

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16101

研究課題名(和文)腫瘍ウイルス感染に伴うエピゲノム異常による発癌機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of epigenetic aberrations induced by oncovirus infection

研究代表者

岡部 篤史 (Okabe, Atsushi)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：80778118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、癌ウイルスであるEpstein-Barrウイルス(EBV)陽性胃癌細胞株特異的なクロマチン構造変化が存在することを見出すと共に、このクロマチン構造異常はEBVゲノムとホストゲノムの直接的な相互作用が原因であることを解明した。更にEBV感染後にEBVゲノム相互作用領域においてH3K9me3の消失とH3K27acの誘導が確認し、このエンハンサー異常活性化によって近傍の癌遺伝子が発現亢進し、異常増殖が誘導されていることを解明した。更にEBV感染前後におけるヒストン修飾解析から、エンハンサー異常誘導因子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、癌ウイルス感染が誘導するクロマチン構造異常とエピゲノム異常を解明し、ゲノム異常を伴うことなくエンハンサーの異常活性化をもたらす新規エピゲノム発癌機構を報告した。この成果は、これまでにない実験手法により、外来DNAであるウイルスゲノムとホストゲノムの直接的な相互作用を検出し、ホストクロマチンに誘導される異常を解明した初めての報告であり、ウイルス研究にも新たな知見をもたらした独創性の高い研究成果である。

EBVは胃癌のみならず、リンパ腫や上咽頭癌など広範な臓器の腫瘍に関与しており、エピゲノムやクロマチン構造異常を標的とした治療応用の基盤データとなる重要な研究である。

研究成果の概要(英文)：We performed a comprehensive analysis of chromatin structure using Hi-C data in 14 GC and 2 normal gastric epithelial cells. We found a specific repertoire of A/B chromatin compartments in EBV(+) GCs, and discovered that regions displaying these features also exhibit direct chromatin interactions with EBV genome. To elucidate epigenetic alterations at the EBV-host interacting regions, we used in vitro EBV infection system and comprehensively analyzed histone modification and chromatin structural changes. We found that at EBV-host interacting regions the specific disruption of H3K9me3(+) heterochromatin and TADs were observed after EBV infection and heterochromatin disruption led to activation of entire domain as enhancer regions. Besides, activated enhancers even within heterochromatin regions upregulate neighboring proto-oncogenes through aberrant de novo loop formations.

研究分野：癌エピゲノム

キーワード：Chromatin structure EBV Epigenome Histone modification Gastric cancer

1. 研究開始当初の背景

発癌や癌の進展には、ゲノム異常だけでなく、感染・炎症などの環境因子や低栄養・低酸素などの微小環境、さらには代謝異常などが誘因となるエピゲノム異常が寄与していることが報告されている (Flavahan ら, Science 2017)。エピゲノム異常による発癌とその進行を解明するため、様々な癌臨床検体を用いたエピゲノム解析が行われており、胃癌では、ゲノムワイドな DNA 異常高メチル化による癌抑制遺伝子の発現抑制や (TCGA, Cancer Cell 2010; 松坂ら, Cancer Res 2011)、エンハンサーの異常活性化による癌の増悪因子の活性化が報告されている (Ooi ら, Nat Comm 2016)。また、転写制御領域間に形成されるループ構造や、数百 kb 程度のドメイン構造といったクロマチン構造が転写制御に重要な役割を果たしており、その構造状態はエピゲノム状態が大きく影響することが報告されている (Shlyueva ら, Nat Rev Genet 2014)。エピゲノム異常やゲノム異常が原因となるクロマチン構造変化は疾患の原因となる転写制御破綻を引き起こすことが知られ、癌においてもクロマチン構造の重要な構成因子である CTCF の結合領域における DNA 異常メチル化やゲノム変異によってクロマチン構造が変化し、癌遺伝子を活性化することが報告されている (Flavahan ら Nature 2016; Hnisz ら, Science 2016)。外的要因によるエピゲノム状態やクロマチン構造の異常が誘発する転写制御破綻について明らかにすることは発癌メカニズムを理解する上で重要であるが、疾患と同様のエピゲノム異常を誘導できる実験系は少なく、十分に解明が進んでいない。

