

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07934

研究課題名(和文)細胞老化に着目したEBウイルス胃癌のエピジェネティックな発癌機構の解析

研究課題名(英文) Mechanism on epigenetic carcinogenesis of EB virus-gastric cancer focused on senescence

研究代表者

関元昭 (SEKI, Motoaki)

千葉大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：70714278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、胃の粘膜上皮細胞へのEpstein-Barrウイルス感染から胃癌の発生に至る分子メカニズムを検討した。EBウイルス感染細胞において細胞老化は誘導されなかったが、DNAバーコードによって細胞系譜を追跡した結果、特定のサブクローンが感染後に濃縮していた。シングルセル解析から元の細胞集団が3つに分かれており、そのうちの1つにEBV感染後の濃縮サブクローンが含まれており、さらにこの細胞集団を特徴付けるマーカー遺伝子を抽出することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から、均質に見える胃正常細胞においても不均一性が存在し、EBウイルスの感染・維持に有利な細胞集団の存在が示唆された。どの細胞がEBウイルスに感染するのかについてはこれまで不明であったが、そのマーカーとなりうる遺伝子を抽出できたことは発癌機構を明らかにする上で有益である。90%以上の成人がEBウイルスに感染しているとされるが、今後、易感染性細胞の性質を明らかにすることで、胃癌発症のリスクを抑える予防法の開発が進むと期待される。

研究成果の概要(英文)：We searched the molecular mechanisms of gastric adenocarcinoma caused by EBV infection. After EBV infection, cellular senescence was not observed, but accumulation of specific subclones was observed by clone tracing with DNA barcodes. From single cell RNA-sequencing, the original cell population was found to consist of three sub clusters and one of which contained the subclones accumulated during EBV infection. We also determined marker genes which characterized this sub-population.

研究分野：分子生物学

キーワード：EBV胃癌 DNAバーコード

1. 研究開始当初の背景

胃癌は部位別の癌死亡者数において世界第2位であり、日本国内の男性で第2位、女性で第4位の癌である。我々のグループは世界に先駆けてエピゲノム修飾に基づいた胃癌の層別化を行い、胃癌全体の約10%を占めるEpstein-Barrウイルス陽性胃癌（EBV胃癌）では、遺伝子発現の不活性化機構であるプロモーター領域の異常高メチル化が観察されることを報告した。その後、ゲノム情報に基づいて胃癌を4群に分けられるとしたTCGAからの報告では、当グループと同様のDNAメチル化異常を示した上で、EBV胃癌の全例で老化誘導に関わるCDKN2A (p16^{INK4A}) のプロモーター領域の異常高メチル化が示された。また、EBウイルス感染によって胃上皮あるいは胃癌培養細胞におけるDNAメチル化酵素DNMT1の発現が上昇し、プロモーター領域のDNAメチル化が誘導されることが報告されている。さらに申請者らは、EBウイルス感染によって宿主ゲノムに経時的にDNAメチル化が蓄積すること、高次構造やエピゲノム修飾に変化が生じ、遺伝子の異常活性化あるいは不活性化が起こることを報告した。このように、外的因子であるEBウイルスが宿主ゲノムのエピゲノム異常を起こすこと、胃癌のサブグループでエピゲノム異常が蓄積していることは報告されているが、それらを繋ぐメカニズムは依然明らかではなかった。

申請者らはEBウイルスの感染実験において、感染後の一部の細胞では細胞の扁平化や細胞核の肥大化といった表現型が観察され、細胞増殖が抑制されていることを発見した。これらが細胞老化の表現型と一致し、あるいはEBV胃癌では細胞老化の調節因子であるCDKN2A (p16^{INK4A}) のプロモーター領域がメチル化されることなどから、EBV感染によって癌遺伝子誘導性の細胞老化 (Oncogene-induced senescence) が惹起されており、この老化を回避した細胞が癌化しているとの仮説を立てた。また、「腫瘍ウイルスへの感染がどのようなエピゲノム異常を誘導し、どのような経路を経て発癌に至るか？」を本研究課題の核心をなす学術的な「問い」とした。

