

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460938

研究課題名(和文) 脱メチル化剤を用いたEBウイルス関連胃癌特異的治療の検討

研究課題名(英文) Decitabine Inhibits Tumor Cell Proliferation in Epstein-Barr Virus-Associated Gastric Cancer

研究代表者

西川 潤 (NISHIKAWA, Jun)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00379950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：脱メチル化剤アザシチジン(Azacitidine: AZA)のEBV陽性胃癌に対する抗腫瘍効果を検討した。EBV陽性ヒト胃癌細胞株SNU719とEBV陰性ヒト胃癌細胞株KATOIIIを10 μ M AZA添加もしくは非添加培地で培養した。AZAはSNU719に対してG2/M arrestとApoptosisを誘導した。また、AZAはSNU719に対し浸潤能を抑制した。AZA添加培地で培養したSNU719ではp73, RUNX3のプロモーター領域が脱メチル化されp73, RUNX3の発現量が亢進した。脱メチル化剤はEBV陽性胃癌に対してApoptosisとEMT抑制を引き起こす効果があることを証明した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of the DNA demethylating agent against EBV-associated gastric cancer (EBVaGC). Decitabine inhibited cell growth and induced G2/M arrest and apoptosis in EBVaGC cell line, SNU719. The cells treated with decitabine were significantly inhibited the expression of E-cadherin and cell motility. The promoter regions of p73 and RUNX3 were demethylated and their expression was up-regulated by decitabine. They enhanced the expression of p21. P21 induced apoptosis and epithelial-methenchymal transition (EMT) inhibition through downregulation of c-Myc. The expression of BZLF1 was induced by decitabine in SNU719. Induction of EBV lytic infection was alternative way to cause apoptosis of the host cells. This study is the first report to reveal the effectiveness of a demethylating agent in inhibiting tumor cell proliferation and suppressing the expression of E-cadherin in EBV-associated gastric cancer.

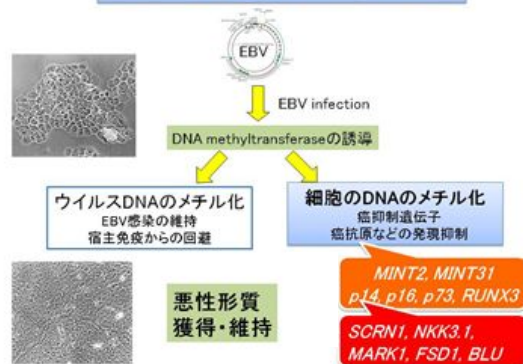
研究分野：消化器内科

キーワード：胃癌 EBウイルス DNAメチル化 脱メチル化剤

1. 研究開始当初の背景

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、バーキット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。近年、EBウイルス関連胃癌の発生機序の検討の中で、特にDNAメチル化の関与についての検討を科学研究費の助成を受けて行ってきた。EBウイルス関連胃癌における腫瘍関連遺伝子のDNAメチル化異常についての検討では、重要な癌抑制遺伝子の発現抑制が関与していることを明らかにした。また、EBウイルス関連胃癌に特異的にDNAメチル化が認められる新規遺伝子の検出を行い、新規に癌抑制遺伝子としての機能が注目されるような遺伝子を検出した。EBウイルス感染がDNAメチル化を誘導する機序についても解析をすすめており、EBウイルス関連胃癌と細胞やウイルスDNAのメチル化が密接に関わっていることが解明されつつある。

図1 EBV感染とDNA methylation



2. 研究の目的

脱メチル化剤のEBV陽性胃癌細胞への抗腫瘍効果とその主要な経路について検討するとともに、EBウイルス関連胃癌への脱メチル化剤の臨床応用を念頭において、最適な薬剤をスクリーニングし実現性の高い臨床試験へ発展させることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) EBウイルス関連胃癌への脱メチル化剤の抗腫瘍効果。細胞培養と薬剤処理。Korean Cell Line Bank (Seoul, Korea)から取得した人胃癌細胞株 SNU719 (EBV陽性胃癌細胞株)と Health Science Research Resources Bank (Osaka, Japan)から取得した人胃癌細胞株 KATOIII (EBV陰性胃癌細胞株)を用いた。細胞は非動化した10% fetal bovine serum (FBS)を添加したRPMI1640を用いて37℃、5%CO₂条件下の培養器で培養した。細胞は10 μM 5-Aza-2'-deoxycytidine (AZA)もしくはControlとして同量のリン酸バッファー (PBS)を添加した培地で培養した。培地は24時間ごとに交換した。AZA添加もしくはAZA非添加の培地を用いた細胞の培養法については同様の実験系を元にした。細胞数カウントによる増殖能の評価。生細胞計測と

