

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月30日現在

機関番号：12601
 研究種目：基盤研究（A）
 研究期間：2008～2012
 課題番号：20249022
 研究課題名（和文） EBウイルス関連胃癌. DNAメチル化亢進の分子機序解明と胃癌治療への展開
 研究課題名（英文） EB virus-associated gastric carcinoma. Molecular mechanisms of DNA hypermethylation and strategy for gastric cancer therapy.
 研究代表者
 深山 正久（FUKAYAMA MASASHI）
 東京大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：70281293

研究成果の概要（和文）：

Epstein-Barr ウイルス（EBV）関連胃癌において、プロモーター領域 CpG 部位のメチル化がゲノムワイドに起こっていることを明らかにした。胃癌細胞株 MKN7 に EB ウイルスを感染させ、ゲノムワイド DNA メチル化異常を再現することに成功し、分子機構解明に重要な実験系を確立した。また、潜在期ウイルス遺伝子蛋白 LMP2A が DNA メチル化異常に関与していることを明らかにするとともに、DNA メチル化、プロテオソーム等に対する阻害剤を用いたウイルス再活性化療法の可能性について検討した。

研究成果の概要（英文）：

Methylation array analyses demonstrated that EBV-associated GC showed genome-wide hypermethylation at CpG sites of promoter regions. We succeeded in reproducing this genome-wide methylation by EBV infection of the gastric cancer cell line, MKN7, which serves as an important experimental system to investigate the molecular mechanisms. We demonstrated that a viral latent protein, LMP2A, partially contributed to the DNA hypermethylation. A possible virus-reactivating therapy was evaluated with inhibitors of DNA methylation and proteasome.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	13,900,000	4,170,000	18,070,000
2009年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2010年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2011年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2012年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
総計	38,700,000	11,610,000	50,310,000

研究分野：人体病理学

科研費の分科・細目：医歯薬学A・人体病理学

キーワード：EBウイルス関連胃癌，EBウイルス，胃癌，エピジェネティクス，LMP2A，SP細胞，トランスジェニックマウス，マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

日本における胃癌死亡率は減少傾向にあるとはいえ、依然として癌死亡の上位を占めており、手術不能進行胃癌に対する有効な治療法の開発が求められている。我々は、代表的なヒトがんウイルスである Epstein-Barr

(EB) ウイルスが、胃癌の10%に密接に関係していることを示し、この特徴的な EB ウイルス関連胃癌が、リンパ腫におけるバーキットリンパ腫のように、胃癌発生機構の解明、治療法開発のモデルケースになると考えて、

多角的な検討を加えてきた。とくに EB ウイルス関連胃癌細胞では、癌関連遺伝子プロモーター領域に広範かつ高度のメチル化が生じ、多数の遺伝子の発現が抑制されていることを見出し、胃癌の 1/3 を占める「高メチル化形質胃癌」の中でも特徴的な一群であることを明らかにした。さらに基盤研究(平成 18, 19 年度)により、ウイルス潜在期タンパク質 LMP2A が、感染細胞 DNA メチル化亢進の中心的役割を担っている可能性を見出した。

2. 研究の目的

本研究では、EB ウイルス関連胃癌における DNA メチル化亢進の分子機構の解明を第一の目的とした。この特徴的な胃癌の分子機構を解明することにより、「高メチル化形質胃癌」の病態解明、治療法の開発へと展開していけるものと考えられる。

本研究は以下のサブテーマからなっている。(1) EB ウイルス関連胃癌における DNA メチル化を網羅的に解析することにより、メチル化亢進の実態をゲノムワイドに明らかにする。また、特徴的な DNA メチル化亢進を実験的に再現できる系を確立する。(2) ウイルス潜在期タンパク質 LMP2A の役割について検討し、メチル化亢進の機序を明らかにする。さらに、(3) 2011 年、Wang らは exome sequencing を用いた胃癌の解析から EB ウイルス関連胃癌で ARID1A 遺伝子異常が高率に起きていることを報告した (Nat Genet 43, 1219, 2011)。ARID1A は SWI/SNF 複合体としてクロマチンリモデリングに関わる核内タンパク質で、Polycomb 複合体との間でバランスを取ることで、エピジェネティックな機構を介して多数の遺伝子の制御に関連している。このため、EB ウイルス関連胃癌について ARID1A 遺伝子異常との関係を検討することとした。以上の分子機構に焦点をあてた研究とともに、(4) EB ウイルス関連胃癌細胞の特性(胃上皮特異的クロロゲン分子 CLDN18, 胃上皮特異的転写因子 Sox2 の発現)について、また、(5) 最近注目されているマイクロ RNA 異常について検討を加えた。最後に、(6) 治療への展開を探るため、種々の薬剤によるウイルス再活性化について検討した。

