

2015 年度「リレー・フォー・ライフ プロジェクト未来」研究助成金報告書(進捗状況)

研究テーマ: B 型肝炎ウイルスゲノム組み込みとエピゲノム変化を標的とした肝癌の本質的病態解明と革新的臨床応用

研究者: 山本博幸

研究者所属: 聖マリアンナ医科大学内科学(消化器・肝臓内科)

## 研究目的

B型肝炎ウイルス(HBV) 関連肝細胞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。我々の開発したGenome capture法併用次世代シーケンサー(NGS)によるDNA組み込み解析法(G-NaVI法)により、肝癌細胞株においてHBV DNA全組み込みに加え、これに伴うHBVおよび宿主ゲノムのDNAメチル化に関して、一定の法則つまり発癌メカニズムの根幹にせまりうる新知見を見出した。これを基盤に本研究では、主に臨床検体で、HBV DNAのヒトゲノムへの組み込みとHBVおよび宿主ゲノムのエピジェネティックな変化の分子病態を解析し、HBV関連肝癌の統合的分子病態の解明と臨床応用を目的とした。

## 研究方法

### 1 HBV DNA のヒトゲノムへの組み込みと HBV および宿主ゲノムのエピジェネティックな変化の分子病態解析

HBV DNA 組み込みと CpG アイランドおよび CpG 密度との関連を DNA メチル化解析法であるパイロシーケンス法にて解析した。HBV DNA 組み込み部位におけるクロマチン構造を Bander ソフトウェアを用いて解析し、周辺のクロマチン構造との比較を行った。メチル化 HBV と非メチル化 HBV で組み込み部位におけるクロマチン構造の差異を Bander ソフトウェアを用いて解析した。非メチル化 HBV と 5-hydroxymethylation との関連を Tet-assisted Bisulfite 法を用いて解析した。HBV プロモーターを用いたレポーターアッセイにより、肝癌細胞株において転写との関連を解析した。HBV DNA 組み込み配列(長さ、繰り返し配列など)とメチル化の関連を解析した。HBV DNA 組み込みと DNA メチル化に関連して、ヒストンメチル化などを ChIP assay を用いて解析した。また、ヒストン修飾をゲノムワイドに解析した。

### 2 HBV 関連肝細胞癌の統合的分子病態の解明

次世代統合トランスオミクス解析(MassARRAY、NGS、サンガーシーケンス、DNA メチル化解析法であるパイロシーケンスおよびMethyLight 法など)によりHBV 関連肝癌におけるジェネティック、エピジェネティックな異常を網羅的に解析し、上記、HBV DNA 組み込みに伴う変化との関連を解析した。

## 研究結果

### 1 HBV DNA のヒトゲノムへの組み込みと HBV および宿主ゲノムのエピジェネティックな変化の分子病態解析

HBV DNA 組み込みと CpG アイランドおよび CpG 密度との関連を解析した。HBV DNA が CpG アイランドメチル化の著しいヒトゲノム領域へ組み込まれた場合、HBV DNA もメチル化を受け不活化す

ると考えられた。一方、HBV DNA が CpG アイランドメチル化の乏しいヒトゲノム領域(プロモーター領域など)へ組み込まれた場合、HBV DNA はメチル化を受けにくいと考えられた。ヒトゲノム側の CpG アイランドのメチル化状態とは異なり、CpG 密度は、HBV DNA メチル化状態と一定の関連を認めなかった。

HBV DNA 組み込み部位におけるクロマチン構造を解析し、周辺のクロマチン構造との比較を行ったところ、タイトなヘテロクロマチン構造に比べ、ユークロマチン構造に組み込みが起りやすいという結果は得られなかった。

メチル化 HBV と非メチル化 HBV で組み込み部位におけるクロマチン構造の差異を解析したが、HBV のメチル化の有無とクロマチン構造の有意な関連を認めなかった。

非メチル化 HBV と 5-hydroxymethylation との関連を、Tet-assisted Bisulfite 法を用いて、5-hydroxy メチル化シトシン(5-hmC)と 5-mC を区別することにより解析したが、一定の傾向を認めなかった。