2. 研究の目的

胃癌のサブグループであるEpstein-Barrウイルス陽性胃癌（EBV胃癌）は、EBウイルスへの感染と、それに続くDNAメチル化によって癌抑制遺伝子が不活性化され発癌に至る。本研究ではEBウイルス感染細胞を表現型に基づいて分取し、遺伝子発現解析、DNAメチル化解析から発癌ドライバー遺伝子を同定することでEBV胃癌発癌の分子メカニズムを明らかにすることを目的としていた。さらに、EBウイルス感染時の遺伝子発現変化とエピゲノム変化を観察することで、発癌過程を包括的に理解し、エピゲノムに基づいた創薬や発癌リスク予測を行うための基盤を築くこととした。

3. 研究の方法

(1) EBウイルス感染による老化様表現系解析

EBウイルスを感染させた胃癌細胞株MKN7および正常胃粘膜上皮細胞株GES1において酸性ガラクトシダーゼ活性の検出を行い、細胞老化様の表現型の検出を試みた。また、細胞核の大きさ毎に細胞を分取し、その増殖速度を比較した。以上より、EBウイルス感染細胞において細胞老化が誘導されるか検討した。

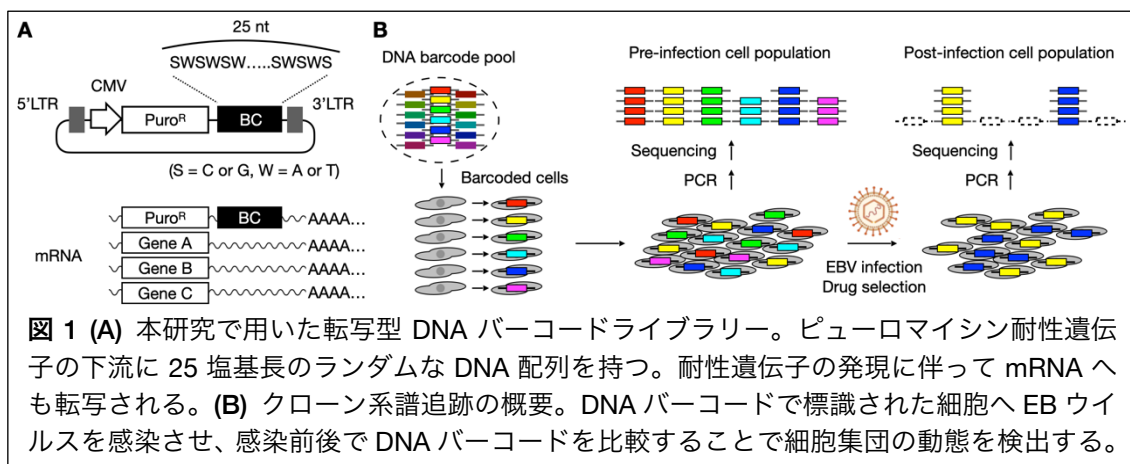
(2) DNAバーコードを用いた胃上皮細胞株におけるクローン系譜解析

EBウイルス感染後の細胞核の大きさに不均一性が見られたため、EBウイルス感染前後での細胞系譜解析を行うこととした。ピューロマイシン耐性遺伝子の下流にランダムな配列のDNAバーコードをクローニングし、転写型DNAバーコードライブラリを作成した。これをGES1細胞へ感染させ、任意のDNAバーコードを発現する細胞集団（以下BC-GES1）を樹立した（図1A）。細胞集団から任意に1000細胞を選択、増幅し、EBウイルスに感染させた。感染前およびEBウイルス感染後、あるいは陰性コントロールとしてランダムに感染するとされるレンチウイルスへの感染後の細胞からゲノムDNAを抽出し、PCRにて増幅したバーコード配列を超並列シーケンサーにて解析、比較した（図1B）。

(3) 一細胞RNA-seqを用いたサブクローンごとの遺伝子発現解析

前述のとおり、本研究で用いたDNAバーコードはピューロマイシン耐性遺伝子の3'末に連結されて転写される。そこでEBウイルス感染前後のBC-GES1細胞を10x Genomics社のChromiumを使って一細胞RNA-seqライブラリを作成し、遺伝子発現データを得た。さらにこの一細胞RNA-seqラ