3. 研究の方法

(1) DNA メチル化亢進の網羅的解析: 胃癌手術検体より得られた胃癌組織 51 検体を Infinium Human Methylation27 BeadChip (イルミナ社)を用いて解析する。この Chip では 27,578 か所の (14,495 遺伝子) の CpG 部位のメチル化を定量的に解析することができる。さらに AKATA システムを用いて胃癌細胞株 MKN7 の EB ウイルス感染株を樹

立し、感染前後で網羅的メチル化解析を行う。(2) ウイルス潜在期タンパク質 LMP2A の役割について:

① 胃癌細胞、胃癌組織における検討: EB ウイルス感染胃癌細胞株、LMP2A 遺伝子導入胃癌細胞株を用いて、DNA メチル化につながる細胞内シグナル伝達異常、引き続く DNA メチル化酵素の誘導について検討する。さらに胃癌組織において、鍵となる分子の発現について検討する。

② 非腫瘍不死化線維芽細胞における検討: LMP2A の機能について新たに検討を加えるため、レトロウイルスベクターを用いて LMP2A を NIH3T3 細胞に遺伝子導入することで LMP2A 発現細胞を作成し、ヌードマウス皮下腫瘍形成能、軟寒天培地コロニー形成能、side population (SP) 細胞分画について検討する。

③ LMP2A 胃発現トランスジェニックマウス: 胃壁細胞特異的 H⁺K⁺-ATPase プロモーターの下流に LMP2A 遺伝子を結合させた組み換えベクターを構築し、これを基に LMP2A 胃発現トランスジェニックマウスを作製する。これにより胃粘膜における LMP2A の長期的な効果を検討する。

(3) ARID1A 遺伝子異常との関係: ARID1 遺伝子異常は発現喪失とよく対応することから、胃癌組織アレイを用いて免疫組織化学的に発現喪失について検討する。

(4) EB ウイルス関連胃癌の細胞学的特徴: CLDN18, Sox2 ならびに関連分子の発現について、胃癌組織アレイを用いて免疫組織化学的に検討する。

(5) マイクロ RNA 異常: 胃癌組織におけるマイクロ RNA を RTPCR で定量するとともに、胃癌細胞株への EB ウイルス感染による細胞、ウイルスマイクロ RNA の変化について検討する。

(6) 薬剤によるウイルス再活性化: EB ウイルス感染胃癌細胞株において、DNA メチル化、ヒストン脱アセチル化、プロテオソーム等に対する阻害剤を用い、ウイルス溶解感染期遺伝子 BZLF1, チミジンキナーゼの発現を検討した。

4. 研究成果

(1) DNA メチル化亢進の網羅的解析: 図 1 に示すように、メチル化の程度を、遺伝子(縦方向)・症例(横方向)に関する二方向クラスタリングで解析した。メチル化を示す遺伝子群によって 51 例の胃癌は、低メチル化胃癌 (n=17)、高メチル化胃癌 (n=23)、EB ウイルス関連胃癌 (n=11) の 3 群に分類さ

れた。EB ウイルス関連胃癌では、高メチル化胃癌と共通してメチル化がみられる遺伝子群（胃癌共通メチル化遺伝子群）に加え、EB ウイルス関連胃癌に特異的な遺伝子群にもメチル化が生じていた。

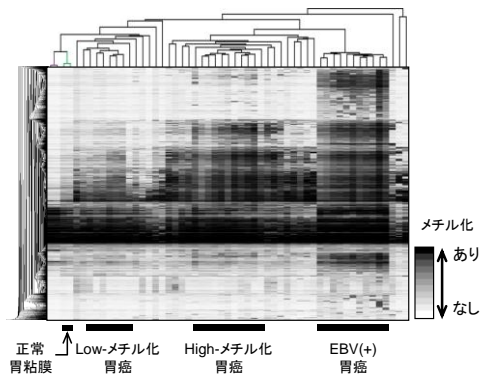


図 1. 胃癌メチル化に関する網羅的解析結果

さらに、胃癌細胞株 MKN7 に EB ウイルスを感染させることにより、グローバルなメチル化亢進状態を再現することができた（発表論文⑤）。興味深い点は、感染細胞のみならずウイルス DNA の CpG 部位にも高度のメチル化が生じていたことであり（発表論文④）、これはウイルスの防御機構としての DNA メチル化が過剰に働き、感染細胞自身のゲノムをメチル化している可能性を示している。

