

令和元年5月23日現在

機関番号：12501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06564

研究課題名(和文) EBウイルス陽性胃癌のTETを介した網羅的エピゲノム変化の解明

研究課題名(英文) Roles of TET family in dynamic epigenomic alteration induced by EB virus infection

研究代表者

南波 宏枝 (Namba, Hiroe)

千葉大学・大学院医学研究院・特任助教

研究者番号：10799654

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト悪性腫瘍の中でも最もDNA高メチル化を呈するEBウイルス(EBV)陽性胃癌において、感染時に脱メチル化酵素TET2が抑制される。本研究では、TET2過剰発現胃上皮細胞株にEBVを感染させ、TET2標的遺伝子に関して、通常感染時のメチル化誘導が阻害されること、ヒストン活性化マークが上昇し遺伝子発現上昇を伴うことを明らかにした。またヒストン修飾変化に働くと考えられるTET2共同因子の存在をゲル上で確認した。それら候補因子をノックダウンした胃上皮癌細胞株のヒストン修飾を解析したところ、TET2ノックダウン時の変化との重複を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子発現を制御するDNAメチル化やヒストン修飾などのエピジェネティクスは、生物の発生はもちろん癌をはじめとする多くの病気の発生に関わる。短期間でダイナミックなエピゲノム変化を生理的に生じさせることが可能なEBウイルス感染モデルを用いることにより、エピゲノム変化の誘導分子機構を詳細に解析することが可能となり、薬剤開発や診断方法の確立等幅広く医学生物学に貢献する。

研究成果の概要(英文)：Epstein-Barr virus (EBV) positive gastric cancer shows the most extensive DNA methylation among all human malignancies. One of the DNA demethylases, TET2, is repressed by EBV infection. In this study, TET2 overexpressing cells were successfully infected with EBV. Regarding TET2 targeting genes, induction of DNA methylation was partially inhibited, and histone activating marks were upregulated compared to normal EBV infection without TET2 overexpression, accompanied by upregulation of targeting genes. Furthermore, we confirmed proteins on SDS-PAGE gel that may work with TET2 for histone modification changes. We have made knockdown cell lines of those protein candidates, and conducted histone modification analysis by ChIP-seq and compared to those of TET2 knockdown cell line. Some regions with histone active marks downregulated were overlapped.

研究分野：癌エピゲノム

キーワード：癌エピゲノム Epstein-Barr virus TET DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

- (1) 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、癌抑制遺伝子の不活化等癌発生に深く関わる。癌は蓄積している分子異常の特性によりいくつかのサブタイプに層別化されるが、大腸癌(参考文献)や脳腫瘍(参考文献)で DNA 異常メチル化が特に多いサブタイプが存在することが知られる。胃癌は大きく 3 つのサブタイプに分類され、Epstein-Barr ウイルス (EBV) 陽性胃癌はヒト悪性腫瘍の中でも最も高メチル化を呈するサブタイプを形成する(図 1A、参考文献)。申請者の所属研究室では、EBV 感染そのものがこの特異的な DNA 高メチル化を誘導する原因であることを証明している(図 1BC、参考文献)。
- (2) 脳腫瘍や骨髄性急性白血病において、*IDH1/2*、*TET2* 等 DNA 脱メチル化関連遺伝子の変異による高メチル化サブタイプが知られるが、超高メチル化を呈する EBV 陽性胃癌においても、EBV 感染が脱メチル化酵素 *TET2* を発現抑制する原因となり、DNA 異常高メチル化を誘導する一因となることを申請者が明らかにした(参考文献)。
- (3) また胃上皮細胞株への EBV 感染によりエンハンサー領域のヒストン修飾に変化が生じ、周辺遺伝子の活性化、不活化を介し癌化に寄与する可能性が報告された。申請者により、*TET2* ノックダウン胃上皮細胞株の作成および網羅的エピゲノム解析を行ったところ、*TET2* ノックダウンのみによってもそれらエンハンサー領域におけるヒストン修飾変化の一部が生じること、ノックダウンのみでは DNA メチル化に変化は生じないことが明らかとなった。

