

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2015-133957

(P2015-133957A)

(43) 公開日 平成27年7月27日(2015.7.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 Q</b> 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A Z	4 B O 2 4
<b>C 4 O B</b> 40/06 (2006.01)	C 4 O B 40/06	4 B O 6 3
<b>G O 1 N</b> 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M	
<b>G O 1 N</b> 33/569 (2006.01)	G O 1 N 33/569 G	
<b>C 1 2 N</b> 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 20 頁)

(21) 出願番号	特願2014-254873 (P2014-254873)	(71) 出願人	596165589 学校法人 聖マリアンナ医科大学 神奈川県川崎市宮前区菅生2-16-1
(22) 出願日	平成26年12月17日(2014.12.17)	(74) 代理人	100088155 弁理士 長谷川 芳樹
(31) 優先権主張番号	特願2013-261438 (P2013-261438)	(74) 代理人	100128381 弁理士 清水 義憲
(32) 優先日	平成25年12月18日(2013.12.18)	(74) 代理人	100126653 弁理士 木元 克輔
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	伊東 文生 神奈川県川崎市宮前区菅生2-16-1 学校法人 聖マリアンナ医科大学内
		(72) 発明者	渡邊 嘉行 神奈川県川崎市宮前区菅生2-16-1 学校法人 聖マリアンナ医科大学内 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ウイルスDNAの宿主ゲノムへの組み込み部位を決定する方法及びその応用

(57) 【要約】

【課題】 ウイルス関連疾患の診断に利用可能な技術の提供。

【解決手段】 ウイルスの配列をもとに作製したプライマーをベイトに用いて、宿主ゲノムの断片化DNAをハイブリダイズさせ次世代シーケンス解析を行うことで、ウイルス核酸の宿主ゲノムへの組み込み部位を決定することが可能である。さらに、組み込み部位におけるメチル化頻度を測定し、メチル化頻度に基づいてウイルス関連疾患の発症又は重症化のリスクを評価することが可能である。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ウイルス核酸の宿主ゲノムへの組み込み部位を決定する方法であって、

a) ウイルス核酸とハイブリダイズするプライマーからなるプライマーライブラリーを準備する工程であって、プライマーライブラリーはウイルスの全核酸領域をカバーするものであり、プライマーは標識されている、工程

b) 宿主ゲノムを断片化する工程

c) 宿主ゲノムの断片化DNAを増幅する工程

d) 宿主ゲノムの断片化DNAとプライマーをハイブリダイズする工程

e) 宿主ゲノムの断片化DNA及びプライマーのハイブリッドを回収する工程

10

f) 回収したハイブリッドからプライマーを除去する工程

g) プライマーが除去された宿主ゲノムの断片化DNAの配列決定を行い、ウイルス核酸の宿主ゲノムへの組み込み部位を決定する工程

を含む方法。

## 【請求項 2】

ウイルス核酸の宿主ゲノムへの組み込み部位に対応する、非組み込みアレルにおけるDNAメチル化頻度を測定する方法であって、

a) ウイルス核酸とハイブリダイズするプライマーからなるプライマーライブラリーを準備する工程であって、プライマーライブラリーはウイルスの全核酸領域をカバーするものであり、プライマーは標識されている、工程

20

b) 宿主ゲノムを断片化する工程

c) 宿主ゲノムの断片化DNAを増幅する工程

d) 宿主ゲノムの断片化DNAとプライマーをハイブリダイズする工程

e) 宿主ゲノムの断片化DNA及びプライマーのハイブリッドを回収する工程

f) 回収したハイブリッドからプライマーを除去する工程

g) プライマーが除去された宿主ゲノムの断片化DNAの配列決定を行い、ウイルス核酸の宿主ゲノムへの組み込み部位を決定する工程

h) ウイルス核酸の宿主ゲノムへの組み込み部位に対応する、非組み込みアレルにおいてDNAメチル化頻度を測定する工程

を含む方法。

30

## 【請求項 3】

ウイルスに感染した患者におけるウイルス関連疾患の発症又は重症化のリスクの指標を得る方法であって、

a) ウイルス核酸とハイブリダイズするプライマーからなるプライマーライブラリーを準備する工程であって、プライマーライブラリーはウイルスの全DNA領域をカバーするものであり、プライマーは標識されている、工程

b) 患者のゲノムを断片化する工程

c) 患者のゲノムの断片化DNAを増幅する工程

d) 患者のゲノムの断片化DNAとプライマーをハイブリダイズする工程

e) 患者のゲノムの断片化DNA及びプライマーのハイブリッドを回収する工程

40

f) 回収したハイブリッドからプライマーを除去する工程

g) プライマーが除去された患者のゲノムの断片化DNAの配列決定を行い、ウイルス核酸の患者のゲノムへの組み込み部位を決定する工程

h) ウイルス核酸の患者のゲノムへの組み込み部位に対応する、非組み込みアレルにおいてDNAメチル化頻度を測定する工程

を含み、

DNAメチル化頻度をウイルス関連疾患の発症又は重症化のリスクの指標とする、方法。

## 【請求項 4】

ウイルス核酸とハイブリダイズするプライマーからなるプライマーライブラリーであっ

50

て、プライマーライブラリーはウイルスの全核酸領域をカバーするものであり、プライマーは標識されている、プライマーライブラリー。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法に使用するための、請求項 4 に記載のプライマーライブラリー。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ウイルス DNA の宿主ゲノムへの組み込み部位を決定する方法及びその応用に関する。

【背景技術】

【0002】

B 型肝炎ウイルス (HBV) は、世界中で 20 億人に感染し、そのうち 4 億人は慢性感染となり、活動性肝炎、肝硬変及び肝細胞癌 (HCC) のリスクが高い。慢性肝疾患を伴う HBV 感染者は、100 倍高い HCC 発症のリスクを有し、世界で 3 番目の癌死の原因となっている。HBV 関連 HCC ケースの 90% は、ヒトゲノムへの HBV の DNA の組み込みが認められる。ヒトパピローマウイルス (HPV) は、子宮頸癌及び尖圭コンジローマの原因ウイルスとして知られている。全世界で年間 3 億人に対する子宮頸部への感染が認められ、子宮頸癌患者のほぼ 100% から HPV は検出される。子宮頸癌の発症についても、ヒトゲノムへの HPV の DNA の組み込みが原因であることが知られている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0003】

【非特許文献 1】Guerrero et al., "The role of hepatitis B virus integrations in the pathogenesis of human hepatocellular carcinoma.", *Journal of Hepatology*, 42(5), 760-77, 2005.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

