

審査の結果の要旨

氏名 船田 さやか

本研究は、低メチル化胃癌、高メチル化胃癌に比べてさらに DNA メチル化がゲノムワイドにみられる超高メチル化という特徴的なエピジェノタイプを呈する Epstein-Barr virus (EBV) 関連胃癌について、EBV 感染でホストゲノムに誘導されるエピゲノム変化を明らかにするために行われた。 *in vitro* で EBV を上皮細胞に感染させる AKATA システムを用いて、低メチル化胃癌細胞株 (MKN7) および不死化胃粘膜上皮細胞株 (GES1) に EBV を感染させ、ホストゲノムの異常 DNA メチル化誘導およびヒストン修飾変化を解析し、以下の結果を得た。

1. 不死化胃上皮細胞株 (GES1) に EBV が感染し、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。低メチル化胃癌細胞株 (MKN7) では既にメチル化されている一方 GES1 ではメチル化されていない遺伝子も、EBV 感染によりメチル化が誘導された。EBV 感染は、低メチル化胃癌ですでにメチル化されているような遺伝子も含むゲノムワイドな DNA メチル化を誘導すること、また、正常に近い胃上皮粘膜 GES1 においても DNA メチル化を誘導できることが示された。
2. MKN7 および GES1 を用いて、EBV 感染後の時系列的な DNA メチル化誘導解析を行ったところ、既報の 18 週間よりはるかに早い 24 日の段階で、ホストゲノムのメチル化エピジェノタイプが完成していることが同定された。また、ホストゲノムの DNA メチル化に先行して、感染後 17 日にウイルスゲノムの DNA メチル化が完成していた。以上から、EBV 感染後短時間で、ウイルスの潜伏感染成立およびホストゲノムの異常 DNA メチル化誘導が起こることが示された。EBV 感染胃粘膜が約 50 日間でメチル化を伴う胃癌となった報告のように、短期間での発がんに寄与する可能性がある。また、異常 DNA メチル化誘導の機序として、ウイルスとホストゲノムの DNA メチル化誘導開始時期にタイムラグがあることから、ウイルスが潜伏感染に用いる DNA メチル化機構が、ウイルス潜伏感染成立後に、ホストゲノムまでメチル化してしまう可能性が示唆された。
3. EBV 感染後クローニングし 18 週間継代を維持して樹立されたクローン MKN7_EB#1 を用いた DNA メチル化解析により、EBV 感染で誘導される転写開始点周囲の新規 DNA メチル化には、次の 2 パターンがあることを見出した。転写開始点を含めた DNA メチル化を受ける転写開始点メチル化感受性遺伝子と、転写開始点のみ DNA メチル化に抵抗する転写開始点メチル化抵抗性遺伝子である。
4. 転写開始点メチル化感受性遺伝子は、遺伝子発現が優位に抑制され ($P=1.0 \times 10^{-18}$)、*CDHI* などの細胞接着遺伝子群や *CDKN2A* などの増殖抑制遺伝子群などが上位を占めた。

これに対し抵抗性遺伝子は発現が抑制されず、ミスマッチ修復遺伝子を含む DNA 修復関連遺伝子群などが上位を占めた。この結果は、EBV 関連胃癌が *CDHI* メチル化を伴う低分化腺癌であること、*CDKN2A* メチル化は EBV 胃癌に特に見られること、マイクロサテライト不安定性がない、という特徴をよく説明するものである。

5. 次に、ゲノムワイドなヒストン修飾状態を検討した。EBV 感染後クローニングし 18 週間継代を維持して樹立されたクローン MKN7_EB#1、EB_#2 を用いて、活性化マークである H3K4me3 および H3K27ac に対する ChIP-seq 解析を行った。EBV 感染前後で比較すると、ゲノム全体のおよそ約 5~10%の遺伝子が、活性化マークの獲得や消失を示した。活性化マークの獲得は遺伝子発現上昇と、活性化マークの消失は発現低下と関連した。消失する遺伝子群には細胞接着遺伝子群が有意に多く含まれており、低分化腺癌という臨床像を説明しうると考えられた。
6. MKN7_EB#1 の DNA メチル化状態とヒストン修飾の相関関係の解析を行ったところ、EBV 感染で誘導されるエピゲノム間には強い相関関係があることが示された。EBV 感染前後を比較し、活性化マークを(+)のまま維持する遺伝子は転写開始点メチル化抵抗性遺伝子であった。活性化マーク(-)を維持する遺伝子は転写開始点メチル化感受性を示し、さらに感染前後で活性化マークを消失し(+) \rightarrow (-)となる遺伝子は顕著に新規 DNA メチル化を獲得していた。活性化マークの維持は異常 DNA メチル化抵抗性に働き、活性化マークの消失は異常 DNA メチル化誘導感受性に働かう重要な因子と考えられた。
7. MKN7_EB#1 において、新規 DNA メチル化感受性は、活性化マークの不在や消失を示す遺伝子に加えて、EBV 感染前にヒストン抑制性マークであるヒストン H3K27me3 マークを持つ遺伝子にもみられた。H3K27me3 マークも新規 DNA メチル化誘導の標識となると考えられた。

以上、本論文は不死化胃上皮細胞株 (GES1)においては、EBV 感染後に DNA メチル化が短期間で誘導・完成が起こり、以降の癌化促進に寄与する可能性があることを新たに明らかにすることで、DNA メチル化誘導にはウイルス-ホスト間の複雑な相互作用が存在することを提案した。

また、低メチル化胃癌細胞株 (MKN7)を使った解析において、EBV 感染で誘導される転写開始点の DNA メチル化誘導に感受性と抵抗性を示す遺伝子が存在することを示し、そのメチル化誘導パターンと発現制御が EBV 関連胃癌の臨床的特徴を説明しうることを示した。さらに、EBV 感染によりヒストン修飾変化も起きることを見出し、ヒストン活性化マークの存在が DNA メチル化抵抗性に働き、逆にその不在や消失が DNA メチル化感受性に働くことを示した。

EBV 感染による宿主ゲノムの異常 DNA メチル化誘導をゲノムワイドな解析で誘導時期やメチル化パターンを明らかにしたこと、およびヒストン修飾状態変化と DNA メチル化の相関関係を示したことは、ヒト胃癌において EBV 感染が誘導するエピゲノム異常の解明に大きく貢献するものであり、学位の授与に値すると考えられる。