

令和元年6月19日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08729

研究課題名(和文) EBV感染が誘導するエピゲノム改変・維持に関わる因子の同定とその機能解析

研究課題名(英文) Identification of factors contributing to epigenetic alteration and maintenance in EBV infection.

研究代表者

松坂 恵介 (Matsusaka, Keisuke)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：40610150

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Epstein-Barr ウイルス(EBV)感染により胃癌細胞MKN7のみならず、正常胃上皮不死化細胞GES1においても、ウイルスと宿主細胞の両者に時間的・空間的に秩序だったDNAメチル化の誘導が確認された。EBV感染早期における遺伝子発現を網羅的に解析した結果、複数のウイルス遺伝子の発現が確認された。蛍光蛋白質で標識した変異型EBNA1を発現ベクターに組み込むことで効率的にEBV感染を脱落させられることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EBV関連腫瘍は、高齢化社会や高度先進医療に伴った免疫抑制状態で今後増加することが予想され、その対策は喫緊の課題である。本研究によりEBV感染がEBV陽性胃癌の際だったエピゲノム異常の原因であることが示され、その発がん機構にエピゲノム異常が重要であることが示された。また、EBV感染を効率的に脱落させられる系が確立し、EBVと宿主との相互作用に影響を及ぼす新規治療戦略の可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that Epstein-Barr virus (EBV) infection induced de novo DNA methylation in immortalized normal gastric epithelial cell, GES1, as well as gastric cancer cell, MKN7. Post-infection time-series DNA methylation analyses showed that EBV infection exerted strong pressure to induce de novo DNA methylation in gastric epithelial cells within a month in a spatiotemporally well-ordered manner. RNA-seq analysis showed that multiple EBV genes expression in early infection phase, indicating that complicated mechanisms should be involved in de novo DNA methylation induction. We established effective EBV dropout system using mutant EBNA1 labeled by fluorescent protein.

研究分野：エピジェネティクス、病理学

キーワード：DNAメチル化 Epstein-Barr virus 胃癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

エピゲノムとは DNA 塩基配列の変化を伴わずに DNA の修飾因子として遺伝子の発現制御に関与する因子の総称である。Epstein-Barr ウイルス (EBV) は約 170kbp の DNA ゲノムを有したヘルペスウイルスの一種で、成人の 90% 以上に無症候性に潜伏感染している。一定の頻度でリンパ腫や胃癌などの腫瘍の発生に関与する側面を持つが、その発がん機構は不明な点が多い。申請者は胃癌における DNA メチル化の網羅的解析により EBV 陽性胃癌が際立って DNA メチル化の蓄積した形質を有すること、*in vitro* の EBV 感染により胃癌細胞 MKN7 にゲノムワイドな DNA メチル化が誘導され、EBV 感染そのものが EBV 陽性胃癌特有の超高 DNA メチル化形質の原因であることを明らかにしてきた (申請者ら, Cancer Res. 2011)。すなわち、感染早期における DNA メチル化の変化を解析することで、ウイルスと宿主との相互作用を明らかにできると考えられる。また、遺伝子発現を宿主細胞と EBV の双方に着目し経時的かつ包括的に解析することで、エピゲノム改変に関わる因子が同定可能と考える。

さらに、EBV 感染脱落系により、エピゲノムの維持という点に着目した解析も展開する。これは、EBV ゲノムが宿主ゲノムに挿入されることなく、核内蛋白質 EBNA1 を介した宿主のクロマチンとウイルスゲノムの連結により環状エピソームの状態では維持されている性質を利用したもので、変異型 EBNA1 を強制発現させることで dominant negative 効果により EBV 感染を脱落させることが可能である。

