博士論文

論文題目 ヒト胃癌において

EB ウイルス感染が誘導するエピゲノム異常の解明

氏名

船田 さやか

目次

要旨	
緒言	7
第1部 EBV 感染が誘導する新規 DNA メチル化	
第1章 序論	
1.1 DNA メチル化機構と癌	
1.2 Epstein-Barr virus (EBV)	11
1.3 EBV 関連胃癌と DNA メチル化	
1.4 DNA メチル化解析技法	
1.4.1 バイサルファイト反応	
1.4.2 パイロシークエンス法	
1.4.3 Infinium ビーズアレイ[47]	15
1.5 目的	
第2章 材料と方法	
2.1 材料	19
2.1.1 細胞株	19
2.1.2 培養液	19

2.2 方	法	20
2.2.1	Akata システム[49]	20
2.2.2	DNA 抽出	21
2.2.3	バイサルファイト処理	21
2.2.4	PyroMarkQ24/Q96 によるメチル化解析	21
2.2.5	Infinium ビーズアレイによるメチル化解析	22
2.2.6	CpG 比によるプロモーター分類	23
2.2.7	階層的クラスタリング	23
2.2.8	転写開始点周囲のメチル化状態の可視化	24
2.2.9	RNA 抽出	24
2.2.10	マイクロアレイを用いた発現解析	25
2.2.11	遺伝子オントロジー(GO: Gene Ontology) 解析	25
第3章 約	吉果	26
3.1 不过	死化胃粘膜上皮への EBV 感染による新規 DNA メチル化誘導	26
3.2 EB	V 感染による DNA メチル化の時系列的解析	28
3.3 転	写開始点周囲のメチル化状態の可視化	30
3.3.1	メチル化しない CpG サイトの分布	30
3.3.2	転写開始点周囲の異常メチル化誘導パターン	32
3.3.3	メチル化誘導状態別遺伝子グループ分類の特徴	33

第4章 考察	43
4.1 EBV 感染が誘導する DNA メチル化の時系列変化とその機構	43
4.2 転写開始点 DNA メチル化抵抗性と遺伝子発現	44
第2部 EBV 感染が誘導するヒストン修飾変化	46
第1章 序論	46
1.1 ヒストン修飾	46
1.2 ヒストン修飾と癌	47
1.3 ヒストン修飾変化と DNA メチル化	48
1.4 目的	48
第2章	49
2.1 材料	49
2.2 方法	49
2.2.1 クロマチン免疫沈降(Chromatin immunoprecipitation: ChIP)	49
2.2.2 ChIP サンプルの濃縮確認	51
2.2.3 次世代シーケンサーによる ChIP サンプルの解析	52
2.2.4 シーケンスリードの解析	52
2.2.5 転写開始点からの位置によるピークの割り当てと分類	52
2.2.6 次世代シーケンサーを用いた発現解析	53

2.2.7 シーケンスリードの解析	53
2.2.8 遺伝子オントロジー(GO: Gene Ontology) 解析	53
第3章 結果	54
3.1 ホストゲノムのゲノムワイドなヒストン修飾変化	54
3.2 ヒストン修飾変化と遺伝子発現	57
3.3 DNA メチル化とヒストン修飾変化の相関	60
第4章 考察	65
総括	70
Buffer 組成	71
プライマー配列	72

謝辞	 5

参考文献

本研究では、Epstein-Barr virus (EBV) 感染によるエピゲノム変化の誘導の解明を 目的として、EBV 感染細胞株の DNA メチル化解析およびヒストン修飾状態解析 を行った。EBV 感染は、ごく短期間に広範な DNA メチル化をホストゲノムに引 き起こし、ヒストン修飾状態の変化も誘導していた。エピゲノム変化の標的と なる遺伝子の発現変化は、EBV 関連胃癌の臨床病理学的、あるいは分子病理学 的特徴をよく説明した。また、転写開始点近傍まで DNA メチル化が誘導されて いても、ヒストン活性化マークが存在するとそれ以上のメチル化は進展せず、 活性化マークが DNA メチル化の抵抗因子である可能性が示された。 緒言

近年、様々な癌種において、塩基配列の変化を示すゲノム異常、遺伝子の増 幅や欠失を示すゲノム構造異常、ゲノム配列への後天的な修飾を介し遺伝子発 現を制御するエピゲノム異常、そしてそれら異常に由来する遺伝子発現異常の 存在が、統合解析により明らかになりつつある。

胃癌では、大規模研究から、ミスマッチ修復遺伝子と関連するマイクロサテ ライト不安定 (Microstatellite instability:MSI) や Epstein-Barr virus (EBV) 関連胃 癌といった分子生物学的性質の異なる複数のサブグループが存在していること が示された[1]。また、臨床検体において、非癌部と癌部を比較し、両者の間で のヒストン修飾状態に変化があることも報告された[2]。このように、正常と胃 癌の間にはエピゲノム状態の違いがあり、癌のサブタイプ間でもエピゲノム状 態の違いがあることがわかってきている。

EBV 関連胃癌では、ゲノムワイドな超高メチル化[3]と SWI-SNF クロマチンリ モデリング遺伝子である ARIDIA の不活化[4, 5]が報告されており、EBV 感染の エピゲノム変化誘導が考えられるが、その全容ならびに誘導機構、癌化への関 与は未だ不明である。

本研究では、EBV 感染が引き起こすエピゲノム異常を明らかにすべく、DNA メチル化解析およびヒストン修飾解析を行った。

7

第1部 EBV 感染が誘導する新規 DNA メチル化

第1章 序論

1.1 DNA メチル化機構と癌

エピゲノムとは、ゲノム配列への後天的な修飾であり、塩基配列を変えるこ となく、体細胞分裂後も安定して保持される遺伝子発現制御機構として働く。 代表的なものとして、DNAメチル化やヒストン修飾が挙げられる[6]。

DNA メチル化は、DNA メチル基転移酵素 (DNA methyl transferase: DNMT)が、 S-アデノシルメチオニン (S-adenosylmethionine: SAM)をメチル基 $(-CH_3)$ 供与 体として、シトシン (C)残基第5位にメチル基を付加し、メチル化シトシン(5mC) を合成する反応である。5mC は、Ten Eleven Translocation (TET)により、ヒドロ キシメチルシトシン (5hmC) へと水酸化され、連続的な酸化反応を経て、最終 的に脱メチル化される[7] (図 1)。



図 1 DNA メチル化 (参考文献[7]より引用) シトシン残基第5位は DNA メチル基転移酵素によりメチル化される。

DNA メチル基転移酵素には DNMT1、DNMT3a、DNMT3b があり、DNMT1 は体細胞分裂時に、DNA メチル化の維持を担当している。*de novo* のメチル化は DNMT3a/3b が責任酵素であるが、癌細胞では DNMT1 も *de novo* のメチル化に 働くという報告がある[8,9]。

DNA メチル化は、主に、シトシン残基とグアニン残基が連続する 5'-CpG-3' (CpG)配列で起こる。この CpG 配列は、約 40~50%のプロモーター領域において、 およそ 500bp~4kbp の短い範囲に密集して存在し、CpG アイランドを形成するこ とが多い[10]。転写開始点プロモーター領域に DNA メチル化による 5mC が存在 すると、CpG 配列を認識する転写因子の結合は阻害され、またメチル化 CpG 結 合ドメイン (Methyl-CpG-Binding Domain: MBD) タンパク質が局在化しクロマ チン構造が変化することで、遺伝子発現は抑制される[11]。

適切な DNA メチル化は、胚発生やゲノムインプリンティング[12]、X 染色体 不活化[13]、細胞分化[14]、RNA スプライシングの制御[15, 16]等に必要とされる。 不適切な DNA メチル化はヒトの病気との関連性が指摘される。ゲノムインプリ ンティング異常だけでなく、たとえば糖尿病[17]、自己免疫疾患[18]、心血管疾 患[19]、そして癌での DNA メチル化異常の報告がされている[20]。癌において 問題になるのは、癌抑制遺伝子や DNA 修復遺伝子の DNA メチル化による発現 抑制である。 ミスマッチ修復遺伝子である *MLH1* のプロモーター領域の DNA メチル化は、 大腸癌[21]、胃癌[22]、類内膜腺癌[23]でみられ、MSI の原因となる。また、細 胞接着に関与する遺伝子である *CDH1* のプロモーター領域の DNA メチル化は、 乳癌[24]、甲状腺癌[25]、胃癌[26]でよく知られている。

そしてゲノムワイドな研究により、大腸癌[27]や胃癌[28]、神経膠腫[29]、その他多くの癌[30]で、CpGアイランドのDNAメチル化で特徴づけられるサブグループがあることが認識された。CpGアイランドメチル化形質 (CpG island methylator phenotype:CIMP)である。

神経膠腫では、クエン酸回路系におけるイソクエン酸脱水酸化酵素である IDH1 体細胞変異と CIMP の関連がわかっている[29]。変異 IDH1 は、2-HG を産 生し、TET 活性を阻害する。そのため、5mC から 5hmC への水酸化が起こらず、 脱メチル化されないため、CIMP が誘導される[31]。

このように、不適切な DNA メチル化による遺伝子抑制が発癌に寄与している こと、その中でも特徴的な DNA メチル化を呈する CIMP というサブグループが あること、そして CIMP の責任因子は CIMP 陽性癌の治療標的となることが示さ れている。

1.2 Epstein-Barr virus (EBV)

Epstein-Barr virus (EBV) は、ヘルペスウイルス科に属する約 184kb の 2 本鎖 DNA ウイルスであり、腫瘍ウイルスに分類される。他のヘルペスウイルス科の ウイルスと同様に、初感染後はホスト体内に潜伏感染し、宿主の免疫抑制状態 によって再活性化する。EBV は全世界の 90%以上の成人に潜伏感染しており、 Hodgkin リンパ腫、免疫抑制状態に起こる日和見リンパ腫、NK/T 細胞性リンパ 腫や、上咽頭癌、胃癌など、様々な腫瘍への関与が指摘されている[32]。

EBV ゲノムはホストゲノムに組み込まれることなく、環状 DNA であるエピソ ームとしてホストゲノムに EBNA1 を介して付着している[33, 34]。潜伏感染時は、 約 80 個程度のウイルス遺伝子のうち、数個から十数個のウイルス遺伝子のみが 発現している。ウイルス遺伝子の発現パターンから、I型、II型、III 型潜伏感染 に分類され、それぞれに特徴的な EBV 関連腫瘍がある[32, 35]。なお、発現して いない遺伝子は、DNA メチル化により発現が抑制されている[36]。

EBV 関連胃癌は、もっとも発現しているウイルス遺伝子が限定されている I 型潜伏感染で起こる。I 型潜伏感染では、C/W/Q プロモーターのうち、Q プロモ ーター下流にある EBNA1[37]と、小分子 RNA である EBER1/2、BARTs のみが発 現している[35]。

1.3 EBV 関連胃癌と DNA メチル化

EBV 関連胃癌は、癌細胞すべてに EBV が潜伏感染している癌として 1990 年 代に報告され、一連の臨床病理学的特徴を有する。日本では胃癌全体の約 7~ 15%の頻度で観察されており、北アメリカでも胃癌全体の 16%[38]を占め、全世 界に目立った人種差なく分布していると考えられる。

発症頻度が男性優位であることや、胃上部胃底腺領域に多く発生すること、 間質に高度なリンパ球浸潤を伴う低分化腺癌という組織像をとりやすいことな ど特徴的な臨床像を呈する[39, 40]。

EBV 関連胃癌では、ゲノムワイドな超高メチル化や[1,3]、SWI-SNF クロマチ ンリモデリング遺伝子である ARIDIA の不活化[5]がみられる。興味深いことに、 EBV 関連胃癌は広範囲の DNA メチル化を呈する一方で、MLHI はメチル化され ていない。そのため、MSI は示さず、またマイクロサテライト安定 (microsatellite stable: MSS)でみられる染色体不安定もみられない[1]エピゲノム異常を主体とし た胃癌である。

EBV 関連胃癌でみられるゲノムワイドな超高メチル化は、EBV 感染そのもの によって誘導されていた。EBV を低メチル化胃癌細胞株 MKN7 に感染させたと ころ、EBV を感染した MKN7 には新規 DNA メチル化が誘導され、臨床症例と 同様に、超高メチル化エピジェノタイプを呈した[3]。