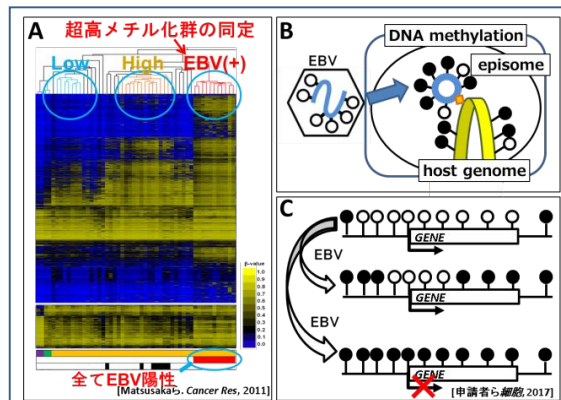


図 1. EBV 陽性胃癌の異常高メチル化。(A) EBV 陽性胃癌は全サンプルが特徴的な DNA 超高メチル化を示す。(B) EBV の感染自体がメチル化を誘導する。(C) EBV 感染が誘導する異常メチル化に抵抗する遺伝子と完全に感受する遺伝子が存在する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、胃上皮細胞への EBV 感染をモデルに用い環境要因が誘導するエピゲノム変異の分子機構と細胞への影響を、エピゲノム網羅的解析により包括的に理解することである。生理的条件下にて実際に癌に見られる DNA 高メチル化を 100 %の再現性で誘導できる *in vitro* 感染モデルを用いることにより、詳細なエピゲノム・トランスクリプトーム統合解析を行い、多くの研究者が解明を目指しているエピゲノム変化を誘導する分子機構を明らかにする。具体的には、メチル化抵抗性が認められた *TET2* のメチル化抵抗分子機構の探索として、ヒストン修飾因子との関連と癌化への影響をゲノム網羅的に解析する。

3. 研究の方法

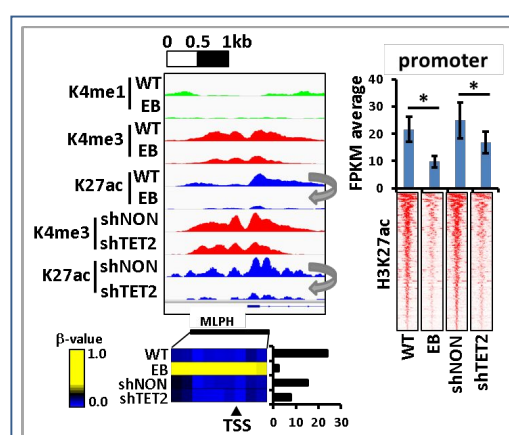
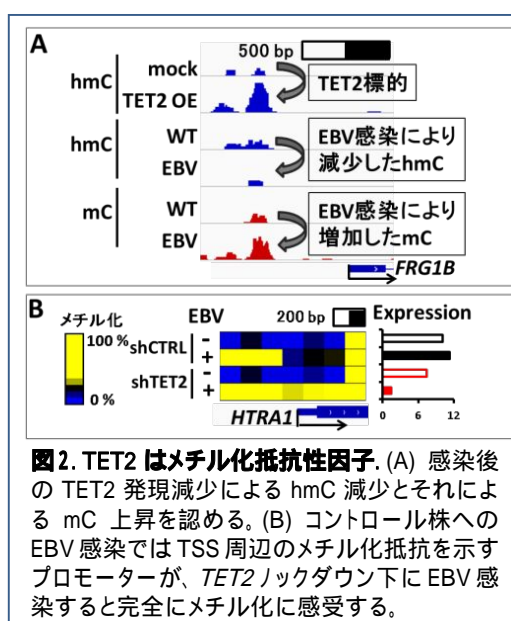
- (1) EBV 感染時の *TET2* によるメチル化抵抗分子機構をより詳細に解析するために、*TET2* 過剰発現株に EBV を *in vitro* 感染させた後、ChIP-seq 法によるヒストン修飾解析、及び Infinium ビーズアレイ法による DNA 修飾解析をゲノム網羅的に行う。
- (2) His タグを付加した *TET2* を胃上皮細胞株にて強制発現させる。細胞破碎液をタグ結合型樹脂を用い精製することで *TET2* 結合蛋白質を抽出し、抽出液に含まれる *TET2* 結合蛋白質を質量分析法により同定する。
- (3) それら *TET2* と協働して働くと考えられる因子のノックダウン、強制発現株において ChIP-seq 法等網羅的エピゲノム解析を行い、*TET2* ノックダウン時の変化と比較することにより、相互作用や癌化への影響を解明する。

