

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590726

研究課題名(和文) EBウイルス陽性胃癌の発生におけるDNAメチル化の関与について

研究課題名(英文) The role of DNA methylation in development of EBV-associated Gastric cancer

研究代表者

西川 潤 (NISHIKAWA JUN)

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：00379950

研究成果の概要(和文)：

EBV 陽性胃癌の発生における DNA メチル化異常の関与について検討を行った。既知の腫瘍関連遺伝子の DNA メチル化異常を EBV 陽性胃癌と陰性コントロールについて、比較検討し、EBV 陽性胃癌に有意に DNA メチル化が認められる遺伝子を検出した。また、新規メチル化遺伝子の検索を行い、EBV 陽性胃癌において、特異的に DNA メチル化が検出される遺伝子を発見した。これらの結果から、DNA のメチル化異常が EBV 陽性胃癌の発生に、非常に強く関与していることが証明された。

研究成果の概要(英文)：

We studied the role of DNA methylation in development of EBV-associated carcinomas. Several tumor-related genes were methylated in EBV-associated carcinomas. We newly identified 7 genes which are methylated in EBV-associated gastric carcinomas. There are several tumor suppresser genes and tumor associated antigens. Based on these results, we concluded that DNA methylation had an important role for developing EBV-associated gastric carcinomas.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：消化器内科

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：胃癌、EBウイルス、DNAメチル化

## 1. 研究開始当初の背景

*Epstein-Barr virus*(EBウイルス)は、ヘルペスウイルス科の2本鎖DNAウイルスであり、Burkittリンパ腫から発見された癌ウイルスである。近年、世界各地より、胃癌の約10%にEBウイルス感染が認められることが報告され、胃癌発生におけるEBウイルスの関与が

注目されている。我々は、過去10年間にわたり、EBウイルスの胃癌発生における関与について、*in vitro*, *in vivo*で研究してきた。この間、EBウイルス陽性胃癌のモデルになりうるEBウイルス感染胃癌細胞株の樹立、EBウイルス感染による胃上皮細胞の悪性度の亢進やEBウイルスの有無による遺伝子発現の

違いなどを報告し、世界的に高い評価を受けている。

EBウイルスは、ヒトBリンパ球に容易に感染し、11のウイルスの潜伏感染遺伝子を発現するが、Burkittリンパ腫や胃癌においては、その内、限られた遺伝子しか発現しておらず、このウイルス遺伝子の発現調節には、ウイルスDNAのメチル化が関与していることが知られていた。また、胃癌で、DNAメチル化によって不活化される癌抑制遺伝子などが次々に発見され、胃癌発生において、DNAメチル化異常が重要な役割をしていることが指摘されてきている。

従って、EBウイルス陽性胃癌の発生には、EBウイルス感染による宿主細胞の反応としてのDNAメチル化の誘導が、ウイルス遺伝子の発現抑制のみならず、細胞の遺伝子、特に癌抑制遺伝子の発現抑制をもたらし、胃癌を発生させる機序が示唆される。

## 2. 研究の目的

EBウイルス陽性胃癌の発生におけるDNAメチル化異常の関与について検討する。(1) EBウイルス陽性胃癌検体やEBウイルス陽性胃癌細胞株における、EBウイルス及び宿主遺伝子のDNAメチル化について検討し、EBウイルス陰性の胃癌検体や細胞株との比較することによって、EBウイルス陽性胃癌の発生におけるDNAメチル化の重要性について検討する。

(2) EBウイルス陽性胃癌細胞株(SNU719)を用い、クロマチン免疫沈降法を用いて、新規メチル化遺伝子の検出を行う。候補遺伝子については、臨床検体でEBウイルス陽性胃癌で特異的にメチル化を受けている遺伝子を抽出し、発癌への関与を検討する。

## 3. 研究の方法

EBウイルス陽性胃癌におけるDNAメチル化の重要性について検討する目的で、*in vivo*, *in vitro*のEBウイルス陽性胃癌を対象に既知のDNAメチル化によって、発現が調節されている癌抑制遺伝子やEBウイルス潜伏関連遺伝子のpromoterのDNAメチル化を検討する。また、EBウイルス陽性胃癌から樹立された細胞株(SNU719)および*in vitro*で人工的にEBウイルス感染させた胃癌細胞株と非感染コントロールを用い、網羅的にDNAメチル化を解析し、新規メチル化関連遺伝子の検出、その遺伝子の発現低下が細胞に及ぼす影響について検討し、EBウイルス感染による胃癌発生の機序を明らか