イブラリをテンプレートに、転写型DNAバーコードに由来する配列と10xバーコードをPCRで増幅し、各細胞の遺伝子発現プロファイルとサブクローン情報とを紐付ける二重バーコードライブラリを作成した。一細胞RNA-seqデータを元にUMAP図を描画することで細胞集団をクラスタリングし、転写型バーコードに由来するサブクローン情報を追加することで各サブクローンを割り付けた。



4. 研究成果

(1) EB ウイルス感染による老化様表現系への影響

本研究で検討した MKN7 細胞、GES1 細胞ともに EB ウイルス感染による酸性ガラクシダーゼ活性の上昇ならびに酸性ガラクシダーゼ陽性率の上昇は見られなかった。さらに細胞核の大きさに基づいた分取後に有意な増殖速度の差異は見られなかった。したがって、EB ウイルスの感染による細胞老化の誘導は見られないという結論に至った。

(2) DNA バーコードを用いた胃上皮細胞株におけるクローン系譜解析

レンチウイルスベクターにクローニングした転写型 DNA バーコードを GES1 細胞に導入して任意の DNA バーコードを発現する細胞集団 BC-GES1 を樹立した。ここから約 1000 細胞を選択して 1K プールとし、増幅して感染実験に使用した。EB ウイルス感染前後での DNA バーコードの解析により、感染前の細胞集団から検出された 842 種類の DNA バーコードのうち、5 種類のバーコードが EB ウイルス感染後に再現良く濃縮していた。一方、レンチウイルスを EB ウイルスの力価と揃えて感染させた場合は特定のバーコードの濃縮は観察されなかった。したがって、一見均質な細胞集団においても EB ウイルスの感染あるいは感染後の維持・生存に有利な細胞が存在することが示唆された。さらに、EB ウイルス感染後に濃縮した DNA バーコードは感染前のシーケンシングリードのうち 1.60%を占めていたことから、後述する一細胞 RNA-seq 解析にて 5,000 細胞を解析した場合、80 細胞程度含まれると期待され、特性の解析に資すると考えた。

(3) 一細胞 RNA-seq を用いたサブクローンごとの遺伝子発現解析

10x Genomics 社のプラットフォームを用いて EB ウイルス感染前後の BC-GES1 細胞の一細胞 RNA-seq 解析を行った。4,670 個の感染前の細胞を解析した結果、遺伝子発現によって大きく 3 つのクラスターに分かれることが明らかになり (図 3A)、ケラチン遺伝子がサブクラスターごとに特徴的な発現パターンを示していた (図 3B)。二重バーコードライブラリをシーケンシングした結果、4,143 細胞に由来する転写型 DNA バーコードの配列を検出し、細胞の由来するサブクローンを同定することができた。前項で濃縮していた 5 種類のバーコードは 64 細胞 (1.54%) から検出され、予想と矛盾しない細胞数だった。このうち 62 細胞がクラスター 1 から、1 細胞がクラスター 0、1 細胞がクラスター 2 からと、大きな偏りを持っていた (図 3C)。

以上より、本研究を通じて正常な胃の粘膜上皮細胞には EB ウイルスへの感染・維持に有利な形質を持った細胞が存在しており、遺伝子発現プロファイルに基づいて特徴付けられることが示唆された。このような細胞の特性を解明することは EB ウイルスによる胃癌発症の機序を理解することへ繋がり、胃癌の予防あるいは治療へ貢献できると期待される。

