

## 論文の内容の要旨

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

### 【第 1 部 EBV 感染が誘導する新規 DNA メチル化】

#### 第 1 章 序論

胃癌の約 10%を占める Epstein-Barr virus (EBV) 関連胃癌は、ほぼすべての腫瘍細胞にモノクローナルな EBV 感染があり、腫瘍発生の初期段階に EBV 感染が関与すると考えられている。このような EBV 関連胃癌は臨床病理学的・分子生物学的な特徴を持ち、組織型はリンパ球浸潤の強い低分化腺癌であることや、ミスマッチ修復遺伝子異常によるマイクロサテライト不安定性 (MSI: microsatellite instability) は示さないことが知られている。また、他の胃癌に比べてさらにゲノム広範な DNA 異常メチル化がみられ、この DNA メチル化は EBV 感染により誘導されることが報告された。

EBV 感染による異常 DNA メチル化誘導についての詳細な検討を加えるため、*in vitro* に EBV を上皮細胞株に感染させる AKATA システムを用いて、正常胃粘膜上皮への EBV 感染による DNA メチル化の誘導検討や、時間的・空間的な DNA メチル化模様の解析を行った。

#### 第 2 章 材料と方法

ヒト低メチル化胃癌細胞株である MKN7 親株と、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、SV40 による不死化胃粘膜上皮細胞株 GES1 を用いた。Infinium 450K ビーズアレイとパイロシークエンシングにより DNA メチル化解析を行った。遺伝子発現解析はマイクロアレイと遺伝子オントロジー (GO: Gene ontology) 解析を行った。

#### 第 3 章 結果

正常上皮への EBV 感染を模倣した不死化胃粘膜上皮細胞株 GES1 にも、MKN7 親株ですでに DNA メチル化されている遺伝子も含むゲノム広範な DNA メチル化が EBV 感染で誘導された。その DNA メチル化は、MKN7 および GES1 ともに EBV 感染後、約 8 日目でウイルスゲノムのメチル化が先行し、約 14 日目から宿主ゲノムのメチル化がゲノムワイドに誘導され約 1 か月で完成した。

MKN7\_EB#1 を用いた Infinium450K の解析では、DNA メチル化状態による遺伝子のグループ分類が可能であった。転写開始点 1,000bp 以内に EBV 感染で新規 DNA メチル化が誘導される遺伝子は、転写開始点も含めてメチル化される「転写開始点メチル化感受性遺伝子」と、転写開始点 500bp 以内で

メチル化に抵抗する「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。感染後に脱メチル化する「転写開始点脱メチル化遺伝子」も存在した。

EBV 感染後、「転写開始点メチル化感受性遺伝子」は、発現が抑制されたが ( $P=1.6\times 10^{-18}$ , *t*-test)「転写開始点メチル化抵抗性遺伝子」は、発現が維持された。「転写開始点脱メチル化遺伝子」は、遺伝子発現が上昇する遺伝子もみられた。GO 解析を行うと、発現が維持される「転写開始点メチル化抵抗性遺伝子」は、DNA 修復関連遺伝子が優位に多く ( $P=1.0\times 10^{-10}$ )、細胞周期関連遺伝子も有意な濃縮がみられた ( $P=1.0\times 10^{-8}$ )。発現が抑制される「転写開始点メチル化感受性遺伝子」は、細胞増殖制御関連遺伝子と細胞接着関連遺伝子が優位に多くみられた ( $P<1.0\times 10^{-4}$ )。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し、転写開始点を含むメチル化で発現が抑制されることで異常な増殖に働くと考えられた。

#### 第 4 章 考察

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、胃粘膜上皮への EBV 感染成立後、短時間で宿主ゲノムの DNA メチル化が完成し発癌を促進する可能性がある。また、EBV ゲノムがメチル化し潜伏感染が成立したと考えられるタイミングで、宿主ゲノムのメチル化が開始した結果は、ウイルスにより誘導された宿主細胞側の DNA メチル化機構が、EBV ゲノムのメチル化で完了せずに、潜伏感染成立後、宿主ゲノムのメチル化に進行する可能性を示唆した。