申請者の所属研究室では、世界で初めて胃癌 DNA メチル化の網羅的解析に成功し、DNA 超高メチル化胃癌は EB ウイルス陽性胃癌と一致することを明らかにし、さらに胃上皮細胞に in vitro で EB ウイルスを感染させることで、臨床検体と同様の DNA 超高メチル化形質を誘導できることを証明した。申請者は更に DNA 異常高メチル化だけでなく、エンハンサー領域の異常な活性化や抑制が起きていることを明らかにし、このエンハンサーの変化が癌遺伝子の発現亢進や癌抑制因子の発現抑制に重要な役割を果たしていることを報告した (岡部ら, Sci Rep 2017)。また、抑制的なヒストン修飾である H3K27me3 や H3K9me3 にも広範な変化が生じていることを明らかにしている。このように、EB ウイルス陽性胃癌はエピゲノム異常が密接に関わる癌サブタイプと考えられるが、発癌ドライバーとしてのエピゲノム異常や薬剤標的となり得るエピゲノム異常誘導因子、発癌誘導機構など詳細は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、in vitro EB ウイルス感染システムを用いることで、癌ウイルス感染が誘導するエピゲノム異常による癌化機構を明らかにすることを目的とする。そのために、(A)エピゲノム異常誘導因子を同定するとともに、(B)エピゲノム異常がクロマチン構造に与える影響を解析することにより転写制御破綻機構を明らかにする。同定されたエピゲノム異常誘導因子は機能解析を行うと共に、発現阻害により治療標的として有効か検証を行う。加えて、発癌ドライバーと考えられるエピゲノム異常とその誘導因子について、(C)臨床検体での検証を行い、臨床応用に向けた基盤データを得る。

3. 研究の方法

(1) ウイルス感染によるエピゲノムドライバー異常の同定と異常誘導因子の探索

EB ウイルス感染が誘導する発癌ドライバーとなるエピゲノム異常を明らかにするため、胃上皮細胞に EB ウイルスを感染させた前後でのヒストン修飾を ChIP-seq 法により同定する。更に正常胃上皮細胞株、EB ウイルス陽性胃癌細胞株においてもヒストン修飾状態を同定し、感染系での結果と合わせて発癌ドライバーとなりうる転写制御領域の異常を同定する。特に癌関連遺伝子の発現変化に寄与することを報

告している活性化/抑制エンハンサー領域について、モチーフ解析と発現解析からエンハンサー異常に関わる転写因子を予測する。

(2) エピゲノム異常誘導因子の機能解析

エピゲノム異常誘導因子が原因として癌化や癌の進展に寄与しているか検討するため、エピゲノム異常誘導因子の機能解析を行う。

(3) エピゲノム異常がもたらすクロマチン構造変化の解析

EB ウイルス感染によるエピゲノム変化がどのように転写制御破綻をもたらし、癌化や癌の悪性化をもたらすのか明らかにするため、クロマチン構造変化を解析する。まず、ドメイン構造変化を Hi-C 法により同定する。加えてより高解像度のクロマチン構造解析手法を用いてループ構造を検出する。特に遺伝子プロモーター領域からのループ構造を網羅的に検出し、各遺伝子の制御エンハンサー領域を同定する。これらの解析により、エピゲノム変化とクロマチン構造変化、転写制御破綻のメカニズムを明らかにする。

(4) 領域特異的ゲノム編集による検証

エピゲノム異常がクロマチン構造に影響を及ぼし、疾患につながる転写制御破綻を引き起こすことを検証するため、領域選択的なゲノム編集を行い、標的遺伝子の発現状態の変化を検証する。

(5) 胃癌臨床サンプルでのクロマチン構造・発現解析

癌化や癌の進展への寄与が確認されたエピゲノム異常とその誘導因子が実際の EB ウイルス陽性胃癌でも確認され、治療標的として有効であるかを検証するため、EB ウイルス陽性胃癌の臨床検体を用いてクロマチン構造を検証する。

4. 研究成果

(1) ウイルス感染によるエピゲノムドライバー異常の同定と異常誘導因子の探索

EBV 感染前後の活性化ヒストン修飾の解析から、ウイルス感染により活性化するエンハンサー領域を同定した。この活性化領域におけるモチーフ解析による結合因子予測と、ウイルス感染によって発現上昇する遺伝子から、転写因子 ATF3, EHF などをエンハンサー活性化にかかわる転写因子として同定した。更に EB ウイルス陽性胃癌細胞株 (SNU719, NCC24, YCC10)、正常胃上皮細胞株での ChIP-seq データから、EB ウイルス陽性胃癌特異的に活性化するエンハンサー領域を同定し、モチーフ解析と発現解析から EHF が EBV 陽性胃癌においてエンハンサー活性化に寄与する候補因子として同定した(図 1)。