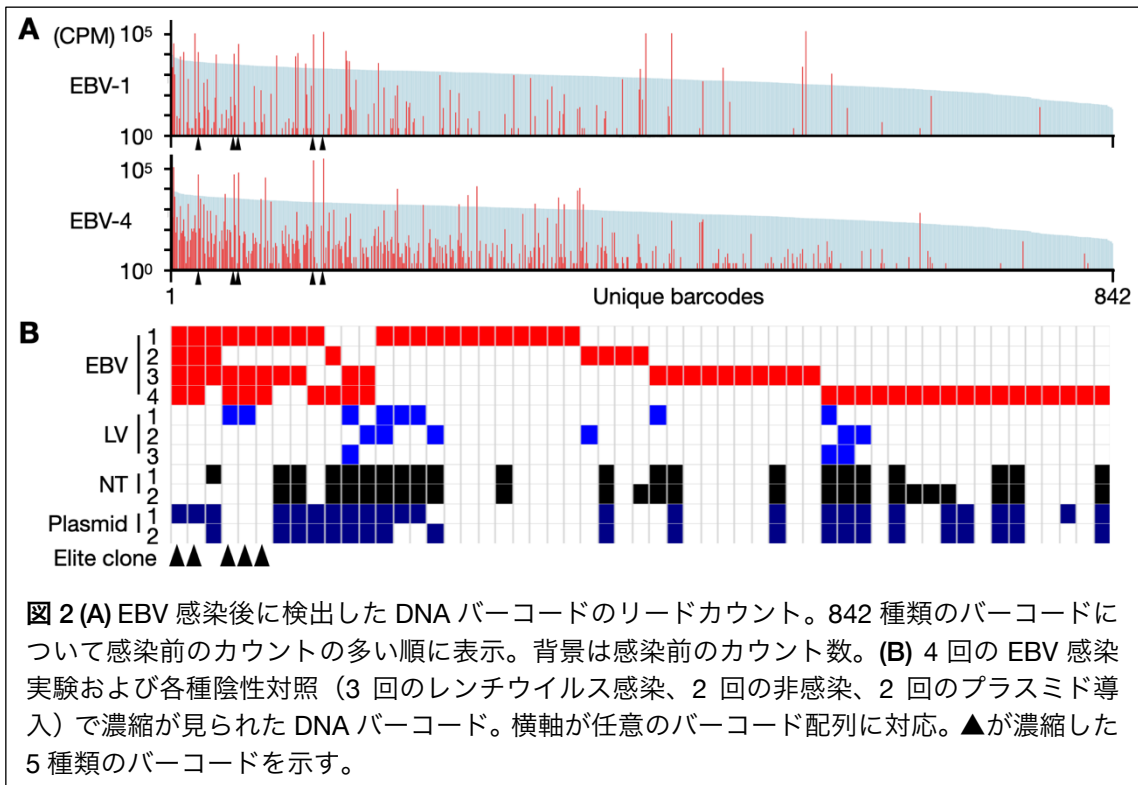


図 2 (A) EBV 感染後に検出した DNA バーコードのリードカウント。842 種類のバーコードについて感染前のカウントの多い順に表示。背景は感染前のカウント数。(B) 4 回の EBV 感染実験および各種陰性対照 (3 回のレンチウイルス感染、2 回の非感染、2 回のプラスミド導入) で濃縮が見られた DNA バーコード。横軸が任意のバーコード配列に対応。▲が濃縮した 5 種類のバーコードを示す。

