

論文の内容の要旨

論文題目

Analysis of resistant factors for DNA methylation acquisition by Epstein-Barr virus infection

(EBウイルス感染が誘導するエピゲノム異常におけるDNAメチル化抵抗因子の解析)

氏名 南波 宏枝

【背景】

癌はゲノム異常およびエピゲノム異常の蓄積により発症する。ゲノム DNA のメチル化異常は癌における代表的なエピゲノム異常であり、特に遺伝子プロモーター領域における異常高メチル化は癌抑制遺伝子を不活化する主要な分子機構であり、癌発生に深く関わる。最も高メチル化な癌のひとつとして知られるのが Epstein-Barr ウイルス (EBV) 関連胃癌であり、低メチル化胃細胞株へ *in vitro* に EBV 感染することにより、その特異的な DNA 超高メチル化を誘導することができる [TCGA Network *Nature* 2014, Matsusaka *et al. Cancer Res.* 2011]。

EBV ウイルス感染に誘導される高メチル化の分子機構は未だ不明だが、ウイルスタンパク質である LMP2A が宿主側の転写因子 STAT3 をリン酸化することで DNA メチル化酵素 DNMT を活性化することが報告されている [Matsusaka *et al. Cancer Res.* 2011, Kaneda *et al. Cancer Res.* 2012]。DNMT を始めとしたメチル化誘導因子の活性化と、それに拮抗するメチル化抵抗因子抑制のバランスの元、メチル化状態の維持や高メチル化誘導が起こると考える。

一方 EBV 関連胃癌以外にも血液腫瘍やグリオーマにて DNA 高メチル化サブタイプが知られている。15%の血液腫瘍患者にて *TET2* の変異が認められ、また *TET2* 変異による高メチル化が白血病を誘導していることが報告された [Delhommeau *et al. NEJM* 2009, Rasmussen *et al. Genes Dev.* 2015]。*TET2* とは DNA 脱メチル化酵素 TET ファミリーの 1 つであり、メチル化シトシンをヒドロキシメチル化、フォルミル化、カルボキシル化へと段階的に酸化させる。また、TET ファミリーの補酵素として知られる α ケトグルタル酸の生成酵素 *IDH1*, *IDH2* の変異が、グリオーマ高メチル化サブタイプ G-CIMP (Glioma CpG island methylator phenotype) で知られる。

【目的】

本研究では、EBV 関連高メチル化胃癌の分子機構を明らかにするため、RNA-seq により網羅的遺伝子発現解析を行い、メチル化抵抗因子候補として TET 酵素に着目した。中でも EBV 感染により最も発現が減少した *TET2* に着目し、メチル化誘導に対する抵抗性を検証した。

【方法】

EBVの *in vitro* 感染には、Akata システムを用いた(図 1A)。EBV 感染 B 細胞である Akata 細胞株を IgG 抗体により刺激し、溶解感染へと移行させる。それらを胃癌細胞株と共培養することで、EBV 感染胃癌細胞株を作成する。

ゲノム上のヒドロキシメチル化部位を特定するため、メチル化との識別が可能なヒドロキシメチル化 DNA 免疫沈降シーケンス法 (hMeDIP-seq) を行った(図 1B)。