にする。

## 4. 研究成果

Frequency of DNA methylation in EBV-associated GCs and controls

	EBV-associated GC (n=25)	controls (n=50)	P-value
HMLH1	3/25 (12.0%)	6/50 (12.0%)	1.0000
MINT1	20/25 (80.0%)	36/50 (72.0%)	0.5775
MINT2	23/25 (92.0%)	34/50 (68.0%)	0.0239
MINT25	25/25 (100.0%)	45/47 (95.7%)	0.5403
MINT31	21/25 (84.0%)	25/50 (50.0%)	0.0055
p14	20/24 (83.3%)	26/49 (53.1%)	0.0191
p16	15/22 (68.2%)	19/49 (38.8%)	0.0387
p73	24/25 (96.0%)	15/50 (30.0%)	<0.0001
APC	17/24 (70.8%)	46/50 (92.0%)	0.0319
MGMT	8/25 (32.0%)	7/50 (14.0%)	0.1231
CDH1	3/21 (14.3%)	14/48 (29.2%)	0.2357
CDH13	22/25 (88.0%)	48/49 (98.0%)	0.1089
DKK2	20/22 (90.9%)	41/50 (82.0%)	0.4847
SFRP1	23/25 (92.0%)	45/49 (91.8%)	1.0000
SFRP4	17/25 (68.0%)	42/50 (84.0%)	0.1392
SFRP5	15/25 (60.0%)	29/49 (59.2%)	1.0000
RUNX3	24/25 (96.0%)	38/49 (77.6%)	0.0497

Figure 1

(1) EBウイルス陽性胃癌臨床検体およびEBウイルス陽性胃癌細胞株のDNAメチル化

①EBウイルス陽性胃癌の臨床検体の検討 EBウイルス陽性胃癌25例これに対応した陰性コントロール50例を対象に、腫瘍関連遺伝子のDNAメチル化をメチル化特異的PCR(MSP)により、検討した。EBV陽性胃癌に特異的に有意差を持って、メチル化が誘導されている遺伝子はMINT2, MINT31, p14, p16, p73, RUNX3などであった。

Frequency of DNA methylation in EBV-associated GCs and controls

	EBV-associated GC (n=25)	controls (n=50)	P-value
TP73	24 (96.0%)	15 (30.0%)	0.0001
ZMYND10(BLU)	5 (20.0%)	1 (2.0%)	0.015
FSD1	12 (50.0%)	5 (10.0%)	0.0003
BCL-7A	15 (55.6%)	12 (44.4%)	0.004
PTPRG	9 (37.5%)	8 (16.3%)	0.075
MARK-1	17 (73.9%)	6 (26.1%)	<0.0001
SCRN-1	12 (70.6%)	5 (29.4%)	0.0008
EYA4	23 (92.0%)	46 (95.8%)	0.6027
CDKN1C	9 (37.5%)	14 (29.2%)	0.5931
HMOX3.1	16 (64.0%)	6 (12.2%)	<0.0001

Figure 2

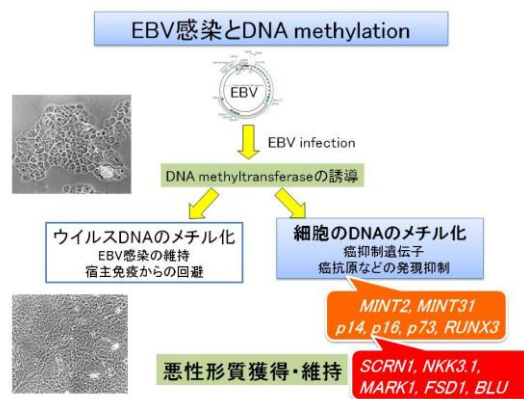
②EBウイルス陽性胃癌細胞株の検討 EBウイルス陽性胃癌細胞株SNU719を用いて、網羅的なメチル化遺伝子検出をおこなった。MBD2(methyl-binding protein2)に対するクロマチン免疫沈降法を施行し、メチル化を受けたDNA断片の抽出を行った。このDNAをDNA chipに応用することで、1000遺伝子あまりもの候補遺伝子が検出された。このうち、60遺伝子は腫瘍関連遺伝子であり、これらのうち19遺伝子についてMSPによる解析を行った。胃癌におい