3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) - 5 - (3-carboxymethoxyphenyl) - 2 - (4-sulfophenyl) - 2H - tetrazolium, inner salt (MTS) assay で評価した。生細胞計測においては、SNU 719、KATOIIIともに5x10⁵個の細胞を6well dishに播種し、24時間培養後にAZA添加もしくはAZA非添加培地で5日間培養した。細胞播種して24時間毎に、細胞をPBSで洗浄し、トリプシンで剥離しトリパンブルー染色で生細胞数を計測した。MTS assayにおいては、細胞(SNU 719: 1x10⁴, KATOIII: 1x10³)を96well dishに播種し、24時間培養後にAZA添加もしくはAZA非添加培地で5日間培養した。細胞播種して24時間毎にMTSを加え、1時間培養後に490nmの吸光度を測定した。細胞周期の解析。AZA添加もしくはAZA非添加培地で72時間処理した細胞に対してフローサイトメトリーを用いて細胞周期解析を行った。処理した細胞をトリプシンで剥離し、PBSで洗浄し、70%エタノールを用いて固定した。次に固定した細胞にPropidium Iodine (final concentration 10ug/ml) (PI)とRNase(final concentration 0.2 mg/ml)を加え、30分後にフローサイトメトリーで評価した。アポトーシス細胞の評価。AZA添加もしくはAZA非添加培地で72時間処理した細胞に対してフローサイトメトリーと蛍光顕微鏡を用いてアポトーシス細胞の検討を行った。フローサイトメトリーの評価はAnnexin V-FITC Apoptosis Detection Kitを用いて添付文書に従って行った。処理した細胞をトリプシンで剥離し、PBSで2回洗浄し、細胞濃度を1x10⁶/mlに調節した。500 μlの細胞溶液に5 μlのAnnexin V-FITCと10 μlのPIを加えた。30分培養後にサンプルをフローサイトメトリーで評価した。蛍光顕微鏡の評価はAnnexin V-FITC Apoptosis Detection KitとHoechst 33342を用いて行った。処理した細胞をトリプシンで剥離し、PBSで2回洗浄した。1x10⁶/mlの細胞を6well dishに播種し、Annexin V-FITCとPI, Hoechstを加え、1500rpmで遠心処理した。その後、蛍光顕微鏡でサンプルを観察した。細胞の形態変化と上皮間葉移行への影響。AZA添加もしくはAZA非添加培地で96時間培養した細胞に対して位相差顕微鏡を用いて細胞の形態評価を行った。細胞の浸潤能の評価はMatrigel invasion chamberを用いて添付文書に従って行った。Matrigel invasion Chamberの上面はMatrigelによってコートされている。無血清培地中に浮遊させたAZA添加もしくはAZA非添加培地で72時間処理した細胞(2.5x10⁴)をChamberの上面に播種した。10%FBSと5 μl/ml Fibronectinを加えた培地を下のChamberに加えた。Controlで細胞が十分浸潤する時間(SNU719: 24hr, KATOIII: 48hr)培養した後に、Chamber上面の非浸潤細胞を綿棒で除去した。Chamber下面まで浸潤した細胞をDiff-quick stain kitを用いて固定・染色し顕微鏡を用いて200倍の任意の視野で浸潤細胞数を計測した。

