

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590918

研究課題名(和文) 胃癌の発生におけるEBV感染とAID発現の関与について

研究課題名(英文) The role of AID expression in the development of EBV associated gastric cancer

研究代表者

西川 潤 (NISHIKAWA, Jun)

山口大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：00379950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：EBV関連胃癌は著明なリンパ球浸潤を伴う特殊型の胃癌であるため、癌細胞でのAIDの発現を周囲のリンパ濾胞を陽性コントロールとして、免疫組織化学で比較を試みた。しかしながら、non-specificな反応しか認められず、検討を断念した。次にEBV関連胃癌患者10名の末梢血リンパ球を分離して、high-density DNA oligonucleotide arraysによるCopy Number Variation(CNV)について検討した。大量のデータからEBV関連胃癌患者に特異的な異常を検出を試みている。また、EBV関連胃癌のDNAメチル化について、検討を追加した。

研究成果の概要(英文)：We analyzed AID expression in EBV-associated Gastric cancers by immunohistochemistry, however, specific reaction by the antibody could not be detected in the paraffin-embedded tissue section. High-density DNA oligonucleotide arrays was performed in mononuclear cells of the patients with EBV-associated Gastric cancers. Copy number variation which specifically occurred in the patients will be identified from big data. The association of DNA methylation in the development of EBV-associated Gastric cancers was also examined. We found several tumor suppressor genes whose promoter regions were specifically methylated in EBV-associated Gastric cancers. Inactivation of these genes may suppress their function as tumor suppressor genes or tumor-associated antigen to develop and maintain EBVaGCs.

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：Epstein-Barr virus 胃癌

## 1. 研究開始当初の背景

*H. pylori*とEBVは、胃癌の発生に関与していると考えられている2つの病原微生物である。*H. pylori*は、胃粘膜に慢性的に持続感染し、胃癌の前癌状態とされる慢性萎縮性胃炎を起こすことが明らかとなっている。胃癌の発生に関する機序については、*H. pylori*の病原因子であるCytotoxin-associated gene A (CagA)の機能解析とCagA+*H. pylori*感染により誘導されるAIDについての検討が進んでいる。一方で、世界各地より、胃癌の約10%にEBV感染が認められることが報告されてきている。また、EBV関連胃癌の背景胃粘膜にも*H. pylori*感染は認められ、慢性胃炎や腸上皮化生を伴っていることが明らかになっており、胃癌発生には、*H. pylori*とEBVの相互作用が重要である可能性が示唆されるが、両者を結び付ける直接的な因子についての報告は認めない。

Honjoらにより免疫グロブリンのクラススイッチに関わるAIDの胃粘膜での異所性発現が発癌をもたらすという重要な報告がなされた。AIDは本来、Bリンパ球において、その生理的機能を発揮するが、*H. pylori*感染によるNF- $\kappa$ Bの発現が、胃粘膜でのAIDの発現を誘導していると報告されている。EBVが胃癌に感染していることは、発見当初は懐疑的であった。EBVは*in vitro*でBリンパ球に感染し不死化するtransformation能を持つが、上皮細胞にはEBVレセプターは発現しておらず、上皮細胞系のEBV感染モデルが存在せず、その活性が十分に検討されてこなかったためである。私は、過去15年間にわたり、EBVの胃癌発生における関与について、*in vitro*、*in vivo*で研究してきている。この間、EBV関連胃癌のモデルになりうるEBV感染胃癌細胞株の樹立などを行い、世界的に高い評価を受けている。このモデルを用いた上皮細胞におけるEBVの有無による遺伝子発現の相違の検討やEBV関連胃癌におけるDNAメチル化の関与の検討から、EBVの胃癌発生メカニズムについて徐々に解明してきている。

AIDとEBVがともに親和性の高い、Bリンパ球の腫瘍であるBurkittリンパ腫において、両者の相互作用が報告されている。EBV感染はAIDの発現誘導をもたらす、AIDの過剰発現は数時間でIgH:myc translocationを引き起こすことが報告されている。このようなAIDとEBVの相互作用が上皮細胞においても認められるのか、*H. pylori* CagAとの関連も含め検討をすることは胃癌発生メカニズムを検討する上で重要であると考えられる。AIDは慢性炎症をもとに発生するC型慢性肝炎からの肝細胞癌や潰瘍性大腸炎を背景にしたcolitic cancerとの関連が報告されてきている。胃部分切除後に発生する残胃の癌は、胆汁逆流などにより慢性的に炎症(残胃炎)が誘因になっていると考えられており、