(2) ウイルス潜在期タンパク質 LMP2A の役割: ① 胃癌細胞、胃癌組織における検討: 胃癌細胞株 MKN1, MKN7 において、EB ウイルスを感染させると *PTEN* 遺伝子メチル化とそれによる発現喪失がおこることを見出した。

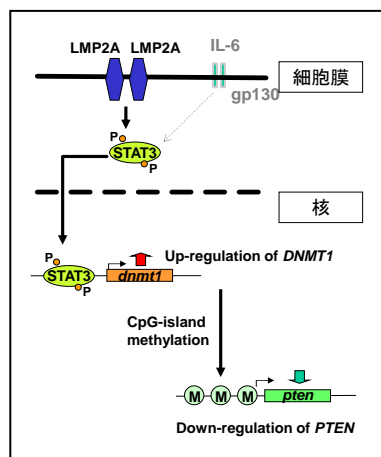


図 2 EB ウイルス潜在期蛋白 LMP2A の働き

そこで潜在期ウイルス遺伝子産物を胃癌細胞株に発現させたところ、LMP2A 遺伝子を

導入した場合にのみメチル化が生じた。さらに LMP2A のメチル化促進作用は、STAT3 活性化と、引き続き DNMT1 の構成的活性化を介していた。また、抗 IL6 抗体によって STAT3 活性化に変化がなかったことから、LMP2A による STAT3 活性化は IL6/gp130 非依存性であると考えられた（図 2）。

EB ウイルス関連胃癌組織を免疫組織化学的に検討すると pSTAT3, DNMT1 が共に高発現しており、in vivo においても LMP2A による STAT3, DNMT1 の活性化がエピジェネティック異常に寄与していると考えられた（発表論文⑭）。

② LMP2A 遺伝子導入線維芽細胞の腫瘍形成能: LMP2A の新たな機能についても検討を加えるため、レトロウイルスベクターを用いて LMP2A を NIH3T3 細胞に遺伝子導入した。ヌードマウス皮下移植実験で、LMP2A-NIH3T3 細胞の移植で 11 匹中 8 匹に腫瘍が形成されたが、ベクターのみを導入した対照群では 11 匹中 1 匹のみであった。LMP2A-NIH3T3 細胞の増殖活性、アポトーシスの頻度は対照群と差がなかったが、軟寒天培地でのコロニー形成能が増加していた。さらに、LMP2A-NIH3T3 細胞では SP 細胞分画が増加し（図 3）、SP 細胞のみが軟寒天培地でのコロニー形成能を持っていた。また LMP2A の SP 細胞増加作用には Erk, Stat3, Akt 系ならびに HMGA2 分子の発現が関与していた（発表論文①）。以上、LMP2A に幹細胞分画増加作用があることが推定された。

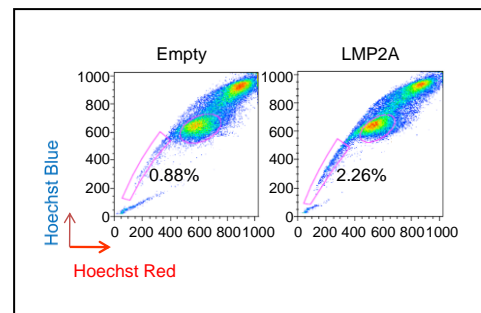


図 3 LMP2A 過剰発現による SP 細胞分画の増加

③ EB ウイルス潜在期タンパク質トランスジェニックマウス: LMP2A 胃発現トランスジェニックマウスを長期飼育すると、頻度は低い浸潤胃癌が発生し、胃癌組織の LMP2A 発現、DNMT1 発現亢進が確認できた（未発表）。また、LMP2A 胃発現トランスジェニックマウスと、高頻度に胃癌を発生するトランスジェニックマウスである Gan マウス (Oshima H, et al, Gastroenterol,