### 2. 研究の目的

胃癌を対象に EBV 感染が誘導するゲノムワイドなエピゲノム改変に関わる因子の同定と、EBV 感染脱落系を用いたエピゲノム維持機構の解明を目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) EBV 感染早期経時的ゲノム網羅的解析: Akata 細胞は EBV 陽性 Burkitt リンパ腫由来の浮遊細胞であり、細胞表面に発現した IgG を抗 IgG 抗体で交叉反応することで潜伏感染から溶解感染に移行させることが可能である。Akata 細胞にはネオマイシン耐性遺伝子組み換え EBV (rEBV) が感染しており、被感染細胞株と共培養することで細胞同士の接触を経て EBV 感染が成立する。胃上皮細胞 MKN7 と GES1 に対して Akata システムを用いて rEBV を感染させ、感染早期の変化を経時的に解析する。選択薬剤 G418 で感染細胞を選択し、経時的に RNA と DNA を抽出し、遺伝子の発現は RNA-seq 法にて宿主細胞とウイルスの両者についてゲノム網羅的に解析する。

(2) EBV 脱落実験: 野生型 EBNA1 は宿主細胞のクロマチンと EBV ゲノムを結びつける役割を果たし、EBV の潜伏感染維持に必須の因子である。過去の報告に従って (Nasimuzzaman M, et al., Mol Ther. 2005)、野生型 EBNA1 から核移行シグナルと DNA 結合・ダイマー形成領域以外を欠損させた変異型 EBNA1 を組込んだ発現ベクターを作製し、EBV 感染細胞から EBV の脱落を検討する。

### 4. 研究成果

(1) 胃癌細胞 MKN7 と正常胃上皮不死化細胞 GES1 に対して、EBV 感染早期におけるウイルスと宿主細胞の両者のゲノムについて DNA メチル化を解析した (申請者ら, J Pathol. 2017)。まず、ウイルスゲノムについてはパイロシーケンス法にてメチル化マーカー遺伝子を調べたところ、感染 11 日目から DNA メチル化誘導が始まり、20 日目にはメチル化が入り終えた。DNA メチル化の誘導を受けたウイルス遺伝子は遺伝子の発現低下が確認された。一方、宿主細胞の DNA メチル化誘導は感染から 17 日目から入り始め、21 日目には入り終えた (図 1)。このように、ウイルスと宿主細胞のゲノム DNA に対する新規 DNA メチル化誘導には前後関係が存在し、秩序だった機序の存在がうかがわれた。

一方、ウイルス感染後の表現型を確認したところ、MKN7 と GES1 には成長速度に有意差は確認できなかった。細胞周期を評価したところ、EBV 感染後の胃上皮細胞は G2 期に多く認められた。

新規に DNA メチル化が誘導された遺伝子は、臨床検体の EBV 陽性胃癌や EBV 陽性胃癌由来細胞株・xenograft においても同様にメチル化されていた。ヒト胚性幹細胞におけるポリコム抑制複合体 (PRC) の標的遺伝子を検討したところ、胃癌で共通にメチル化される遺伝子には PRC 標的遺伝子が有意に多く含まれているのに対し、EBV 陽性胃癌で特異的にメチル化される遺伝子は PRC 標的以外の遺伝子にメチル化が加わっていた。このことは、通常の DNA メチル化誘導とは異なる機序の存在を示唆している。また、メチル化遺伝子のプロモーター領域における CpG スコアを検討したところ、胃癌で共通にメチル化される遺伝子と EBV 陽性胃癌に特異的にメチル化される遺伝子との間に有意差はなく、CpG スコアの高い遺伝子に誘導されることが示された。以上の結果より、EBV 感染という単独因子により、正常の胃上皮由来細胞においても新規 DNA メチル化が誘導され、さらにそれは胃癌に共通にメチル化される遺伝子にも及んでいることが示された。

