発されたターゲットシーケンシング:シーケンシングキャプチャー法を利用して、さらに得られた産物から次世代高速シーケンサーを用いて多数検体を一度に処理・解析して、発癌に関与する候補遺伝子を検出して、非癌組織における微生物DNA挿入と、発癌との関係を明らかにするものである。この結果に立脚して、新しい癌発生の予知・予防の方法論を確立して、臨床に応用可能な基盤的知見を得ることを目的とするものである。

本研究により、各癌種についてヒトゲノム解析およびマッピング解析により、感染源のゲノムの組み込み部位を確定して、さらにHot spotの存在を確認することに成功すれば、これらのHot spotの簡便な検出法(real-time PCRシステムおよびアッセイ系)を開発することが可能であり、発癌の予知・予防に与える影響は大きい。

また、本研究の目的の一つとして、医学部という単独施設にて肝癌の臨床検体を収集し解析することにより、次世代シーケンサーにより得られたゲノム・エピゲノム異常と、板橋病院にある詳細な臨床情報をリンクさせて、肝癌のメカニズムをより詳細に明らかにすることを同時に行った。

## 2. 対象および方法

本研究は、平成27年度より28年度までの2ヵ年計画である。

平成27年度については、以下のごとく研究をおこなった。

### 1) 研究対象

対象は、2014(平成26)年度から2015(平成27)年度にかけて、インフォームドコンセントを得られた日本大学医学部附属板橋病院にて手術切除された、B型肝炎3例、C型肝炎20例、NBNC型肝炎10例、胃癌5例、大腸癌5例、子宮頸癌3例である。これらの症例について、癌部および非癌部組織を手術切除後直ちに採取した。また、既にHBVゲノムの組み込み部位が確定されているPLC細胞株について、我々の方法論によっても同様にHBVゲノムの挿入様式が検出されるのか、さらには新規の組み込み部位が確認しうるのかについて検討を行った。

### 2) 研究方法

#### (1) 各種mega probeの作製

各癌部においてヒトゲノムへの挿入が既に報告されているウイルス(CMV, HPV16, HBV, HCV)およびHPについて、SeqCap EZ library (Roche)を用いて、各微生物ゲノム全長に対するcapture用probeを合成した。HPはゲノム中に特異性の低い領域があるため、probeを作成できない領域が存在するが、基本的には解析対象微生物ゲノムの全領域を抽出できる各probeを合成した。このhybridizationに用いるSeqCap EZ probeは、Roche社のEZ probeシステムを用いて作製し、この各種probeに試料を識別できるadaptorを標識した。

#### (2) 検体の採取とDNAの抽出

肝癌、胃癌、大腸癌、膵癌、子宮頸癌について、手術切除された癌および非癌部組織を当日のうちにDNA抽出kitを使用して、各々からDNA6 $\mu$ g以上を抽出した。採取後直ちにQIAamp DNA mini kit (QIAGEN, Germany)を用いてDNAの抽出を行い高純度のDNAを得た。

#### (3) DNAとのhybridization

癌部、非癌部および末梢血リンパ球より抽出したDNAを超音波破碎機(Covaris社)にて断片化後、

(1) で作製した各種probeとhybridizationを行った。Hybridization後にadaptor probeに標識されているビオチンを利用し、ビーズに固定されたストレプトアビジンと結合させ、probeとhybridizeしたDNAのみを回収した。サンプルの調節はTruSeq Nano DNA Sample Prep Kit (Illumina) を用いて行った。

(4) 次世代高速シークエンサーによる解析

(3) で回収されたDNAを、次世代高速シークエンサー (NGS) により解析した。平均1000以上のcoverageでシーケンスした。これは、既報の解析より、最低100depthを施行することにより、90%以上のヒトゲノムが検出されていることより決定した。シークエンサーはIllumina HiSeq2000を使用して行った。予備的実験で、100試料程度を1ランで解析可能であることが示された。次年度は、特に肝癌患者由来試料の解析を中心に行う予定であった。

(5) 各ウイルス・細菌由来DNAのヒトゲノムへの組み込みの有無の検索

得られた各readの塩基配列をヒトゲノムと微生物ゲノムに同時にマッピングを行った。微生物ゲノムに対してのみマッピングすると、微生物ゲノムに低いホモロジーのあるヒトゲノム由来配列が微生物ゲノムにマップされノイズとなる。

まず微生物ゲノムにマッピングされたpaired readの中から、片方のreadがヒトゲノムへマッピングされたものを抽出した。これらのreadは、微生物ゲノム由来DNAのヒトゲノム挿入部位に関する情報を提供する。

