

令和元年6月11日現在

機関番号：32713

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15435

研究課題名(和文) DNA全組込と間質細胞の次世代統合解析によるEBV関連胃癌機構の解明とその制御

研究課題名(英文) Elucidation and regulation of gastric carcinogenesis based on the next-generation integrated analysis of DNA integration and stromal cells

研究代表者

山本 博幸 (Yamamoto, Hiroyuki)

聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40332910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：DNAウイルスのヒトゲノムへの組み込みは、腫瘍において重要な役割を担う。胃癌におけるEBウイルスの役割を明らかにするために、次世代シーケンサーに基づく組み込みウイルスゲノムのメチル化解析を行った。胃癌細胞株において、組み込まれたウイルスゲノムは、さまざまなDNAメチル化レベルを示した。動的なDNAメチル化変化が、機能的にウイルスの生物学的動態に影響することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNAウイルスであるEbstein-Barr virus(以下、EBV)が関連する胃癌(EBV関連胃癌)は胃癌の10%を占め、ヘリコバクター・ピロリ菌感染者が減少していく時代において重要性が増している。次世代シーケンサーによる精度の高いEBV DNA組み込み解析法を確立し、EBV DNA組み込みとともにDNAメチル化の多様性を明らかにした。EBVが関わる他の癌種やさらには、EBV以外のウイルスDNAのヒト発癌における役割の解明につながる成果であることから、学術的意義は大きく、胃癌撲滅に向けた社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：Integration of DNA viruses into the human genome plays an important role in various types of tumors. However, the molecular details and clinical impact of EB virus (EBV) integration on either the human or EBV epigenomes in gastric cancer are unknown. We used a next-generation sequencing-based method for structural methylation analysis of integrated viral genomes. We detected integrated EBV sequences in the genome of the gastric cancer cell line and found variable levels of methylation within the integrated EBV genomes. The observed dynamic changes in DNA methylation of the host and viral genomes may functionally affect the biological behavior of EBV.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：EBV DNA組み込み DNAメチル化 胃癌 間質細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

我々は、ウイルス、細菌などの病原体のヒト癌への関わりを研究してきた。DNA ウイルスである Epstein-Barr virus（以下、EBV）が関連する胃癌（EBV 関連胃癌）は胃癌の 10%を占め、*H. pylori* 菌皆除菌時代において重要性が増している。EBV が胃発癌に関わる機序は十分解明されていない。解明が進んでいる他の癌種の解析では、EBV 感染にかかわる主要な発癌機序のひとつに EBV DNA のヒトゲノムへの組み込みがある。

DNA ウイルスのヒトゲノムへの組み込みは、学術的重要性が高く、網羅的解析が進んできている。我々は、類似した研究と異なり、B 型肝炎ウイルス（HBV）DNA 組み込み配列を含むヒトゲノム断片のみを効率的に抽出した後に次世代シーケンサー（NGS）解析を行うという新しい発想に基づくバイアスのない解析法（G-NaVI 法）を開発した。これにより HBV DNA 組み込み解析に加え、メチル化解析を可能にし、HBV 組み込み部位における HBV DNA およびヒトゲノムのメチル化の相関という肝発癌機構の重要な新知見を見出した。

従って、G-NaVI 法を用いることにより、胃癌における EBV の役割を明らかにすることができると考えられる。

2. 研究の目的

胃癌発生機序の解明は重要な課題である。本研究では、①EBVのヒトゲノムへの組み込みおよび、②EBV組み込みに伴うEBVおよび宿主ゲノムのエピジェネティックな変化の全貌を明らかにし、背景因子も含めて、③EBV関連胃癌の統合的分子病態の解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) EBV組み込み部位の視覚化解析

EBV感染胃癌細胞株を用い、EBV配列に特異的なプローブの作成を行い、Two-color FISH法を用いて、組み込み部位の視覚化解析を行う。

(2) EBV組み込み部位とLINE、Alu（Yb8）のDNAメチル化との関連の比較検討

EBV感染胃癌細胞株におけるLINE、Alu（Yb8）領域のDNAメチル化解析を定量的メチル化解析法であるパイロシーケンス法にて行い「EBV DNA組み込み部位」との関係を比較検討する。