Billroth-II法で再建された残胃の断端吻合部に発生することが多い。この残胃の癌におけるEBV感染の頻度は通常胃癌の3,4倍と非常に高い。このような観点からもAIDが関与する腫瘍とEBV感染には類似性が見いだせる。

## 2. 研究の目的

近年、*Helicobacter pylori*(*H. pylori*)感染による胃癌発生機序について、免疫グロブリンのクラススイッチに関わるActivation-induced cytidine deaminase (AID)遺伝子の胃粘膜での異所性発現が重要な役割を果たしていることが報告されてきている。一方、我々はBurkittリンパ腫や移植後の日和見リンパ腫などB細胞腫瘍を発生させるEpstein-Barr virus(EBV)の感染が胃癌の発生に関与していることを報告してきた。この本来Bリンパ球で生理的な活性を示すAIDと通常Bリンパ球を宿主とするEBVの胃癌発生における関連について検討することを目的とする。

## 3. 研究の方法

EBV感染とAIDの異所性発現の胃癌の発生への相互作用について検討を行う。

### (1) EBV関連胃癌におけるAIDの発現について

EBV関連胃癌におけるAIDの発現について免疫染色で検討を行う。また、慢性炎症を背景に発生する残胃の癌におけるEBV感染とAIDの発現について検討を行う。

### (2) EBV感染によるAIDの発現を増強について

EBV感染胃癌細胞株におけるAID遺伝子の発現増強について検討する。AIDの発現増強が認められた場合、EBVの責任遺伝子は何か、また、その機序について解析を行う。また、EBV関連胃癌において、AIDによるrecombinationのため変異が起こった癌抑制遺伝子について検討する。

### (3) EBV関連胃癌において、AIDにより変異を受ける遺伝子の探索

EBV関連胃癌において、high-density DNA oligonucleotide arraysによるCopy Number Variation (CNV)について検討する。kb単位でDNAの増幅、欠失について検討を行うことで、発現に影響を受けている遺伝子を同定したいと考えている。対象には、EBV関連癌患者の末梢血リンパ球とEBV関連胃癌患者のから樹立された細胞株SNU-719を用いて検討を行う。

## 4. 研究成果

### (1) EBV関連胃癌におけるAIDの発現

EBV関連胃癌をスクリーニングしてきており、約100例の症例を蓄積して、その臨床的特徴などを報告してきた。これらの症例の胃癌組織を用い、AIDの発現について、免疫染色で検討を行った。

EBV関連胃癌は著明なリンパ球浸潤を伴う特殊型の胃癌であるため、癌細胞でのAIDの発現を周囲のリンパ濾胞を陽性コントロール

として、リンパ球でのAIDの発現との比較を試みた。しかしながら、2種類の抗体を購入し、免疫組織化学での検討を行ったが、non-specificな反応しか認められず、陰性コントロールでも染色される状態が続いたため、検討を断念した。

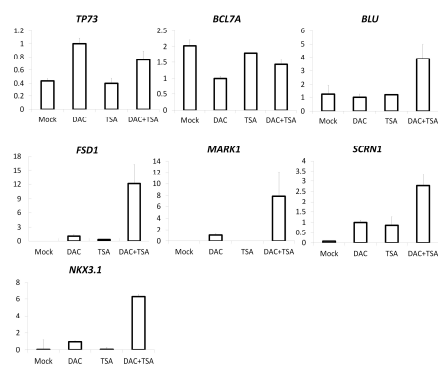
(2) EBV 関連胃癌における変異遺伝子の検索

EBV 関連胃癌患者10名の末梢血リンパ球を分離して、high-density DNA oligonucleotide arraysによるCopy Number Variation (CNV)について検討した。これらで検出される変異は必ずしもAIDにより引き起こされるものではないかもしれないが、現在、EBV 陰性胃癌をコントロールとして、データとも比較を行っており、大量のデータの解析中である。今回の研究費で測定したデータを今後の病態解明、治療への応用に生かしていきたい。

(3) EBV 関連胃癌のDNAメチル化について前課題から継続して、EBV 関連胃癌の発生に強い関連があるDNAメチル化の検討を行った。EBV 関連胃癌細胞株 SNU-719 を用い、新規メチル化遺伝子を同定していたので、これらの遺伝子の発現が脱メチル化剤により、増強してくるか、RT-PCRで検討した。(図1)