(2) エピゲノム異常誘導因子の機能解析

エンハンサーにおけるモチーフ解析と発現解析から候補因子として同定された転写因子の発癌への寄与を明らかにするため、siRNA, shRNA によるノックダウン解析を行い、表現型への影響を調べた。EB ウイルス感染によって活性化される ATF3 のノックダウンを行うと EB ウイルス感染細胞において増殖抑制され、アポトーシスが誘導されていることを明らかにした。また、もう一つの候補因子である EHF についてもノックダウン解析を行い、EHF ノックダウンが増殖抑制とアポトーシス誘導を引き起こすことから癌化への寄与を明らかにした。更に EHF の下流遺伝子として Wnt パスウェイの重要な遺伝子である FZD5 を同定し、EBV 感染が EHF 活性化を通して FZD5 を含む Wnt パスウェイを活性化し、発癌に寄与して

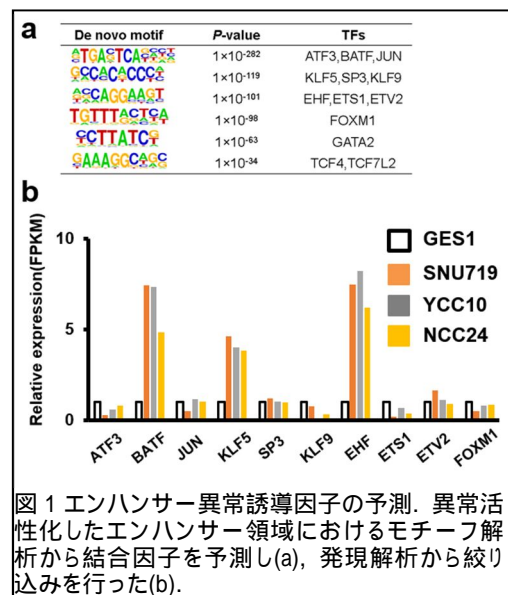


図 1 エンハンサー異常誘導因子の予測. 異常活性化したエンハンサー領域におけるモチーフ解析から結合因子を予測し(a), 発現解析から絞り込みを行った(b).

いることを明らかにした。

(3) エピゲノム異常がもたらすクロマチン構造変化の解析

EB ウイルス陽性胃癌におけるクロマチン構造異常を同定するため、EB ウイルス感染前後における Hi-C 解析によりクロマチン構造変化を同定した。ユークロマチン、ヘテロクロマチンとの相関が報告されているコンパートメント解析を行い、ユークロマチンからヘテロクロマチンに変遷するコンパートメント変化と、ヘテロクロマチンからユークロマチンへの変化と同定した(図 2)。

ユークロマチンからヘテロクロマチンに変遷するコンパートメント変化はこれ

までに報告してきた遺伝子転写開始点への DNA メチル化誘導と関連していた。一方、ヘテロクロマチンからユークロマチンへの変化とヒストン修飾状態の変化の統合解析により、ヘテロクロマチンマークである H3K9me3 が消失し、活性化エンハンサーマークである H3K4me1, H3K27ac が誘導されることが明らかとなった。この EB ウイルス感染によって誘導される活性化されるエンハンサー領域でのループ構造変化を解析したところ、近傍の proto-oncogene との相互作用が上昇しており、相互作用する近傍遺伝子はウイルス感染後に発現上昇していることを明らかにした(図 3a, b)。

更にこのヘテロクロマチン構造の破綻を誘導するメカニズムを明らかにするため、より詳細にこのヘテロクロマチン領域の解析を行ったところ、EB ウイルスゲノムとの強い相互作用が起きていることが同定された。これまでの研究から EB ウイルスは宿主細胞の核内に侵入した後、エピソームといわれる環状構造を取り、ホストクロマチンに接着し、宿主核内に維持されることが知られていたが、ホストクロマチンへの影響は知られて

いなかった。本研究により、エピソーム構造は宿主ヘテロクロマチン領域を標的として相互作用するだけでなく、ホストのヘテロクロマチン構造を破壊し、エンハンサーとして活性化支えることで宿主ゲノムの転写制御に影響を与えていることが明らかとなった。

(4) 領域特異的ゲノム編集による検証

EB ウイルス感染によってヘテロクロマチン構造が破壊され、活性化されたエンハンサー領域が癌の異常増殖に寄与していることを検証するため、領域選択的ゲノム編集を行い、標的遺伝子の発現への影響と細胞増殖へ与える影響を解析した。EB ウイルス陽性胃癌細胞 SNU719, NCC24 を用いて EB ウイルスゲノムが相互作用する活性化エンハンサー領域を標的としてゲノム編集を行ったところ、標的遺