EBV 感染が発癌のどの段階に寄与しているか、いまだ不明な点は多い。

EBV 関連胃癌では、EBV の単クローン性の感染[41]と EBER1 の発現がほぼす べての腫瘍細胞に EBER in situ ハイブリダイゼーションで確認される[39]のに 対して、EBV 関連胃癌の背景粘膜では EBER1 発現はみられない[42]。また、EBV 関連胃癌とその他の胃癌においては、背景胃粘膜の DNA メチル化蓄積の程度は 変わらない[43]。

癌の一部の成分にのみ限局性に EBER1 の発現が認められたという症例もまれ にあり[44]、もともとある癌に EBV が感染したあと EBV 感染細胞だけが選択性 に増殖したという可能性も否定はできない。しかしながら、やはり多くの EBV 関連胃癌は、増殖する腫瘍細胞のすべてに単クローン性の EBV 感染がみとめら れることから、腫瘍化の初期段階で、EBV 潜伏感染が成立した細胞があり、そ の細胞がクローナルに増殖することで、DNA メチル化が高度な EBV 関連胃癌と なっていると考えられている[39]。

1.4 DNA メチル化解析技法

ここからは、本章で用いる DNA メチル化解析技法の背景を概説する。

1.4.1 バイサルファイト反応

バイサルファイト反応[45]は、DNA メチル化の解析に最も汎用される方法で ある。二本鎖 DNA を変性して一本鎖 DNA とし、バイサルファイト (重亜硫酸、 亜硫酸水素ナトリウム) 処理すると、スルホン化・加水脱アミノ化反応がおこる。 引き続き、脱スルホン化すると、シトシン(C) はウラシル(U)に変換される。一 方、メチル化シトシン(5-mC) では、スルホン化の反応速度が非常に遅いため、 Uには変換されず mC のままとなる。従って、バイサルファイト処理をしたゲノ ム DNA を用いて PCR を行うと、5-mC は C として、C は T として認識される。 つまりバイサルファイト処理後には、非メチル化 DNA とメチル化 DNA は異な る塩基配列を持つ(C または T)ことになる。ただし、この方法では、5mC と 5hmC はどちらも変換されず、C として検出されてしまうことに留意する必要がある。



図 2 バイサルファイト反応

バイサルファイト反応により、非メチル化シトシン(C)はウラシル(U)へされる が、メチル化シトシンは変換されず、PCR 反応により、非メチル化シトシンは チミン(T) として、メチル化シトシンは C として認識される。

1.4.2 パイロシークエンス法

ポリメラーゼ伸長反応時に、ヌクレオチドが取り込まれる際に放出されるピ ロリン酸から遊離する ATP をルシフェラーゼ発光反応に用いることで、いずれ の塩基が取り込まれたのかを定量するという原理に基づき、パイロシークエン サーと呼ばれる特別なシークエンサーを用いる[46]。バイサルファイト処理後の ゲノム DNA では、5-mC は C として、C は T として検出されることから、C/(C+T) ×100(%)を計算することにより、メチル化の比率を定量する。

1.4.3 Infinium ビーズアレイ[47]

SNP 解析用として用いられるマイクロアレイプラットフォームを利用してメ チル化率を測定する。2014 年現在では、HumanMethylation450 BeadChip (Illumina, San Diego, CA) が最新版であり、45 万以上ものメチル化部位を標的としてプロ ーブの設計がなされている。バイサルファイト処理による非メチル化 DNA とメ チル化 DNA の塩基の違いを、プローブの蛍光強度のシグナル比率として検出す る。ゲノム領域広範に、500ng と少量の DNA 量で、比較的定量性を持って多数 のサンプルのメチル化模様を観察できる点で優れた技法である。2 種類のアッセ イ系を使用してメチル化を検出するが、いずれの場合もメチル化、非メチル化 は蛍光シグナルとして検出され、それぞれのシグナル強度からメチル化状態を 表す β 値を算出する。

Infinium I アッセイでは、メチル化サイト1ヶ所に対して、メチル化 DNA 検出用プローブと、非メチル化 DNA 検出プローブを用いる。プローブは、メチ ル化 DNA 検出用プローブの 3'-末端はシトシン塩基と、非メチル化 DNA 検出用 プローブの 3'-末端はバイサルファイト処理により変換されたチミン塩基とハイ ブリダイズするように設計されている。ハイブリダイズ後、ラベル化 dNTP を用 いた伸長反応を行う。メチル化、非メチル化の割合は、蛍光強度のシグナル比 率から算出される。なお、用いるカラーチャンネルは単一である。対して、 Infinium II アッセイでは、メチル化サイト1ヶ所に対して1種類のプローブのみ を用いる。そのプローブの3'-末端は検出サイトのすぐ上流の塩基に相補的であ る。ハイブリダイズ後の1塩基伸長時、メチル化 DNA ではメチル化シトシン塩 基に相補的なラベル化グアニン塩基が付加され、非メチル化 DNA ではバイサル ファイト処理後のチミン塩基に相補的なラベル化アデニン塩基が付加される。

Infinium I、II アッセイをあわせてそのカバー率は、CpG アイランドの 96%で あり、また RefSeq 遺伝子の 99%である。検出対象となるメチル化サイトは、プ ロモーター領域だけではなく、5'-UTR、gene body、3'-UTR、遺伝子間領域と広 範な領域のメチル化を、ゲノムワイドに観察することができる点で優れている。 また、RNA との関連をみると、mRNA 遺伝子の 361,766 か所、non-coding RNA 遺伝子の 4,168 か所のメチル化サイトが、解析対象となっている。

このときに用いるカラーチャンネルは緑と赤の2種類である(図3)。



図 3 Infinium アッセイ

DNA メチル化は、蛍光強度のシグナル比率として検出され、0.0-1.0 までの β 値として算出される。

1.5 目的

以上を踏まえて、EBV 感染による新規 DNA メチル化誘導が EBV 関連胃癌の 発癌メカニズムに寄与していることを明らかにする目的で、解析を行う。

- (1) EBV 感染による異常 DNA メチル化の誘導が、正常胃粘膜上皮にも起こる ことを示す。
- (2) EBV 感染による異常 DNA メチル化誘導の開始時期、完成時期を明らかに する。

第2章 材料と方法

2.1 材料

2.1.1 細胞株

本研究では、ヒト低メチル化胃癌細胞株である MKN7 (National Institute of Biomedical Innovation, Osaka, Japan より購入)、不死化胃粘膜上皮細胞株 GES1 (Beijing Institute for Cancer Research より購入[48])、また前研究において、EBV 感染後クローニングし、18 週間継代を維持して樹立したクローン MKN7_EB #1 [3]を用いた。

2.1.2 培養液

RPMI-1640 medium (Life technologies, Carlsbad, CA) にウシ胎児血清 10% (Life technologies)、抗生物質(ペニシリン-ストレプトマイシン×100) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を加えたものを培養に用いた。遺伝子組み換え EBV 持続感染株については、上記培養液に G418 (Life technologies, Carlsbad, CA) を添加し、MKN7 感染株では 200µg/mL、GES1 感染株では 300µg/mL の濃度で添加した。

2.2 方法

2.2.1 Akata システム[49]

Neomycin 耐性遺伝子を導入した遺伝子組み換え EBV が感染している Akata 細胞(東京医科歯科大学難治疾患研究所・清水重臣教授、北海道大学遺伝子病制 御研究所・高田賢蔵教授から供与され、東京大学人体病理学教室にて経代培養 された)を用い、粘膜上皮細胞への感染実験を行った。

遺伝子組み換え EBV 感染実験の実施にあたっては、「遺伝子組み換え生物等 の使用等の規則による生物の多様性の確保に関する法律」(平成 15 年法律第 97 号)第 13 条 1 項の規定により、第二種使用等「組み換え Epstein-Barr ウイルス感 染によるエピゲノム変異の解明」をする間に執する拡散防止措置を順守した(25 受文科振第 2172 号)。

以下、Akata システムによる感染実験の時系列プロトコルである。まず、被感 染粘膜上皮細胞 (MKN7 および GES1) は、6 ウェルカルチャーないしは 12well プレート (TPP, Trasadingen, Switzerland) に、1well あたり 1.0×10⁵ 個播種した。 その翌日、Akata 細胞を最終濃度 0.5%の抗 IgG 抗体 (免疫生物研究所) で 3 時間 刺激し PBS (Phosphalate buffered Saline) での洗浄後、培養液で懸濁し 1mL (1.5×10⁶/mL)ずつ各ウェルに添加し、被感染細胞との共培養を開始した (day0)。 48 時間の共培養後、PBS での洗浄を 5 回繰り返すことで Akata 細胞を除去し、 G418 を含む新しい培養液を添加して継代を維持し、時系列サンプルの回収を行った。

2.2.2 DNA 抽出

細胞株からの DNA 抽出は、0.25% Trypsin - 1mmol/L EDTA・4Na Solution with Phenol Red (Wako, Osaka, Japan) を用いて細胞を回収しペレットにした後、PBS で懸濁し、QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて抽出した。 抽出後の DNA 濃度は、Nanodrop (Thermo Scientific, Waltham, MA) にて測定した。

2.2.3 バイサルファイト処理

ゲノム DNA500ng を、EZ DNA Methylation [™] Kit (Zymo research, Irvine, CA.) を 用いてバイサルファイト処理をした。最終的な溶出量は、キット含有の Elultion Buffer ないしは 10mM Tris-HCl (pH8.0) 80µL とした。

2.2.4 PyroMarkQ24/Q96 によるメチル化解析

パイロシークエンス法には、PyroMarkQ24/Q96 (Qiagen)を使用し、PyroMark Q24/Q96 ユーザーマニュアルに従って解析を行った。まず、パイロシークエン スに用いる一本鎖 PCR 産物の調整をした。バイサルファイト処理したゲノム DNA を、プライマーペアの片方のみ 5'末端にビオチンタグをつけ、PCR 増幅さ せた。PCR アンプリコンをストレプトアビジンでコーティングされたビーズに 吸着させ、アルカリ変性処理による一本鎖 PCR 産物を得た。次に、この一本鎖 PCR 産物に、シークエンシングプライマーをハイブリダイズさせ、 PyroMarkQ24/Q96 をシークエンサーとして用い、メチル化を定量的にパイログ ラムとして観察した。

また、EBV 感染による新規 DNA メチル化誘導のスクリーニングには、EBV 感染による超高メチル化が誘導される遺伝子群に属する EBV-マーカー (*CXXC4*, *TIMP2*, *PLXND1*) 、高メチル化胃癌でメチル化される遺伝子群に属する High-マ ーカー (*COL9A2*, *EYA1*, *ZNF365*) 、低メチル化胃癌でメチル化される遺伝子群に 属する Common マーカー (*AMPH*, *SORCS3*, *AJAP1*) を使用した[3] 。

2.2.5 Infinium ビーズアレイによるメチル化解析

HumanMethylation450 BeadChip (Illumina)を用いた。バイサルファイト処理後の DNA を全ゲノム増幅させ断片化し、ビーズアレイとのハイブリダイゼーション を行い、伸長反応によって生じる蛍光シグナルを BeadArray Reader (Illumina) で 検出し、β値を算出した。

2.2.6 CpG 比によるプロモーター分類

検出標的となる CpG 周囲 500bp 以内の CpG 比と GC%を計算し、プロモータ 一領域に設計された Infinium ビーズアレイプローブを、Weber らの提唱した 3 種類(High-/intermediate-/low-CpG) に分類した[50]。

CpG 比=(CpG 配列の数×500)/(シトシンの数×グアニンの数) で計算し、CpG 比が 0.75 以上かつ GC%が 0.55 以上のプローブを high CpG プロ ーブ (以下 high とする)、CpG 比が 0.48 以上 0.75 未満のプローブを intermediate CpG プローブ (以下 intermediate)、CpG 比が 0.48 未満かつ GC%が 0.55 未満の プローブを low CpG プローブ (以下 low) とした。

2.2.7 階層的クラスタリング

まず、性染色体のプローブは、生理的ヘミメチル化を示すため除外した。 Infinium450K では、プロモーター領域に設計されたプローブが遺伝子毎に複数 あるため、(i) CpG ratio が一番高く、また、サンプル間での比較をより顕著に示 すと考えられるため (ii) 症例間でβ値のばらつきが小さい (SD<0.05) プローブ は除外し、1遺伝子1プローブとなるようにプローブの選出を行った。また、癌 で加わる異常高メチル化は CpG 比の高い領域を標的とすることから、選出され たプローブは (iii) High-/intermediate と low で独立してそれぞれ、フリーソフト ウェア Cluster3.0 を用いて階層的クラスタリングを行い、出力データは Java Tree View を用いてヒートマップとして可視化した。