て、初めて DNA メチル化が証明された遺伝子を含まれており、①の臨床検体を用いて、EBV 陽性胃癌に特異的にメチル化を受けている遺伝子を検索した。p73, BLU, FSD1, BCL-7a, MARK1, SCRNI1, NMX3.1 の 7 遺伝子が EBV 陽性胃癌群において、統計学的に有意にメチル化の頻度が高かった。脱メチル化剤などを投与により、これらの遺伝子の発現は回復し、検討した DNA メチル化が発現に関与していることが示唆された。(Figure 2)

以上の結果より、EBV 陽性胃癌の発生における DNA メチル化の関与の重要性が証明された。既知の腫瘍関連遺伝子の中から、RUNX3 のメチル化が EB ウイルス陽性胃癌で高頻度であり、癌化への関与が示唆された。また、未知のメチル化遺伝子の検出では、新たに 7 遺伝子が EB ウイルス陽性胃癌特異的にメチル化を受けていることを明らかにした。これらの遺伝子には、他臓器の癌で抑制遺伝子としての機能が確立されている NKX3.1, BLU, BCL7a が含まれていた。また、SCRNI1 は腫瘍関連抗原として胃癌の免疫療法の標的として注目されている。EB ウイルス陽性胃癌においては、腫瘍免疫からの回避のため、この遺伝子のメチル化が起こっている可能性が示唆された。

以上の内容をまとめ、論文投稿中である。

Figure 3



### 5. 主な発表論文等

(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 4 件)

①西川 潤ら EBV 感染と胃癌 臨床消化器内科 査読無 25(6) 2010 335-341

②西川 潤ら Epstein-Barr Virus 関連胃癌 Biotherapy 査読無 24(6) 2010 429-434

③西川 潤 EB ウイルス関連胃癌 日本臨床 消化管症候群 査読無 2 2009 210-213

④西川 潤 Epstein-Barr virus 陽性胃癌における DNA メチル化異常について 消化器科 査読無 48 2009 509-513

[学会発表] (計 7 件)

①Saito M, Nishikawa J, et al. Comprehensive DNA methylation analysis in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma UEGW2010 2010 Oct 24 Barcelona, Spain

②西川 潤 EB ウイルス感染による DNA メチル化の異常が胃癌を発生させる JDDW2009 (日本消化器病学会週間) 2009 年 10 月 15 日 京都 京都国際会議場

③金子紗耶佳、西川 潤他 Comprehensive DNA methylation analysis in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma 第 68 回日本癌学会総会 2009 年 10 月 1 日 横浜 パシフィコ横浜

④齋藤真理、西川 潤他 Epstein-Barr virus 陽性胃癌における DNA メチル化について 第 112 回山口大学医学会学術講演会 2009 年 7 月 17 日 宇部 山口大学医学部

⑤西川 潤 部分切除後の胃・大腸における発癌の比較—残胃癌の EBV 感染と DNA メチル化異常について— 第 95 回日本消化器病学会総会 2009 年 5 月 7 日 札幌 北海道厚生年金会館

⑥齋藤真理、西川 潤他 Epstein-Barr virus 陽性胃癌における DNA メチル化について 第 95 回日本消化器病学会総会 2009 年 5 月 7 日 札幌 北海道厚生年金会館

⑦西川 潤 Epstein-Barr virus 陽性胃癌における DNA メチル化異常について 第 50 回日本消化器病学会大会 2008 年 10 月 29 日 東京 グランドプリンスホテル新高輪

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ichinai-yamaguchi.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西川 潤 (NISHIKAWA JUN)

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：00379950

### (2) 研究分担者

小賀 厚徳 (OGA ATSUNORI)

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：90243633

### (3) 連携研究者

なし