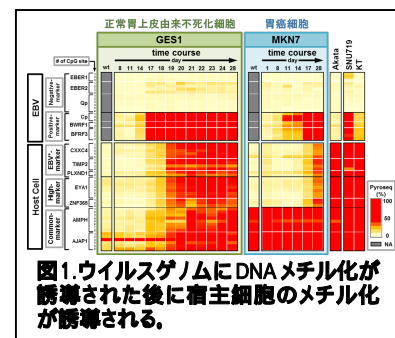


図1. ウイルスゲノムに DNA メチル化が誘導された後に宿主細胞のメチル化が誘導される。

新規 DNA メチル化誘導パターンに応じて3つの遺伝子に分類した(図2)。メチル化抵抗性遺伝子: CpG アイランドの辺縁には誘導されるが、中心部に対しては誘導に抵抗性を示す遺伝子。メチル化感受性遺伝子: CpG アイランドの中心部まで全てメチル化が入る遺伝子。非メチル化遺伝子: EBV 感染においても新規 DNA メチル化が誘導されない遺伝子。これらについて、DNA メチル化の誘導に速度と加速度の概念を加えて検討したところ、CpG アイランドの辺縁部から中心部に対して新規 DNA メチル化が誘導されることが示された。

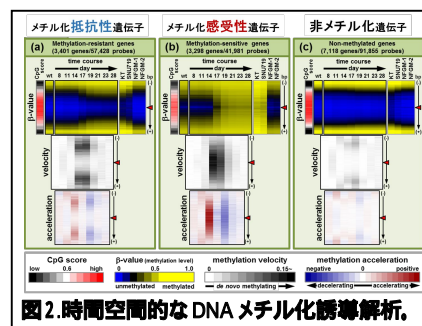


図2.時間空間的なDNAメチル化誘導解析。

EBV 感染早期の時相で遺伝子発現の変化を次世代シーケンサーを用いた RNA-seq 法にて網羅的に解析した。ウイルスの発現遺伝子には溶解感染遺伝子も含めて多数の発現が確認され、複雑な機構の存在がうかがわれた。

(2) EBV 感染脱落を効率的に行う系の検討を行った。変異型 ENBA1 を発現ベクターに組み込み transfection 方にて遺伝子導入を行うと、確かに一定の EBV 感染脱落が得られるが、残存する細胞も少なからず認められた。これは遺伝子導入後に薬剤にて選択を行っているが、選択された細胞における変異型 ENBA1 の発現が必ずしも均一ではないことが原因と考えられた。すなわち、高発現を維持している細胞もあれば発現量が少ない細胞もあり、それらが一様に薬剤選択にて選択されてしまうと考えられた。そこで、長時間にわたり高発現を維持している細胞を得る工夫として、変異型 ENBA1 に蛍光蛋白質を融合させ、transfection から 7 ~ 10 日後に強く蛍光が認識される細胞はその期間にわたり高発現を維持していた細胞と判断した。その時点でセルソーターにて蛍光標識される細胞を選択することで、高発現を維持した細胞の選別が可能と考えられた。

rEBV 感染済みの MKN7 に対して、赤色蛍光蛋白質 mCherry を C 末端に融合させた変異型 ENBA1 を組み込んだ発現ベクターを作成した。transfection 後、薬剤選択を行わずに 10 日間継代を維持し、その時点で赤色蛍光蛋白質を高発現している細胞をセルソーターにて選別した。その結果、効率的に EBV が脱落した細胞を得ることに成功した。

今後、DNA 脱メチル化因子 TET2 の強制発現や、DNA メチル基転移酵素 DNMTs の knock down、DNA 脱メチル化剤 5-Aza-2'-deoxycytidine の投与による DNA メチル化とヒストン修飾の変化について評価し、EBV 感染がエピゲノム修飾の維持に対してどのような働きを有しているかを検討してゆく予定である。特に TET2 の knock down 下に EBV 感染を行ったところ、control と比較してより多くの遺伝子に DNA メチル化が誘導されることを示しており、TET2 が EBV 感染による新規 DNA メチル化の抵抗因子である結果を得ている(申請者ら、Oncotarget, 2016)。TET2 が EBV 感染時に DNA メチル化の維持にどのように働いているかについて解析を進めてゆく。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計16件)