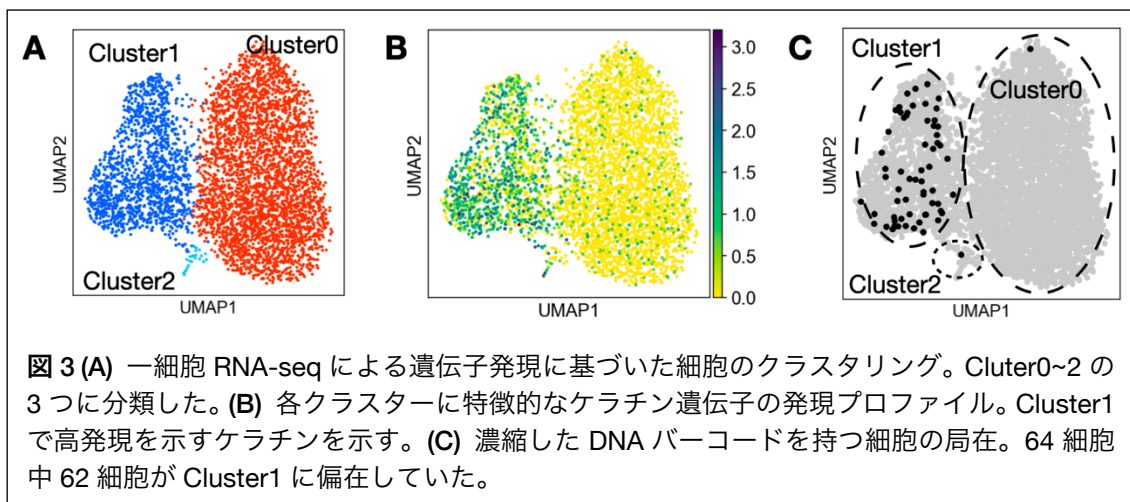


図 3 (A) 一細胞 RNA-seq による遺伝子発現に基づいた細胞のクラスタリング。Cluster0~2 の 3 つに分類した。(B) 各クラスターに特徴的なケラチン遺伝子の発現プロファイル。Cluster1 で高発現を示すケラチンを示す。(C) 濃縮した DNA バーコードを持つ細胞の局在。64 細胞中 62 細胞が Cluster1 に偏在していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 7件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Ito Yuki, Usui Genki, Seki Motoaki, Fukuyo Masaki, Matsusaka Keisuke, Hoshii Takayuki, Sata Yuki, Morimoto Junichi, Hata Atsushi, Nakajima Takahiro, Rahmutulla Bahityar, Kaiho Taisuke, Inage Terunaga, Tanaka Kazuhisa, Sakairi Yuichi, Suzuki Hidemi, Yoshino Ichiro, Kaneda Atsushi	4. 巻 114
2. 論文標題 Association of frequent hypermethylation with high grade histological subtype in lung adenocarcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3003 ~ 3013
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15817	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takane Kiyoko, Cai Tingwei, Noguchi Rei, Gohda Yoshimasa, Ikenoue Tsuneo, Yamaguchi Kiyoshi, Ota Yasunori, Kiyomatsu Tomomichi, Yano Hideaki, Fukuyo Masaki, Seki Motoaki, Bahityar Rahmutulla, Kaneda Atsushi, Furukawa Yoichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Genome-Wide Analysis of DNA Methylation in Pseudomyxoma Peritonei Originated from Appendiceal Neoplasms	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Oncology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000536219	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Usui Genki, Seki Motoaki, Yeoh Khay Guan, Tan Patrick, Kaneda Atsushi et al.	4. 巻 98
2. 論文標題 Integrated environmental, lifestyle, and epigenetic risk prediction of primary gastric neoplasia using the longitudinally monitored cohorts	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eBioMedicine	6. 最初と最後の頁 104844 ~ 104844
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ebiom.2023.104844	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Mizokami Harue, Okabe Atsushi, Choudhary Ruchi, Mima Masato, Saeda Kenta, Fukuyo Masaki, Rahmutulla Bahityar, Seki Motoaki, Goh Boon-Cher, Kondo Satoru, Dochi Hiroto, Moriyama-Kita Makiko, Misawa Kiyoshi, Hanazawa Toyoyuki, Tan Patrick, Yoshizaki Tomokazu, Fullwood Melissa Jane, Kaneda Atsushi	4. 巻 102
2. 論文標題 Enhancer infestation drives tumorigenic activation of inactive B compartment in Epstein-Barr virus-positive nasopharyngeal carcinoma	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 eBioMedicine	6. 最初と最後の頁 105057 ~ 105057
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ebiom.2024.105057	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ishiguro S, Ishida K, Sakata RC, Mori H, Takana M, King S, Bashth O, Ichiraku M, Masuyama N, Takimoto R, Kijima Y, Adel A, Toyoshima H, Seki M, Oh JH, Archambault AS, Nishida K, Kondo A, Kuhara S, Aburatani H, Klein GRI, Takashima Y, Shakiba N, Yachie N	4. 巻 -
2. 論文標題 A multi-kingdom genetic barcoding system for precise target clone isolation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2023.01.18.524633	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yogi Norikazu, Usui Genki, Matsusaka Keisuke, Fukuyo Masaki, Fujiki Ryoji, Seki Motoaki, Takano Shigetugu, Abe Hiroyuki, Morikawa Teppei, Ushiku Tetsuo, Ohtsuka Masayuki, Kaneda Atsushi	4. 巻 12
2. 論文標題 Association of tumors having Epstein-Barr virus in surrounding lymphocytes with poor prognosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 1122 ~ 1136