なお、Infinium27K によるメチル化データと 450K によるメチル化データが混 在する解析では、松坂らの 27K によるメチル化解析で使用したプローブ[3]と同 様の位置情報を持つプローブを 450K から選出し使用した。

2.2.8 転写開始点周囲のメチル化状態の可視化

1 遺伝子毎の転写開始点周囲の DNA メチル化の誘導の様子を、18 週感染後の MKN7_EB#1 の β 値を用いて解析した。プローブ位置情報に基づき、RefSeq 遺 伝子 (hg19) の転写開始点周囲±4,000bp 以内に存在する Infinium450K プローブ を、その遺伝子に所属するプローブとし、ヒートマップを作成した。

2.2.9 RNA 抽出

細胞株からの RNA 抽出は、RNeasy® Mini (Qiagen) を用いた。10cm ディッシ ュにおいて 80%コンフルエントになった培養細胞に、Buffer RLT を添加し直接 溶解して、スピンカラムによる RNA 抽出をおこなった。 洗浄ステップの前に カラム上で、RNase-Free DNase Set (Qiagen) による DNase 分解を行った。抽出後 の RNA 濃度は、Nanodrop (Thermo Scientific) にて測定した。

2.2.10 マイクロアレイを用いた発現解析

EBV 感染前の MKN7 親株 、および EBV 感染後クローニングし 18 週間培養 した MKN7_EB#1 をサンプルとし、発現アレイ解析を GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affimetrix, Santa Clara, CA) を用いて行った。ノーマライゼー ションのため全プローブの中央値を 100 とした。

2.2.11 遺伝子オントロジー(GO: Gene Ontology) 解析

Gene Ontology Consortium (http://www.geneontology.org/)は、遺伝子機能分類を 系統だて、機能を表す標準的な用語「Gene Ontology (GO) Term」としてデータベ ース化している。発現変動遺伝子の機能は、GO 解析を行い GO Term の濃縮と して確認した。この GO 解析には、オンライン解析ソフト Database for annotation, Visualization and Integrated Discover (DAVID)を用いた

(http://david.abcc.ncifcrf.gov/)。

第3章 結果

3.1 不死化胃粘膜上皮への EBV 感染による新規 DNA メチル化誘導

正常上皮への感染を模倣するため、胃癌細胞株より正常胃粘膜上皮に近い、 SV40 不死化胃粘膜上皮細胞株 GES1 を用いて感染実験を行った。DNA メチル 化解析は、EBV-マーカー、High-マーカー、Common マーカーを代表としたパイ ロシークエンシング法および Infinium ビーズアレイでまず評価した。MKN7 と 同様に、GES1 親株に EBV を感染させた場合でも、マーカー遺伝子のメチル化 が確認された。GES1 は不死化胃粘膜上皮細胞株であり、癌細胞株由来ではない ため、低メチル化胃癌ですでにメチル化されている Common-マーカーのメチル 化は EBV 感染前には少なかった。EBV 感染により Common-マーカーを含めた DNA メチル化が誘導された (図 4)。



図 4 EBV 感染による GES1 への DNA メチル化誘導 MKN7 および GES1 に EBV を感染させ、パイロシークエンスおよび Infinium ビーズアレイを用い、樹立されているマーカー遺伝子を対象とした DNA メチル 化解析を行った。不死化正常胃粘膜上皮細胞株である GES1 にも、低メチル化胃 癌細胞株 MKN7 と同様に、DNA メチル化が新規に誘導されている。

次に、Infinium ビーズアレイで、DNA メチル化標的遺伝子についてゲノムワ イドに、MKN7 と GES1 の比較を行った。EBV 感染後の GES1 で新規に DNA メ チル化が誘導される遺伝子 (β値:感染前<0.2 かつ感染後>0.4)を抽出し、クラ スタリング解析を行った。EBV 感染後の MKN7_EB+と GES1_EB+はそれぞれク ラスタリングされた。また、EBV 感染前に GES1 ではメチル化されておらず MKN7 ではすでにメチル化がみられている遺伝子群があった (図 5:赤線部)。



図 5 MKN7 と GES1 の DNA メチル化標的遺伝子の重複 GES1 で EBV 感染後に新たに DNA メチル化が入る遺伝子(β 値:感染前<0.2 かつ感染後>0.4))を抽出し、MKN7 感染前後、GES1 感染前後での階層的クラス タリングを行った。感染後の MKN7 と感染後の GES1 はクラスターされる。ま たもともと低メチル化胃癌である MKN7 でメチル化が入っている遺伝子群(図の 赤線部)も、GES1 は標的としている。

3.2 EBV 感染による DNA メチル化の時系列的解析

DNA メチル化誘導の様子を明らかにするために、時系列的な DNA メチル化 解析をパイロシークエンスおよび Infinium ビーズアレイで行った。MKN7 およ び GES1 に EBV を感染させ、EBV 感染細胞を、時系列的に全回収することで行 った。

ウイルスゲノムは、EBV 関連胃癌でみられる I 型潜伏感染のメチル化パター ンを示した。すなわち、C プロモーター (Cp) 、BWRF1、BFRF3 はメチル化さ れており、EBER1、EBER2、Q プロモーター (Qp) ではメチル化がみられなかっ た。そして、感染後 17 日の段階で、ウイルスゲノムのメチル化は完成していた。

ホストゲノムのメチル化は、MKN7、GES1 ともに、ウイルスのメチル化完成 にやや遅れてゲノム全体で同時に開始し、感染後 4 週の段階でメチル化が完成 した。ウイルスゲノムのメチル化が先行し、続いてホストゲノムのメチル化が 同時に進展する様子と、既報告よりはるかに早い感染後 4 週でメチル化エピジ エノタイプが完成する様子がみられた (図 6)。

28



図 6 時系列的メチル化解析

MKN7 と GES1 ともに、EBV 感染後 17 日ごろからホストゲノムの DNA メチ ル化が開始し、4 週間程度でメチル化状態の完成がみられる。また、ウイルスゲ ノムのメチル化はホストゲノムのメチル化に先行して開始し、完成している。

3.3 転写開始点周囲のメチル化状態の可視化

3.3.1 メチル化しない CpG サイトの分布

転写開始点(TSS: Transcriptional Start Site) 周囲の DNA メチル化の誘導の様子 を、18 週感染後の MKN7_EB#1 の β 値を用いて解析した。メチル化されていな いと定義する β 値 0.2 以下である U プローブとメチル化されていると定義する β 値が 0.4 以上に上昇する M プローブの 2 つにプローブを分類した。新規 DNA メ チル化誘導がされている遺伝子として、転写開始点 1,000bp 以内に U→M プロー ブが 1 つ以上ある遺伝子を抽出したところ、9,272 遺伝子が抽出された。しかし、 転写開始点 1,000bp 以内に U→U プローブがない遺伝子を抽出すると 1241 遺伝 子であり、8,031 遺伝子は、転写開始点 1,000bp 以内でメチル化されないプロー ブをもつ遺伝子と考えられた (図 7)。



図 7 新規 DNA メチル化誘導遺伝子の抽出

18 週間感染後の MKN7_EB#1 を用いた。転写開始点 (TSS)より 1,000bp 以内 で、 MKN7 親株 (WT)と EBV 感染後(EB#1)での U プローブ(β 値≦0.2)、M プロ ーブ(β 値≧0.4)の分布により新規 DNA メチル化誘導遺伝子の抽出を行った。 次に、抽出された転写開始点 1,000bp 以内でメチル化されないプローブをもつ 遺伝子 8,031 遺伝子の U プローブの分布を詳細に検討した。 8,031 遺伝子の転 写開始点 1,000bp 以内にあるすべてのプローブを用い、U→M プローブの割合を 転写開始点からの距離別にグラフ化し分布を表した。U→M プローブの割合は平 均して 37.4%となり、転写開始点近傍で平均より少なくなった。転写開始点近傍 でメチル化されないメチル化抵抗性 CpG サイトが偏在して存在することが示唆 された (転写開始点 400bp 以内 vs. 遠位 400bp 以上; *P*=1.6×10⁻¹¹(Fisher)) (図 8)。



図 8 メチル化抵抗性 CpG サイトの偏在

メチル化される U→M プローブの割合を転写開始点 (TSS)からの距離別にグ ラフ化すると、U→M プローブの分布は、転写開始点近傍に偏在して少なく、転 写開始点近傍は、新規 DNA メチル化誘導に抵抗する可能性がある。

3.3.2 転写開始点周囲の異常メチル化誘導パターン

18 週感染後の MKN7_EB#1 を用いて、転写開始点周囲の DNA メチル化状態 による遺伝子のグループ分類を行った。遺伝子は、新規 DNA メチル化誘導あり (Group1)、新規メチル化誘導なし (Group2, 3) 、脱メチル化誘導あり (Group4) に分類された (図 9)。

新規 DNA メチル化誘導がある遺伝子は、転写開始点 1,000bp 以内で U→M プ ローブが 1 つ以上ある遺伝子と定義した。その中で、転写開始点 500bp 以内で U →U プローブが無い転写開始点メチル化感受性遺伝子を Group1 (S)、転写開始点 500bp 以内に U→U プローブが 2 連続して存在する転写開始点メチル化抵抗性遺 伝子を Group1 (R)に分類した。

新規メチル化誘導がない遺伝子は、転写開始点 1,000bp 以内の全プローブ数の 総和を用いて以下の2群に分類した。総プローブ数が M→M プローブ数と一致 する遺伝子を、もともとメチル化していてメチル化誘導がない Group3: メチル 化非対象(M)と分類した。対して、U→U プローブ数と M→M プローブ数の総和 が総数と一致する遺伝子を、もともとメチル化しておらずメチル化誘導がない Group2: メチル化非対象(U)と分類した。

また、転写開始点 500bp 以内に M→U プローブが存在する遺伝子を、Group4: DNA 脱メチル化遺伝子と分類した。



図 9 DNA メチル化誘導状態別遺伝子グループ分類

18 週間感染後の MKN7_EB#1 の DNA メチル化状態で遺伝子のグループ分類 を行った。Uプローブ (β 値 \leq 0.2)と M プローブ (β 値 \geq 0.4)の定義を用いて、転 写開始点 (TSS) 1,000bp 以内のプローブに着目した。DNA メチル化誘導遺伝子 は、転写開始点メチル化感受性遺伝子と転写開始点メチル化抵抗性遺伝子に分 類された。DNA メチル化非誘導性遺伝子は、転写開始点がメチル化しないまま である遺伝子と転写開始点がメチル化を維持する遺伝子に分類された。また、 転写開始点周囲が脱メチル化する遺伝子も存在した。

3.3.3 メチル化誘導状態別遺伝子グループ分類の特徴

18 週感染後の MKN7_EB#1 における、転写開始点周囲の DNA メチル化状態 別遺伝子グループ分類 (前項 3.3.2 参照) を用いて、それぞれのグループに所属 する遺伝子群の特徴について解析を行った。 まず、転写開始点周囲に CpG Island が存在するか否かを検討した。EBV 感 染前にメチル化されていない遺伝子が所属する Group1 (R)、Group1 (S)、Group2 では転写開始点 500bp 以内に CpG アイランドを持つ遺伝子が多くみられた。も ともとメチル化されている遺伝子である Group3、Group4 に所属する遺伝子は CpG アイランドを持たない遺伝子が多くみられた (図 10)。



図 10 メチル化誘導状態別グループ分類と CpG アイランド アレイスコアがある遺伝子で、転写開始点(TSS)周囲 500bp 以内に CpG アイラ ンドがある遺伝子数と、CpG アイランドが無い遺伝子数をそれぞれのグループ 別に棒グラフに表した。EBV 感染前にメチル化していない遺伝子が所属するグ ループは、CpG アイランドが転写開始点周囲に存在する遺伝子が多くみられた。 次に、DNA メチル化状態が EBV 感染前後で変化するグループに着目した解析 を行った。新規 DNA メチル化誘導遺伝子間でも、転写開始点メチル化抵抗性、 感受性により、遺伝子発現変動に差がみられた。すなわち、転写開始点がメチ ル化に抵抗する Group1 (R)では遺伝子発現が維持されるのに対して、転写開始点 もメチル化される Group1 (S)では遺伝子発現が抑制されていた (*P*=1.6×10⁻¹⁸ (t-test))。また、脱メチル化誘導が起こる Group4 では遺伝子発現が上昇する傾 向がみられた (図 11)。