しかしながら、HBV 及び HPV などのウイルスの DNA の組み込みはランダムに生じるものであるため、ウイルスのヒトゲノム組み込み部位による発癌への影響に関しては未だ不明である。断片化したヒトゲノムをシーケンス解析し、ウイルス DNA の組み込み部位を特定しようとした場合、大量の解析不能配列の中に、組み込まれたウイルス配列が埋もれてしまい、ウイルスのヒトゲノム組み込み部位を特定することができなかった。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明者らは、HBV の全ジェノタイプの配列をもとにプライマーライブラリーを作成し、HBV の DNA の組み込み部位に関する研究を行った結果、HBV の DNA の組み込みは確かにランダムに生じるものであるが、ヒトゲノムにおける組み込み部位の相違によって HBV が関連する疾患の重篤度が異なるという知見を得た。より具体的には、メチル化頻度の高いヒトゲノムの領域に HBV の DNA が組み込まれた場合、組み込まれた HBV の DNA のメチル化頻度も高くなり、それによって HBV の DNA の発現が抑制され、HBV が関連する疾患の重篤度が低かった。一方、メチル化頻度の低いヒトゲノムの領域に HBV の DNA が組み込まれた場合、組み込まれた HBV の DNA のメチル化頻度も低くなり、それによって HBV の DNA の発現が十分抑制されず、HBV が関連する疾患の重篤度が高かった。また、本発明者らは、HPV についても同様の方法により、HPV の DNA の組み込み部位を特定できることを確認した。本発明者らは、この知見をウイルス関連疾患の診断に利用できると考え、本発明を完成するに至った。

【0006】

第一に、本発明は、ウイルス核酸の宿主ゲノムへの組み込み部位を決定する方法を提供

10

20

30

40

50

する。先に述べたように、ウイルス核酸の宿主ゲノムへの組み込みはランダムに生じるため、診断に先立って宿主ごとの組み込み位置を決定する必要がある。かかる方法は、

- a) ウイルス核酸とハイブリダイズするプライマーからなるプライマーライブラリーを準備する工程であって、プライマーライブラリーはウイルスの全核酸領域をカバーするものであり、プライマーは標識されている、工程
  - b) 宿主ゲノムを断片化する工程
  - c) 宿主ゲノムの断片化DNAを増幅する工程
  - d) 宿主ゲノムの断片化DNAとプライマーをハイブリダイズする工程
  - e) 宿主ゲノムの断片化DNA及びプライマーのハイブリッドを回収する工程
  - f) 回収したハイブリッドからプライマーを除去する工程
  - g) プライマーが除去された宿主ゲノムの断片化DNAの配列決定を行い、ウイルス核酸の宿主ゲノムへの組み込み部位を決定する工程
- を含む。

10

【0007】

次に、本発明は、ウイルス核酸の宿主ゲノムへの組み込み部位に対応する、非組み込みアレルにおけるDNAメチル化頻度を測定する方法を提供する。ウイルス核酸が組み込まれた宿主ゲノムの領域のDNAメチル化頻度を測定することで、組み込まれたウイルス核酸がDNAメチル化を受けやすいかどうかを判断することができる。かかる方法は、

- a) ウイルス核酸とハイブリダイズするプライマーからなるプライマーライブラリーを準備する工程であって、プライマーライブラリーはウイルスの全核酸領域をカバーするものであり、プライマーは標識されている、工程
  - b) 宿主ゲノムを断片化する工程
  - c) 宿主ゲノムの断片化DNAを増幅する工程
  - d) 宿主ゲノムの断片化DNAとプライマーをハイブリダイズする工程
  - e) 宿主ゲノムの断片化DNA及びプライマーのハイブリッドを回収する工程
  - f) 回収したハイブリッドからプライマーを除去する工程
  - g) プライマーが除去された宿主ゲノムの断片化DNAの配列決定を行い、ウイルス核酸の宿主ゲノムへの組み込み部位を決定する工程
  - h) ウイルス核酸の宿主ゲノムへの組み込み部位に対応する、非組み込みアレルにおいてDNAメチル化頻度を測定する工程
- を含む。

20

30

【0008】

さらに、本発明は、ウイルスに感染した患者におけるウイルス関連疾患の発症又は重症化のリスクの指標を得る方法を提供する。この指標を利用して、ウイルス関連疾患の診断を行うことができる。かかる方法は、

- a) ウイルス核酸とハイブリダイズするプライマーからなるプライマーライブラリーを準備する工程であって、プライマーライブラリーはウイルスの全DNA領域をカバーするものであり、プライマーは標識されている、工程
  - b) 患者のゲノムを断片化する工程
  - c) 患者のゲノムの断片化DNAを増幅する工程
  - d) 患者のゲノムの断片化DNAとプライマーをハイブリダイズする工程
  - e) 患者のゲノムの断片化DNA及びプライマーのハイブリッドを回収する工程
  - f) 回収したハイブリッドからプライマーを除去する工程
  - g) プライマーが除去された患者のゲノムの断片化DNAの配列決定を行い、ウイルス核酸の患者のゲノムへの組み込み部位を決定する工程
  - h) ウイルス核酸の患者のゲノムへの組み込み部位に対応する、非組み込みアレルにおいてDNAメチル化頻度を測定する工程
- を含み、  
DNAメチル化頻度をウイルス関連疾患の発症又は重症化のリスクの指標とする。

40

【0009】

50

別の態様では、本発明は、上記方法に利用可能なプライマーライブラリーを提供する。かかるプライマーライブラリーは、ウイルス核酸とハイブリダイズするプライマーからなり、プライマーライブラリーはウイルスの全核酸領域をカバーするものであり、プライマーは標識されている。

【発明の効果】

【0010】

本発明にかかるウイルスDNAの宿主ゲノムへの組み込み部位を決定する方法は、ウイルス関連疾患の診断方法として利用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】HBVのX遺伝子プロモーターのCpGアイランドにおけるDNAメチル化頻度の結果を表す図である。1～10は患者番号を表す。Tは腫瘍組織試料を、Nは近接非腫瘍組織試料を表す。

【図2】組み込まれた染色体における、HBVのX遺伝子プロモーターのCpGアイランドにおけるDNAメチル化頻度の結果を表す図である。Chr 1、Chr 2、Chr 4、Chr 6、Chr 8及びChr 12は、それぞれ第1、2、4、6、8及び12染色体を表す。円グラフの下の数字はメチル化頻度(%)を表す。