メチル化に関しては、ゲノムワイドな解析にはメチル化 DNA 免疫沈降シーケンス法 (MeDIP-seq) を、定量的には infinium 450K

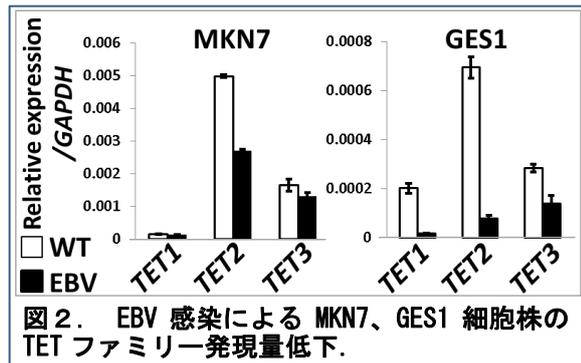
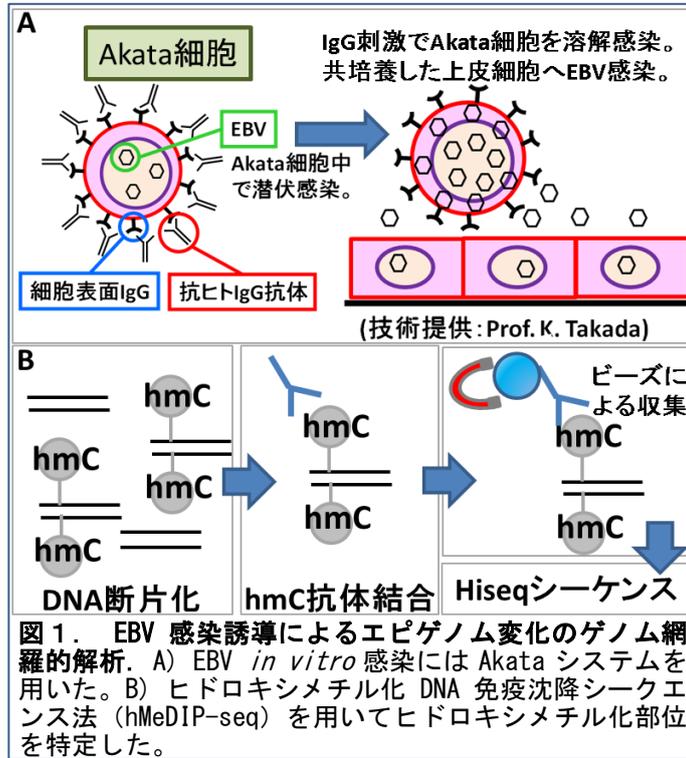
ビーズアレイ解析を用いた。網羅的な遺伝子発現解析には RNA-seq 法を、定量的発現解析には real-time RT-PCR 法を用いた。

【結果と考察】

1. EBV 感染における TET ファミリーの発現低下

低メチル化胃癌細胞株 MKN7 の野生株 (MKN7_WT), EBV 感染株 (MKN7_EBV) の RNA-seq 解析を行ったところ、脱メチル化酵素である *TET1*, *TET2* 発現低下が認められ、RT-PCR での定量的解析によってもそれらの発現減少が認められた(図 2)。EBV 感染により異常高メチル化が誘導されるもうひとつの細胞株である胎児由来胃上皮細胞 GES1 でも同様に、*TET1-3* 全ての TET ファミリーの発現低下が RT-PCR にて認められた(図 2)。

その中でも最も発現の低下した *TET2* に着目した。EBV 感染により発現上昇が認められた 7 種の *TET2* 標的 miRNA を MKN7, GES1 細胞株にトランスフェクションした後 48 時間後に *TET2* の遺伝子発現を調べた結果、7 種全ての miRNA で *TET2* の発現低下が認められた。



2. TET2 標的遺伝子と EBV 感染時メチル化標的遺伝子の比較

TET2 の標的遺伝子を調べるため強制発現株を作成した(図 3A)。hMeDIP-seq を行い、TET2 強制発現下に転写開始地点から±1 K bp 以内でヒドロキシメチル化を獲得する遺伝子、すなわち TET2 によるヒドロキシメチル化の標的遺伝子 634 個を抽出した。これらの標的遺伝子を EBV 感染によるメチル化標的遺伝子と比較した