4. 研究成果

- (1) 本研究開始までに、EBV 感染時における DNA 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、EBV 感染後の *TET2* 発現低下が、新規メチル化誘導の重要な要因となっていることを明らかにした。具体的には、EBV 感染時の *TET2* 発現低下、*TET2* 標的遺伝子と EBV 感染時のメチル化標的遺伝子の重複、*TET2* ノックダウン下における EBV 感染による更なる高メチル化誘導を明らかにした(図 2 AB)。また *TET2* ノックダウンのみによってはメチル化誘導遺伝子が検出されなかったことから、*TET2* 発現低下を伴う高メチル化には、EBV 感染のようなメチル化圧を上昇させる因子の必要性が示唆された(参考文献、発表論文)。
- (2) 本研究では、メチル化抵抗因子として働く *TET2* を過剰発現させた胃上皮細胞株に EBV を感染させることに成功した。*TET2* の標的遺伝子に関して、通常の感染時に誘導される DNA メチル化が阻害された。また通常の感染時に比べ *H3K4me3* や *H3K27ac* 等のヒス

トン活性化マークが上昇すること、またそれらの領域において遺伝子発現上昇が伴うことが明らかとなった。

- (3) また胃上皮細胞株への EBV 感染によりエンハンサー領域のヒストン修飾に変化が生じ、周辺遺伝子の活性化、不活化を介し癌化に寄与することが明らかとなった(発表論文)。TET2 ノックダウンのみによってもそれらエンハンサー領域におけるヒストン修飾変化の一部が生じることが明らかとなり、またノックダウンのみでは DNA メチル化に変化は生じないことから、TET2 と共にヒストン修飾変化に対して働く協働因子の存在が示唆された(図3)。
- (4) ヒストン修飾変化に働く TET2 協働蛋白質を同定するため、TET2 結合蛋白質を精製した。胃上皮細胞株にて His タグを付加した TET2 の強制発現に成功し、強制発現細胞株を破碎後、タグ結合型樹脂を用いた蛋白精製を行った。コントロールベクターを導入した細胞株と比較し、TET2 強制発現株において TET2 と結合していると考えられる蛋白質を SDS ゲル上にて確認することが出来た。それらの精製液を MALDI-TOF マスにて解析を行う予定である。
- (5) それら TET2 と協働して働くと考えられる候補因子のノックダウン株において H3K4me3 及び H3K27ac を標的とした ChIP-seq 解析を行ったところ、TET2 ノックダウン時の抑制変化との重複が認められた。共免疫沈降後のウェスタンブロットング及び、MALDI-TOF MS 解析によりそれら協働蛋白質を同定し、TET2 との相互作用を介したヒストン修飾変化及び癌化への影響を解析する予定である。



【参考文献】

- The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*, 487:330–337, 2012
- Turcan S, Rohle D, Goenka A, Walsh LA, Fang F, Yilmaz E, Campos C, Fabius AW, Lu C, Ward PS, Thompson CB, Kaufman A, Guryanova O, Levine R, Heguy A, Viale A, Morris LG, Huse JT, Mellinghoff IK, Chan TA. IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature*, 483:479-83, 2012
- Matsusaka K, Kaneda A, Nagae G, Ushiku T, Kikuchi Y, Hino R, Uozaki H, Seto Y, Takada K, Aburatani H, Fukayama M. Classification of Epstein-Barr virus-positive gastric cancers by definition of DNA methylation epigenotypes. *Cancer Research*, 71:7187-97, 2011
- Kaneda A, Matsusaka K, Aburatani H, Fukayama M. Epstein-Barr virus infection as an epigenetic driver of tumorigenesis. *Cancer Research*, 72:3445-50, 2012
- The Cancer Genome Atlas Research Network, Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*, 513:202–209, 2014
- Namba-Fukuyo H, Funata S, Matsusaka K, Fukuyo M, Rahmutulla B, Mano Y, Fukayama M, Aburatani H, Kaneda A. TET2 functions as a resistance factor against DNA methylation acquisition during Epstein-Barr virus infection. *Oncotarget*, 7:81512-26, 2016