図 11 転写開始点(TSS)メチル化 状態と遺伝子発現変動

転写開始点メチル化抵抗性である Group1 (R)と転写開始点メチル 化感受性である Group1 (S)間を比較 すると、メチル化誘導後の遺伝子発 現状態に優位な差がみられた。転写 開始点メチル化抵抗性は遺伝子発 現維持に、転写開始点メチル化感受 性は遺伝子発現抑制に働いている。

最後に新規メチル化誘導遺伝子について、その遺伝子機能分類を解析するために、遺伝子オントロジー (GO: Gene Ontology)解析を行った。転写開始点がメチル化に抵抗し発現を維持する Group1(R)に所属する遺伝子は、DNA 修復関

連遺伝子(図 12 上*)(表 1)が優位に多くみられた (P=1.0×10⁻¹⁰)。この中には、ヌ クレオチド除去修復関連遺伝子や、相同組み替え修復遺伝子、ミスマッチ修復 遺伝子が含まれていた。また、細胞周期関連遺伝子 (図 12 上**)(表 2) も濃縮 がみられた (P=1.0×10⁻⁸)。

転写開始点がメチル化感受性であり発現が抑制される Group1 (S)に所属する 遺伝子は、細胞増殖制御関連遺伝子 (図 12 下*)(表 3) と細胞接着関連遺伝子 (図 12 下**)(表 4)が優位に多くみられた (P<1.0×10⁻⁴)。細胞増殖制御関連は、 増殖の負の制御方向や、アポトーシスの正の制御方向に関連する遺伝子であり、 発現が抑制されることで、細胞増殖方向に働くと考えられた。


図 12 転写開始点メチル化状態別遺伝子オントロジー

DNA 修復関連遺伝子は転写開始点メチル化抵抗性であり、細胞接着遺伝子は メチル化感受性となる。

表 1 DNA 修復関連遺伝子

NM_003146	ssm1	NM_016290	uimc1
NM_001923		NM_002946	RPA2
NM_014956	CEP164	NM 152405	JMY
NM 199191	BRE	NM 024624	SMC6
NM 130395	wrnip1	NM 014311	smua1
NM 001033002	RPAIN	NM 016614	Ttrap
NM 002907	RECQL	NM 007300	BRCA1
NM 002874	RAD23B	NM 000124	Ercc6
NM_001517	GTF2H4	NM_006384	CIB1
NM_001516	gtf2h3	NM_000122	ercc3
NM_005483	CHAF1A	NM_004260	Recql4
NM_001017420	ESCO2	NM_032018	C1orf124
NM_006479	RAD51AP1	NM_175073	APTX
NM_199420	POLQ	NM_001018115	Fancd2
NM_001024465	Sod2	NM_000553	wm
NM_015630	EPC2	NM_000553	LOC652522
NM_000179	msh6	NM_004629	Fancg
NM_002914	RFC2	NM_022362	MMS19
NM_152221	CSNK1E	NM_003589	cul4a
NM_018319	TDP1	NM_025128	MUS81
NM_001037872	REV1	NM_014502	prpf19
NM_022836	DCLRE1B	NM_001893	CSNK1D
NM_078468	bccip	NM_024068	OBFC2B
NM_001042698	ZSWIM7	NM_001799	CDK7
NM_000082	ERCC8	NM_002180	IGHMBP2
NM_207118	GTF2H5	NM_152463	EME1
NM_000400	ercc2	NM_004284	Chd1l
NM_003337	ube2b	NM_005732	rad50
NM_000244	MEN1	NM_000534	Pms1
NM_004993	ATXN3	NM_001005782	SUMO1P3
NM_145080	nsmce1	NM_001005782	Sumo1
NM_006791	MORF4L1	NM_003362	ung
NM_006791	MORF4	NM_007027	TOPBP1
NM_000251	Msh2	NM_002431	Mnat1
NM_012415	rad54b		
NM_001042683	SHPRH		
NM_001031716	OBFC2A		
NM_000059	Brca2		
NM_006304	SHFM1		
NM_018193	fanci		

表 2 細胞周期関連遺伝子

NM_004856	KIF23	NM_021645	alg11
NM_002790	psma5	NM_021645	UTP14C
NM_004127	GPS1	NM_001040285	Papd5
NM_000321	RB1	NM_012112	Трх2
NM_016238	anapc7	NM_002811	psmd7
NM_152405	JMY	NM_004935	cdk5
NM_015261	ncapd3	NM_014874	MFN2
NM_018410	Hjurp	NM_012115	Casp8ap2
NM_005255	GAK	NM_015169	rrs1
NM_198240	CLIP1	NM_145697	NUF2
NM_002776	Klk10	NM_032811	TBRG1
NM_018097	HAUS2	NM_000660	TGFB1
NM_018944	C21orf45	NM_006461	SPAG5
NM_002808	PSMD2	NM_030756	Tcf7l2
NM_002804	psmc3	NM_181716	CENPV
NM_012197	RABGAP1	NM_001799	CDK7
NM_002805	PSMC5	NM_024808	c13orf34
NM_007300	BRCA1	NM_016262	tube1
NM_001009958	ZNF655	NM_203394	E2F7
NM_021732	AVPI1	NM_006031	PCNT
NM_199246	ccng1	NM_005732	rad50
NM_018140	CEP72	NM_138957	MAPK1
NM_001032410	USP16	NM_005611	RBL2
NM_001018115	Fancd2	NM_004741	NOLC1
NM_003589	cul4a	NM_001253	Cdc5l
NM_001761	CCNF	NM_003218	LOC646127
NM_018955	UBB	NM_003218	LOC646316
NM_003883	HDAC3	NM_003218	LOC283523
NM_181799	UBE2C	NM_003218	TERF1
NM_004524	llgl2	NM_003218	LOC646359
NM_002954	RPS27AP11	NM_024511	haus3
NM 002954	RPS27AP12	NM 005805	PSMD14
NM_002954	RPS27A	NM_015341	NCAPH
NM_002954	RPS27AP16	NM_003620	PPM1D
NM 004523	KIF11	NM 005886	katnb1
NM_001790	CDC25C	NM_017853	Txnl4b
NM_005047	PSMD5	NM_016478	zc3hc1
NM_018131	CEP55	NM_002431	Mnat1
NM_014781	RB1CC1	_	
NM_002815	Psmd11		

表 2 細胞周期関連遺伝子 (続き)

NM_024348	DCTN3	NM_014885	ANAPC10P1
NM_014956	CEP164	NM_014885	anapc10
NM_018451	CENPJ	NM_153223	CEP120
NM_018101	CDCA8	NM_001809	CENPA
NM_002094	GSPT1	NM_002520	LOC399804
NM_005916	MCM7	NM_002520	LOC100131044
NM_138369	BOD1	NM_002520	LOC729686
NM_006342	TACC3	NM_002520	Npm1
NM_015097	CLASP2	NM_002520	LOC729342
NM_021009	UBC	NM_002520	NPM1P21
NM_006530	Yeats4	NM_002520	LOC440577
NM_005483	CHAF1A	NM_006717	spin1
NM_001017420	ESCO2	NM_000251	Msh2
NM_020242	KIF15	NM_152524	SGOL2
NM_017520	Mphosph8	NM_018685	AnIn
NM_000986	rpl24	NM_012415	rad54b
NM_000986	RPL24P6	NM_018688	BIN3
NM_175866	Uhmk1	NM_138443	Haus1
NM_024011	Cdk11b	NM_003903	CDC16
NM_024011	CDK11A	NM_152699	Senp5
NM_024011	LOC100133692	NM_013277	RACGAP1P
NM_017884	PINX1	NM_013277	racgap1
NM_000179	msh6	NM_014756	ckap5
NM_002497	NEK2	NM_203401	STMN1
NM_013299	SAC3D1	NM_002789	Psma4
NM_032636	Psrc1	NM_005067	Siah2
NM_002211	ltgb1	NM_199187	KRT18P19
NM_033637	btrc	NM_199187	KRT18
NM_001042549	NSL1	NM_199187	KRT18P26
NM_006400	DCTN2	NM_004036	ADCY3
NM_078468	bccip	NM_000059	Brca2
NM_002519	NPAT	NM_177983	Ppm1g
NM_024735	FBXO31	NM_013374	PDCD6IP
NM_002710	Ppp1cc	NM_019063	eml4
NM_020328	ACVR1B	NM_005792	MPHOSPH6
NM_000244	MEN1	NM_018191	RCBTB1
NM_001017405	maeA	NM_004337	OSGIN2
NM_006403	Nedd9	NM_013367	Anapc4
NM_002923	RGS2	NM_006600	nudC
NM_014335	EID1	NM_018193	fanci

表 3 細胞増殖制御関連遺伝子

NM_002291	LAMB1	NM_032711	MAFG
NM_002293	LAMC1	NM_000584	IL8
NM_001005340	GPNMB	NM_024420	pla2g4a
NM_014624	S100A6	NM_004235	Klf4
NM_173209	Tgif1	NM_005450	nog
NM_002203	ITGA2	NM_002632	PGF
NM_000581	GPX1	NM_014762	DHCR24
NM_003246	Thbs1	NM_005253	Fosl2
NM_003255	timp2	NM_001753	cav1
NM_000575	ll1a	NM_003873	NRP1
NM_004348	Runx2	NM_000022	ada
NM_002840	ptprf	NM_014862	ARNT2
NM_130445	COL18A1	NM_005596	NFIB
NM_006094	DLC1	NM_198964	PTHLH
NM_003749	irs2	NM_001769	CD9
NM_003238	TGFB2	NM_000956	Ptger2
NM_198159	MITF	NM_004624	VIPR1
NM_003236	TGFA	NM_138712	PPARG
NM_000077	CDKN2A	NM_006167	NKX3-1
NM_003242	Tgfbr2	NM_001124	ADM
NM_001674	atf3	NM_007298	BRCA1
NM_003243	Tgfbr3	NM_005438	FOSL1
NM_015973	GAL	NM_001955	EDN1
NM_024408	Notch2	NM_005130	FGFBP1
NM_001993	F3	NM_001425	emp3
NM_001992	F2R	NM_053056	CCND1
NM_023110	Fgfr1	NM_000346	SOX9
NM_003597	klf11	NM_001329	CTBP2
NM_001004720	NCK2	NM_201282	egfr
NM_000598	igfbp3	NM_030571	NDFIP1
NM_170734	BDNF	NM_001730	Klf5
NM_001565	CXCL10	NM_022740	HIPK2
NM_000963	PTGS2	NM_001945	HBEGF
NM_001562	IL18	NM_007169	pemt
NM_002994	CXCL5	NM_004747	DLG5
NM_016205	PDGFC	NM_000214	JAG1
NM_002335	LRP5	NM_005023	Pggt1b
NM_006147	irf6	NM_000875	IGF1R
NM_000115	ednrb	NM_032551	Kiss1r
NM_000585	IL15		

表 4 細胞接着関連遺伝子

NM_002291	LAMB1	NM_002318	loxl2
NM_001005242	Pkp2	NM_004360	CDH1
NM_002293	LAMC1	NM_005245	Fat1
NM_181847	AMIGO2	NM_020351	COL8A1
NM_001010972	ZYX	NM_014246	celsr1
NM_053034	ANTXR1	NM_001040000	mllt4
NM_139029	cd151	NM_001040000	LOC730031
NM_001307	cldn7	NM_017671	FERMT1
NM_001005340	GPNMB	NM_005682	GPR56
NM_002203	ITGA2	NM_018222	PARVA
NM_001305	CLDN4	NM_022121	PERP
NM_000227	LAMA3	NM_001903	Ctnna1
NM_005157	ABL1	NM_000346	SOX9
NM_005501	ITGA3	NM_001901	CTGF
NM_173515	MAGI1	NM_006505	PVR
NM_173515	CNKSR3	NM_201282	egfr
NM_005506	scarb2	NM_001793	CDH3
NM_002942	robo2	NM_004040	RHOB
NM_003873	NRP1	NM_080645	col12a1
NM_002205	ITGA5	NM_004385	VCAN
NM_003246	Thbs1	NM_005675	DGCR6
NM_201414	APP	NM_001848	COL6A1
NM_021101	CLDN1	NM_001943	DSG2
NM_002543	Olr1	NM_021195	CLDN6
NM_002840	ptprf	NM_021195	LOC284620
NM_007183	PKP3	NM_004747	DLG5
NM_001001390	CD44	NM_000210	itga6
NM_005010	nrcam	NM_003568	ANXA9
NM_213589	Raph1	NM_013327	PARVB
NM_130445	COL18A1	NM_019619	Pard3
NM_080927	dcbld2	NM_001554	cyr61
NM_006094	DLC1	_	-
NM_002160	TNC		
NM_006670	TPBG		
NM_014944	CLSTN1		
NM_001769	CD9		
NM_001331	CTNND1		
NM_001005731	ITGB4		
NM_002213	ltgb5		
NM_002214	ITGB8		