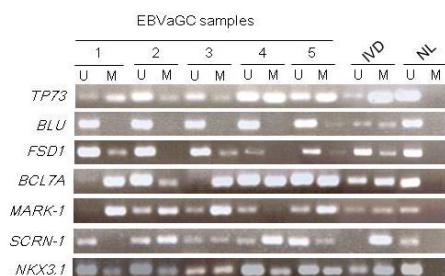
これらの遺伝子は胃癌において、癌抑制遺伝子としての機能が確認されているものや、他の悪性腫瘍において、癌抑制遺伝子として注目されている遺伝子であり、EBV 関連胃癌の治療に脱メチル化剤の投与が有用である可能性が示唆された。

図1



EBV 関連胃癌の臨床サンプルを用いて、これらの遺伝子のDNAメチル化を検討したところ、いずれの遺伝子も陰性コントロールを比較して高頻度にDNAメチル化が検出された。(図2)

図2



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)

- Okamoto T, Hayashi Y, Mizuno H, Yanai H, Nishikawa J, Nakazawa T, Iizasa H, Jinushi M, Sakaida I, Yoshiyama H. Colonization of an acid resistant *Kingella denitrificans* in the stomach may contribute to gastric dysbiosis by *Helicobacter pylori*. *J Infect Chemother*. 査読有 2014 20(3):169-74.
- Okada T, Nakamura M, Nishikawa J, Sakai K, Zhang Y, Saito M, Morishige A, Oga A, Sasaki K, Suehiro Y, Hinoda Y, Sakaida I. Identification of genes specifically methylated in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinomas. *Cancer Sci*. 査読有 2013 104(10):1309-14.
- Saito M, Nishikawa J, Okada T, Morishige A, Sakai K, Nakamura M, Kiyotoki S, Hamabe K, Okamoto T, Oga A, Sasaki K, Suehiro Y, Hinoda Y, Sakaida I. Role of DNA methylation in the development of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *J Med Virol*. 査読有, 2013 85(1):121-7.
- Iizasa H, Nanbo A, Nishikawa J, Jinushi M and Yoshiyama H. Epstein-Barr Virus (EBV)-associated Gastric Carcinoma *Viruses* 査読有 2012, 4(12), 3420-3439

〔学会発表〕(計6件)

- Jun Nishikawa, Munetaka Nakamura, Kouhei Sakai, Atsushi Goto, Junichi Nishimura, Takeshi Okamoto, Yutaka Suehiro, Isao Sakaida. IDENTIFICATION OF GENES SPECIFICALLY METHYLATED IN EPSTEIN-BARR VIRUS ASSOCIATED GASTRIC CARCINOMAS UEGW2013 (欧州消化器病学会週間) 2013.10.15 Berlin
- 西川 潤, 中村宗剛、坂井田功 Epstein-Barr virus 関連胃癌の病態解明から治療への展開 第85回日本消化器病内視鏡学会総会 2013.5.10-12 京都(国立京都国際会館)
- 中村宗剛, 西川 潤, 五嶋敦史, 西村純一, 岡本健志, 酒井幸平, 末広 寛, 坂井田功 EBV 陽性胃癌に対する脱メチル化剤の抗腫瘍効果と上皮間葉移行への影響 第16回中国消化管スタディーグループ研究会 2012.11.30 宇部 (ANA クラウンプラザホテル宇部)
- 西川 潤, 齋藤真理, 岡田季之, 末広 寛, 坂井田功. Epstein-Barr virus 関連胃癌の発生におけるDNAメチル化の意義 第71回日本癌学会学術総会 2012.9.19-21 札幌(ロイトン札幌)
- 西川 潤, 齋藤真理, 浜辺功一, 五嶋敦

史、岡本健志、坂井田功 Epstein-Barr virus 関連胃癌特異的な DNA メチル化異常とその誘導機序について 第 53 回日本消化器病学会大会 2011.10.20-23 福岡(福岡国際センター)

6. 西川 潤、齊藤真理、坂井田功 Epstein-Barr virus 関連胃癌の特性に合わせた脱メチル化剤による治療 第 97 回日本消化器病学会総会 2011.5.13-15 東京(京王プラザホテル)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔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・医学部附属病院・准教授  
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

### (3)連携研究者

なし