【図3】PLC/PRF/5細胞株における、HBVのDNAのヒトゲノムへの組み込み部位を特定した結果の一例を示す図である。

【図4】HBV-VCCの臨床試料における、HBVのDNAのヒトゲノムへの組み込み部位を特定した結果の一例を示す図である。

【図5】PLC/PRF/5細胞株における、HBVのDNAのヒトゲノムへの組み込み部位におけるメチル化頻度を測定した結果の一例を示す図である。

【図6】HBV-HCCの臨床組織における、HBVのDNAのヒトゲノムへの組み込み部位におけるメチル化頻度を測定した結果の一例を示す図である。

【図7】各種子宮頸癌細胞株における、HPVのDNAのヒトゲノムへの組み込み部位を特定した結果の一例を示す図である。Chr. 8q24.21の表記は、HPVのDNAが組み込まれたヒト染色体の位置を表す。HPV-18:5736及びHuman Chr. 8:128230632の表記は、それぞれ組み込まれた部位におけるHPV-18のヌクレオチド位置及びヒト第8染色体のヌクレオチド位置を表す。他の表記も同様である。

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明の対象となるウイルスは、DNAウイルスでもRNAウイルスでもよい。DNAウイルスとしては、例えば、HBV、HPV、ヒトヘルペスウイルス(HHV)が挙げられ、RNAウイルスとしては、例えば、ヒトTリンパ好性ウイルス(HTLV、特にHTLV-1)及びヒト免疫不全ウイルス(HIV)などのレトロウイルスやC型肝炎ウイルス(HCV)が挙げられる。

【0013】

本発明の対象となる宿主及び患者は、ウイルスが感染してウイルス核酸がゲノムに組み込まれる限り特に制限されない。宿主及び患者は、哺乳動物であることが好ましく、ヒトであることが最も好ましい。宿主及び患者はイヌ及びネコなどのペットでもよく、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ及びニワトリなどの家畜でもよい。

【0014】

本発明の一実施形態において、ウイルス核酸の宿主ゲノムへの組み込み部位を決定する方法は、

a) ウイルス核酸とハイブリダイズするプライマーからなるプライマーライブラリーを準備する工程であって、プライマーライブラリーはウイルスの全核酸領域をカバーするものであり、プライマーは標識されている、工程

b) 宿主ゲノムを断片化する工程

10

20

30

40

50

- c) 宿主ゲノムの断片化DNAを増幅する工程
- d) 宿主ゲノムの断片化DNAとプライマーをハイブリダイズする工程
- e) 宿主ゲノムの断片化DNA及びプライマーのハイブリッドを回収する工程
- f) 回収したハイブリッドからプライマーを除去する工程
- g) プライマーが除去された宿主ゲノムの断片化DNAの配列決定を行い、ウイルス核酸の宿主ゲノムへの組み込み部位を決定する工程を含む。

**【0015】**

工程aでは、ウイルスのゲノム配列に基づいて、宿主に組み込まれたウイルス核酸を釣るためのプライマー(ベイト)を設計及び合成する。各プライマーは100~140mer、好ましくは110~130mer、最も好ましくは約120merの核酸である。核酸はDNAでもRNAでもよい。各プライマーは標識されており、この標識により後の工程でウイルス核酸が組み込まれた宿主ゲノムの断片化DNAを回収することが可能となる。標識は、例えばビオチンを用いることが可能である。プライマーの集合体であるプライマーライブラリーが、ウイルスの全核酸領域をカバーできるように、各プライマーを設計する。このようにすることで、組み込み部位を確実に決定できるようにすることが可能となる。ウイルスが複数の遺伝子型を有する場合、すべての遺伝子型の核酸領域をカバーできるようにプライマーを設計してもよい。例えば、HBVは、遺伝子型A~Jまで存在することが知られており(具体的には、表1に記載の遺伝子型が知られている)、これらすべての遺伝子型をカバーできるようなプライマーライブラリーを準備することができる。

プライマーの設計に際しては、ウイルスの遺伝子データベースに開示されている遺伝子配列情報をもとに、市販のソフトウェアを利用することが可能である。

10

20

**【0016】**

【表 1】

Accession No.	Subtype	Country
AB014370	Ae	Japan
EF208113	Ae	Germany
AB453979	Ae	Japan
AY233277	Aa	South Africa
AB116087	Aa	India
AB453986	Aa	Japan
AB014366	B1(Bj)	Japan
D23678	B1(Bj)	Japan
AB073845	B1(Bj)	Japan
AB073840	B2(Ba)	Taiwan
AF282917	B2(Ba)	China
D00331	B3	Indonesia
AB033554	B3	Indonesia
AB031266	B4	Vietnam
AB073835	B4	Vietnam
AB241117	B5	Philippines
EU330989	B6	China
AB111946	C1	Vietnam
AB112066	C1	Myanmar
AB112472	C1	Thailand
AB014360	C2	Japan
AB014379	C2	Japan
AB014362	C2	Japan
AB014369	C2	Japan
D50517	C2	Japan
D23681	C2	Japan
X75665	C3	Polynesia
AB270541	D1	Mongolia
AB270543	D1	Mongolia
AB205126	D2	Japan
AB116266	D2	Japan
AB270537	D3	Mongolia
AB033558	D4	Japan
AB205192	E	Ghana
AY090455	F	Nicaragua
AB056514	G	USA
AY090457	H	Nicaragua
FJ023670	I	Laos
AB486012	J	Japan:Ryuku

10

20

30

## 【 0 0 1 7 】

また、ウイルスが複数の遺伝子型を有する場合、一又は複数の所定の遺伝子型の核酸領域をカバーできるようにプライマーを設計してもよい。所定の遺伝子型は、地域、人種、疾患の種類、疾患のリスクの高さなどを基準に、当業者が適宜選択することが可能である。例えば、日本では、A、B及びC型のHBVの感染が多いことが知られているため、日本でのHBVの診断を目的とする場合は、A、B及びC型のHBVの核酸領域をカバーできるプライマーを設計してよい。また、HPVのうち16、18、31、33、35、39、45、51、55、56、58、59、66、68型などが高リスクであることが知られているため、HPVの高リスクの患者を診断する目的の場合は、これらの型のHPVの核酸領域をカバーできるプライマーを設計してよい。さらに、子宮頸癌は主として16及び18型のHPVが原因であることが知られているため、子宮頸癌の診断を目的とする場合は、16及び18型のHPVの核酸領域をカバーできるプライマーを設計してよい。また、尖圭コンジロームは主として6及び11型のHPVが原因であることが知られているため、尖圭コンジロームの診断を目的とする場合は、6及び11型のHPVの核酸領域をカバーできるプライマーを設計してよい。