- (1) Takane K, Fukuyo M, [Matsusaka K](#) (3rd of 10), Kaneda A, et al. The frequency of promoter DNA hypermethylation is decreased in colorectal neoplasms of familial adenomatous polyposis. *Oncotarget*. 2018 Aug 24;9(66):32653-32666. doi: 10.18632/oncotarget.25987. (査読あり)
- (2) Kusano-Arai O, Iwanari H, [Matsusaka K](#) (7th of 11), Hamakubo T, et al. Synergistic cytotoxic effect on gastric cancer cells of an immunotoxin cocktail in which antibodies recognize different epitopes on CDH17. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*. 2018 Feb;37(1):1-11. doi: 10.1089/mab.2017.0043. (査読あり)
- (3) Nakagawa T, [Matsusaka K](#) (2nd of 15), Kaneda A, et al. Frequent promoter hypermethylation associated with human papillomavirus infection in pharyngeal cancer. *Cancer Lett*. 2017 Oct 28;407:21-31. doi: 10.1016/j.canlet.2017.08.008. (査読あり)
- (4) Otsuji K, Sasaki T, [Matsusaka K](#) (6th of 9), Seto Y, et al. Use of droplet digital PCR for quantitative and automatic analysis of the HER2 status in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2017; 162(1):11-18 doi: 10.1007/s10549-016-4092-5. (査読あり)
- (5) Okabe A, Funata S, [Matsusaka K](#) (3rd of 10), Kaneda A, et al. Regulation of tumour related genes by dynamic epigenetic alteration at enhancer regions in gastric epithelial cells infected by Epstein-Barr virus. *Sci Rep*. 2017; 7(1):7924. doi: 10.1038/s41598-017-08370-7. (査読あり)
- (6) Nakagawa T, [Matsusaka K](#) (2nd of 15), Kaneda A, et al. Frequent promoter hypermethylation associated with human papillomavirus infection in pharyngeal cancer. *Cancer Lett*. 2017; 407:21-31. doi: 10.1016/j.canlet.2017.08.008. (査読あり)

- (7) Matsusaka K (1st of 7), Kaneda A, et al. Epstein-Barr virus infection induces genome-wide de novo DNA methylation in non-neoplastic gastric epithelial cells. *J Pathol.* 2017 Aug;242(4):391-399. doi: 10.1002/path.4909. ( 査読あり )
- (8) Funata S, Matsusaka K (2nd of 9), Kaneda A, et al. Histone modification alteration coordinated with acquisition of promoter DNA methylation during Epstein-Barr virus infection. *Oncotarget.* 2017; 8(33):55265-55279. doi: 10.18632/oncotarget.19423. ( 査読あり )
- (9) Takane K, Matsusaka K (2nd of 15), Kaneda A, et al. Two subtypes of colorectal tumor with distinct molecular features in familial adenomatous polyposis. *Oncotarget.* 2016; 7(51):84003-84016. doi: 10.18632/oncotarget.11510. ( 査読あり )
- (10) Sakai E, Fukuyo M, Matsusaka K (4th of 16), Kaneda A, et al. Genetic and epigenetic aberrations occurring in colorectal tumors associated with serrated pathway. *Int J Cancer.* 2016; 138(7):1634-1644. doi: 10.1002/ijc.29903. ( 査読あり )
- (11) Sakai E, Fukuyo M, Matsusaka K (3rd of 10), Kaneda A, et al. TP53 mutation at early stage of colorectal cancer progression from two types of laterally spreading tumors. *Cancer Sci.* 2016; 107(6):820-827. doi: 10.1111/cas.12930. ( 査読あり )
- (12) Saju P, Murata-Kamiya N, Matsusaka K (7th of 14), Hatakeyama M, et al. Host SHP1 phosphatase antagonizes *Helicobacter pylori* CagA and can be downregulated by Epstein-Barr virus. *Nat Microbiol.* 2016; 1:16026. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.26. ( 査読あり )
- (13) Namba-Fukuyo H, Funata S, Matsusaka K (3rd of 9), Kaneda A, et al. TET2 functions as a resistance factor against DNA methylation acquisition during Epstein-Barr virus infection. *Oncotarget.* 2016; 7(49):81512-81526. doi: 10.18632/oncotarget.13130. ( 査読あり )
- (14) Matsusaka K (1st of 11), Ushiku T, Fukayama M, et al. Coupling CDH17 and CLDN18 markers for comprehensive membrane-targeted detection of human gastric cancer. *Oncotarget.* 2016; 7(39):64168-64181. doi: 10.18632/oncotarget.11638. ( 査読あり )
- (15) Matsusaka K (1st of 13), Ishikawa S, Fukayama M, et al. Tumor Content Chart-Assisted HER2/CEP17 Digital PCR Analysis of Gastric Cancer Biopsy Specimens. *PLoS One.* 2016; 11(4):e0154430. doi: 10.1371/journal.pone.0154430. ( 査読あり )
- (16) Kishikawa J, Matsusaka K (8th of 27), Watanabe T, et al. CD133 Expression at the Metastatic Site Predicts Patients' Outcome in Colorectal Cancer with Synchronous Liver Metastasis. *Ann Surg Oncol.* 2016; 23(6):1916-1923. doi: 10.1245/s10434-016-5099-1. ( 査読あり )