第4章 考察

4.1 EBV 感染が誘導する DNA メチル化の時系列変化とその機構

EBV 感染後短期間で、不死化胃粘膜上皮細胞株にも DNA メチル化が誘導され、 超高メチル化エピジェノタイプが完成することが示された。つまり、胃粘膜上 皮に EBV 感染が成立した後、短時間で DNA メチル化が完成し癌化に寄与する 可能性がある。これは、EBV 感染胃粘膜が、わずか 50 日で CDHI のプロモータ 一領域の DNA メチル化を伴う胃癌となったという臨床報告に一致する[51]。 H.pyroli 感染による胃発癌機構として、CagA タンパク質による細胞増殖促進[52] や、萎縮性胃炎を背景とする非癌部粘膜への DNA メチル化の蓄積[53]が考えら れている。しかし、今回の EBV 感染による短期間の DNA メチル化誘導は、 H.pyroli 感染による長期のメチル化蓄積とは異なる経路を持つと考えられ、独自 に胃発癌に寄与する可能性がある。

ウイルスゲノムのメチル化が先行し、ホストゲノムのメチル化が続いてゲノ ムワイドに同じタイミングで誘導され完成する特徴をとらえることが、潜伏感 染を取る EBV が誘導するメチル化機構の解明につながると考えられる。その一 案として、上皮細胞に存在する自然免疫機構の存在を提示する。

外来因子に対する防御機構は、外来因子の非メチル化 CpG を、B 細胞や T 細胞が認識することで誘導される[54]。ウイルスゲノムはその免疫防御機構から逃れるために、ホスト細胞側のメチル化機構を誘導し、自身の非メチル化 CpG を

メチル化して潜伏感染を完成していることが想定される。ウイルス遺伝子が最 も高度にメチル化される I 型潜伏感染関連腫瘍ではホストゲノムのメチル化の 程度は強く、ウイルス遺伝子のメチル化レベルが最も少ない III 型潜伏感染関連 腫瘍ではホストゲノムのメチル化の程度は弱いという、ウイルスゲノムとホス トゲノムのメチル化の程度の相関からも、EBV とホストゲノムはメチル化機構 が共通していると考えられていた[55]。以上を踏まえて今回の時系列を追った実 験結果からは、EBV 感染で誘導されるホストゲノムのメチル化は、ウイルスに より誘導されたメチル化からホストゲノムを守る何らかの防御機構が脆弱ある いは破綻しており、通常であれば EBV ゲノムのメチル化のみで完了するはずが、 ホストゲノムのメチル化まで進行してしまう可能性を示唆した。

4.2 転写開始点 DNA メチル化抵抗性と遺伝子発現

本研究では、DNA メチル化が誘導された場合においても転写開始点はメチル 化されず遺伝子発現が維持される遺伝子群と、転写開始点までメチル化される 遺伝子群があることがわかった。後者の遺伝子群は転写開始点を含むメチル化 に伴い遺伝子発現も抑制されていた。この DNA メチル化誘導パターンは、EBV 関連胃癌の特徴、つまり、低分化腺癌であることや、マイクロサテライト不安 定性を示さない分子病理学的特徴に当てはまると考えられた。具体的には、転 写開始点までメチル化されることで発現が抑制される遺伝子には *CDH1* が含ま れており、低分化腺癌の組織型となりうることが説明できた。そして、ミスマ ッチ修復遺伝子である *MLH1 や MSH2、MSH6* がいずれもメチル化が誘導される が転写開始点はメチル化を逃れ、DNA メチル化による発現抑制が起こらず、マ イクロサテライト不安定性とならないと考えられた。

細胞増殖・細胞周期に関しては、CDKN2A-CCND1-Rb 経路の遺伝子が DNA メチル化標的遺伝子として抽出された。ただし、CCND1 は転写開始点メチル化 感受性で発現抑制方向であるが、RB1 は転写開始点メチル化抵抗性を示した。 CDKN2A-CCND1-Rb 経路では、CCND1 が Rb をリン酸化により失活させ、Rb による抑制がはずれた活性化型 E2F-DP1 転写因子複合体が、S 期進行必要な因 子の転写を起こす。EBV 感染では、CCND1 がメチル化により抑制され、Rb 活 性化が起きず、S 期進行へと向かう因子の過剰な転写も起こっていないことが示 唆される。EBV 感染による DNA メチル化だけでは、細胞周期の大きな破綻は起 こらない可能性が考えられる。

DNA メチル化から転写開始点を守る仕組みがあることが考えられ、今後の課題である。第二部では、DNA メチル化から転写開始点を守る仕組みについての研究、考察をする。

第1章 序論

1.1 ヒストン修飾

ヒストン修飾は、DNA メチル化とならぶエピゲノム機構の一つである。ヒス トンは、H2A、H2B、H3、H4 という4 種類のコアヒストンが、それぞれ 2 分子 ずつ集まった 8 量体である。その周囲に、147bp の DNA が巻きつきヌクレオソ ームを形成し[56]、ヌクレオソーム間をつなぐリンカーヒストン (H1) とリンカ ーDNA とともに[57]、クロマチンを構築している。ヒストンの N 末端はヒスト ンテイルと呼ばれ、そのアミノ酸残基に、メチル化 (me) 、アセチル化 (ac) 、 リン酸化 (ph) 、ユビキチン化 (ub) など様々な化学修飾が加わる[58]。この修 飾により、クロマチン構造の変化や、転写因子をはじめとするタンパク質複合 体との結合性に変化が起こり、遺伝子転写制御が行われる[59]。このヒストン修 飾は、化学修飾を加えるメチル基転移酵素やアセチル基転移酵素などの修飾酵 素(writer)、脱メチル化酵素や脱アセチル化酵素などの脱修飾酵素 (eraser) 、そ してヒストン修飾を認識するタンパク質 (reader) により調節されている[60]。

ヒストン修飾として、ヒストン H3 に加わる修飾がよく研究されている。ヒストン H3 における、リシン (K) のメチル化は、修飾を受ける K やメチル化レベル(me1、me2、me3) により転写活性化にも転写抑制化にも働く。例えば、転写

開始点周囲のH3K4me3は転写活性化の指標であるのに対して、H3K27me3は転 写を抑制し遺伝子不活化の指標となる[59, 61]。Kのアセチル化は、転写活性化 に働く[59]。

1.2 ヒストン修飾と癌

癌細胞では、正常細胞とのヒストン修飾状態の違いや予後との関連、ヒストン修飾をつかさどる writer、eraser、reader の異常が報告されている[60, 62]。例えば、writer の異常としては、H3K27 をメチル化するポリコーム抑制複合体 (polycomb repressive complex: PRC)の構成タンパク質 EZH2の異常が有名である。 EZH2の過剰発現は、前立腺癌、乳癌、腎癌、肺癌の予後不良因子であり、濾胞性リンパ腫やびまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫では EZH2 の機能ドメインである SET ドメインの活性型変異と H3K27me3 レベルの上昇が報告されている。 EZH2の過剰発現でヒストン不活化マークである H3K27me3 が広範に入り、遺伝子発現が不適切に抑制され、癌化や予後不良につながっていることが考えられる。このために、活性型変異を持つ EZH2 を治療標的とする阻害薬開発が進んでいる[63, 64]。このように、癌におけるヒストン修飾状態と修飾責任因子の同定は、治療につながる可能性がある。

1.3 ヒストン修飾変化と DNA メチル化

ヒストン修飾と DNA メチル化の間には入り組んだ相互関係があることを、 数々の報告が示している。DNA メチル基転移酵素は、自身の持つドメインを介 して直接的にあるいは間接的に、ヒストンメチル基転移酵素やヒストン修飾と 相互作用できる。このために、DNA メチル基転移酵素の局在を、ヒストン修飾 が制御している可能性が指摘されている。たとえば、H3K36me3 は DNA メチル 基転移酵素 DNMT3a の PWWP ドメインとの結合能があり[65]、ヘテロクロマチ ン領域のマークである H3K9me3 はそのメチル基転移酵素が DNA メチル化の完 成に必要であることや、ヘテロクロマチン形成タンパク質 HP1 が DNA メチル 基転移酵素 DNMT3a/3b と結合することから[66]、*de novo* の DNA メチル化に関 与している。反対に K4 のメチル化は、DNMT3a/3b の結合を阻害し、*de novo* の DNA メチル化に抵抗すると考えられている[67]。

1.4 目的

以上の背景を踏まえて、EBV 感染によるエビジェネティックな変化の誘導と その相互関係を明らかにする目的で、ヒストン修飾状態の解析を行う。前章で 示されたメチル化抵抗の有無に、ヒストン修飾が寄与する可能性を検討する。

第2章

2.1 材料

本研究では、ヒト低メチル化胃癌細胞株である MKN7 (National Institute of Biomedical Innovation, Osaka, Japan より購入)、不死化胃粘膜上皮細胞株 GES1 (Beijing Institute for Cancer Research より購入[48])、また前研究において、EBV 感染後クローニングし、18 週間継代を維持して樹立したクローン MKN7_EB #1, MKN7_EB#2 [3]を用いた。

2.2 方法

2.2.1 クロマチン免疫沈降(Chromatin immunoprecipitation: ChIP)

クロマチン免疫沈降は一般的な方法に準じて行った[68]。150mm ディッシュ において 80%コンフルエントになった培養細胞に対して、最終濃度 1%となるよ うにホルムアルデヒドを培養液中に添加し、室温で 10 分間振盪してタンパク質 の DNA への固定化 (クロスリンク)を行った。その後、最終濃度が 0.125 mM に なるようにグリシン溶液を添加してクロスリンク反応を停止させた。氷冷した PBS での洗浄を 3 回繰り返し、セルスクレイパーで回収し、遠心により得られ たペレットを液体窒素で凍結して-80℃で保存、ないしはクロマチン DNA 断片 化の行程へと進んだ。 クロマチン DNA 断片化は、プローブ型超音波細胞破砕装置 UD-201 (Tomy, Tokyo, Japan) ないしは密閉式超音波破砕装置 Picoruptor (Diagenode, Liège, Belgium) を用い、断片が 200~500 bp 程度となるように行った。断片後、遠心 (4°C, 13,000g, 10 分間) し得られた上清に、3mL の ChIP dilution buffer を加えクロ マチン DNA 断片化溶液とした。この溶液に Protein A Sepharose Fast Flow (GE Healthcare, Buckinghamshire, U.K.) または Dynabeads (Life technologies) を添加し 4℃で 30 分間ローテートして非特異的吸着を除き、ChIP 用調製液を得た。なお 調整液中、100µl は input サンプルに用いた。

抗体とビーズを 2 時間 4℃で反応させて抗体吸着ビーズの調整を行った。 H3K4me3 (#39159, Abcam, Cambridge, MA, 2µl per ChIP) と Protein A Sepharose Fast Flow、H3K27ac (CMA309, 大阪大学の木村宏先生よりご提供, 2µl per ChIP) と Dynabeads (anti-mouse)、Histone H3 (#4620, cell signaling technology, Danvers, MA, 2ul per ChIP) と Dynabeads (anti-rabbit) をそれぞれ抗体とビーズとして用い た。遠心して上清の除去および洗浄をして得られた抗体吸着ビーズに、上述の ChIP 用調整液を1晩4℃でローテートさせながら抗体反応させた。

抗体反応後のビーズは ChIP dilution Buffer による洗浄 4 回、Wash Buffer1 によ る洗浄 2 回、Wash Buffer2 による洗浄 2 回、TE による洗浄 2 回と 300ul の Elution Buffer による溶出を行った。溶出液にプロナーゼを添加し(終濃度 1.5 μg/mL)、 42℃で2時間、その後65℃で一晩ローテートさせながら脱クロスリンク反応を 行った。この際、input サンプルに対しては、RNaseA 処理による RNA 除去後、 プロナーゼを添加し、脱クロスリンク反応を行った。

脱クロスリンク反応後、サンプル溶液に、最終濃度 0.8M となるように LiCl を加え、Phenol/chloroform-/isoamyl alcohol (25:24:1)、chloroform/isoamyl alcohol (24:1)を用いたフェノールクロロホルム抽出により DNA 溶液を回収した。エタ ノール沈殿による濃縮後 ChIP サンプルないし input サンプルは、Quantus TM Fluorometer (Promega, Fitchburg, WI) により濃度測定が行われた。