40

## 【 0 0 1 8 】

工程bでは、宿主から採取した試料からゲノムを適切な長さに切断し、配列決定を行いやすくする。断片化は、例えば、超音波処理、制限酵素処理などを利用することが可能である。100～1000bpの長さのDNA断片とすることが好ましい。

50

## 【 0 0 1 9 】

工程 c では、工程 b で得られた宿主ゲノムの断片化 DNA を増幅する。PCR などの周知の核酸増幅技術を利用することが可能である。

## 【 0 0 2 0 】

工程 d では、工程 c で得られた増幅後の宿主ゲノムの断片化 DNA と工程 a で準備したプライマーライブラリーを混ぜることで、両者のハイブリッド形成を行う。ハイブリダイズの条件は、Green et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Fourth Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012等を参照の上、当業者が適宜設定することが可能である。

## 【 0 0 2 1 】

工程 e では、工程 d で得たハイブリッドを回収し、ハイブリッド形成しなかった宿主ゲノムの断片化 DNA を除去する。例えば、プライマーがビオチン標識されている場合、ストレプトアビジンが結合した磁性ビーズを混ぜ、磁力を利用して磁性ビーズを回収することで、ハイブリッドを選択的に回収することが可能である。

## 【 0 0 2 2 】

工程 f では、工程 e で回収したハイブリッドからプライマーを除去し、ウイルス核酸が組み込まれた宿主ゲノムの断片化 DNA を得る。ハイブリッド形成が生じない条件下で、磁力を利用して磁性ビーズを回収することで、ビオチン標識されたプライマーのみを除去することが可能である。

## 【 0 0 2 3 】

工程 g では、工程 f で得たウイルス核酸が組み込まれた宿主ゲノムの断片化 DNA の配列決定を行い、ゲノムアセンブリを行うことで、ウイルス核酸の宿主ゲノムへの組み込み部位を決定する。

## 【 0 0 2 4 】

かかる方法は、Agilent's SureSelect Target Enrichment System (登録商標) を利用して行うことも可能である。

## 【 0 0 2 5 】

本発明の一実施形態において、ウイルス核酸の宿主ゲノムへの組み込み部位に対応する、非組み込みアレルにおける DNA メチル化頻度を測定する方法は、

a) ウイルス核酸とハイブリダイズするプライマーからなるプライマーライブラリーを準備する工程であって、プライマーライブラリーはウイルスの全核酸領域をカバーするものであり、プライマーは標識されている、工程

b) 宿主ゲノムを断片化する工程

c) 宿主ゲノムの断片化 DNA を増幅する工程

d) 宿主ゲノムの断片化 DNA とプライマーをハイブリダイズする工程

e) 宿主ゲノムの断片化 DNA 及びプライマーのハイブリッドを回収する工程

f) 回収したハイブリッドからプライマーを除去する工程

g) プライマーが除去された宿主ゲノムの断片化 DNA の配列決定を行い、ウイルス核酸の宿主ゲノムへの組み込み部位を決定する工程

h) ウイルス核酸の宿主ゲノムへの組み込み部位に対応する、非組み込みアレルにおいて DNA メチル化頻度を測定する工程を含む。

## 【 0 0 2 6 】

工程 a ~ 工程 g は、ウイルス核酸の宿主ゲノムへの組み込み部位を決定する方法で説明した通りである。

## 【 0 0 2 7 】

工程 h は、工程 g で決定されたウイルス核酸の宿主ゲノムへの組み込み部位に対応する、ウイルス核酸の組み込みが生じていないアレルにおいて DNA メチル化頻度を測定する。この測定には、重亜硫酸塩処理 - パイロシーケンス法とアレル特異的 PCR とを組み合わせたアレル特異的 DNA メチル化分析を利用することが可能である。

10

20

30

40

50



## 【0028】

本発明の一実施形態において、ウイルスに感染した患者におけるウイルス関連疾患の発症又は重症化のリスクの指標を得る方法は、

a) ウイルス核酸とハイブリダイズするプライマーからなるプライマーライブラリーを準備する工程であって、プライマーライブラリーはウイルスの全DNA領域をカバーするものであり、プライマーは標識されている、工程

b) 患者のゲノムを断片化する工程

c) 患者のゲノムの断片化DNAを増幅する工程

d) 患者のゲノムの断片化DNAとプライマーをハイブリダイズする工程

e) 患者のゲノムの断片化DNA及びプライマーのハイブリッドを回収する工程

f) 回収したハイブリッドからプライマーを除去する工程

g) プライマーが除去された患者のゲノムの断片化DNAの配列決定を行い、ウイルス核酸の患者のゲノムへの組み込み部位を決定する工程

h) ウイルス核酸の患者のゲノムへの組み込み部位に対応する、非組み込みアレルにおいてDNAメチル化頻度を測定する工程

を含み、

DNAメチル化頻度をウイルス関連疾患の発症又は重症化のリスクの指標とする。

## 【0029】

工程a～工程hは、宿主を患者に置き換えた点以外は、ウイルス核酸の宿主ゲノムへの組み込み部位に対応する、非組み込みアレルにおけるDNAメチル化頻度を測定する方法で説明した通りである。

## 【0030】

非組み込みアレルにおけるDNAメチル化頻度を測定することで、組み込まれたウイルス核酸がDNAメチル化を受けやすいか否かを予測することが可能となり、組み込まれたウイルス核酸が発現し易いか否か、ひいてはウイルス関連疾患の発症又は重症化につながるか否かを予測することが可能となる。DNAメチル化頻度の高い領域に組み込まれたウイルス核酸は、その後DNAメチル化を受けやすくなり、ウイルス核酸の発現が抑制されることとなり、ウイルス関連疾患の発症又は重症化のリスクが低いと判断できる。逆に、DNAメチル化頻度の低い領域にウイルス核酸が組み込まれると、ウイルス関連疾患の発症又は重症化のリスクが高いと判断できる。

## 【0031】

ここで、ウイルス関連疾患とは、ウイルスの種類に応じて異なる。例えば、ウイルスがHBV及びHCVの場合は、代表的な疾患は肝炎、肝硬変及び肝細胞癌であり、ウイルスがHPVの場合は、代表的な疾患は尖圭コンジローマ及び子宮頸癌であり、ウイルスがHTLVの場合は、代表的な疾患は成人T細胞白血病であり、ウイルスがHIVの場合は、代表的な疾患は後天性免疫不全症候群であり、ウイルスがHHV6の場合は、代表的な疾患は突発性発疹である。

## 【実施例】

## 【0032】

実施例1：HBV-HCC組織における腫瘍関連遺伝子のCpGアイランドのDNAメチル化頻度の測定

メチル化CpGアイランド(CGI)増幅マイクロアレイ(MCAM)分析を行って、HBV抗原陽性のヒト肝細胞癌由来であるPLC/PRF/5(別名Alexander)細胞株及び一次HCC試料(HBV陽性がn=4、HCV陽性がn=5)におけるメチル化遺伝子の選別を行った。健常ボランティアの末梢血リンパ球(PBL)混合物又は近接非腫瘍試料のCGIのDNAメチル化状態と比較して、PLC/PRF/5細胞株及びHBV-HCC試料では、顕著なDNAメチル化の頻度は少なかった。重亜硫酸塩処理-パイロシーケンス法でも、PLC/PRF/5細胞株及びHBV-HCC試料において、候補遺伝子のメチル化頻度は高くなかった。

## 【0033】

10

20

30

40

50

これらの結果は、腫瘍関連遺伝子のプロモーターCGIは、HCV-HCCと比較して、HBV-HCCでは通常メチル化していないことを示唆している。

【0034】

実施例2：HBVのX遺伝子プロモーターにおけるDNAメチル化

HBVのX遺伝子プロモーターのDNAメチル化レベルを、重亜硫酸塩処理-パイロシーケンス法により、16のHBV-HCC試料、15の近接非腫瘍試料及びPLC/PRF/5細胞株について分析した。結果を図1に示す。ほとんどのHBVゲノムにおいて、前がん病変よりもメチル化しているものの、非メチル化状態のHB-XをコードするHBV遺伝子を保有していた。

【0035】

さらに、組み込まれた染色体に基づいて、X遺伝子のDNAメチル化レベルを調べた。結果を図2に示す。驚いたことに、組み込まれたX遺伝子のDNAメチル化レベルは、組み込まれた染色体によって異なっていた。これらの結果は、組み込み部位に依存してHBVのメチル化の広がりに関して何らかの規則があることを示唆している。

【0036】

X遺伝子プロモーターのメチル化レベルとLINE-1及びAluリピートのメチル化レベルとの関係についても調べたが、両者には何の関係も見出せなかった。

【0037】

実施例3：HBV組み込みのFISH分析

PLC/PRF/5細胞株にHBVが存在することを確かめるために、蛍光インサイチュアハイブリダイゼーション(FISH)を行った。PLC/PRF/5細胞株において、HBV配列がヒトゲノムに組み込まれていることを確認した。

【0038】

実施例4：Alu-PCR及びNGSによるHBV DNA組み込み部位配列の分析

Alu-PCRにより、PLC/PRF/5細胞株におけるHBV DNA組み込み部位の分析を行った。しかしながら、一つのHBV DNA組み込み部位配列の増幅しかできなかった。そこで、HBV DNA組み込み部位配列のための、次世代シーケンサー(NGS)分析を開発した。Agilent's SureSelect Target Enrichment System(登録商標)はNGSを最適化するための高度に効率的なハイブリッド選択技術である。本発明者らは、このシステム及びHBVの遺伝子型AからJのDNA配列をカバーする12391個のカスタムベイトを利用し、FLXチタニウムNGSシステム(ロシュ)に実験を最適化した。2つの細胞株及び4つの対臨床試料において、断片化したHBV配列の組み込みを特徴づけることができた。平均読み込み長さは333.14であった。PLC/PRF/5細胞株における、HBVのDNAの組み込み部位を特定した結果の一例を図3に示し、HBV-VCCの臨床試料における、HBVのDNAの組み込み部位を特定した結果の一例を図4に示す。PLC/PRF/5細胞株の場合、組み込みが起きたのは、インタージェニック(40%)、イントロン(40%)、プロモーター(7%)、双方向性プロモーター(13%)及びエクソン(0%)であった。DNA組み込みパターンはHBV-HCCの臨床試料と酷似しているため、PLC/PRF/5細胞株は、肝細胞癌発症におけるHBVの役割を明らかにするのに役立つモデルシステムであると考えられる。

【0039】

実施例5：PLC/PRF/5細胞株における組み込まれたHBVのDNAメチル化

ディープ重亜硫酸塩処理-パイロシーケンス法により、組み込まれたHBVのDNAメチル化を分析した。ヒトゲノムに組み込まれたHBV配列は低メチル化及び高メチル化の両方があることを見出した。共通したHBV組み込み部位は存在しなかった。一方、メチル化の広がりには何らかの規則がありそうであった。そこで、アレル特異的DNAメチル化分析により、HBVゲノムのメチル化状態をさらに決定した。結果を図5に示す。最も重要なことに、メチル化されたヒトゲノムに組み込まれた場合、HBVゲノムは顕著なメチル化を受けているのに対して、非メチル化ヒトゲノムに組み込まれた場合、HBVゲノ

10

20

30

40

50

ムは非メチル化のままであった。一方、HBVのメチル化パターンとヒトゲノムのヒストン修飾とは何の相関もなかった。

【0040】

実施例6：HepG2.2.15細胞株における組み込まれたHBVのDNAメチル化  
HBV抗原陰性のヒト肝癌株であるHepG2にHBV DNAをトランスフェクトしたHepG2.2.15細胞株について、組み込まれたHBVのDNAメチル化を分析した。PLC/PRF/5細胞株の結果と同様に、メチル化されたヒトゲノムに組み込まれた場合、HBVゲノムは顕著なメチル化を受けているのに対して、非メチル化ヒトゲノムに組み込まれた場合、HBVゲノムは非メチル化のままであった。HepG2.2.15細胞株は、マルチコピーのHBV DNAが安定的にトランスフェクトされた細胞株であるため、自然のHBV感染を模したものである。そうであっても、HBVの組み込みとヒト及びHBVの両方のエピゲノムとの関連は、臨床試料においてさらに調べる必要がある。

10

【0041】

実施例7：HBV-HCC組織における組み込まれたHBVのDNAメチル化  
上記のインビトロの結果が、実際のヒト腫瘍と関連しているのかを決定するため、HCC及び近接非腫瘍組織からなる外科検体対におけるHBV及びヒトのゲノムメチル化状態を調べた。結果を図6に示す。PLC/PRF/5細胞株及びHepG2.2.15細胞株の結果と同様に、メチル化されたヒトゲノムに組み込まれた場合、HBVゲノムは顕著なメチル化を受けているのに対して、非メチル化ヒトゲノムに組み込まれた場合、HBVゲノムは非メチル化のままであった。

20

【0042】

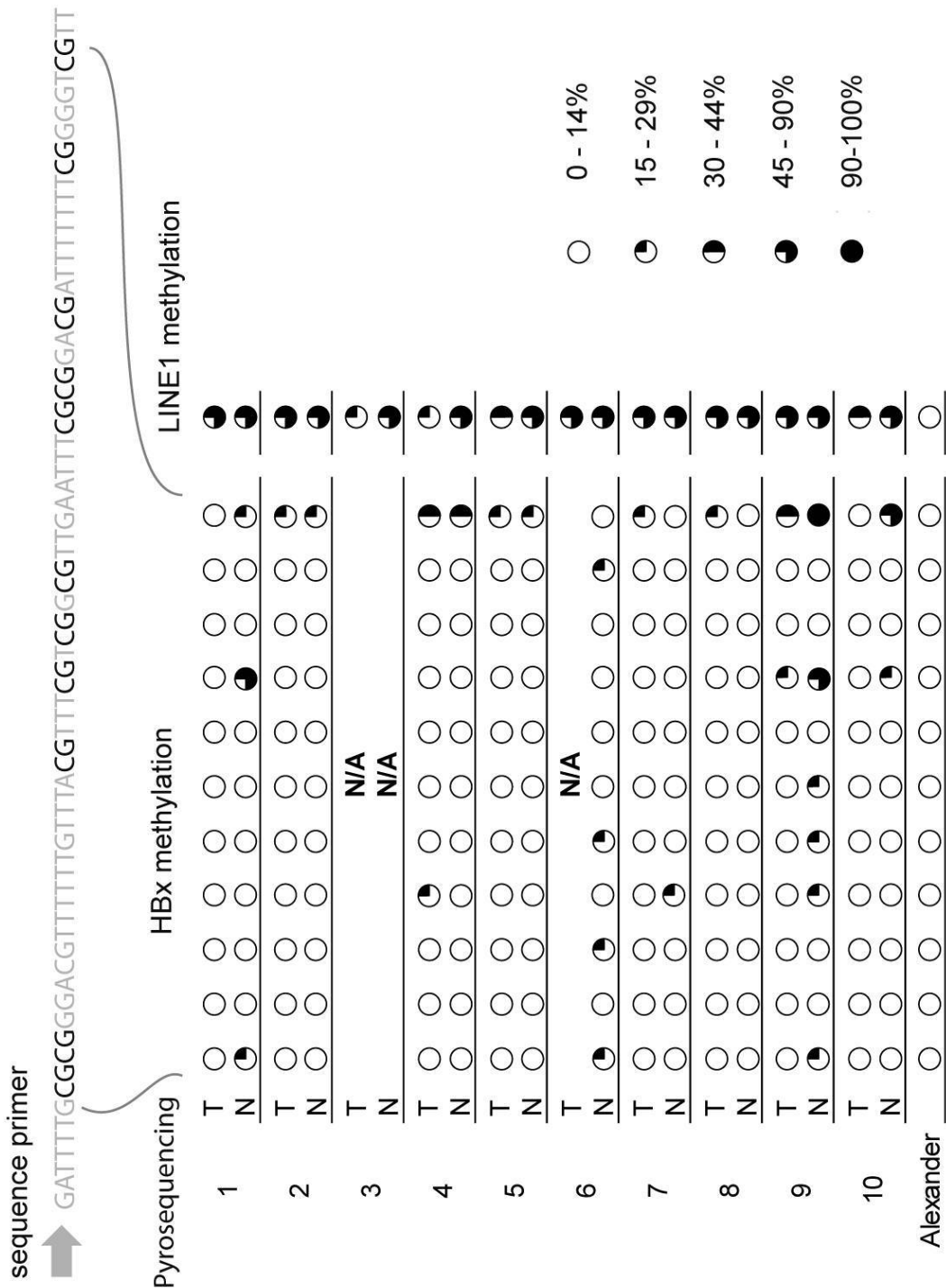
実施例8：NGSによるHPV DNA組み込み部位配列の分析

実施例4と同様に、Agilent's SureSelect Target Enrichment System（登録商標）と、HPV-16のDNAをカバーする391個及びHPV-18のDNA配列をカバーする397個の計788個のカスタムベイトを利用し、FLXチタニウムNGSシステム（ロシュ）に実験を最適化した。HPV抗原陽性のヒト子宮頸癌由来であるHeLa、SiHa、SKG-I、SKG-II及びSKG-IIIIaの5つの細胞株全てにおいて、断片化したHPV配列の組み込みを特徴づけることができた。平均読み込み長さは350.93であった。HeLa、SiHa、SKG-I、SKG-II及びSKG-IIIIa細胞株における、HPVのDNAの組み込み部位を特定した結果の一例を図7に示す。