131, 1086, 2006)との交配を行ったところ、このマウスの発癌を促進することを見出した。LMP2A が Cox2/mPGES1 発現と協同的に発癌に寄与していると考えられる。

(3) EB ウイルス関連胃癌における ARID1 遺伝子異常: ARID1A 発現の喪失は、通常胃癌では 5% (32 例/657 例) に認められただけであったが、EB ウイルス関連胃癌では 34% (23 例/67 例) と高率であった (図 4)。

しかも EB ウイルス関連胃癌では、早期胃癌、異型上皮の段階で発現喪失が生じていた。また、EB ウイルス感染によって胃癌細胞株の ARID1A 発現に変化は見られなかった (発表論文②)。このため、EB ウイルス感染が成立する胃上皮において ARID1A 異常が先行して生じていると考えられた。

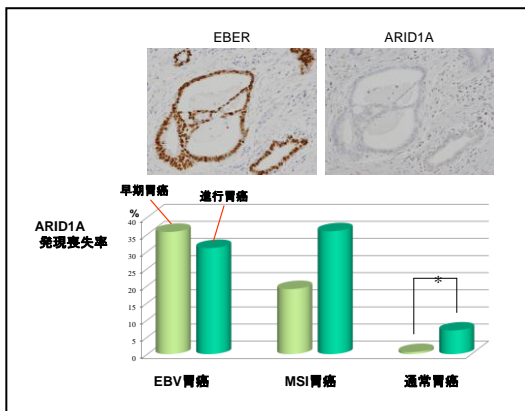


図 4 EB ウイルス関連胃癌における ARID1A 発現喪失

(4) EB ウイルス関連胃癌の細胞学的特徴:

① EB ウイルス関連胃癌では、胃癌細胞が CLDN18(+)/CLDN3(-) の均一な発現パターンを示し、胎児、ならびに成人胃細胞に固有の形質を保持していた (発表論文⑬)。

② 消化管上皮細胞に特徴的な転写因子の発現を胃癌において検討した。EB ウイルス関連胃癌は、SOX2(+), CDX2(-)/HNF4aP1(-) の G 型 (77%), あるいは SOX2(-), CDX2(-)/HNF4aP1(-) の N 型 (23%) のいずれかに分類され、転写因子発現においても特異な一群であることが示された (発表論文⑦)。

以上から胃固有細胞へ分化する幹細胞への感染が推定された。

(5) EB ウイルス関連胃癌におけるマイクロ RNA 異常:

① EB ウイルス関連胃癌では、microRNA 200 family に含まれる miR-200a と miR-200b の発現が一般の胃癌に比べて有意に低下していた。同時に E-cadherin 転写抑制因子である ZEB1/ZEB2 の発現が亢進し、結果的に E-cadherin の発現が抑制されてい

た (発表論文⑨)。EB ウイルス関連胃癌における発癌の初期において、細胞内マイクロ RNA 制御の攪乱により上皮間葉転換を引き起こしている可能性が示された。

② ウイルス由来マイクロ RNA: EB ウイルス関連胃癌組織を用い、EB ウイルスに由来するマイクロ RNA が産生されていることを確認した。また EB ウイルス感染胃癌細胞株では、これらのマイクロ RNA が細胞外にも存在しており、感染細胞の外部にエクソソームとして放出されている可能性を見出した。

(6) 薬剤によるウイルス再活性化: EB ウイルス感染胃癌細胞株 MKN1 を対象に、ウイルス再活性化をウイルス遺伝子 BZLF1 の発現を指標として検討した (図 5)。5-Azacytidine, TSA で増加が見られたが、形態学的変化までは至らなかった。

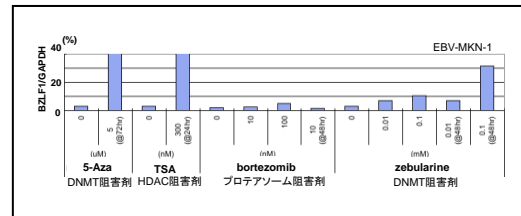


図 5 EB ウイルス感染胃癌細胞株におけるウイルス再活性化の誘導

一方、プロテオソーム阻害剤 Bortezomib については、ウイルス・チミジンキナーゼ活性化を誘導し、放射性物質標識基質を投与することにより、診断・治療に応用できる可能性がある (発表論文⑮)。

(7) まとめ

EB ウイルス感染によりゲノムワイドなメチル化を引き起こす実験系を確立し、分子機構解明のための橋頭堡を築いた。

LMP2A の幹細胞増加作用、EB ウイルスマイクロ RNA の機能解析など、新たな課題が見出された。とくに、EB ウイルスマイクロ RNA がエクソソームを介して癌微小環境中の免疫細胞の機能を制御している可能性について、今後、検討を進める必要がある (図 6)。

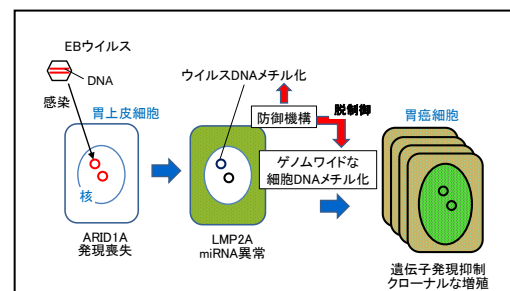


図 6 EB ウイルス関連胃癌の発生機構

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 27 件)

- ① Nakaya T, Kikuchi Y, Kunita A, Ishikawa S, Matsusaka K, Hino R, Aburatani H, Fukayama M. Enrichment of stem-like cell population comprises transformation ability of Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A for non-transformed cells. *Virus Research*, 査読有, Vol.174, 2013, 108-115
doi:10.1016/j.virusres.2013.03.009.
- ② Abe H, Maeda D, Hino R, Otake Y, Isogai M, Ushiku AS, Matsusaka K, Kunita A, Ushiku T, Uozaki H, Tateishi Y, Hishima T, Iwasaki Y, Ishikawa S, Fukayama M. ARID1A expression loss in gastric cancer: pathway-dependent roles with and without Epstein-Barr virus infection and microsatellite instability. *Virchows Archiv*, 査読有, Vol. 461, 2012, 367-77.
doi: 10.1007/s00428-012-1303-2.
- ③ Sun M, Uozaki H, Hino R, Kunita A, Shinozaki A, Ushiku T, Hibiya T, Takeshita K, Isogai M, Takada K, Fukayama M. SOX9 expression and its methylation status in gastric cancer. *Virchows Archiv*. 査読有, Vol. 460, 2012, 271-279
doi: 10.1007/s00428-012-1201-7.
- ④ Kaneda A, Matsusaka K, Aburatani H, Fukayama M. Epstein-Barr virus infection as an epigenetic driver of tumorigenesis. *Cancer Research*, 査読有, Vol.72, 2012, 3445-3450.
doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3919.
- ⑤ Matsusaka K, Kaneda A, Nagae G, Ushiku T, Kikuchi Y, Hino R, Uozaki H, Seto Y, Takada K, Aburatani H, Fukayama M. Classification of Epstein-Barr virus positive gastric cancers by definition of DNA methylation Epigenotypes. *Cancer Research*, 査読有, Vol.71, 2011, 7187-97
doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1349.
- ⑥ Fukayama M, Ushiku T. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Pathology, Research and Practice*. 査読有, Vol.207, 2011, 529-53
doi: 10.1016/j.prp.2011.07.004.
- ⑦ Uozaki H, Barua RR, Minhua S, Ushiku T, Hino R, Shinozaki A, Sakatani T, Fukayama M. Transcriptional factor typing with SOX2, HNF4aP1, and CDX2 closely relates to tumor invasion and Epstein-Barr virus status in gastric cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 査読有, Vol.4, 2011, 230-240
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3071656/>
- ⑧ Morikawa T, Hino R, Uozaki H, Maeda D, Ushiku T, Shinozaki A, Sakatani T, Fukayama M. Expression of ribonucleotide reductase M2 subunit in gastric cancer and effects of RRM2 inhibition in vitro. *Human Pathology*, 査読有, Vol.41, 2010, 1742-1748
doi: 10.1016/j.humpath.2010.06.001.
- ⑨ Shinozaki A, Sakatani T, Ushiku T, Hino R, Isogai M, Ishikawa S, Uozaki H, Takada K, Fukayama M. Downregulation of microRNA-200 in EBV-associated gastric carcinoma. *Cancer Research*, 査読有, Vol.70, 2010, 4719-4727
doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4620.
- ⑩ Ushiku T, Shinozaki A, Uozaki H, Iwasaki Y, Tateishi Y, Funata N, Seto Y, Fukayama M. Gastric carcinoma with osteoclast-like giant cells. Lymphoepithelioma-like carcinoma with Epstein-Barr virus infection is the predominant type. *Pathology International*, 査読有, Vol.60, 2010, 551-558.
doi: 10.1111/j.1440-1827.2010.02557.x.
- ⑪ Fukayama M. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. *Pathology International*, 査読有, Vol.60, 2010, 337-350.
doi: 10.1111/j.1440-1827.2010.02533.x.
- ⑫ Shinozaki A, Ushiku T, Fukayama M. Prominent Mott cell proliferation in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Human Pathology*, 査読有, Vol.41, 2010, 134-138
doi: 10.1016/j.humpath.2009.07.004.
- ⑬ Shinozaki A, Ushiku T, Morikawa T, Hino R, Sakatani T, Uozaki H, Fukayama M. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma: a distinct carcinoma of gastric phenotype by claudin expression profiling. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 査読有, Vol.57, 2009,