この作業を繰り返し、各癌に特有なCMV, HPV, HBV, HCV, HPのヒトゲノムへの挿入様式を解析した。マッピング解析ソフトはCLC genomics workbenchを用いた。

### 3. 結果

#### 1) 次世代シークエンサーによるHBVゲノムの挿入様式の検出と解析

まず第1回目の検討として、B型肝炎例の癌部および非癌部肝組織5例、C型肝炎例の癌部および非癌部肝組織10例、胃癌2例、子宮頸癌2例、PLC細胞株について、抽出したRNAを用いて作製した各種微生物probeとhybridizationを行い、adaptor

probeとcaptureしたDNAのみを回収した。これらのcaptureしたDNAのみを回収して、第3世代高速シークエンサーを最低500depth以上にて施行した。次にmapping解析ソフトを用いて得られたシークエンスdataをヒトゲノムにmappingした。

#### 2) PLC細胞の解析

最初に我々は、今回使用したターゲットシークエンス:シークエンスキャプチャー法のvalidationをも兼ねて、すでにHBVゲノムの挿入箇所が報告されているPLC細胞株における、HBVゲノムの挿入様式について検索した。

まず正確にHBVゲノムのprobeがcaptureされているかについて確認するためHBVのみをmapping解析した。

この結果ではHBVゲノムの全長よりgenotype Aであることが確認された。この事実より、正確に作製したprobeとDNAはcaptureされていることが確認された。この結果より、次世代シークエンサーによるHBVゲノムの挿入様式の解析を行った。

解析の結果では、HBVゲノムの挿入箇所は、両端が確認し得たのはChromosome3, 11, 12, 16, 17であった。Ch11はSNX15 gene, Ch12はMMAB, MVK Gene, Ch16はCLEC18A geneに、Ch17はCCDC17 geneの部位にHBVの一部の挿入を確認し得た。またCh3については、報告されていないgeneであった。

一方、片側のみHBVの組み込みが検出し得たのは、Ch5のTERT gene, Ch8のUNC5D geneの部位であった。またCh10については片側のみしか境界を検出出来なかった。

Watanabe, Bonilla GRらの既報と我々のdataを比較すると、ほぼ同様の検出結果であり、我々の使用したターゲットシークエンス:シークエンスキャプチャー法は、目的ゲノムの組み込み様式の解析に有用であることが確認された。

#### 3) PCR and Sanger sequencing validation

次世代シークエンサーでintegrationが確認された各領域において、次世代シークエンサーではシークエンスしきれていない部分を、次世代シークエンサーで得られたシークエンス結果をもとにプライマーを作成し、PCRを行った。

PCRを行った後に電気泳動を行うと2本のバンドが確認された。この産物をクローニングし、サンガーシークエンス法を用いてその領域の配列を確認した。この結果、約3000bpの領域に見られるものが、HBVとヒトからなるintegrationが見られた領域であり、1000bpの領域にはヒトのみからなるwildの領域であった。

この手法を用いて、次世代シークエンサーでヒトゲノムとHBV DNAの境界が両側共に検出されたもの(Both side)のうち、Chr.3, Chr.11, Chr.17においてHBVとヒトの境界を両側ともに確認することが可能であった。

ヒトゲノムとHBV由来DNAの境界が片側のみ検出できたもの(One side)においては、シークエンスされたヒトゲノム上の上流にプライマーを設計し、改めてPCRを行ったが増幅されるものはみられなかった。Chr.8においては、次世代シークエンサーでシークエンスされたHBVゲノムとヒトの領域で、それぞれプライマーを作成することによって、その境界を検出することができた。

そこで、Alu-PCRと次世代シークエンサーによる解析においても、HBVとヒトの境界が片側のみしか検出されなかったため、遺伝子の転座の可能性を考慮した。また次世代シークエンサーでは読みきれなかったHBVゲノムの組み込み部分を、次世代シークエンサーでシークエンスされた領域をもとにプライマーを作成し、その両方でPCRを行ったところ、同じようなバンドが電気泳動で検出された。このPCR産物のクローニングを行い、Sanger Sequence(サンガーシークエンス)法で確認した。サンガーシークエンス法で確認してみると、ヒトゲノムにHBVがintegrateされた部分で遺伝子の転座が起こっていることが確認された。

以上、chromosomeの転座を検出して確認し得た。B型肝炎培養細胞株ではあるが、これらの転座は現在まで報告されておらず、我々の報告が世界で最初である。

近年肺癌など固形癌においても染色体の転座が報告されており、これらの転座の有無と生命予後の関連性が報告されている。このように非常に癌の進展との関係が注目されている染色体の転座を肝癌細胞株でも認められたことにより、ヒト肝癌組織においても染色体の転座が存在する可能性が高いことが