定量PCRによるEBウイルス遺伝子の発現。細胞のRNAをAll Prep DNA/RNA Mini Kitを用いて添付文書に従って抽出した。p21, p73,

RUNX3, *LMP2A*, *EBNA1*, *LMP1*, *BZLF1*, *-actin* の mRNA の発現量を One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit を用いて添付文書に従って行った。全てのデータは *-actin* の mRNA で標準化して発現量を比較した。DNA メチル化解析。AZA 添加もしくは AZA 非添加培地で 72 時間処理した細胞に対して Methylation-specific PCR (MSP) を用いて Methylation status を解析した。細胞の DNA を All Prep DNA/RNA Mini Kit を用いて添付文書に従って抽出した。抽出した DNA を EpiTect^R Bisulfite Kit を用いて添付文書に従って Bisulfite 処理を行った。Bisulfite 処理した DNA 濃度は吸光度計を用いて 20ng/μl に調整した。*p21*, *p73*, *RUNX3* の遺伝子について DNA のメチル化を評価した。まず 2μl の Bisulfite DNA を加えた Total 10μl の PCR 溶液をメチル化プライマーと非メチル化プライマーで PCR 反応を行った。Positive control の DNA として SssI methyltransferase で処理した胎盤の DNA を使用し、Negative control の DNA として Normal lymphocyte の DNA を使用した。PCR 産物を 3% アガロースゲルで電気泳動し、Ethidium bromide 染色で可視化した。

ウエスタンブロットによるタンパク発現の検討。AZA 添加もしくは AZA 非添加培地で 72 時間培養した細胞に対してウエスタンブロットを用いて発現タンパク量の比較を行った。タンパク抽出のために、細胞を 50mM Tris-HCL (pH 7.4) と 150mM NaCl と 2mM EDTA と 1% Nonidet P-40 と Phenylmethylsulfonyl fluoride を含む Lysis buffer で溶解した。タンパク濃度は Bradford Protein Assay を用いて定量した。タンパクは 8% もしくは 12% ゲルで電気泳動し、PVDF membrane にトランスファーし、特異的抗体によって抗原抗体反応を行った。ウエスタンブロットの抗体には抗 E-cadherin 抗体 (NCH-38, Dako)、抗 N-cadherin 抗体 (6G11, Dako)、抗 Vimentin 抗体 (V9, Dako)、抗 β -catenin 抗体 (β -Catenin-1, Dako)、抗 p21 抗体 (C-19, Santa Cruz)、抗 p73 抗体 (EP436Y, Abcam)、抗 *RUNX3* 抗体 (R3-5G4, Abcam) 抗 *-actin* 抗体 (13E5, Cell Signaling) を用いた。抗体の Buffer には Immuno-enhancer を用い、発色には ImmunoStar^R LD (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) を用いた。Image J (National Institutes of Health) を用いて Blotting band の Densitometry を行い、*-actin* で標準化し、タンパク発現量を比較した。統計学的解析。平均値の差の検定には Student's t test を用いた。有意差は $P < 0.05$ をもって有意とした。統計処理には統計処理ソフト JMP (SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いた。

(2) EB ウイルス関連胃癌に抗腫瘍効果を持つ、その他の脱メチル化剤やヒストン修飾薬剤をスクリーニングも行った。経口薬としての開発が期待されている脱メチル化剤ゼブラリンと抗てんかん薬として汎用されているバルプロ酸を用いて、EB ウイルス関連胃癌細胞に対する効果を(1)と同様に評価した。