2.2.2 ChIP サンプルの濃縮確認

得られた ChIP サンプルは、input サンプルを用いて定量的 PCR を行い、濃縮 確認を行った。各抗体の ChIP サンプルのターゲット領域の存在量を定量し、 input%を計算した。そして、ポジティブコントロールのターゲット領域とネガ ティブコントロールのターゲット領域の比率から濃縮率を計算した。

2.2.3 次世代シーケンサーによる ChIP サンプルの解析

良好な濃縮が確認できた ChIP サンプルを、NEB Next[®] Index Primers for Illumina (New England biolabs, Ipswich, MA)を用いてライブラリーの作成を行い、 次世代シーケンサーHiseq1500 (Illumina) で解析した。

2.2.4 シーケンスリードの解析

Hiseq1500 によって配列決定された 50bp のシングルエンドのショートリード をリファレンスゲノム (hg19) に Bowtie [69]で mapping し、Web ベースの解析 実行環境である Galaxy [70]での解析を行った。MACS (Ver.1.3.7.1) によって統計 学的に検定し、P 値<1e-5 の領域を有意に濃縮した領域と判定した。その他のパ ラメータは、tag size "25"、Band width "300"、genome size "2.7e+9"、MFOLD "30"、 λ_{local} "5000,7500,10000"に設定した。

2.2.5 転写開始点からの位置によるピークの割り当てと分類

p<1e-5 を満たす各ピーク領域は、ピーク領域より 1,000bp 以内に存在する転写 開始点をもつ遺伝子に割り当てた。

2.2.6 次世代シーケンサーを用いた発現解析

DNase 処理を行った抽出 RNA は、TruSeq RNA Sample Prep Kit (Illumina)を用 いてライブラリーの作成を行い、次世代シークエンサーHiseq1500 (Illumina)で解 析した。

2.2.7 シーケンスリードの解析

Hiseq1500 によって配列決定された 50bp のシングルエンドのショートリード をリファレンスゲノム(hg19)に Tophat [71]で mapping し、Cufflinks [72]により発 現量の推定を行い、遺伝子毎に FPKM の値を得た。

2.2.8 遺伝子オントロジー(GO: Gene Ontology) 解析

発現変動遺伝子の機能は、GO 解析を行い GO Term の濃縮として確認した。 このGO 解析には、オンライン解析ソフト Database for annotation, Visualization and Integrated Discover (DAVID)を用いた(http://david.abcc.ncifcrf.gov/)

第3章 結果

3.1 ホストゲノムのゲノムワイドなヒストン修飾変化

EBV 感染後、18 週間継代培養した MKN7_EB#1 ならびに#2 において、転写が 活発である遺伝子の転写開始点にみられるヒストン修飾であるヒストン活性化 マーク H3K4me3、H3K27ac について、EBV 感染前後での修飾状態の変化をみた。 RefSeq 21,839 遺伝子中、H3K4me3 は約 5%、H3K27ac は約 8%で修飾状態が変化 していた (図 13)。また、変化する遺伝子はクローン間で重複していた (図 14)。



図 13 EBV 感染前後のヒストン修飾変化

EBV 感染後クローニングし、18 週間培養した MKN7_EB#1 と_EB#2 では、感 染前後でヒストン修飾状態が変化する遺伝子がみられる。H3K4me3 はその修飾 を失う遺伝子が多く、H3K27ac は新たに修飾を受ける遺伝子が多くみられる。



 図 14 遺伝子の重複関係 MKN7_EB#1、_EB#2 で、
ヒストン修飾変化の対象となる遺伝子は重複がみられる。

MKN7_EB#1を用いて、ヒストン修飾変化が起こる遺伝子機能を解析するため、 遺伝子オントロジー(GO: Gene Ontology)解析を行った。H3K4me3 消失が起こる 遺伝子の多くは、発達分化に関与する遺伝子と細胞接着関連遺伝子であった。 一方、H3K27ac 消失が起こる遺伝子の多くは、細胞増殖関連遺伝子であった。 細胞増殖関連遺伝子には、負の細胞増殖抑制に働くとされる btg1、DCUN1D3、 Apbb2、CDKN2A、CCDC85B、DAB2、nppb、NRP1、SEMA4F、Tnk1 が含まれて いた (図 15)。活性化マークの消失により、発癌に優位となる可能性が考えられ た。

H3K4me3 の獲得は、炎症細胞の走化性に関わる遺伝子に認められ、上皮細胞 系においても、ウイルス感染によるシグナル系が活性化することを示唆すると 考えられた。H3K27ac の獲得は細胞増殖関連遺伝子に認められたが、この中に は正および負の両方向の細胞増殖調節が含まれていた (図 16)。



図 15 ヒストン活性化マークが消失した遺伝子の遺伝子オントロジー MKN7_EB#1 を用いた遺伝子機能分類を行うと、H3K4me3 消失が起こる遺伝 子は、発達分化に関与する遺伝子と細胞接着関連遺伝子が多く、H3K27ac 消失 が起こる遺伝子は、細胞増殖関連遺伝子に多い。



図 16 ヒストン活性化マークを獲得した遺伝子の遺伝子オントロジー MKN7_EB#1を用いた遺伝子機能分類を行うと、H3K4me 獲得が起こる遺伝子 は、炎症細胞の活性化因子にみられ、H3K27ac 獲得が起こる遺伝子は、正およ び負の両方向の細胞増殖調節遺伝子にみられる。

3.2 ヒストン修飾変化と遺伝子発現

EBV 感染前 MKN7 親株と感染後 18 週間培養した MKN7 EB#1 において、ヒ

ストン修飾変化を起こす遺伝子群とその発現状態の比較を、マイクロアレイデ

ータを用いて行った。

MKN7 親株でヒストン活性化マーク H3K4me3、H3K27ac がある遺伝子群は、

親株でヒストン活性化マークがない遺伝子群と比較し、発現が高い傾向にあっ

た。これは、ヒストン活性化マークを持つ遺伝子は active な遺伝子であるという 知見に合致している。

次に、MKN7親株でヒストン活性化マークを持つ遺伝子群にのみ着目し、EBV 感染後も活性化マークを維持するか、または消失するかで親株での遺伝子発現 状態の比較を行った。ヒストン活性化マークを感染後も維持する遺伝子群と比 較して消失する遺伝子群は、親株での遺伝子発現が低い傾向にあった。このこ とから、ヒストン活性化マークの消失は、inactive な遺伝子に起きやすいと考え られた。また、ヒストン活性化マークの獲得は、遺伝子発現上昇と関連してい た。このことから、EBV 感染により活性化マークを獲得し、その発現が active となり発現が誘導される遺伝子群の存在が示唆された(図 17)。

また、DNAメチル化の誘導対象とならない遺伝子の発現変動ヒストン修飾状態変化みると、ヒストン活性化マークの消失は、発現が減少する遺伝子に濃縮がみられ、活性化マークの獲得は発現が増加する遺伝子に濃縮がみられた(図 18)。

以上から、EBV 感染によりヒストン活性化マークを獲得し遺伝子発現が上昇 しうる遺伝子群があること、および、遺伝子発現抑制に働く DNA メチル化が誘 導されない遺伝子でも、ヒストン活性化マークを消失することにより遺伝子発 現を抑制されうることが明らかとなった。



図 17 ヒストン修飾状態変化と遺伝子発現

EBV 感染前 MKN7 親株(WT)と感染後 18 週間培養した MKN7_EB#1 を用いた 遺伝子発現アレイスコアを棒グラフで示す。親株での発現レベルをみると、ヒ ストン活性化マークがある遺伝子は、ない遺伝子に比べて、親株での遺伝子発 現レベルは高い。ヒストン活性化マークを消失する遺伝子は、ヒストン活性化 マークを維持する遺伝子に比べ、親株での発現が低い。また、EBV 感染後のヒ ストン活性化マークの獲得は、遺伝子発現の上昇と、ヒストン活性化マークの 消失は、遺伝子発現の低下と関連している。



図 18 ヒストン修飾による発 現制御

DNAメチル化が誘導されず非 メチル化状態を保つ遺伝子で は、ヒストン活性化マークの獲 得は、遺伝子発現が上昇する遺 伝子に濃縮がみられ、活性化マ ークの消失は、遺伝子発現が減 少する遺伝子に濃縮がみられ る。

3.3 DNAメチル化とヒストン修飾変化の相関

EBV 感染がヒストン修飾にも影響を及ぼすこと、またヒストン修飾状態で遺 伝子発現が制御されていることがわかった。最後に、ヒストン修飾状態と、DNA メチル化の相関関係を検討した。EBV 感染前 MKN7 親株と感染後 18 週間培養 した MKN7_EB#1 の DNA メチル化状態 (第1章 3.3.2 参照) とヒストン修飾状 態を用いて解析を行った。

EBV 感染後、転写開始点メチル化抵抗性遺伝子群 Group1 (R) と、転写開始点 メチル化感受性遺伝子群 Group1 (S) について、ヒストン活性化マークの状態を 比較した。転写開始点メチル化抵抗性遺伝子群は、EBV 感染後にヒストン活性 化マークである H3K4me3/H3K27ac が存在している遺伝子が優位に多かったの に対し、転写開始点メチル化感受性遺伝子群ではヒストン活性化マークが存在 しない遺伝子が多かった。転写開始点メチル化抵抗性遺伝子群は、EBV 感染前 後で優位に活性化マークを維持しており、転写開始点メチル化感受性遺伝子群 は、EBV 感染前から優位にヒストン活性化マークが不在であった。興味深いこ とに、ヒストン活性化マークが抜ける遺伝子は転写開始点メチル化感受性を示 していた (図 19)。具体的には、転写開始点メチル化抵抗性遺伝子であったミ スマッチ修復遺伝子は、転写開始点近傍でヒストン活性化マークを維持してい た(図 20)。転写開始点メチル化感受性であった CDKN24 (p16) はヒストン活性 化マークを消失する遺伝子であった (図 21) 。また、EBV 感染前の親株でヒス トン抑制性マークである H3K27me3 を有する遺伝子は、転写開始点メチル化感 受性遺伝子に 多くみられていた (図 22) 。

DNA メチル化とヒストン修飾の関係では、DNA メチル化が誘導される場合に はヒストン活性化マークが不在あるいは消失する傾向にあること、一方で DNA メチル化が誘導されないあるいは転写開始点で抵抗する場合には、ヒストン活 性化マークの維持が重要であることが示された。以上から、ヒストン活性化マ ークは DNA メチル化抵抗性に働くと考えられた。さらに、もともとヒストン抑 制性マークである H3K27me3 マークをもつ遺伝子が、転写開始点メチル化感受 性遺伝子となりやすい可能性が示唆された。



図 19 DNAメチル化パターンとヒストン修飾状態変化の相関 DNAメチル化状態とヒストン活性化マークの状態ごとの遺伝子数で示す。 転写開始点メチル化抵抗性遺伝子 Group1 (R)と感受性遺伝子 Group1 (S) で遺伝 子数の比較を行うと、活性化マークが感染前に存在することは転写開始点メチ ル化抵抗性に、存在しないことは転写開始点メチル化感受性に、優位に働くこ とが示される。また活性化マークを感染後に消失する遺伝子は、転写開始点メ チル化感受性に多くみられる。



図 20 ミスマッチ修復遺伝子のヒストン修飾状態 転写開始点メチル化抵抗性遺伝子であったミスマッチ修復遺伝子 MSH6 や MLH1 は転写開始点近傍で活性化マークを維持している。



図 21 *CDKN2A(p16)*のヒストン活性化マークと DNA メチル化 転写開始点メチル化感受性遺伝子であった *CDKN2A (p16*)は DNA メチル化が 誘導され、ヒストン活性化マークの消失がみられている。



図 22 EBV 感染前 H3K27me3 ピーク数と転写開始点メチル化誘導 感染後 18 週間培養した MKN7_EB#1 を用いたメチル化状態の分類ごとに、 EBV 感染前 MKN7 親株 (WT)での H3K27me3 ピーク数を表す。転写開始点メチ ル化感受性である Group1 (S)に所属する遺伝子には。感染前にヒストン抑制性マ ークである H3K27me3 ピークが多くみられる。

第4章 考察

EBV 感染後 18 週間経過した低メチル化胃癌細胞株 MKN7 では、異常 DNA メ チル化だけではなくヒストン修飾変化も誘導されていた。ヒストン修飾変化は 遺伝子発現と相関しており、特にヒストン活性化マーク H3K4me3 の消失は、細 胞接着遺伝子群に多くみられ、癌化との関連が推察された。ただし、H3K27ac の変化は、細胞増殖の正の抑制、負の抑制どちらの遺伝子にもみられており、 EBV 感染は細胞増殖に複雑な影響を与えていると推察された。