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Kawajiri-Manako C, Mimura N, Fukuyo M, Namba H, Rahmutulla B, Nagao Y, Togasaki E, Shimizu R, Oshima-Hasegawa N, Tsukamoto S, Mitsukawa S, Takeda Y, Ohwada C, Takeuchi M, Iseki T, Misawa S, Yokote K, Tsuiji M, Kuwabara S, Sakaida E, Kaneda A, Nakaseko C. Clonal immunoglobulin λ light-chain gene rearrangements detected by next generation sequencing in POEMS syndrome. *American Journal of Hematology*, 査読有り, 93 巻, 2018, 1161-1168, doi:10.1002/ajh.25213

Okabe A, Funata S, Matsusaka K, Namba H, Fukuyo M, Rahmutulla B, Oshima M, Iwama A, Fukayama M, Kaneda A. Regulation of tumour related genes by dynamic epigenetic alteration at enhancer regions in gastric epithelial cells infected by Epstein-Barr virus. *Scientific Reports*, 査読有り, 7 巻, 2017, 7924, doi:10.1038/s41598-017-08370-7

南波宏枝、金田篤志. 胃がん発生におけるエピゲノム異常とその誘導機構、細胞、査読なし、49 巻, 2017, 13-16

〔学会発表〕(計 11 件)

Okabe A, Matsusaka K, Fukuyo M, Funata S, Namba H, Fukayama M, Kaneda A. Induction of dynamic epigenomic activation and inactivation by Epstein-Barr virus infection in gastric cancer. 11th AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: Biology to Precision Medicine, 2019

岡部篤史, 松坂恵介, 福世真樹, 南波宏枝, 船田さやか, 金田篤志. Epstein-Barr ウィルスエピソーム形成をもたらすエンハンサー活性化. 第41 回分子生物学会年会 2018

岡部篤史, 松坂恵介, 福世真樹, 南波宏枝, 船田さやか, 金田篤志. Epstein-Barr ウィルスエピソーム形成をもたらすエンハンサー活性化. 第29 回日本消化器癌発生学会総会、2018

Okabe A, Matsusaka K, Namba H, Funata S, Fukuyo M, Kaneda A. Dynamic epigenetic and chromatin structural change in gastric epithelial cells infected by Epstein-Barr virus, KEYSTONE SYMPOSIA Cancer Epigenetics: New Mechanisms, New Therapies, 2018

南波宏枝, 船田さやか, 松坂恵介, 深山正久, 金田篤志, Epstein-Barr ウィルス感染胃癌におけるTET2 発現低下とDNA 異常高メチル化獲得機、第11 回日本エピジェネティクス研究会、2017

南波宏枝, 船田さやか, 松坂恵介, 福世真樹, 深山正久, 金田篤志, DNA 異常高メチル化を呈するEpstein-Barr ウィルス陽性胃癌におけるTET2 発現低下とメチル化獲得機構の解明、2017 年度千葉大学再生システムと疾患・癌エピゲノム公開シンポジウム、2017

岡部篤史, 松坂恵介, 南波宏枝, 船田さやか, 福世真樹, 金田篤志, Epstein-Barr ウィルス感染による異常エピゲノム変化に伴うクロマチン構造変化、第76 回日本癌学会総会、2017

Asakawa Y, Okabe A, Funata S, Matsusaka K, Namba H, Fukuyo M, Kaneda A. Involvement of ATF3 in Epstein-Barr virus associated gastric cancer. 第 76 回日本癌学会総会、2017

Namba H, Funata S, Matsusaka K, Fukuyo M, Fukayama M, Aburatani H, Kaneda A. TET2 repression contributes to DNA methylation acquisition during Epstein-Barr virus infection in gastric cancer. France Japan Epigenetics Workshop, 2017

岡部篤史, 船田 さやか, 松坂 恵介, 南波 宏枝, 福世 真樹, 金田 篤志, EB ウィルス感染によるエピゲノム異常に伴うクロマチン構造変化、第40 回日本分子生物学会、2017

岡部篤史, 松坂恵介, 南波宏枝, 船田さやか, 福世真樹, 金田篤志, 癌におけるDNA 異常メチル化に伴うクロマチン構造変化、2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.m.chiba-u.ac.jp/class/moloncol/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：金田 篤志

ローマ字氏名：(KANEDA, Atsushi)

研究協力者氏名：小原 収

ローマ字氏名：(OHARA, Osamu)

研究協力者氏名：松坂 恵介

ローマ字氏名：(MATSUSAKA, Keisuke)

研究協力者氏名：岡部 篤史

ローマ字氏名：(OKABE, Atsushi)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。