〔学会発表〕(計 6 件)

- (1) Matsusaka K, Mano Y, Kaneda A, et al. Synergistic effect of genetic/epigenetic alteration independent of TP53 mutation in hypermethylation gastric cancer. 29th Annual Meeting of the Japanese Society for gastroenterological carcinogenesis in Tokyo 2018.
- (2) Matsusaka K, Mano Y, Kaneda A, et al. Identification of genetic/epigenetic alterations based on wild-type TP53 in high methylation gastric cancer. 77th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association in Osaka, 2018.
- (3) Matsusaka K, Mano Y, Kaneda A, et al. Identification of genetic-epigenetic interaction independent of TP53 mutation in gastric cancer. 107th Annual Meeting of the Japanese Society of Pathology in Sapporo 2018.
- (4) Matsusaka K, Mano Y, Kaneda A, et al. Identification of unique genetic and epigenetic alterations in gastric cancer with hypermethylation epigenotypes. 76th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association in Yokohama, 2017.
- (5) Matsusaka K, Mano Y, Kaneda A, et al. Identification of unique genetic/epigenetic alteration in gastric cancer with high DNA methylation. 106th Annual Meeting of the Japanese Society of Pathology in Tokyo, 2017.
- (6) Matsusaka K, Mano Y, Kaneda A, et al. Unique genetic and epigenetic features of gastric cancer subtypes with high-methylation or Epstein-Barr virus infection. 75th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association in Yokohama, 2016.

〔図書〕(計 3 件)

- (1) Matsusaka K and Kaneda A. DNA and Histone Methylation in Gastric Cancer. In: Kaneda A., Tsukada Y. (eds) DNA and Histone Methylation as Cancer Targets. Cancer Drug Discovery and Development. Humana Press, Cham; 2017; 377-390.
- (2) 松坂恵介. 『ピロリ菌未感染胃癌(未分化型)病理所見』ピロリ菌陰性時代の上部消化管内視鏡, 文光堂, 東京. p.139-141, 2016.
- (3) 松坂恵介, 宇於崎宏. 『EBウイルス関連胃癌』病理と臨床, 文光堂, 東京. vol.34, No.9,

p.959-962, 2016.

〔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.m.chiba-u.ac.jp/class/moloncol/>

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：福世 真樹

ローマ字氏名：(FUKUYO, Masaki)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。