EBV 感染による新規 DNA メチル化遺伝子には、「転写開始点メチル化抵抗性遺伝子」と、転写開始点までメチル化される「転写開始点メチル化感受性」があることが明らかになった。遺伝子発現が抑制される「転写開始点メチル化感受性遺伝子」は、*CDH1* などの細胞接着関連遺伝子を含み、低分化腺癌という組織型の説明となりえた。転写開始点がメチル化せずに発現が維持される「転写開始点メチル化抵抗性遺伝子」にはミスマッチ修復遺伝子 *MLH1* や *MSH2*、*MSH6* などが含まれ、EBV 関連胃癌が MSI でない特徴に合致した。DNA メチル化誘導パターンは、EBV 関連胃癌の臨床的特徴を説明すると考えられた。また、DNA メチル化から転写開始点を守る機構の存在が考えられ、第 2 部で検証した。

### 【第 2 部 EBV 感染が誘導するヒストン修飾変化】

#### 第 1 章 序論

ヒストン修飾はエピゲノム機構の一つである。転写開始点周囲の H3K4me3 や H3K27ac は転写活性化の指標であり、H3K27me3 は遺伝子不活化の指標である。また、ヒストン修飾は DNA メチル基転移酵素の局在制御との関連が指摘されている。以上から、EBV 感染によるエピゲノム変化の誘導とエピゲノム間の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った。

## 第2章 材料と方法

MKN7 親株と、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、EB#2 を用いた。H3K4me3、H3K27ac、H3K27me3 に対するクロマチン免疫沈降 (Chromatin immunoprecipitation: CHIP)、および CHIP-seq 解析をした。遺伝子発現解析はマイクロアレイと GO 解析を行った。

## 第3章 結果

MKN7\_EB#1、#2 において、ヒストン活性化マーク H3K4me3、H3K27ac とともに、RefSeq 21,839 遺伝子中、H3K4me3 は約 5%、H3K27ac は約 8%の遺伝子で感染前後での変化がみられ、遺伝子はクローン間で重複した。

活性化マークの消失は遺伝子発現抑制と相関した。H3K4me3 を消失する遺伝子は、発達分化に関与する遺伝子と細胞接着関連遺伝子であった。H3K27ac を消失する遺伝子は、細胞増殖関連遺伝子であった。細胞増殖関連遺伝子は、負の細胞増殖抑制に働く遺伝子で、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。活性化マークの獲得は遺伝子発現上昇と相関し、H3K4me3 の獲得は炎症細胞の走化性に関わる遺伝子にみられ、上皮細胞系においてもウイルス感染による炎症シグナル系が活性化することが示唆された。H3K27ac の獲得は細胞増殖関連遺伝子にみられたが、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。

MKN7 親株での遺伝子発現に着目してみると、MKN7 親株でヒストン活性化マークがある遺伝子は、活性化マークがない遺伝子と比較し発現が高く、ヒストン活性化マークを持つ遺伝子が active であるという知見に合致した。また、EBV 感染後に活性化マークを消失する遺伝子は親株での発現が低く、ヒストン活性化マークの消失が inactive な遺伝子に起きやすいと考えられた。

ヒストン修飾状態と DNA メチル化の相関関係の解析では、「転写開始点メチル化抵抗性遺伝子」は、EBV 感染後にヒストン活性化マークが存在する遺伝子が優位に多く、「転写開始点メチル化感受性遺伝子」は、ヒストン活性化マークが存在しない、ないしは、感染後に消失する遺伝子が多かった。以上から、ヒストン活性化マークの消失が DNA メチル化感受性となる可能性が考えられた。「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が、「転写開始点メチル化感受性遺伝子」であった *CDKN2A* は、EBV 感染後に活性化マークを消失した。さらに、MKN7 親株でヒストン抑制性マークである H3K27me3 もつ遺伝子が、メチル化感受性遺伝子となりやすい事が示された。

## 第4章 考察

EBV 感染は、遺伝子発現制御を行うヒストン修飾変化も誘導した。また、ヒストン修飾と DNA メチル化には相互関係が示された。ヒストン活性化マークの存在は DNA メチル化抵抗性に働き、不在な

いしは消失は DNA メチル化感受性に働いた。DNA メチル基転移酵素 DNMT3a/3b の結合を H3K4me3 が阻害し *de novo* の DNA メチル化に抵抗するという報告や、H3K4 脱メチル基酵素が DNMT1 の安定化に働き DNA メチル化を誘導したという報告からは、EBV 感染後にみられる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。EBV 感染によるヒストン活性化マーク変化と DNA メチル化誘導の前後関係を明らかにするために、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のが、今後の課題である。

本研究により、新たにわかった EBV 感染後の DNA メチル化の誘導時期や、ゲノム広範な DNA メチル化およびヒストン修飾とその相互関係は、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。