(3) EBVの組み込み配列が存在するヒトゲノム断片のみの回収

EBV感染胃癌細胞株のDNAをアコースティックソルビライザー Covarisを用いて裁断化し、カスタム作成したGenome capture用のEBV bait primerを用いて、ハイブリダイズさせ、EBVの組み込み配列が存在するヒトゲノム断片のみを回収する。

(4) 次世代シーケンサーによるEBVの組み込み部位確認

得られたEBV組み込み配列の断片が含まれるヒトゲノムのみをde novo配列解析が可能な次世代シーケンサーを用いて配列を解析し、組み込み部位を確認する。Genome captureにより、EBV組み込み配列の含まれるDNA断片のみであるため、ゲノムシーケンス断片量は非常に少なく、十分量の解析depthを確保することが可能である。

(5) EBV関連胃癌細胞株の遺伝子異常の次世代統合オミクス解析

①遺伝子変異解析：MassARRAYシステムやIon PGMシーケンサーを用いて多サンプルの多領域を同時にスクリーニングする。

②DNAメチル化解析：MCAマイクロアレイ等による網羅的解析、パイサルファイト-パイロシーケンスを行う。

③エピゲノム異常の解析：高速次世代シーケンサーを用いたMCAシーケンス法等を用いる。

④マイクロRNA異常の解析：TaqMan qPCR、マイクロアレイ、次世代シーケンサー、ChIP-on-chip等を用いて網羅的な解析も行う。

(6) 組み込み部位におけるEBV遺伝子のメチル化レベルの解析

組み込み部位におけるEBV遺伝子のメチル化レベルをカスタム合成したprimerを用いて解析を行い、各サンプルごとの関連アルゴリズムを合成し、発癌にかかわる組み込み先を同定解析する。de novo配列を特殊プログラムを用いて決定する。

(7) 組み込み部位のシーケンスの検証試験

得られた組み込み部位情報を用い、組み込み部位の検証試験をダイレクトシーケンス法にて行う。

(8) 組み込まれた遺伝子の発現への影響および組み込みにより影響する融合蛋白の解析

組み込まれた部位が転写領域である場合には、組み込まれた遺伝子の発現への影響をreal-time PCRおよびWestern Blottingにて解析するとともに、組み込みにより影響する融合蛋白に関する解析を行う。

(9) 各組み込み部位におけるEBV及びヒトゲノム側のメチル化レベル解析

各組み込み部位におけるエピジェネティックな不活化制御機構（とくにDNAメチル化）を確認する目的から、各組み込み部位特異的なビオチン化primerを作成し（F-Primer: EBV側、R-Primer: 組み込まれたヒトゲノム側）、EBV側のメチル化レベルを測定する。また組み込まれたヒトゲノム側（組み込み領域両脇のヒトゲノム）のメチル化レベルも併せて測定する。本検討には、比較的長い領域をメチル化解析することが求められることから、次世代パイロシーケンサーを用いて行う。

(10) アレル特異的DNAメチル化解析

上記に引き続き、EBV組み込みありと無しのそれぞれのアレル特異的DNAメチル化解析を行う。

4. 研究成果

(1) 次世代シーケンサーによる EBV DNA 組み込み解析の基礎実験において、多数の primers を設計し遺伝子増幅を試み、増幅不良などにより primers の再設計・再増幅等を要したが、解析系を確立した。

G-NaVI 法による解析の至適化の結果、得られたリード長、平均リードクオリティ、正確性において、十分な結果を得ることができた。従って、解析を進め、EBV DNA 組み込みの多様性を明らかにした。

つまり、組み込まれた EBV DNA のサイズの多様性やヒト側の組み込み部位（繰り返し配列など）の多様性を明らかにした。高頻度で、組み込みがみられる標的遺伝子候補も明らかにしたが、組み込みパターンはさまざまであった。

上記の成果を踏まえ、次のステップとなる DNA メチル化解析（パイロシーケンス法）を至適化した。EBV DNA 組み込みの多様性から、DNA メチル化解析に必要な primer の設計等も複雑になったが、パイロシーケンス法がワークしていることを確認できた。