DNA メチル化とヒストン修飾の関係として、 (1)ヒストン活性化マークが転 写開始点に存在する場合、転写開始点はメチル化されず遺伝子発現が保たれる こと、(2) DNA メチル化はヒストン活性化マークがない、あるいは抜ける遺伝子 に起こりやすいこと、(3) H3K27me3 でマークされている遺伝子は、DNA メチル 化が起こりやすいこと、(4) 脱メチル化が起こる遺伝子が存在すること、が示さ れた (図 23)。



図 23 EBV 感染後のエピゲノム変化

EBV 感染後、ホストゲノムで誘導される DNA メチル化とヒストン修飾変化に ついて図中(1)~(4)が起こっていた。ヒストン脱修飾酵素や DNA メチル基転移 酵素などのエピゲノム修飾因子の相互作用が考えられる。

まず、ヒストン活性化マークの DNA メチル化抵抗性に関して考察する。ヒス トン活性化マークの存在による DNA メチル化抵抗性は、不活化している遺伝子 でも H3K4me2 がプロモーターに残存すると DNA メチル化レベルが低くなりヒ ストン H3K4 のメチル化が *de novo* の DNA メチル化に抵抗する可能性があると いう報告[50]に合致する。ヒストン H3 のアセチル化が CpG アイランドを特徴づ けているという報告[73]から、H3K27ac も DNA メチル化に影響を与えることが 考えられていたが、本研究では、H3K27ac も H3K4me3 とともに、DNA メチル 化抵抗性に働くことが示された。さらには、転写開始点 近傍 500bp 以内まで DNA メチル化が誘導されていても、ヒストン活性化マークが存在することで転 写開始点はメチル化されず、遺伝子の発現は維持されるという点で、ヒストン 活性化マークが DNA メチル化抵抗性をより増強する可能性を強く示唆する。

DNA メチル化は、ヒストン抑制性マークである H3K27me3 を有する遺伝子に 起こりやすい傾向がみられた。これは、発生・分化の段階、また癌において、 H3K27me3 でマークされている遺伝子に DNA メチル化が起こりやすいという報 告[74]に合致する。H3K27me3 のメチル化をつかさどる EZH2 が、DNA メチル 基転移酵素のリクルートに関与するためだと考えられている[75]。

DNA メチル化と活性化マークの消失に関しての結果について考察を加える。 H3K4me3 の消失が DNA メチル化の下地になる可能性としては、H3K4 のメチル 化が、DNA メチル基転移酵素 DNMT3a/3b の結合を阻害し、*de novo* の DNA メ チル化に抵抗するという報告があげられる[67]。H3K4 のメチル化が消失するこ とにより、DNA メチル基転移酵素の結合能があがり、結果として DNA メチル 化が誘導される可能性は興味深い。また、マークの消失と DNA メチル化誘導に 関しては、K4 脱メチル基酵素 LSD1 が低酸素刺激下で誘導され、H3K4 の脱メ チル化の結果として *MLH1* のプロモーター領域の DNA メチル化が起こったとい う *in vitro* 実験も報告されている[22]。この LSD1 は、ヒストン修飾変化による

67

DNAメチル化誘導だけではなく、DNAメチル基転移酵素 DNMT1 自身のリシン (K)残基を脱メチル化し、DNMT1 の安定化に働くという報告もある[76]。今回、 EBV 感染という刺激により、LSD1 が誘導され、H3K4 脱メチル化、あるいは DNMT1 のリシン残基脱メチル化が起こった可能性が推察される。

ヒストン活性化マークの消失が DNA メチル化の下地となるか、あるいは、 DNA メチル化が誘導され遺伝子が不活化するために活性化マークが消失するか は実験的には、ヒストン修飾変化をより短期間で時系列的に解析すること、お よび、DNA メチル基転移酵素やヒストン修飾変化責任酵素をノックダウンした ときのエピゲノム修飾変化をみることで証明が可能であり、今後の課題である。

また、本研究では、何がゲノムワイドに、ヒストン修飾酵素やDNAメチル基 転移酵素を誘導し局在変化を起こしているのかが、問題として提起された。ウ イルス潜伏膜タンパク質である LMP は DNA メチル基転移酵素の転写量や活性 を上昇させ、EBNA はヒストンアセチル化修飾酵素やクロマチンリモデリング 因子と相互作用を持つことが報告されている[77]。胃癌においては、LMP2A が STAT3 シグナルを介して DNMT1 の活性化をするといわれている[78]。しかし、 これは特定の遺伝子に着目した研究で、ゲノムワイドなエピゲノム変化はみて おらず、その相関関係については考慮されていない。今回、新たにわかった DNA メチル化の誘導時期、および DNA メチル化とヒストン修飾の相互関係は、EBV 関連胃癌で起こるエピゲノム変化の責任因子を探索する鍵となるはずである。 総括

EBV 感染により、DNA メチル化とヒストン修飾変化が、ホストゲノムに誘導 されることを示した。その誘導にはウイルス感染によって起こされる特異なメ カニズムが関わると考えられた

本研究では、Infinium ビーズアレイの解析方法を工夫することにより、遺伝子 ごとの DNA メチル化を可視化し、メチル化パターンを分類することが可能とな り、DNA メチル化にも転写開始点まで完全にメチル化され遺伝子発現が抑制さ れる遺伝子と、転写開始点はメチル化に抵抗し遺伝子発現が維持される遺伝子 があることがわかった。DNA メチル化による遺伝子発現抑制は、EBV 関連胃癌 の組織学的、分子病理学的特徴の形成に寄与すると考えられた。

また、EBV 感染によって引き起こされる DNA メチル化はヒストン修飾との相 関関係があり、DNA メチル化に抵抗するホスト側の因子としてヒストン活性化 マークの存在が示唆された。おそらくウイルス感染で誘導される因子により起 こされると考えられる活性化マークの消失は、完全な DNA メチル化と関連して いた。

今後は、この責任因子の探究を行うことで、EBV 関連胃癌の特徴のみならず、 一般的なエピゲノム制御機構の解明につながると考えられる。

SDS Lysis Buffer

- 10 mM Tris-Cl (pH 8.0)
- 150 mM NaCl
- 1 % SDS
- 1 mM EDTA

ChIP dilution buffer

- 20 mM Tris-Cl (pH 8.0)
- 150 mM NaCl
- 1 mM EDTA
- 1 % Triton X-100
- 100x Complete proteinase inhibitor

Wash Buffer 1

- 20 mM Tris-HCl (pH 8.0)
- 500mM NaCl
- 2 mM EDTA
- 1 % TritonX-100
- 0.1 % SDS
- 1mM PMSF

Wash Buffer 2

- 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)
- 1 mM EDTA
- 0.25 M LiCl
- 0.5 % Na-Deoxycholate
- 0.5% NP-40
- 1mM PMSF

Elution Buffer

- 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)
- 10 mM EDTA
- 1 % SDS

プライマー配列

-			anneal
Gene	Primer types	Primer sequence	(°C)
Positive control			
ACTB	Fwd	CTTAGAAGTCGCAGGACCACA	60
	Rev	GTTTGTAGCCTTCATCACGG	
GAPDH	Fwd	A A G A C C TT G G G C T G G G A C T	60
0/11 // 11	Rev	GCTGCGGGCTCAATTTATAG	00
	100	0010000001011111110	
Negative control			
HBB	Fwd	GGGCTGAGGGTTTGAAGTCC	60
	Rev	CCACAGGGTGAGGTCTAAGTG	
CDKN24(n16)	Fwd	CCCGTCCGTATTAAATAAACC	60
021111211(p10)	Rev	GACTGCTCTCTCCTCCC	00
Primers for j	oyrosequencin	g	anneal
Gene	Primer types	Primer sequence	(°C)
'ommon-markers			
AMPH	Fwd	GGGGAGTTGAGAAGAGTAGA	56
	Rev	CTTCTCCCCCTCCTCCCTTACTC	
	Seq	GGAGTTGAGAAGAGTAGAG	
SORCS3	Fwd	GGGGAATTTGATTTTAAGAAAGAAAGT	55
	Rev	TCTCCACTCTTCCCTCCTAAC	
	Seq	GTTTGGAATTATTTTTTGGATAAG	
AIAPI	Fwd	TTGGGA GA GTTA GGTTTTGA GG	55
10/11/1	Rev	AAAAAAAATCCCTTAATTTACAACAT	22
	Seq	GTGGATTTAATAGTTTTTAGGA	
High-markers	E4	CONCILLA COCOLOTIA OLA CO	62
COL9A2	Pwu		03
	Sea	AGATTTAGTATTTTGGATTTTGGTA	
	ч		
EYAl	Fwd	TGTGGAGGGTTTTTTTTGGGGAATA	55
	Rev	AACCTCCATTCCTAACATAATTTTACT	
	Seq	TGTAGAGGAGTTTTATTTTTAGAAG	
ZNF365	Fwd	AGTTTGTTAGGGTTTGTAGAAAG	55
	Rev	CTACCCAACTAACCAAAACATCATCTAC	
	Seq	GGGGAATGATTTTAGTATTTT	
RV(+) - wash			
CXXC4	Fwd	GGGA GTGA A GGGTTGTTA TGA	58
022107	Rev	TATCCCCTAAACACTACAAACC	50
	Seq	GGGATAGAGGAAAAAGT	
	-		
TIMP2	Fwd	GTTGTTTTTTAAGGATGTGTTTGTT	55
	Rev	AAACCCCCAAAACCTACATTAACC	
	Seq	TTTGTTGAGGGTTTGG	
PLXND I	Fwd	GTTAAGTTTAGTATGTTGGGGGAATAT	55
	Rev	CAACTACAACAAAATCCTACAACTAA	
謝辞

本研究の指導教官である東京大学大学院医学系研究科人体病理学・病理診断 学分野、深山正久教授には、本研究の遂行にあたり、多大なるご高配とご指導、 ご鞭撻を賜りました。

本研究の指導委託教官である千葉大学大学院医学研究院分子学講座、金田篤 志教授、また、東京大学先端科学技術研究センターゲノムサイエンス分野、油 谷浩幸教授には、本研究の遂行にあたり、多大なるご高配とご指導、ご鞭撻を 賜りました。

本研究の遂行にあたり、千葉大学大学院医学研究院分子学講座、喜多和子講 師、菅谷茂助教、松坂恵介助教、眞野恭伸特任助教、福世真樹特任助教、篠原 憲一特任研究員に多大なるご指導、ご協力を賜りました。

本研究の解析にあたり、東京大学先端科学技術研究センターゲノムサイエンス分野、山中遼太氏、仲木竜氏に多大なるご協力を賜りました。

本研究の試料作製・実験遂行にあたり、千葉大学大学院医学研究院分子腫瘍 学講座、田中裕美技術補佐員、佐藤知穂美技術補佐員、東京大学先端科学技術 研究センターゲノムサイエンス分野、椎名香織技術員、目黒裕子技術員、川辺 さおり技術員、藤中恭子技術員に多大なるご協力を賜りました。

本研究全般において、東京大学大学院医学系研究科人体病理学・病理診断学 分野、国田朱子助教、東京大学先端科学技術研究センターゲノムサイエンス分 野、辰野健二博士研究員、山本尚吾特任研究員、関元昭博士研究員、野中綾博 士研究員、岡部篤史博士研究員、野村征太郎協力研究員には、数々のご教示、 ご協力を頂きました。

本研究で、ご指導、ご鞭撻、ご高配、ご協力賜りました上記の方々、および 千葉大学大学院医学研究院分子腫瘍学講座、東京大学大学院医学系研究科人体 病理学・病理診断学分野、東京大学先端科学技術研究センターゲノムサイエン ス分野の皆々様に、深謝申し上げる次第です。

大阪大学大学院生命機能研究科、木村宏准教授からは、H3K27ac のマウスモ ノクローナル抗体のご提供を頂きました。厚く御礼申し上げます。

74

参考文献

- Wang, K., et al., Whole-genome sequencing and comprehensive molecular profiling identify new driver mutations in gastric cancer. Nat Genet, 46(6): p. 573-82. 2014.
- Muratani, M., et al., Nanoscale chromatin profiling of gastric adenocarcinoma reveals cancer-associated cryptic promoters and somatically acquired regulatory elements. Nat Commun, 5: p. 4361. 2014.
- 3. Matsusaka, K., et al., *Classification of Epstein-Barr virus-positive gastric cancers by definition of DNA methylation epigenotypes.* Cancer Res, **71**(23): p. 7187-97. 2011.
- 4. Wang, K., et al., *Exome sequencing identifies frequent mutation of ARID1A in molecular subtypes of gastric cancer.* Nat Genet, **43**(12): p. 1219-23. 2011.
- 5. Abe, H., et al., ARID1A expression loss in gastric cancer: pathway-dependent roles with and without Epstein-Barr virus infection and microsatellite instability. Virchows Arch, **461**(4): p. 367-77. 2012.
- 6. D, B.H.P. and B.K.H.P. D, *Epigenetics: Linking Genotype and Phenotype in Development and Evolution*. 2011: University of California Press.
- Liyanage, V.R., et al., DNA modifications: function and applications in normal and disease States. Biology (Basel), 3(4): p. 670-723. 2014.