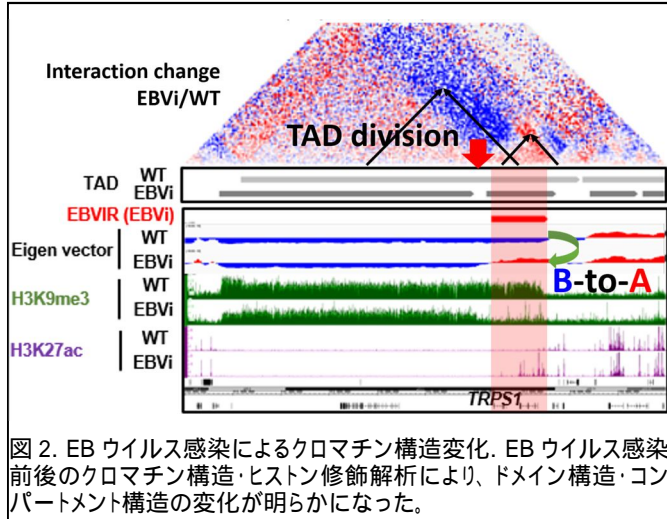


図 2. EB ウイルス感染によるクロマチン構造変化. EB ウイルス感染前後のクロマチン構造・ヒストン修飾解析により、ドメイン構造・コンパートメント構造の変化が明らかになった。

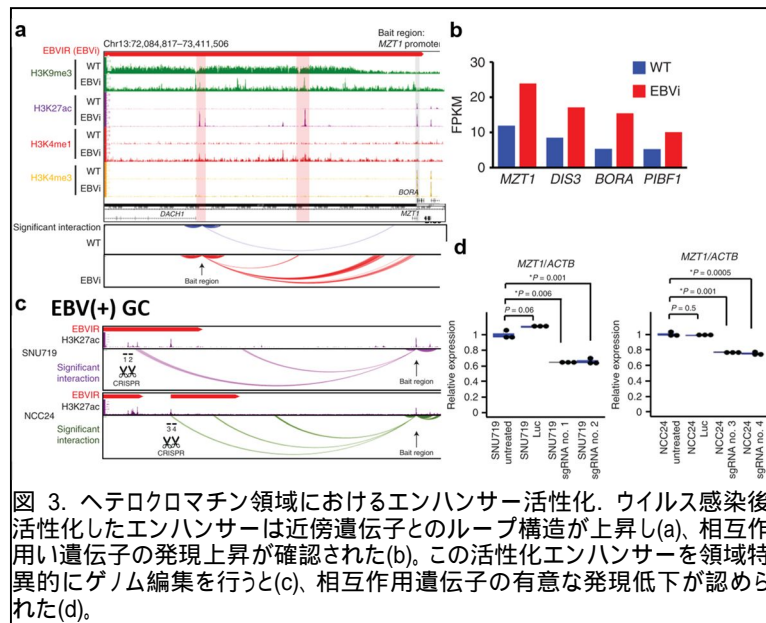


図 3. ヘテロクロマチン領域におけるエンハンサー活性化. ウイルス感染後活性化したエンハンサーは近傍遺伝子とのループ構造が上昇し(a)、相互作用遺伝子の発現上昇が確認された(b). この活性化エンハンサーを領域特異的にゲノム編集を行うと(c)、相互作用遺伝子の有意な発現低下が認められた(d).

伝子である MZT1 の発現低下が誘導されることを確認した(図 3c, d)。更にこの MZT1 の発現低下によって細胞増殖が抑制されることを確認し、EB ウイルスゲノムが相互作用することで活性化するエンハンサー領域は、近傍の癌遺伝子の活性化を通して癌の異常増殖に寄与していることを明らかにした。