(2) EBV 関連胃癌細胞株の遺伝子異常の次世代統合オミクス解析

遺伝子変異解析として、MassARRAY システムや Ion PGM シークエンサーを用いて多遺伝子の多領域を同時にスクリーニングする系の確立を行った。DNA メチル化解析として、MCA マイクロアレイ等による網羅的解析とともにバイサルファイト-パイロシーケンス解析の条件設定を行い系を確立した。エピゲノム異常の解析として、高速次世代シーケンサーを用いた MCA シークエンシング法の確立も行った。マイクロ RNA 異常の解析として、マイクロアレイを用いた網羅的な解析とともに TaqMan qPCR の系を確立した。

EBV 関連胃癌細胞株の遺伝子異常の次世代統合オミクス解析の結果として、さまざまな遺伝子変異、DNA メチル化異常、エピゲノム異常、マイクロ RNA 異常を明らかにした。それぞれ、網羅的解析ののち、結果の検証を行った。例えば、マイクロ RNA 異常に関しては、マイクロアレイ解析による網羅的な解析で、重要なマイクロ RNA 発現変化と考えられたマイクロ RNA に関して、TaqMan qPCR で検証することができた。

さらに EBV DNA 組み込みと、EBV 関連胃癌の遺伝子異常の相関を明らかにすることができた。

(3) 次世代シーケンサーによる EBV DNA 組み込み解析において、精度の高い解析法を確立した。EBV DNA 組み込みとともに DNA メチル化の多様性を明らかにした。本法を今後、応用することにより、胃癌における EBV DNA 組み込みの役割が明確になるものと期待できる。

EBV 関連胃癌細胞株は、さまざまな遺伝子変異、DNA メチル化異常、エピゲノム異常、マイクロ RNA 異常を示した。今後、ドライバーとなる遺伝子異常の解明および EBV DNA 組み込みに関連したドライバー遺伝子異常の解明に結びつく意義のある研究成果であると考えられる。

得られた研究成果の国内外におけるインパクトは大きいと考えられる。今後、EBV が関わる他の癌種やさらには、EBV 以外のウイルス DNA のヒト発癌における役割の解明につながることから今後の展望も多いに期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 5 件）

- ① 辻 顕介、山本博幸、末永大介、森田 亮、吉田良仁、安田 宏、大坪 人、伊東文生、胃癌由来の胃液エクソソームの機能分子の解析、聖マリアンナ医科大学雑誌、査読有、46、2018、111-118
https://www.jstage.jst.go.jp/article/stmari/46/3/46_111/_article/-char/ja
- ② Matsuo Y, Yamamoto H, Sato Y, Oikawa R, Maehata T, Fujino T, Yahagi N, Yasuda H, Takagi M, Itoh F. GNAS-mutated carcinoma arising from gastric foveolar metaplasia in the duodenum after 9 years of observation. Clin J Gastroenterol, 査読有, 11, 2018, 391-395
DOI: 10.1007/s12328-018-0856-2

- ③ Matsuo Y, Yasuda H, Kato M, Kiyokawa H, Ozawa M, Sato Y, Ikeda Y, Ozawa SI, Yamashita M, Fujino T, Yamamoto H, Takagi M, Itoh F. Endoscopic small capacity forceps increase the pathological diagnosis of gastric indefinite neoplasia. *Turk J Gastroenterol*, 査読有, 29, 2018, 481-487
DOI: 10.5152/tjg.2018.17347
- ④ Fujimoto A, Uraoka T, Nishizawa T, Shimoda M, Goto O, Ochiai Y, Maehata T, Akimoto T, Mitsunaga Y, Sasaki M, Yamamoto H, Yahagi N. Rebamipide solution: a novel submucosal injection material to promote healing speed and healing quality of ulcers induced by endoscopic submucosal dissection. *Gastrointest Endosc*, 査読有, 87, 2018, 1114-1120
DOI: 10.1016/j.gie.2017.09.040
- ⑤ Oikawa R, Watanabe Y, Miyamoto S, Sato Y, Ono S, Mabe K, Yamamoto H, Kato M, Itoh F. Enrichment of *Helicobacter pylori* mutant strains after eradication therapy analyzed by gastric wash-based quantitative pyrosequencing. *Tumor Biol*, 査読有, 39, 2017, 1010428317734865
DOI 10.1177/1010428317734865