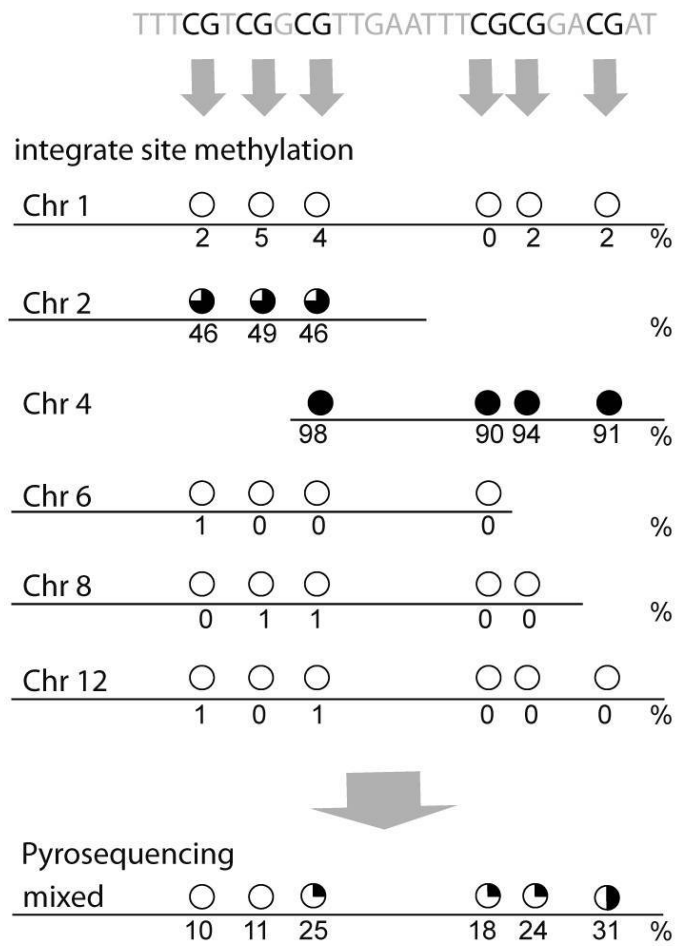
30

【 図 7 】

細胞株	染色体		
HeLa	Chr.8q24.21	HPV-18 : 5736	Human Chr.8 : 128,230,632
	Chr.8q24.21	Human Chr.8 : 128,234,255	HPV-18 : 25
	Chr.8q24.21	Human Chr.8 : 128,233,367	HPV-18 : 3100
	Chr.8q24.21	Human Chr.8 : 128,240,389	HPV-18 : 7311
SiHa	Chr.13q22.1	HPV-16 : 3384	Human Chr.13 : 73,788,866
	Chr.13q22.1	Human Chr.13 : 74,087,558	HPV-16 : 3128
SKG- I	Chr.12p13.2	HPV-18 : 4844	Human Chr.12 : 11,884,619
	Chr.12p13.2	Human Chr.12 : 11,884,567	HPV-18 : 3797
SKG- II	Chr.3q22.2	Human Chr.3 : 135,087,965	HPV-18 : 2107
	Chr.3q28	Human Chr.3 : 190,949,391	HPV-18 : 6008
SKG- IIIa	Chr.10p24.2	Human Chr.10 : 101,531,589	HPV-16 : 5119
	Chr.10q24.2	HPV-16 : 2232	Human Chr.10 : 101,512,900