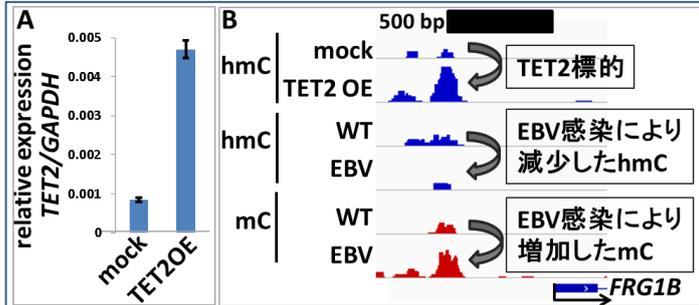


図 3. TET2 強制発現下でのヒドロキシメチル化及びメチル化解析. A) GES1 細胞株において TET2 強制発現株を作成した。B) TET2 標的遺伝子は、EBV 感染時にヒドロキシメチル化レベルが低下すると同時にメチル化レベルが上昇した。

ところ、TET2 標的遺伝子 629 個のうち 192 個が EBV 感染時メチル化標的遺伝子と重なった ($P < 0.021$)。このことから、TET2 によるヒドロキシメチル化がメチル化の抵抗因子として働き、EBV 感染時の TET2 の発現減少により、ヒドロキシメチル化が低下し、その基質であるメチル化が上昇したと考えられる(図 3B)。

また、上記の 192 遺伝子は、TET2 強制発現によるヒドロキシメチル化とともに DNA メチル化量が $23.0 \pm 0.5\%$ から $20.3 \pm 0.5\%$ へ低下したが ($P < 10 \times 10^{-16}$)、EBV によるメチル化標的でない 442 遺伝子に関しても、TET2 強制発現により有意にメチル化が低下していた ($P < 10 \times 10^{-16}$)。これらのことから、EBV 感染誘導メチル化遺伝子に限らず、全ての TET2 標的遺伝子においてヒドロキシメチル化はメチル化の抵抗因子として働いていると考えられる。

3. TET2 ノックダウン株への EBV 感染による更なる高メチル化

次に shRNA による TET2 のノックダウンを行い(shTET2)、その後 EBV を感染させて (shTET2_EBV) メチル化レベルを検証した(図 4A)。

EBV 感染 72 日後のメチル化状態を確認すると、コントロール株(shCTRL)に EBV を感染させた細胞株(shCTRL_EBV)では 1008 遺伝子に新規メチル化が入ったのに対し、shTET2_EBV では 3334 もの遺伝子にメチル化が入った(図 4B)。TET2 のノックダウンによりメチル化抵抗性が低下し、更なるメチル化が入ったと考えられる。

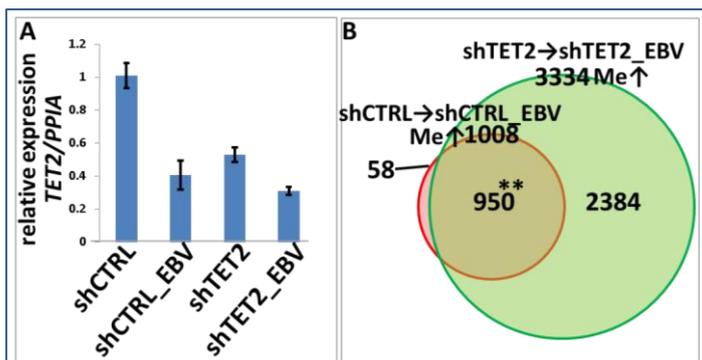


図 4. TET2 ノックダウン EBV 感染株におけるメチル化解析. A) MKN7 細胞株の TET2 をノックダウンした後、EBV を感染させた。B) shCTRL_EBV の 1008 個に比べ、shTET2_EBV では 3334 個もの遺伝子にメチル化が誘導された。

続いてプロモーター領域に完全にメチル化が誘導されたメチル化感受性遺伝子に注目した。shCTRL_EBV では 339 の遺伝子がメチル化感受性となったのに対し、shTET2_EBV では 1508 もの遺伝子が感受性となった。コントロール株、TET2 ノックダウン株共に感受性となった 298 遺伝子に関しても、TET2 ノックダウンによりメチル化レベルは更に上昇し、また遺伝子発現レベルの低下も伴った。