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.4967	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamasoba D, Kimura I, Nasser H, Morioka Y, Naganori N, Ito J, Uriu K, Tsuda M, Zahradnik J, Shirakawa K, Suzuki R, Kishimoto M, Kosugi Y, Kobiyama K, Hara T, Toyoda M, Tanaka YL, Butlertanaka EP, Shimizu R, Ito H, Wang L, Oda Y, Orba Y, Sasaki M, Nagata K, Yoshimatsu K, Asakura H, Nagashima M, Seki M, Sato K et al.	4. 巻 185
2. 論文標題 Virological characteristics of the SARS-CoV-2 Omicron BA.2 spike	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 2103 ~ 2115.e19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2022.04.035	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hirasaki Yoshiro, Okabe Atsushi, Fukuyo Masaki, Rahmutulla Bahityar, Mano Yasunobu, Seki Motoaki, Hoshii Takayuki, Namiki Takao, Kaneda Atsushi	4. 巻 360
2. 論文標題 Cinobufagin inhibits proliferation of acute myeloid leukaemia cells by repressing c-Myc pathway-associated genes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemico-Biological Interactions	6. 最初と最後の頁 109936 ~ 109936
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cbi.2022.109936	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Evans-Yamamoto Daniel, Rouleau Francois D, Nanda Piyush, Makanae Koji, Liu Yin, Despres Philippe C, Matsuo Hitoshi, Seki Motoaki, Dube Alexandre K, Ascencio Diana, Yachie Nozomu, Landry Christian R	4. 巻 -
2. 論文標題 Barcode fusion genetics-protein-fragment complementation assay (BFG-PCA): tools and resources that expand the potential for binary protein interaction discovery	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkac045	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Uriu Keiya, Kimura Izumi, Shirakawa Kotaro, Takaori-Kondo Akifumi, Nakada Taka-aki, Kaneda Atsushi, Nakagawa So, Sato Kei, Seki Motoaki (as a part of the G2P-Japan)	4. 巻 385
2. 論文標題 Neutralization of the SARS-CoV-2 Mu Variant by Convalescent and Vaccine Serum	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 New England Journal of Medicine	6. 最初と最後の頁 2397 ~ 2399
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1056/NEJMc2114706	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Fukushima Tsuyoshi, Tanaka Yosuke, Adachi Keito, Masuyama Nanami, Tsuchiya Akiho, Asada Shuhei, Ishiguro Soh, Mori Hideto, Seki Motoaki, Yachie Nozomu, Goyama Susumu, Kitamura Toshio	4. 巻 11
2. 論文標題 CRISPR/Cas9-mediated base-editing enables a chain reaction through sequential repair of sgRNA scaffold mutations	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-02986-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Godai, Saito Yutaka, Seki Motoaki, Evans-Yamamoto Daniel, Negishi Mikiko, Kakoi Kentaro, Kawai Hiroki, Landry Christian R., Yachie Nozomu, Mitsuyama Toutai	4. 巻 7
2. 論文標題 Machine learning approach for discrimination of genotypes based on bright-field cellular images	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 npj Systems Biology and Applications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41540-021-00190-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Shirai Kiyokazu, Nagae Genta, Seki Motoaki, Kudo Yotaro, Kamio Asuka, Hayashi Akimasa, Okabe Atsushi, Ota Satoshi, Tsutsumi Shuichi, Fujita Takanori, Yamamoto Shogo, Nakaki Ryo, Kanki Yasuharu, Osawa Tsuyoshi, Midorikawa Yutaka, Tateishi Keisuke, Ichinose Masao, Aburatani Hiroyuki	4. 巻 112
2. 論文標題 TET1 upregulation drives cancer cell growth through aberrant enhancer hydroxymethylation of HMGA2 in hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2855 ~ 2869
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14897	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 谷内江 望、谷内江研究室 (関 元昭ら)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 189
3. 書名 超生物学 次のX	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------