- Jair, K.W., et al., *De novo CpG island methylation in human cancer cells.* Cancer Res,
 66(2): p. 682-92. 2006.
- 9. Denis, H., M.N. Ndlovu, and F. Fuks, *Regulation of mammalian DNA* methyltransferases: a route to new mechanisms. EMBO Rep, **12**(7): p. 647-56. 2011.
- Ioshikhes, I.P. and M.Q. Zhang, Large-scale human promoter mapping using CpG islands. Nature Genetics, 26(1): p. 61-63. 2000.
- Bird, A., DNA methylation patterns and epigenetic memory. Genes Dev, 16(1): p.
 6-21, 2002.
- Lee, J., et al., Erasing genomic imprinting memory in mouse clone embryos produced from day 11.5 primordial germ cells. Development, 129(8): p. 1807-17.
 2002.
- Sharp, A.J., et al., DNA methylation profiles of human active and inactive X chromosomes. Genome Res, 21(10): p. 1592-600. 2011.
- Laurent, L., et al., *Dynamic changes in the human methylome during differentiation.* Genome Res, **20**(3): p. 320-31. 2010.
- Choi, J.K., Contrasting chromatin organization of CpG islands and exons in the human genome. Genome Biol, 11(7): p. R70. 2010.

- 16. Maunakea, A.K., et al., *Intragenic DNA methylation modulates alternative splicing* by recruiting MeCP2 to promote exon recognition. Cell Res, **23**(11): p. 1256-69. 2013.
- Ling, C. and L. Groop, *Epigenetics: a molecular link between environmental factors and type 2 diabetes.* Diabetes, 58(12): p. 2718-25. 2009.
- Suarez-Alvarez, B., et al., DNA methylation: a promising landscape for immune system-related diseases. Trends Genet, 28(10): p. 506-14. 2012.
- Handy, D.E., R. Castro, and J. Loscalzo, *Epigenetic modifications: basic mechanisms* and role in cardiovascular disease. Circulation, **123**(19): p. 2145-56. 2011.
- Baylin, S.B. and J.G. Herman, DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. Trends Genet, 16(4): p. 168-74. 2000.
- Herman, J.G., et al., Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. Proc Natl Acad Sci U S A, 95(12): p. 6870-5. 1998.
- 22. Leung, S.Y., et al., *hMLH1 promoter methylation and lack of hMLH1 expression in sporadic gastric carcinomas with high-frequency microsatellite instability.* Cancer Res, **59**(1): p. 159-64. 1999.

- 23. Esteller, M., et al., MLH1 promoter hypermethylation is associated with the microsatellite instability phenotype in sporadic endometrial carcinomas. Oncogene, 17(18): p. 2413-7. 1998.
- 24. Graff, J.R., et al., *E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas.* Cancer Res, **55**(22): p. 5195-9. 1995.
- 25. Graff, J.R., et al., Distinct patterns of E-cadherin CpG island methylation in papillary, follicular, Hurthle's cell, and poorly differentiated human thyroid carcinoma. Cancer Res, **58**(10): p. 2063-6. 1998.
- Yoshiura, K., et al., Silencing of the E-cadherin invasion-suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas. Proc Natl Acad Sci U S A, 92(16): p. 7416-9.
 1995.
- 27. Toyota, M., et al., CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. Proc Natl
 Acad Sci U S A, 96(15): p. 8681-6. 1999.
- 28. Toyota, M., et al., Aberrant methylation in gastric cancer associated with the CpG island methylator phenotype. Cancer Res, **59**(21): p. 5438-42. 1999.
- 29. Noushmehr, H., et al., Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. Cancer Cell, **17**(5): p. 510-22. 2010.

- Hughes, L.A., et al., The CpG island methylator phenotype: what's in a name?
 Cancer Res, 73(19): p. 5858-68. 2013.
- 31. Turcan, S., et al., *IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype.* Nature, **483**(7390): p. 479-83. 2012.
- 32. Young, L.S. and A.B. Rickinson, *Epstein-Barr virus: 40 years on.* Nat Rev Cancer,
 4(10): p. 757-68. 2004.
- 33. Reisinger, J., et al., Visualization of episomal and integrated Epstein-Barr virus DNA by fiber fluorescence in situ hybridization. Int J Cancer, **118**(7): p. 1603-8. 2006.
- 34. Lu, F., et al., Genome-wide analysis of host-chromosome binding sites for Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 1 (EBNA1). Virol J, 7: p. 262. 2010.
- Young, L.S. and P.G. Murray, *Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours*. Oncogene, **22**(33): p. 5108-21. 2003.
- Allday, M.J., et al., CpG methylation of viral DNA in EBV-associated tumours. Int J Cancer, 45(6): p. 1125-30. 1990.
- 37. Takacs, M., et al., Epigenetic regulation of latent Epstein-Barr virus promoters.
 Biochim Biophys Acta, 1799(3-4): p. 228-35. 2010.
- Shibata, D. and L.M. Weiss, *Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinoma*.
 Am J Pathol, **140**(4): p. 769-74. 1992.

- Fukayama, M. and T. Ushiku, *Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma*.
 Pathol Res Pract, **207**(9): p. 529-37. 2011.
- 40. Maeda, E., et al., CT appearance of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma.
 Abdom Imaging, 34(5): p. 618-25. 2009.
- Uozaki, H. and M. Fukayama, Epstein-Barr virus and gastric carcinoma--viral carcinogenesis through epigenetic mechanisms. Int J Clin Exp Pathol, 1(3): p. 198-216. 2008.
- Yanai, H., et al., Epstein-Barr virus infection in non-carcinomatous gastric epithelium. J Pathol, 183(3): p. 293-8. 1997.
- Ushiku, T., et al., p73 gene promoter methylation in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. Int J Cancer, 120(1): p. 60-6. 2007.
- 44. Truong, C.D., et al., Characteristics of Epstein-Barr virus-associated gastric cancer:
 a study of 235 cases at a comprehensive cancer center in U.S.A. J Exp Clin Cancer
 Res, 28: p. 14, 2009.
- 45. Hayatsu, H., Discovery of bisulfite-mediated cytosine conversion to uracil, the key reaction for DNA methylation analysis--a personal account. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 84(8): p. 321-30. 2008.

- 46. Colella, S., et al., *Sensitive and quantitative universal Pyrosequencing methylation analysis of CpG sites.* Biotechniques, **35**(1): p. 146-50. 2003.
- 47. Dedeurwaerder, S., et al., Evaluation of the Infinium Methylation 450K technology.
 Epigenomics, 3(6): p. 771-84. 2011.
- 48. Ke, Y., T. Ning, and B. Wang, [Establishment and characterization of a SV40 transformed human fetal gastric epithelial cell line-GES-1]. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi, 16(1): p. 7-10. 1994.
- Imai, S., J. Nishikawa, and K. Takada, Cell-to-cell contact as an efficient mode of Epstein-Barr virus infection of diverse human epithelial cells. J Virol, 72(5): p. 4371-8. 1998.
- 50. Weber, M., et al., *Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome.* Nat Genet, **39**(4): p. 457-66. 2007.
- 51. Au, W.Y., et al., Epstein-barr virus-related gastric adenocarcinoma: an early secondary cancer post hemopoietic stem cell transplantation. Gastroenterology, 129(6): p. 2058-63. 2005.
- Higashi, H., et al., Helicobacter pylori CagA induces Ras-independent morphogenetic response through SHP-2 recruitment and activation. J Biol Chem, 279(17): p. 17205-16. 2004.

- 53. Maekita, T., et al., *High levels of aberrant DNA methylation in Helicobacter* pylori-infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk. Clin Cancer Res, **12**(3 Pt 1): p. 989-95. 2006.
- 54. Reyes-Sandoval, A. and H.C. Ertl, *CpG methylation of a plasmid vector results in extended transgene product expression by circumventing induction of immune responses.* Mol Ther, **9**(2): p. 249-61. 2004.
- 55. Kaneda, A., et al., *Epstein-Barr virus infection as an epigenetic driver of tumorigenesis.* Cancer Res, **72**(14): p. 3445-50. 2012.
- 56. Luger, K., et al., Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 A resolution.
 Nature, 389(6648): p. 251-60. 1997.
- 57. Woodcock, C.L., A.I. Skoultchi, and Y. Fan, *Role of linker histone in chromatin* structure and function: H1 stoichiometry and nucleosome repeat length. Chromosome Res, **14**(1): p. 17-25. 2006.
- Kouzarides, T., Chromatin modifications and their function. Cell, 128(4): p. 693-705.
 2007.
- 59. Kimura, H., *Histone modifications for human epigenome analysis.* J Hum Genet,
 58(7): p. 439-45. 2013.

- 60. Chi, P., C.D. Allis, and G.G. Wang, Covalent histone modifications--miswritten, misinterpreted and mis-erased in human cancers. Nat Rev Cancer, 10(7): p. 457-69.
 2010.
- Barski, A., et al., *High-resolution profiling of histone methylations in the human genome.* Cell, **129**(4): p. 823-37. 2007.
- Greer, E.L. and Y. Shi, *Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance.* Nat Rev Genet, 13(5): p. 343-57. 2012.
- 63. McCabe, M.T., et al., *EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations.* Nature, **492**(7427): p. 108-12. 2012.
- Helin, K. and D. Dhanak, Chromatin proteins and modifications as drug targets.
 Nature, 502(7472): p. 480-8. 2013.
- 65. Dhayalan, A., et al., The Dnmt3a PWWP domain reads histone 3 lysine 36
 trimethylation and guides DNA methylation. J Biol Chem, 285(34): p. 26114-20.
 2010.
- 66. Lehnertz, B., et al., Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. Curr Biol, 13(14): p. 1192-200. 2003.

- 67. Ooi, S.K., et al., *DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA.* Nature, **448**(7154): p. 714-7. 2007.
- Carey, M.F., C.L. Peterson, and S.T. Smale, *Chromatin immunoprecipitation (ChIP)*.
 Cold Spring Harb Protoc, **2009**(9): p. pdb prot5279. 2009.
- 69. Langmead, B., et al., Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. Genome Biol, **10**(3): p. R25. 2009.
- Giardine, B., et al., Galaxy: a platform for interactive large-scale genome analysis.
 Genome Res, 15(10): p. 1451-5. 2005.
- Trapnell, C., L. Pachter, and S.L. Salzberg, *TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq.* Bioinformatics, **25**(9): p. 1105-11. 2009.
- 72. Trapnell, C., et al., *Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks.* Nat Protoc, **7**(3): p. 562-78. 2012.
- Roh, T.Y., S. Cuddapah, and K. Zhao, Active chromatin domains are defined by acetylation islands revealed by genome-wide mapping. Genes Dev, 19(5): p. 542-52.
 2005.
- 74. Schlesinger, Y., et al., *Polycomb-mediated methylation on Lys27 of histone H3* pre-marks genes for de novo methylation in cancer. Nat Genet, **39**(2): p. 232-6. 2007.

- Vire, E., et al., *The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation*.
 Nature, **439**(7078): p. 871-4. 2006.
- 76. Wang, J., et al., The lysine demethylase LSD1 (KDM1) is required for maintenance of global DNA methylation. Nat Genet, 41(1): p. 125-9. 2009.
- Birdwell, C.E., et al., Genome-wide DNA methylation as an epigenetic consequence of Epstein-Barr virus infection of immortalized keratinocytes. J Virol, 88(19): p. 11442-58. 2014.
- Tempera, I. and P.M. Lieberman, *Epigenetic regulation of EBV persistence and oncogenesis*. Semin Cancer Biol, 26: p. 22-9. 2014.