



TITLE:

Comprehensive analysis of full-length transcripts reveals novel splicing abnormalities and oncogenic transcripts in liver cancer(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Kiyose, Hiroki

CITATION:

Kiyose, Hiroki. Comprehensive analysis of full-length transcripts reveals novel splicing abnormalities and oncogenic transcripts in liver cancer. 京都大学, 2023, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2023-05-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k24783>

RIGHT:

Kiyose et al. PLOS Genetics 第18巻 第(8)号: e1010342

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1010342>

京都大学	博士 (医学)	氏名	清瀬 大樹
論文題目	Comprehensive analysis of full-length transcripts reveals novel splicing abnormalities and oncogenic transcripts in liver cancer (完全長転写産物の網羅的解析による肝細胞癌における新規スプライシング異常と発がん性転写産物の解明)		
(論文内容の要旨) 肝癌は予後不良の疾患であり、世界全体の部位別がん死亡率では第3位である。また、日本における部位別がん死亡率では第5位であり、死亡実数は年間2万人を超えている。それら肝癌の多くは、B型肝炎ウイルス (HBV) あるいはC型肝炎ウイルス (HCV) の持続感染による慢性肝炎、肝硬変を背景としており、これらの発癌メカニズムや病態の解明は、わが国の疾病対策上で重要な課題の一つとなっている。 近年、短鎖シーケンサー (いわゆる次世代シーケンサー) を用いた肝癌の大規模ゲノム・エクソーム解析が行われている。国内の肝癌症例については、国際がんゲノムコンソーシアム (ICGC) に参画した理化学研究所を中心として大規模なゲノム・エクソーム解析が行われ、数多くの変異が同定された。しかしその一方で、短鎖シーケンサーでは読み取り長が短いため、原理的に検出困難な領域が多く存在するという問題に直面した。特にショートリードを繋げる従来のRNA-seqでは、スプライシングバリエントの細かい識別が困難であった。選択的スプライシングによって一つの遺伝子から生じた多様なスプライシングバリエントは、mRNAの安定性、局在および翻訳の様式が異なり、細胞・組織レベルで機能的変化を及ぼす可能性がある。したがって、肝癌の転写異常の全貌を明らかにするには、転写されたゲノム領域を決定するだけでなく、転写産物の完全長配列を決定する必要がある。長鎖シーケンサーのMinIONは、最長数百 kbp以上のシーケンス長を得ることが可能である。この特性を活かして、短鎖シーケンサーでは解析が困難であった転写産物全長を読み取り、複雑な転写異常の全貌を明らかにすることが出来る。しかし、MinIONから出力された配列情報は、そのエラー率の高さなどからデータの解析は困難であった。 本研究では、完全長cDNA配列を解析するためにSPLICEという解析パイプラインを開発した。SPLICEは、スプライシングジャンクションのアラインメントエラーやマップピングエラーを考慮することで、アノテーションエラーやアーチファクトの融合遺伝子を除去することが可能である。MCF-7細胞株とPCRを用いた検証により、本解析手法の信頼性が示された。42組の肝細胞癌(HCC)の癌部および対象非癌部のcDNA配列をMinIONで読み取り、SPLICEで解析した。解析の結果、癌部と非癌部ではタンパク質をコードする遺伝子から46,663個の転写産物が検出され、そのうち5,366個(11.5%)が新規転写産物であった。新規エクソンの約40%はトランスポーザブルエレメント(TE)に由来しており、それらはTEに由来する既知のエクソンよりも有意に高い割合を示した。癌部と非癌部の転写産物の発現量レベルを比較すると、9,933個の転写産物が有意に発現変化していた(DETs)。興味深いことに、LINE1-METを含む746個のDETを持つ遺伝子は、遺伝子レベルの解析では有意な発現差は見つからなかった。また、HBVのX蛋白をエンコードするHBx遺伝子とヒトのTEの融合転写産物がHCCで過剰発現していることがわかった。DETのin vitro実験では、LINE1-METとHBx-ヒトTEが細胞増殖を促進することが示された。さらに、融合遺伝子の検出により、ショートリードでは検出されなかった新規の融合遺伝子が検出された。これらの結果は、完全長トランスクリプトーム解析の有用性と、発がんにおけるスプライシングバリエントの重要性を示唆するものである。			

(論文審査の結果の要旨)

短鎖シーケンサーを使用した肝細胞癌のゲノム・エクソーム解析は多くの変異を同定したが、トランスクリプトーム解析ではスプライシングバリエントの識別に問題があった。肝細胞癌の転写異常を明らかにするためには、転写産物の完全長配列を決定する必要があり、長鎖シーケンサーのMinIONはその役割を果たすことができる。しかし、MinIONから得られる情報は、そのエラー率の高さなどから解析が困難であった。

本研究は、肝細胞癌の完全長cDNA配列解析を行い、その転写異常を明らかにすることを目的としている。解析には、長鎖シーケンサーのMinIONを用いて開発された解析パイプライン「SPLICE」が使用された。42組の肝細胞癌患者の癌部と非癌部のcDNA配列が解析され、新規転写産物やトランスポーザブルエレメント(TE)由来の新規エクソンなど、多数のスプライシングバリエントが同定された。さらに、新規の融合遺伝子の存在や、TE由来のエクソンを持つスプライシングバリエントが癌の発生に重要な役割を果たしていることが示された。本研究は、完全長トランスクリプトーム解析の有用性と、がんにおけるスプライシングバリエントの重要性を示した。

以上の研究は、肝細胞癌の解明に貢献し、疾患の理解に寄与するところが大きい。

したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和5年2月22日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降