(5) 胃癌臨床サンプルでのクロマチン構造・発現解析

今回我々の EB ウイルス感染系、および細胞株を用いて明らかにした EB ウイルス陽性胃癌におけるクロマチン構造異常が、実際の臨床サンプルにおいても起きているか検証するため、EB ウイルス陽性胃癌の臨床サンプルを用いて Hi-C 解析を行った。その結果、やはり EB ウイルスは細胞株と同様にホストのヘテロクロマチン領域と相互作用していることが確認された。また、EB ウイルスゲノム相互作用領域における活性化エンハンサーの標的遺伝子として同定した MZT1, TGFBR2 の発現レベルを、免疫組織染色による解析し、EB ウイルス陽性胃癌特異的に活性化していることを確認した。以上の検証により、今回解明した EB ウイルスゲノムとホストクロマチンの相互作用によるエンハンサー異常活性化は、EB ウイルス陽性胃癌の発癌に寄与していることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Okabe Atsushi, Kaneda Atsushi	4. 巻 -
2. 論文標題 Transcriptional dysregulation by aberrant enhancer activation and rewiring in cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	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） 10.1111/cas.14884	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 Okabe Atsushi, Huang Kie Kyon, Matsusaka Keisuke, Fukuyo Masaki, Xing Manjie, Ong Xuewen, Hoshii Takayuki, Usui Genki, Seki Motoaki, Mano Yasunobu, Rahmutulla Bahityar, Kanda Teru, Suzuki Takayoshi, Rha Sun Young, Ushiku Tetsuo, Fukayama Masashi, Tan Patrick, Kaneda Atsushi	4. 巻 52
2. 論文標題 Cross-species chromatin interactions drive transcriptional rewiring in Epstein-Barr virus-positive gastric adenocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Genetics	6. 最初と最後の頁 919 ~ 930
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41588-020-0665-7	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 Asakawa Yuta, Okabe Atsushi, Fukuyo Masaki, Li Wenzhe, Ikeda Eriko, Mano Yasunobu, Funata Sayaka, Namba Hiroe, Fujii Takahiro, Kita Kazuko, Matsusaka Keisuke, Kaneda Atsushi	4. 巻 111
2. 論文標題 Epstein-Barr virus positive gastric cancer involves enhancer activation through activating transcription factor 3	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1818 ~ 1828
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14370	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8件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 岡部篤史、Kie Kyon Huang、松坂恵介、福世真樹、星居孝之、白井源紀、関元昭、眞野恭伸、Bahityar Rahmutulla、神田輝、鈴木孝禎、牛久哲男、深山正久、Patrick Tan、金田篤志
2. 発表標題 ウイルスがもたらすヘテロクロマチン破綻と新たなエピジェネティック発癌機構「エンハンサー侵襲」の発見
3. 学会等名 第14回日本エピジェネティクス研究会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Atsushi Okabe, Kie Kyon Huang, Keisuke Matsusaka, Masaki Fukuyo, Takayuki Hoshii, Bahityar Rahmutulla, Manjie Xing, Xuewen Ong, Patrick Tan, Atsushi Kaneda
2. 発表標題 CHROMATIN REWIRING BY ONCOVIRUS INFECTION THROUGH THE NOVEL MECHANISM " ENHANCER INFESTATION " IN GASTRIC ADENOCARCINOMA
3. 学会等名 15th Asian Epigenomics Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Atsushi Okabe, Kie Kyon Huang, Keisuke Matsusaka, Masaki Fukuyo, Bahityar Rahmutulla, Takayuki Hoshii, Patrick Tan, Atsushi Kaneda
2. 発表標題 Heterochromatin reprogramming and chromatin structural rewiring induced by oncovirus infection in gastric adenocarcinoma
3. 学会等名 第31回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Atsushi Okabe, Kie Kyon Huang, Keisuke Matsusaka, Masaki Fukuyo, Bahityar Rahmutulla, Patrick Tan, Atsushi Kaneda
2. 発表標題 Chromatin Structural Aberrations due to oncovirus infection activate neighboring oncogenes through enhancer activation
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Atsushi Okabe, Kie Kyon Huang, Keisuke Matsusaka, Masaki Fukuyo, Bahityar Rahmutulla, Patrick Tan, Atsushi Kaneda
2. 発表標題 Heterochromatin disruption and chromatin structural rewiring in gastric adenocarcinoma infected by Epstein-Barr virus
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Meeting Epigenetics and Chromatin (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Atsushi Okabe, Keisuke Matsusaka, Masaki Fukuyo, Hiroe Namba, Sayaka Funata, Atsushi Kaneda
2. 発表標題 Heterochromatin reprogramming induced by Epstein-Barr virus infection induces oncogenic activation through aberrant enhancer activation
3. 学会等名 第13回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Atsushi Okabe, Keisuke Matsusaka, Masaki Fukuyo, Bahityar Rahmutulla, Patrick Tan, Atsushi Kaneda
2. 発表標題 EBV infection induces domain structural changes which lead to oncogenic activation
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Atsushi Okabe, Kie Kyon Huang, Keisuke Matsusaka, Masaki Fukuyo, Bahityar Rahmutulla, Patrick Tan, Atsushi Kaneda
2. 発表標題 癌ウイルス感染がもたらすヘテロクロマチンリプログラミングによる癌遺伝子の活性化
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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
研究協力者	松坂 恵介 (Matsusaka Keisuke)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	福世 真樹 (Fukuyo Masaki)		
研究協力者	牛久 哲男 (Ushiku Tetsuo)		
研究協力者	松原 久裕 (Matsubara Hisahiro)		

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		
シンガポール	Duke-NUS Medical School,	Genome Institute of Singapore,	Cancer Science Institute of Singapore,