推測され、今後の研究に非常に有意な結果となった。

#### 4) 転座の検証

染色体上に存在する転座の確認を行った。そこで4倍体でのQ-Band解析を行った(Fig.1)。解析した8細胞の1 cloneの染色体解析結果を以下に示す。

解析結果は、20個の分裂像を解析した結果、染色体数の分布は以下の通りであった。モダル数は88本であり、異数性が認められたが、モダル数付近の染色体本数がさらに倍化した分裂像はほとんど認められなかった。モダル数付近の染色体数の細胞では、解析に供した8細胞全てで非常に複雑な染色体の構造異常が認められ、共通した核型は認められなかった。

本細胞株は、7番染色体の長腕の末端に欠失が認められる染色体、14番染色体の短腕に由来不明の付加が認められる染色体、恐らく15番染色体の長腕の末端に14番染色体が転座した染色体(14番染色体の台座に配置)、15番染色体の短腕に由来不明の付加が認められる染色体及び3種類のマーカー染色体(M1, M2, M3)が、共通の異常染色体として認められた。

由来不明の異常染色体や由来不明な部分について、より詳細に調査する場合は、m-FISHによる解析が必要となるが、今後の検討課題とした。

以下に、解析した8細胞の染色体像及び染色体数のまとめを提示する。腫瘍細胞であるため、染色体は正常な細胞の形式とは大きく異なっている。また、Integration siteだけでなく、その他の染色体上でも転座を疑う部分が見られた。Q-Band解析では明らかな転座を証明する所見は見られなかった。

さらに、遺伝子の転座を確認するためにQ-band解析とFISH法で染色体の構造異常を確認した。Q-band解析においては非常に複雑な染色体の構造異常が認められ、その他のHBVのintegrationが確認されていない部分においても、遺伝子の転座や欠失がみられた。

PCR産物の解析より、Chr.の転座を確認し得ているが、さらに確証を得るためFISH法などを施行した(Fig.2)。しかしながら、FISH法では、明らかな転座確証は得られなかった。この理由としては、全ての細胞の染色体上に同様に転座している確率が

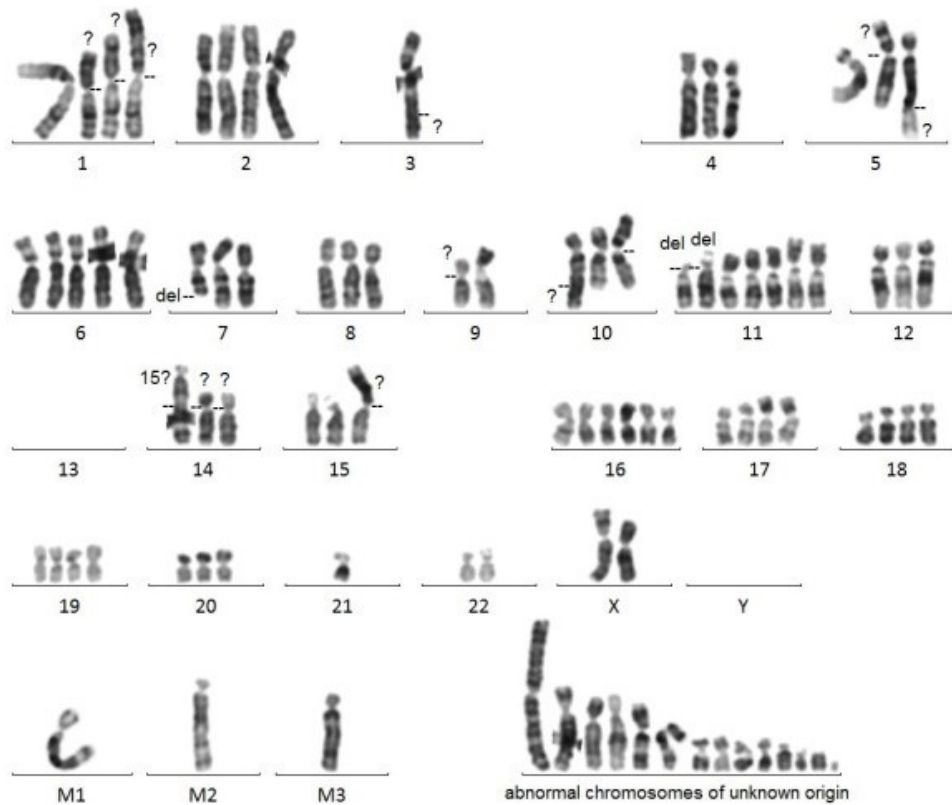


Fig. 1

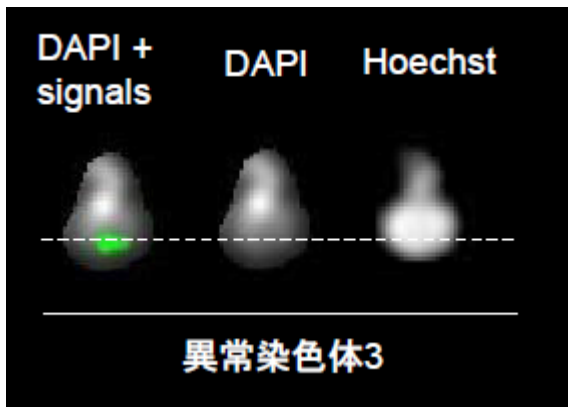


Fig. 2 Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法を用いた転座の証明

低いと推定している。こちらもまた、今後の解析課題の一つである。

### 5) HBV nearly full genome の組み込みの検出

約2800塩基のHBVゲノムの挿入が認められた。このシーケンスを行い、組み込まれたHBV genome

の配列を決定した。

この結果、HBV genomeは、HBVのS regionを含み、X領域はほぼ含まれており、Precore、Core領域もほぼ含まれていた。

### 6) ヒト肝癌組織からのHBVゲノムの組み込みの検出

ヒトHBs抗原陽性肝癌およびHCV抗体陽性肝癌の癌部肝組織より、HBVゲノムの組み込みの有無について、同様にマッピング解析を施行して検索した。現在までの結果を以下に提示する。

- ① 癌部においては、Chr.1 ; RCC2, SYT14, Chr.2 ; CPS1, Chr.15 ; FAH, CERS3 部位に、いずれもHBVゲノムの挿入が認められた。
- ② 非癌部においては、Chr.2 ; FN1, Chr.5 ; PIK3R1, Chr.18 ; RP11-146N18.1の部位にHBVゲノムの挿入が認められている。
- ③ これらに関しては症例によって、HBVゲノムの挿入部位は異なっており、解析を継続している。

#### 4. 考 察

以上今回の研究結果をまとめると、HBVゲノムのヒト染色体上への組み込みを確認することができた。PLC細胞の解析より、染色体上にHBVゲノムのほぼ全長に近いゲノムの組み込みを確認した。

組み込まれたゲノムは既報の組み込み部位以外にも認められた。HBVゲノムの組み込みと共に、染色体の転座を認めた。これらの結果より、HBVゲノムの染色体上への組み込みは、HBVのreactivationおよび肝発癌に関与していることが推測された。

今回の研究の成果の一つとして、我々は、染色体の転座を確認した。B型肝炎培養細胞株ではあるが、これらの転座は現在まで報告はされておらず、我々の報告が世界で最初である。

近年肺癌など固形癌においても染色体の転座が報告されており、これらの転座の有無と生命予後との関連性が報告されている。このように非常に癌の進展との関係が注目されている染色体の転座を肝癌細胞株でも認められたことより、ヒト肝癌組織においても染色体の転座が存在する可能性が高いことが推測され、今後の研究に非常に有意な結果となった。

さらに我々は、HBV nearly full genomeの組み込みを検出し得た。このシーケンス結果より、組み込まれたHBV genomeの配列を決定したところ、HBVのwhole S region (PreS1+PreS2+S領域)を含み、X領域はほぼ含まれており、DR1, DR2, core promoter領域をも含めたPrecore, Core領域もほぼ含まれていた。

X領域はcis/trans機能を有しており、HBVゲノムの複製や染色体上への組み込みには、発癌に重要な役割を果たしていることが推測されている領域である。この領域がほぼ全長組み込まれていることは非常に興味深く、また今後の機能解析が重要と考えられた。

またこの組み込みの欠失部位は、polymerase領域の下流域であり、ある意味では複製や組み込みなどには重要ではないと推測される。

さらにHBVの複製に重要とされている、covalently closed circle DNA (cccDNA)の領域もほぼ全長が含まれている。最近の報告では、HBVのreactivationには、細胞核内に存在しているcccDNAが関与していることを推定している。我々の検討から、染色体上にcccDNAの部位のゲノムが存在しているこ

とが確認されたが、この事実はHBVの細増殖機序を考える上で重要な発見であると考えている。

上述したが、X領域のcis/trans機能は発癌にも深い関与があることが知られている。このように染色体上に、X領域が組み込まれていたことは、HBV関連肝癌の発生および進展への影響は必ずあると考えられる。現在、染色体上に組み込まれたnearly full genomeの機能解析と、ヒト肝癌組織での検出を行っている。