[学会発表] (計12件)

- ① 松尾康正、小澤 碧、服部美紀、辻 顕介、末永大介、佐藤義典、池田佳子、山下真幸、山本博幸、安田 宏、高木正之、伊東文生、細径鉗子による胃生検では、腫瘍か非腫瘍かの鑑別困難例が増加する、第29回日本消化器癌発生学会総会、2018
- ② 及川律子、渡邊嘉行、宮本修一、佐藤義典、小野尚子、間部克裕、山本博幸、加藤元嗣、伊東文生、早期胃癌ESD症例におけるピロリ菌除菌前後の変異株含有率の変動、第77回日本癌学会、2018
- ③ 及川律子、渡邊嘉行、宮本修一、小野尚子、間部克裕、山本博幸、加藤元嗣、伊東文生、同一症例胃内における除菌前後のピロリ菌複数種混在比変動の検討、第24回日本ヘリコバクター学会学術集会、2018
- ④ Watanabe Y, Oikawa R, Yamamoto H, Itoh F, Enrichment of *Helicobacter pylori* mutant strains after eradication therapy analyzed by gastric wash-based quantitative pyrosequencing and NGS, *Digestive Disease Week 2018*, 2018
- ⑤ 山本博幸他、胃洗浄廃液を用いたヒトとピロリ菌ゲノム解析に基づく胃全体の情報を網羅した胃癌のトランスレーショナルリサーチ、第104回日本消化器病学会総会、2018
- ⑥ Watanabe Y, Oikawa R, Yamamoto H, Itoh F, Enrichment of *Helicobacter pylori* mutant strains after eradication therapy analyzed by gastric wash-based quantitative pyrosequencing. *AACR Annual Meeting*, 2018
- ⑦ 渡邊嘉行、及川律子、宮本修一、佐藤義典、小野尚子、間部克裕、山本博幸、加藤元嗣、伊東文生、次世代シーケンサーによる胃内*H. pylori*菌遺伝子解析のテーラーメイド治療への応用、第59回日本消化器病学会大会、2017
- ⑧ 山本博幸他、ヒトとピロリ菌ゲノム解析に基づく“胃全体の情報を網羅した”次世代の胃癌バイオマーカーの開発と診断・治療・予防への応用、第76回日本癌学会総会、2017
- ⑨ 渡邊嘉行、及川律子、宮本修一、佐藤義典、小野尚子、間部克裕、山本博幸、加藤元嗣、伊東文生、除菌治療後に胃内*H. pylori* (変異株) の含有比は変動する、第23回日本ヘリコバクター学会学術集会、2017
- ⑩ 山本博幸、ヒトとピロリ菌ゲノム解析による次世代の胃癌リスク診断・除菌治療・癌予防、*BIO tech 2017 第16回バイオ・ライフサイエンス研究展*、2017
- ⑪ 及川律子、渡邊嘉行、山本博幸、伊東文生、ピロリ菌混合感染の定量的解析法の開発と臨床応用、第54回日本臨床分子医学会学術集会、2017
- ⑫ 辻顕介他、山本博幸、及川律子、渡邊嘉行、佐藤義典、松尾康正、森田 亮、吉田良仁、安田 宏、伊東文生、胃洗浄廃液および胃液エクソソームDNAを用いたBARHL2遺伝子メチル化による早期胃癌診断、第54回日本臨床分子医学会学術集会、2017

[図書] (計 1 件)

- ① 山本博幸、渡邊嘉行、伊東文生、Springer Nature、Cell-free DNA、2019、180 (50-63)

[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：

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：

国内外の別：

[その他]

ホームページ

<http://www.marianna-u.ac.jp/gastro/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：安田 宏

ローマ字氏名：(YASUDA, Hiroshi)

所属研究機関名：聖マリアンナ医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：80262129

研究分担者氏名：伊東 文生

ローマ字氏名：(ITOH, Fumio)

所属研究機関名：聖マリアンナ医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：90223180

※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。