HBV プロモーターを用いたレポーターアッセイにより、転写との関連を解析した。メチル化 HBV プロモーターでは、転写活性の低下を認めた。

HBV DNA 組み込み配列(長さ、繰り返し配列など)とメチル化の関連では、HBV DNA 組み込み配列の長さや繰り返し配列の有無とメチル化の程度との一定の関連は認めなかった。

HBV DNA 組み込みと DNA メチル化に関連して、ヒストンメチル化などを ChIP assay を用いて解析した。ヒストンメチル化の動態は、さまざまであり、HBV DNA 組み込みと一定の関連は認めなかった。より網羅的なゲノムワイドなヒストン修飾解析においても同様の結果であった。

## 2 HBV 関連肝細胞癌の統合的分子病態の解明

HBV 関連肝癌の統合的分子病態の解明として検体から DNA、mRNA、miRNA を抽出した。ジェネティックな変化として遺伝子変異解析、エピジェネティックな変化としてバイサルファイト処理 DNA を用いて腫瘍関連遺伝子の DNA メチル化解析、さらに、miRNA 発現解析を行った。遺伝子変異、DNA メチル化、miRNA 発現と HBV DNA 組み込みとの関連を解析した。

遺伝子変異では、TERT 遺伝子プロモーター(TERTp)変異を半数の症例で検出した。TERTp変異陽性例では、TERT 遺伝子プロモーター領域への HBV DNA 組み込みを認めなかった。

HBV DNA の組み込みを認めた遺伝子つまり、UNC5D、SNX15、MVK、CLEC18A、CCDC57、EVA1A、AUTS2、BICC1、PAK3、DNAH8、COLGA8F、SLC6A13 遺伝子(以上、癌部で検出)、AK026965、CALN1、FN1、KLF13 遺伝子(以上、非癌部で検出)に関して、同様に解析したところ、有意な変異を検出しなかった。

DNA メチル化では、Wnt など様々なシグナルに関連する遺伝子、RASSF1A、p16、SOCS1、RIZ1、KLHL35、SPDYA 遺伝子等のメチルを検出したが、HBV DNA 組み込みと関連する特定のメチル化変化は認めなかった。

miRNA 発現では、増殖、アポトーシス、細胞周期、転移等に関わるさまざまな miRNA 発現の変化を検出したが、HBV DNA 組み込みと関連する特定の miRNA 発現変化は認めなかった。

## 考察

HBV DNA のヒトゲノムへの組み込みおよび組み込みに伴う HBV およびヒトゲノムの DNA メチル化動態の検討は重要である。我々は、組み込まれた HBV 断片のみならず周囲ヒトゲノムの CpG 配列部位におけるシトシンメチル化をパイロシークエンス法により定量解析することに成功した。また、DNA 組み込みを利用してプライマーを設計することにより、通常では解析困難なアレル特異的 DNA メチル化解析を可能とした。この結果、ヒト側及びウイルス側のメチル化には正の相関関係があることを見

出した。

この結果から、メチル化の著しいヒトゲノム領域へHBV DNAが組み込まれた場合、HBV DNAもメチル化を受け不活化し、その後の発癌には影響しない可能性が考えられた。一方、メチル化の乏しいヒトゲノム領域(プロモーター領域など)へHBV DNAが組み込まれた場合、HBV DNAはメチル化を受けず、さまざまな機序で、その後の発癌に影響する可能性が考えられた。実際、TohらのNGSを用いた組み込み解析において、癌部では、非癌部に比べプロモーター領域への組み込みが有意に多いことが報告されており、興味深い。

また、TERTプロモーター領域へのHBV DNA組み込みによるTERT発現増加があれば、新たにTERT<sub>p</sub>変異は必要ないと考えられ、改めて、HBV DNAの組み込みの機能的意義が示唆された。HBV DNAの組み込みやTERT<sub>p</sub>変異など活性化分子機構に違いを認めるものの、標的遺伝子としてのTERT遺伝子の重要性が示唆された。

引き続き詳細な解析を行い、臨床応用可能な研究成果を目指したい。