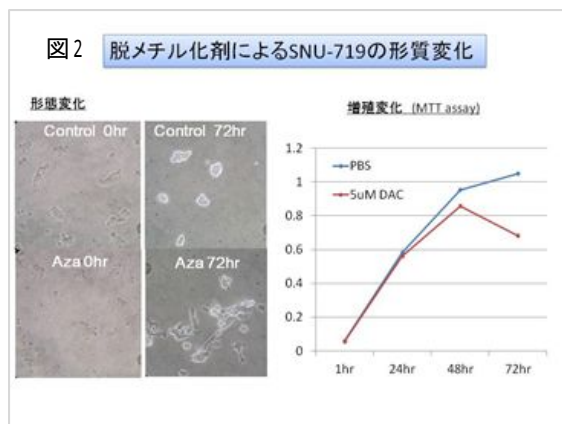
4. 研究成果

(1) 脱メチル化剤の EBV 陽性胃癌細胞への抗腫瘍効果。AZA 添加培地で培養した SNU719 は AZA 非添加培地で培養した SNU719 と比較し、72 時間以降に有意に腫瘍増殖抑制効果が認められた。AZA 添加培地で培養した KATOIII においても、AZA 非添加培地で培養した KATOIII と比較し有意な腫瘍増殖抑制効果が認められた。MTS assay でも同様に、SNU719 と KATOIII とともに AZA 投与により、Control と比較し有意に腫瘍増殖抑制効果が認められた。フローサイトメトリーを用いた細胞周期解析の結果、AZA 添加培地で培養した SNU719 においては、G2/M 期細胞割合が増加 (AZA 非添加: 12.7%, AZA 添加: 23.7%)、S 期細胞数割合が減少 (AZA 非添加: 20.1%, AZA 添加: 6.1%) し、G2/M arrest が誘導された。AZA 添加培地で培養した SNU719 においては、Sub G1 期細胞数割合が増加 (AZA 非添加: 1.1%, AZA 添加: 7.9%) した。AZA 添加培地で培養した SNU719 においては、PI (+)、Annexin V-FITC (+) のアポトーシス細胞の割合が増加 (AZA 非添加: 0.4%, AZA 添加: 5.7%) した。蛍光顕微鏡を用いて AZA 添加培地で培養した SNU719 を観察した結果、核が PI の蛍光を発し、細胞膜が Annexin V-FITC の蛍光を発するアポトーシス細胞が観察された。一方、AZA 添加培地で培養した KATOIII においては、G2/M arrest が誘導されたが、Apoptosis は誘導されなかった (Sub G1, AZA 非添加: 1.4%, AZA 添加: 1.8%)。また、PI (+)、Annexin V-FITC (+) のアポトーシス細胞の割合は増加しなかった。

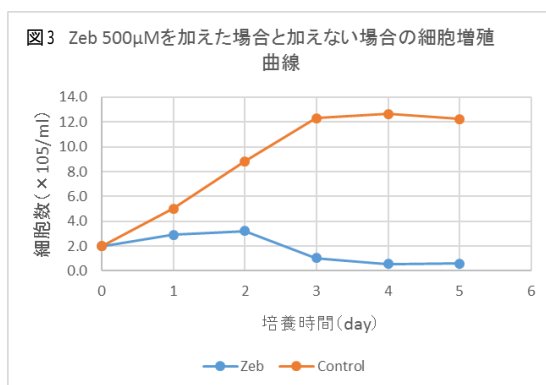
(2) 脱メチル化剤による EBV 陽性胃癌細胞における上皮間葉移行の抑制。AZA 非添加培地で培養した SNU719 と KATOIII は、ともに胃癌細胞株でありながら、血球系細胞様に球形で増殖する。AZA 添加培地で培養した SNU719 は上皮細胞株のように monolayer を形成した。AZA 添加培地で培養した KATOIII は上皮細胞様へ形態変化しなかった。ウエスタンブロットを用いて上皮間葉移行関連タンパクの発現量を比較すると、AZA 添加培地で培養した SNU719 では E-カドヘリンの発現が上昇し、N-カドヘリンの発現が減少した。AZA 添加培地で培養した KATOIII は E-カドヘリンの発現が上昇しなかった。Invasion assay では、AZA 非添加培地で培養した SNU719 で 63/HPF であるのに対して、AZA 添加培地で培養した SNU719 は 0.33/HPF であり、AZA 添加培地で培養した SNU719 において浸潤能は有意に低下した ($P=0.030$)。AZA は KATOIII に対して浸潤能の有意な低下を引き起こさなかった。

(3) 脱メチル化剤による癌抑制遺伝子の発現回復と EB ウイルス遺伝子の発現の変化。AZA 添加培地で培養した SNU719 と KATOIII では p21 と p73, *RUNX3* が増加した。Western blotting でも同様に p21, p53, *RUNX3* の発現増加が認められた。MSP の結果、未処理の SNU719 と KATOIII の p73 と *RUNX3* のプロモーター領域

にはメチル化が認められ、p73 と RUNX3 のプロモーター領域のメチル化は AZA によって脱メチル化を受けることが示された。AZA 添加培地で培養した SNU719 では、LMP2A の発現上昇が認められた。EBNA1 と LMP1 の発現上昇は認められなかった。AZA 添加培地で培養した SNU719 では、EBV の溶解感染誘導随伴遺伝子である BZLF1 の発現亢進が認められた。