775-785

doi: 10.1369/jhc.2009.953810.

- ⑭ Hino R, Uozaki H, Murakami N, Ushiku T, Shinozaki A, Ishikawa S, Morikawa T, Nakaya T, Sakatani T, Takada K, Fukayama M. Activation of DNA methyltransferase 1 by EBV Latent Membrane Protein 2A Leads to Promoter Hypermethylation of PTEN Gene in Gastric Carcinoma. *Cancer Research*, 査読有, Vol.69, 2009, 2766-2774
doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3070.
- ⑮ Fu DX, Tanhehco Y, Chen J, Foss CA, Fox JJ, Chong JM, Hobbs RF, Fukayama M, Sgouros G, Kowalski J, Pomper MG, Ambinder RF. Bortezomib-induced enzyme-targeted radiation therapy in herpesvirus-associated tumors. *Nature Medicine*, 査読有, Vol.14, 2008, 1118-1122
doi: 10.1038/nm.1864.
- ⑯ Fukayama M, Hino R, Uozaki H. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma: virus-host interactions leading to carcinoma.. *Cancer Science*, 査読有, Vol.99, 2008, 1726-1733
doi: 10.1111/j.1349-7006.2008.00888.x.

[学会発表] (計 42件)

- ① Abe H et al. Pathway-dependent roles of ARID1A expression loss in gastric cancer: relationships with Epstein-Barr virus infection and microsatellite instability. 2013年3月6日, Baltimore Convention Center, Baltimore, USA
- ② Fukayama M. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. 2nd International Symposium of Infection-associated Cancers. 2012年3月12日, 北海道大学, 札幌市
- ③ Fukayama M. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. Seoul Pathology Forum. 2011年12月16日, ソウル大学, ソウル市, 大韓民国
- ④ Fukayama M. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. 第9回日中がんワークショップ, 2011年12月23, Oriental Riverside Hotel, 上海市, 中華人民共和国

[図書] (計 4件)

- ① Fukayama M, Shinozaki A, Hino R, Wolters Kluwer/ Lippincott Williams & Wilkins, Advances in Surgical Pathology: Gastric Cancer, 2010, pp38-50

- ② 深山正久, 診断と治療社, EBウイルス改訂第2版, 2008, pp159-166

[その他]

ホームページ: <http://pathol.umin.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

深山 正久 (FUKAYAMA MASASHI)
東京大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 70281293

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

宇於崎 宏 (UOZAKI HIROSHI)
東京大学・大学院医学系研究科・講師 (H23より准教授)

研究者番号: 10296246

(H20-H23)

坂谷 貴司 (SAKATANI TAKASHI)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 50431903

(H20-H23)

日野 るみ (HINO RUMI)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 60451770

牛久 哲男 (USHIKU TETSUO)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 60376415

(H20-H23)

森川 鉄平 (MORIKAWA TEPPEI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 80451772

(H20-H24)

菊地 良直 (KIKUCHI YSHINAO)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 90512260

(H20)

仲矢 丈雄 (NAKAYA TATKEO)

東京大学・大学院医学系研究科・特任助教

研究者番号: 80512277

(H20-H22)

篠崎 綾 (SHINOZAKI AYA)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 60581824

(H23)

国田 朱子 (KUNITA AKIKO)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 50608768

(H24)

松坂 恵介 (MATSUSAKA KEISUKE)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 40610150

(H24)