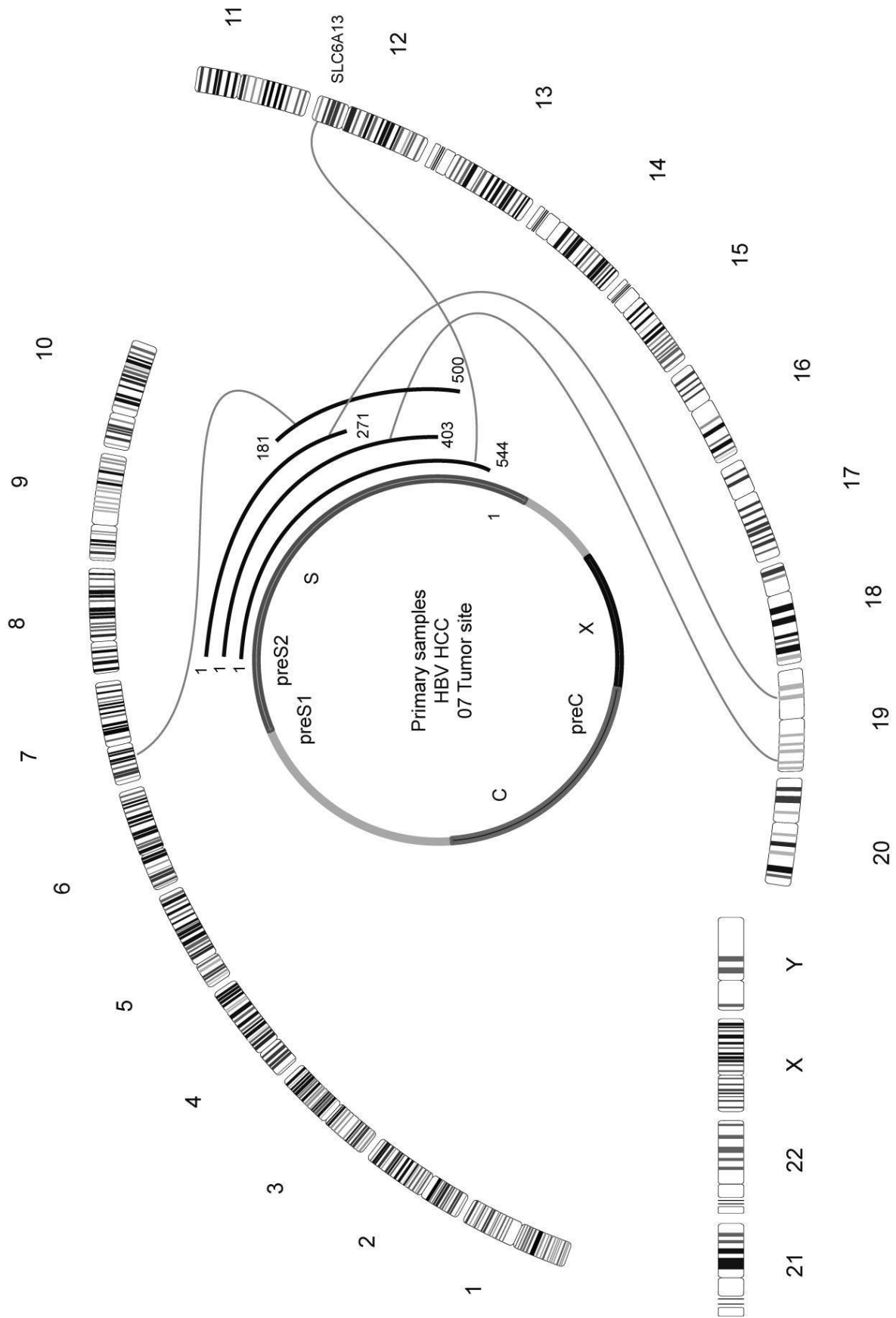


【 図 2 】

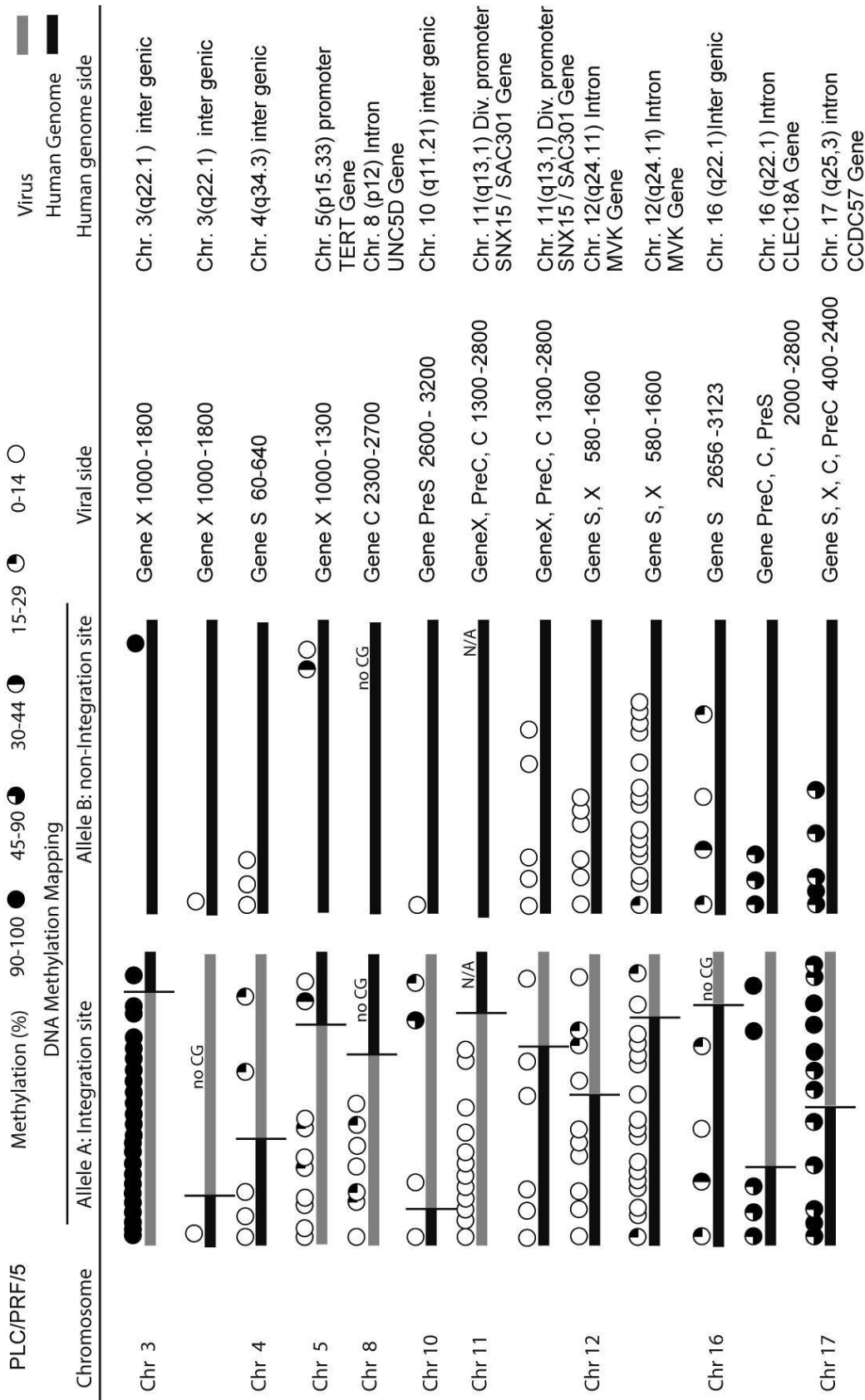




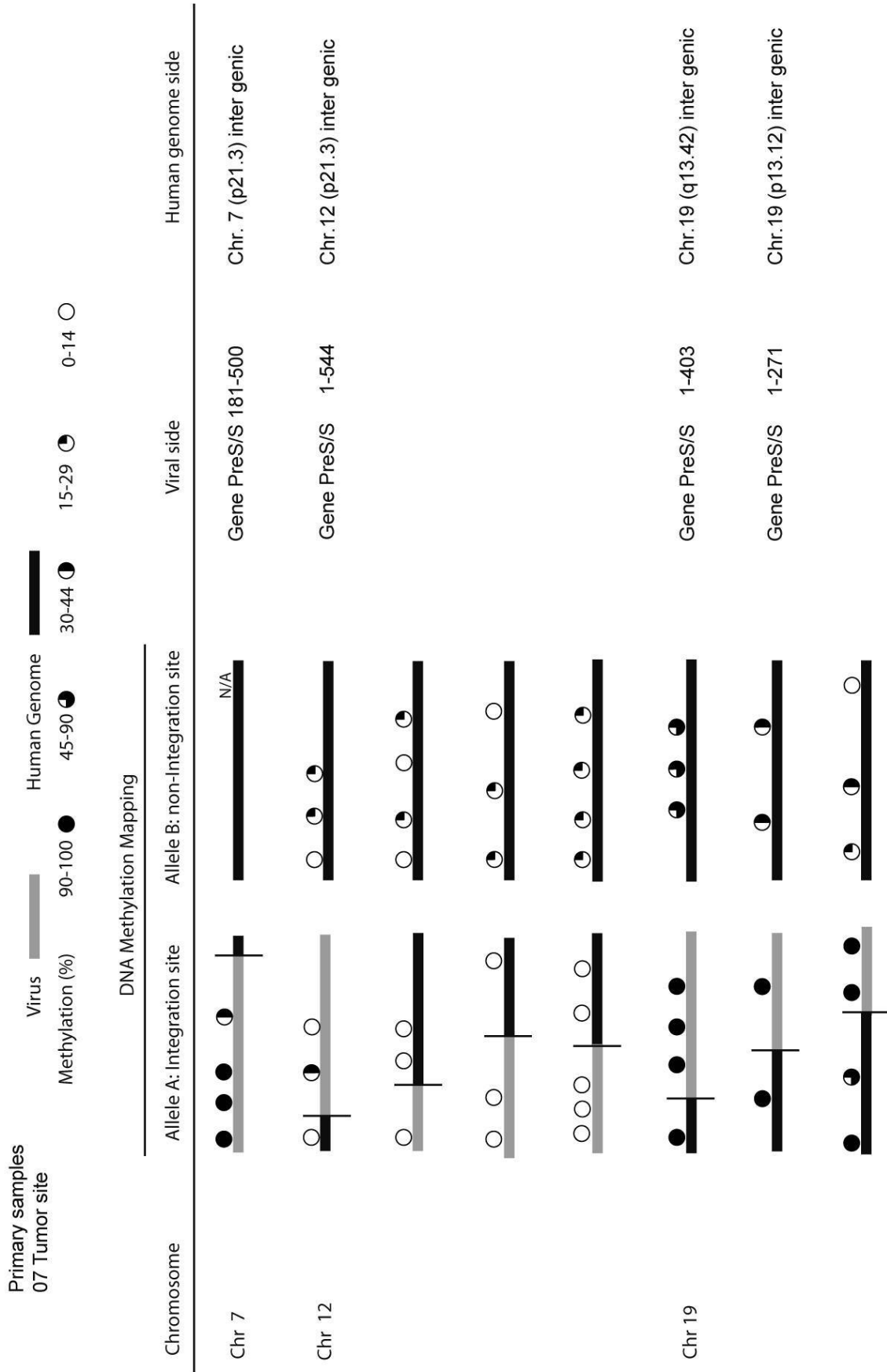
【 図 4 】







【 図 6 】



【 配列表 】

2015133957000001.app

フロントページの続き

Fターム(参考) 4B024 AA12 CA09 HA12 HA19

4B063 QA13 QQ02 QQ42 QR08 QR32 QR55 QR62 QS25 QS34 QX02