以上今回の検討より、我々はターゲットシーケンス・シーケンスキャプチャー法がHBVのintegrationの検索に有用であることを確認し得た。

今回の研究より得られた結果の一つとして、これらの挿入されたHBV DNAは、HBV genomeの異なる場所から由来した断片が、様々の方向性で結合されたものであった。おそらくインテグレーションサイトは不安定であり、継代を重ねる間にそのサイトにさらに変異がおこり、ポリクローナルな細胞集団になったと考えられる。実際に肝細胞癌にも同じようなことが起こっていると思われる。また挿入されたHBV DNAはいずれも短い塩基配列のものが多数であった。この原因としては、HBV感染早期には、染色体上へ組み込まれたHBVゲノムは、比較的長い配列が多かったが、経時的に組み込み部位が生体反応によりクレープされて細胞死に至り、結果として短い塩基のものだけが、長期間にわたって存在し得たのではないだろうか。今後の課題の一つである。

最後に、HBV integrationの検出法についてまとめを以下に記す。

##### 1) Alu PCR

- (1) 費用が安く、かつ手間が少ない。すなわちPCRおよびクローニング、さらにSanger Sequence法での確認が可能であること。
- (2) ただしintegration siteの片側しか検出が基本的にできない。さらに検出感度が次世代シーケンサーを用いた方法より劣る。

##### 2) 次世代シーケンサー (Next Generation Sequencer ; NGS)

- (1) 検出感度がAlu PCRより圧倒的に良好である。
- (2) 費用が高額となる。そのため多検体での検索が難しい。
- (3) 解析までの工程に手間が多い (NGSの行程が複

雑)。

(4) Sanger Sequence法でのPrimerの作成が難しい。

## 5. 今後の研究方針

現在少数例での検討にすぎないので、より多数例について検討を加える必要がある。また、PLC細胞の解析にて確認された、クロモゾームの転座およびほぼ全長に近いHBVゲノムの挿入の有無について、ヒト検体においても同様の所見が得られるかについて検討を加えている。

同様に胃癌検体からはHPゲノムの組み込み、子宮頸癌検体からはHPVゲノムの組み込みの有無をまず検出する。さらにこれらの微生物ゲノムの組み込み部位を確定して、発癌の候補遺伝子の異常に繋がるかについて検討を継続する。

最終的には、ドライバー遺伝子(発癌候補遺伝子)を確定して、これを末梢血より検出し得る、RTD-PCR系およびEIA assay系の確立を目指すものである。

## 謝辞

本研究は、平成27年度日本大学学術研究助成金(総合研究)(総15-009)により実施されたものである。

## 文 献

- 1) Yamamoto T, Kajino K, Kudo M, et al. Determination of the clonal origin of multiple human hepatocellular carcinomas by cloning and polymerase chain reaction of the integrated hepatitis B virus DNA. *Hepatology* 1999; 29: 1446-1452.
- 2) Murakami Y, Saigo K, Takashima H, Minami M, Okanoue T, Bréchet C, Paterlini-Bréchet P. Large scaled analysis of hepatitis B virus (HBV) DNA integration in HBV related hepatocellular carcinomas. *Gut*. 2005 Aug;54(8):1162-8.
- 3) Wang J, Lin J, Chang Y, et al. MCM3AP, a novel HBV integration site in hepatocellular carcinoma and its implication in hepatocarcinogenesis. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2010; 30: 425-429.
- 4) Ding D, Lou X, Hua D, Yu W, Li L, Wang J, Gao F, Zhao N, Ren G, Li L, Lin B. Recurrent targeted genes of hepatitis B virus in the liver cancer genomes identified by a next-generation sequencing-based approach. *PLoS Genet*. 2012;8(12):e1003065.
- 5) Toh ST, Jin Y, Liu L, Wang J, Babrzadeh F, Gharizadeh B, Ronaghi M, Toh HC, Chow PK, Chung AY, Ooi LL, Lee CG. Deep sequencing of the hepatitis B virus in hepatocellular carcinoma patients reveals enriched integration events, structural alterations and sequence variations. *Carcinogenesis*. 2013

Apr;34(4):787-98.

- 6) Matsuoka S, Nirei K, Tamura A, et al. Influence of Occult Hepatitis B Virus Coinfection on the Incidence of Fibrosis and Hepatocellular Carcinoma in Chronic Hepatitis C. *Intervirolology* 2009; 51: 352-361.