続いて、shCTRL_EBV にて、メチル化が誘導されるも転写開始点近傍ではメチル化が入らない 314 個のメチル化部分抵抗性遺伝子に着目した。314 遺伝子のうち 63 遺伝子が、shTET2_EBV では転写開始点全域にメチル化の入る感受性プロモーター

となった(図 5A, B)。これらメチル化感受性となった遺伝子 63 個は発現も有意に低下した ($P < 0.005$) (図 5C)。

これらのことより、TET2 が部分抵抗性プロモーターにて新規メチル化の抵抗因子として働いていたが、ノックダウンによりその抵抗が減少し、部分抵抗性から感受性プロモーターへと変化したと考えられる。

4. TET2 ノックダウンのみによる効果

最後に shCTRL と shTET2 とで比較し TET2 ノックダウンのみによる新規メチル化遺伝子を探したところ、そのような遺伝子は 1 つも抽出されなかった。このことより、通常の培養条件では異常メチル化を誘導する圧力はないため TET2 をノックダウンしても新規メチル化は生じず、EBV 感染時にはメチル化圧の原因となる何らかのメチル化誘導因子が存在し、かつ抵抗因子である TET2 の発現低下により高メチル化が生じると考えられた。

【結論】

EBV 感染によるメチル化誘導において、TET2 によるヒドロキシメチル化がメチル化抵抗因子として働いており、TET2 発現低下による抵抗性の低下が、新規メチル化誘導の重要な要因になっていると考えられた。

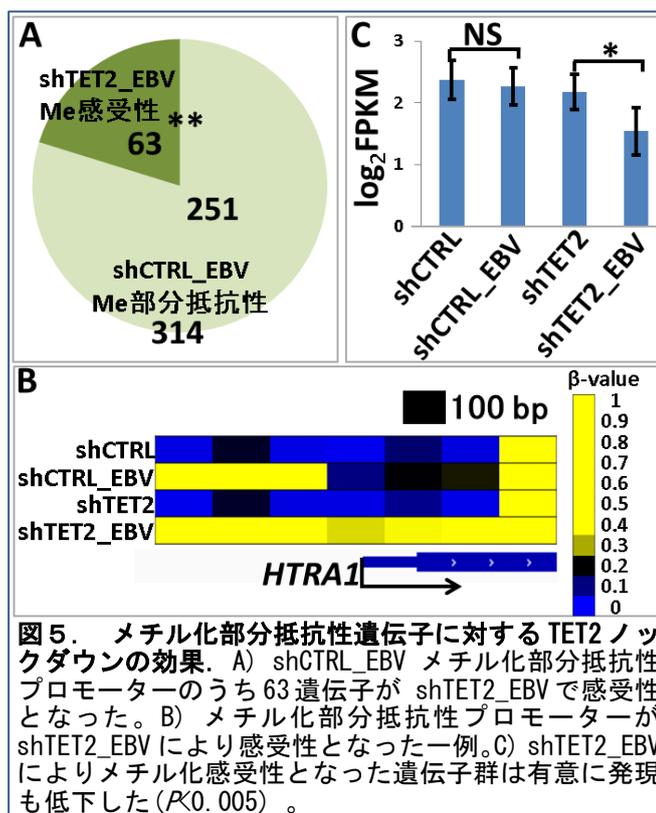


図5. メチル化部分抵抗性遺伝子に対する TET2 ノックダウンの効果. A) shCTRL_EBV メチル化部分抵抗性プロモーターのうち 63 遺伝子が shTET2_EBV で感受性となった。B) メチル化部分抵抗性プロモーターが shTET2_EBV により感受性となった一例。C) shTET2_EBV によりメチル化感受性となった遺伝子群は有意に発現も低下した ($P < 0.005$)。