

## 自己評価報告書

平成23年 4月15日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2012

課題番号：20249022

研究課題名（和文） EBウイルス関連胃癌．DNAメチル化亢進の分子機序解明と胃癌治療への展開．

研究課題名（英文） Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. Molecular mechanisms and therapeutic application.

研究代表者

深山 正久（FUKAYAMA MASASHI）

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70281293

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：EBウイルス関連胃癌，EBウイルス，胃癌，エピジェネティクス，LMP2A，DNMT1，STAT3，マイクロRNA

## 1. 研究計画の概要

胃癌の1/3は高メチル化形質を示す胃癌である。このタイプの胃癌は、癌抑制遺伝子プロモーター領域 CpG 繰り返し配列のシトシンにメチル化を高頻度起こし、その下流の遺伝子発現が抑制されている。EBウイルス感染細胞がモノクローナルに増殖している EBウイルス関連胃癌は、その代表的な存在である。本研究では、EBウイルス関連胃癌における DNAメチル化亢進の分子機構の詳細について EBウイルス感染胃癌細胞系、トランスジェニックマウスなどを用いて解明する。細胞内標的分子の同定により、「高メチル化形質胃癌」の病態解明、治療法の開発につながる事が期待される。

(1) メチル化亢進機序の解明：胃癌細胞株に組みかえ EBウイルスを感染させた実験系において、PTENメチル化、PTEN発現喪失が再現された。ウイルス潜在期蛋白の中で LMP2A が異常を引起している可能性を見出した。このため、EBウイルス感染胃癌細胞株、LMP2A 遺伝子導入胃癌細胞株、ならびに EBウイルス関連胃癌細胞株 SNU-719, KT を用い、細胞内機序について解析を進める。

(2) LMP2A の機能解析：レトロウイルスによる上皮細胞での発現系、LMP2A 胃発現トランスジェニックマウスを用い、解析を進める。とくに、胃粘膜における LMP2A の長期的な効果（メチル化亢進、形質変化）を検討する。

(3) EBウイルス関連胃癌の細胞学的特徴：EBウイルス関連胃癌の細胞学的特徴をさらに明らかにし、メチル化形質との関係を探る。このため、EBウイルス関連胃癌細胞株、早期胃癌を主な対象として、遺伝子発現プロファイリング、メチル化遺伝子プロファイリング、

遺伝子コピー数解析、さらにマイクロRNA異常の解析を進める。

(4) ピロリ菌感染の影響：EBウイルス感染細胞株へのピロリ菌感染実験、CagA, LMP2A 各々による細胞内シグナル異常の関連性について検討する。

(5) 治療戦略の構築：メチル化阻害、脱メチル化など、EBウイルス関連胃癌を対象にした検討を行うことにより、「高メチル化形質胃癌」の治療法を探索する。

## 2. 研究の進捗状況

(4)、(5)の課題については、着実に実験を進めており、以下、(1)から(3)について具体的な成果を述べる。

(1) メチル化亢進機序の解明：EBウイルス感染胃癌細胞株の系で検討を進めている。潜在期ウイルス蛋白 LMP2A が感染細胞の STAT3 を構成的に活性化し、DNMT1 を発現亢進させることによって PTEN メチル化を引起していた。免疫組織化学的にも、EBウイルス関連胃癌組織では、pSTAT3, DNMT1 がともに高発現していたことから、EBウイルス関連胃癌ではウイルス膜蛋白 LMP2A が STAT3 を活性化し、エピジェネティック異常を引起しているものと考えられた。

(2) LMP2A の機能解析：レトロウイルスベクターを用いて LMP2A を NIH3T3 細胞に遺伝子導入した。LMP2A-NIH3T3 細胞のヌードマウス皮下移植で高率に腫瘍が形成された。また、EBウイルス潜在期蛋白を胃特異的に発現させるため、胃壁細胞特異的 H<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase プロモーターを用い、その下流に LMP2A, EBNA1 遺伝子を結合させた組み換えベクターを構築した。このベクターを用いて LMP2A トランスジェニック

ックマウスを作製し、発癌実験を継続中である。

(3) EB ウイルス関連胃癌の細胞学的特徴: EB ウイルス関連胃癌では、CLDN18+CLDN3-の均一な発現パターンを示し、胎児、成人胃細胞に固有の形質を保持していた。転写因子の発現も、SOX2(+)/CDX2(-)/HNF4aP1(-)であり、特異な一群であることが示された。胃固有細胞へ分化する幹細胞への感染が推定された。

マイクロ RNA の中でも、EB ウイルス関連胃癌では、miR-200a, miR-200b の発現が通常胃癌に比べて有意に低下している。この低下によって E-cadherin の転写抑制因子 ZEB1/ZEB2 の発現が亢進し、結果的に E-cadherin の発現が抑制されていることを明らかにした。EB ウイルス関連胃癌の発癌の初期課程において、細胞内マイクロ RNA 制御の攪乱により上皮間葉転換を起こしている可能性が示された。

### 3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

(理由)

EB ウイルス感染胃癌細胞系が、ヒトの細胞株に DNA メチル化を高頻度に誘導することのできるユニークな系であることを実証した。さらに、EB ウイルス潜在期蛋白 LMP2A を標的に、着実に in vitro, in vivo の実験系を作製している。

さらに、EB ウイルス感染に伴うマイクロ RNA 異常を見出しており、メチル化異常との関連性という点で、新しい分子機構の発見につながる可能性がある。

### 4. 今後の研究の推進方策

今後も、研究計画の概要に示した項目に沿って着実に研究を推進するが、とりわけ、マイクロ RNA 異常は全く新しい分野であり、エピジェネティクス異常の解明についても、ウイルス、宿主細胞、両者のマイクロ RNA に着目した検討を加えていきたい。

また、(1)における EB ウイルス感染胃癌細胞系におけるエピジェネティクス異常は、網羅的エピゲノム解析においても確認されており、この系の解析が分子機序解明の突破口になるものと考えている。

### 5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 17 件)

(1) Fukayama M. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. *Pathol International*. 査読有, 2010 年 60 巻 337-350 頁.

(2) Shinozaki A, Sakatani T, Ushiku T, Hino R, Isogai M, Ishikawa S, Uozaki H, Takada

K, Fukayama M. Downregulation of microRNA-200 in EBV-associated gastric carcinoma. *Cancer Research*. 査読有, 2010 年 70 巻 4719-4727 頁.

(3) Shinozaki A, Ushiku T, Morikawa T, Hino R, Sakatani T, Uozaki H, Fukayama M. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma: a distinct carcinoma of gastric phenotype by claudin expression profiling. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 査読有, 2009 年 57 巻 75-85 頁.

(4) Hino R, Uozaki H, Murakami N, Ushiku T, Shinozaki A, Ishikawa S, Morikawa T, Nakaya T, Sakatani T, Takada K, Fukayama M. Activation of DNA methyltransferase 1 by EBV latent membrane protein 2A leads to promoter hypermethylation of PTEN gene in gastric carcinoma. *Cancer Research*. 査読有, 2009 年 69 巻 2766-2774 頁.

(5) Fu DX, Tanhehco Y, Chen J, Foss CA, Fox JJ, Chong JM, Hobbs RF, Fukayama M, Sgouros G, Kowalski J, Pomper MG, Ambinder RF. Bortezomib-induced enzyme-targeted radiation therapy in herpesvirus-associated tumors. *Nature Medicine*. 査読有, 2008 年 14 巻 1118-1122 頁.

[学会発表] (計 31 件)

(1) 深山正久. 外科医に伝えたい病理学トピックスー胃癌を例に. 第 72 回臨床外科学会. 2010 年 11 月 21 日, 横浜パシフィコ, 横浜.

(2) Fukayama M. Epstein-Barr virus and cancer. International symposium of Research Center for Infection-associated Cancer, Institute for Genetic Medicine, Hokkaido University. 2010 年 3 月 3 日, 北海道大学学術交流会館, 札幌.

(3) Fukayama M. Epstein-Barr virus: another infectious agent causing gastric cancer. Sapporo Cancer Seminar 29<sup>th</sup> International Symposium on Cancer, 2009 年 7 月 13 日, 北海道大学学術交流会館, 札幌.

(4) 深山正久. 感染症と癌. Epstein-Barr ウイルス関連胃癌の病理. 第 98 回日本病理学会総会. 2009 年 5 月 1 日, 国立京都国際会館, 京都.

[図書] (計 3 件)

(1) 深山正久, 大倉康男 (編集) 文光堂, 腫瘍鑑別アトラス胃癌, 2009 年, 298 頁.