(4)脱メチル化剤 Zebularin(ゼブラリン,以下 Zeb)の EBV 陽性胃癌細胞への抗腫瘍効果。生細胞数計測において、2 回分の平均の結果はコントロールが 3 日目まで増加したのに対して、Zebularine を入れた場合は、2 日目まで増加したが、その後徐々に減少した。この結果を図3に示す。フローサイトメータで細胞周期を検討したところ、コントロールの G2/M 期は 15.6%だったが、Zebularine を入れた場合は 69.4%へと上昇し、G2/M arrest を起こしていた。この他、ヒストン修飾作用があることが知られている抗てんかん薬のバルプロ酸の投与を試みてみたが、有意な細胞増殖抑制効果は得られなかった。



今回の検討で、我々は初めて脱メチル化剤が EBV 陽性胃癌に対して抗腫瘍効果のみでなく、EMT 抑制も引き起こすことを示した。AZA が EBV 陽性胃癌に対して、いくつかの癌抑制遺伝子の発現を回復させ、溶解感染も誘導することは、胃癌治療の新たな扉を開く可能性がある。切除不能 EBV 陽性胃癌に対する脱メチル化剤の投与は、切除不能 EBV 陽性胃癌に対して第一選択薬になりうるかもしれない。

5. 主な発表論文等 (雑誌論文) (計 2 件)

Nakamura M, Nishikawa J, Saito M, Sakai K, Sasaki S, Hashimoto S, Okamoto T, Suehiro Y, Yamasaki T, Sakaida I. Decitabine inhibits tumor cell proliferation and up-regulates e-cadherin expression in Epstein-Barr virus-associated gastric cancer. *J Med Virol.* 2017 Mar;89(3): 508-517. doi:10.1002/jmv.24634. (査読有)
Nishikawa J, Yoshiyama H, Iizasa H, Kanehiro Y, Nakamura M, Nishimura J, Saito M, Okamoto T, Sakai K, Suehiro Y, Yamasaki T, Oga A, Yanai H, Sakaida I. Epstein-barr virus in gastric carcinoma. *Cancers (Basel).* 2014 Nov 7;6(4):2259-74. doi: 10.3390/cancers6042259. (査読有)

(学会発表) (計 6 件)

西川 潤, 佐々木翔, 永尾未玲, 小川亮, 五嶋敦史, 橋本真一, 岡本健志, 坂井田功 EB ウイルス関連胃癌の内視鏡診断と治療への展開 第 93 回日本消化器内視鏡学会総会 2017.5.11 大阪国際会議場 (大阪)

Decitabine Inhibits Tumor Cell Proliferation and Up-regulates E-cadherin Expression in Epstein-Barr Virus-Associated Gastric Cancer. 中村宗剛, 西川 潤 第 89 回日本胃癌学会 2017.3.8 広島国際会議場 (広島)

EB ウイルス関連胃癌の発生機序と特異的治療について 西川 潤, 柳井秀雄, 坂井田功 第 102 回日本消化器病学会総会 2016.4.21 京王プラザホテル(東京)
EB ウイルス関連胃癌の発生におけるヘリコバクターピロリ胃炎の意義 柳井秀雄, 西川 潤, 坂井田功 第 102 回日本消化器病学会総会 2016.4.21 京王プラザホテル(東京)

EB ウイルス陽性胃癌の臨床・病理学的特徴 西川 潤, 柳井秀雄 第 88 回日本胃癌学会総会 2016.3.19 別府ビーコンプラザ(別府)

Epstein-Barr virus 陽性胃癌の臨床像と治療への展開 佐々木翔, 西川 潤, 中村宗剛, 西村純一, 永尾未玲, 橋本真一, 岡本健志, 坂井田功 第 101 回日本消化器病学会総会 2015.4.24 仙台国際センター (仙台)

(図書) (計 1 件)

EB ウイルス関連胃癌 診断と治療社 柳井秀雄, 西川 潤, 吉山裕規, 清水則夫編 2016, 77(60 ~ 75)

(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 なし。

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・教授

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

末広 寛 (SUEHIRO, Yutaka)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 40290978

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし