

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790347

研究課題名(和文)EBV感染と宿主細胞との相互作用によるDNAメチル化誘導機構の包括的解析

研究課題名(英文)Comprehensive DNA methylation analysis in the close interaction between Epstein-Barr virus and host cell

研究代表者

松坂 恵介(Matsusaka, Keisuke)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40610150

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌の一部にEBV感染を伴った特殊な一群が存在する。我々は先行研究によりEBV陽性胃癌はゲノム全体にDNAメチル化が亢進しており、その際立ったメチル化形質はEBV感染により獲得されることを明らかにしてきた。本研究では宿主細胞とウイルスの継時的な変化に着目し、そのメカニズム解明に挑むことを目的とする。結果、EBVゲノムのメチル化は宿主細胞に先行することが明らかとなり、秩序だったメカニズムの存在が示唆された。また、宿主細胞のゲノムワイドなDNAメチル化は4週間以内という短期に入り終えることが明らかとなった。本実験系を用いることでDNAメチル化誘導メカニズムの詳細が明らかとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Gastric cancers (GCs) have a characteristic subgroup with Epstein-Barr virus (EBV) latent infection. EBV-positive (EBV(+)) GC showed extremely higher methylation phenotype and EBV infection induced genome-wide de novo DNA methylation in a low-methylation cell line, MKN7, resulting in acquisition of EBV(+)-particular phenotype. In this study, we tried to clarify the mechanism to induce de novo DNA methylation through time-series analysis of DNA methylation focusing on both host cell and virus. As a result, the EBV genome methylation preceded to the host cellular genome methylation, which implied that there should be well-ordered mechanism through close interaction between EBV and host cells. Host cellular genome-wide methylation completed in only 4 weeks. This study might lead to breakthrough about the mechanism of induction of aberrant DNA methylation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：エピジェネティクス ウイルス学 病理学

1. 研究開始当初の背景

(1) 胃癌は世界中で悪性腫瘍による死亡原因の上位を占め、本邦でも毎年約 10 万人が罹患し 5 万人が命を落としている重要な疾患である。胃癌発生には二つの病原体の関与が知られており、ひとつはグラム陰性らせん桿菌である *H. pylori*、もうひとつはヘルペスウイルスの一種である Epstein-Barr virus (EBV) である。EBV の潜伏感染を伴った EBV 陽性胃癌は本邦では胃癌全体の約 7% と推定されており、年間発生数は約 7,000 例と様々な EBV 関連悪性腫瘍の中では最も頻度の高い疾患である。

(2) エピジェネティクスとは 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に関与する因子であり、その機構の一つである DNA メチル化は癌抑制遺伝子の発現抑制に関わることで発癌や癌の進行に寄与していると考えられている。胃癌は特に DNA メチル化異常の亢進した癌腫であることが報告されている。

(3) 我々は先行研究により胃癌臨床検体 51 例を用いて DNA メチル化の網羅的解析を行い、胃癌が大きく 3 つのクラスターに分けられること、またその中でも超高メチル化形質を示す症例が完全に EBV 陽性胃癌に一致することを明らかにした。また、低メチル化形質を示す胃癌細胞株に EBV を感染させることにより新規にゲノムワイドな DNA メチル化が誘導される結果、EBV 陽性胃癌と同様の DNA メチル化形質が獲得されることを証明した。

(4) しかし、どのようなメカニズムで DNA メチル化が誘導されるかということについては全く不明であり、EBV と宿主細胞との相互作用に着目した詳細な解析が必要である。EBV は DNA ウイルスであり、EBV 自身のゲノムにも DNA メチル化が誘導され、潜伏感染に不要な溶解感染遺伝子の発現を抑制させることが知られている。宿主細胞とウイルスの両者に着目し、エピジェネティクス機構を介した相互作用を解析することで、DNA メチル化誘導のメカニズム解明の一助となることが期待される。

2. 研究の目的

EBV 感染がもたらす新規 DNA メチル化の誘導には宿主細胞と EBV の密接な相互作用が寄与しているものと推測されるが、その詳細なメカニズムについては不明な点が多い。そこで、本研究の目的は EBV 感染成立後の宿主細胞と EBV の DNA メチル化と遺伝子発現の変化を経時的かつ網羅的に解析し、両者の未知の相互作用を明らかにすることとする。

3. 研究の方法

(1) 胃癌細胞株に EBV を感染させる方法として、EBV 感染を伴ったパーキットリンパ腫由来の浮遊細胞株 Akata と被感染上皮細胞とを共培養することで感染させる Akata システムを用いる。Akata 細胞との共培養開始から

時的に DNA を抽出する。Akata 細胞にはネオマイシン耐性遺伝子が組み込まれた遺伝子組換え EBV が感染しており、感染細胞は G-418 に対して耐性を得るため、薬剤選択が可能となる。

(2) EBV 感染により DNA メチル化が誘導されることが判明している胃癌細胞株 MKN7 を用いた。臨床検体の解析から各 DNA メチル化形質に特徴的な 3 個ずつ計 9 個のマーカージェノムを抽出しており、それに EBV 陽性胃癌に感染した EBV にメチル化が確認されている EBV 遺伝子のマーカージェノムを抽出し、それらの DNA メチル化の変化をパイロシーケンスを用いて定量的に解析した。また、宿主細胞の網羅的な DNA メチル化の変化を DNA メチル化アレイ Infinium を用いて解析した。

4. 研究成果

被感染細胞として胃癌細胞株 MKN7 を用いた。Akata 細胞との共培養開始から 1、2、3、8、11、14、17、20、24、28 日と継時的に DNA を抽出した。EBV の感染は細胞株からホルマリン固定・パラフィン包埋セルブロックを作製し、EBER-*in situ* hybridization 法にて確認した。

共培養開始から 11 日目に EBV のマーカージェノムに徐々に DNA メチル化が誘導され始め、17 日目に入り終えることが示された。一方、ウイルスゲノムにメチル化が誘導される過程で宿主細胞のゲノムには変化がなく、EBV ゲノムの DNA メチル化が入り終えた 17 日目

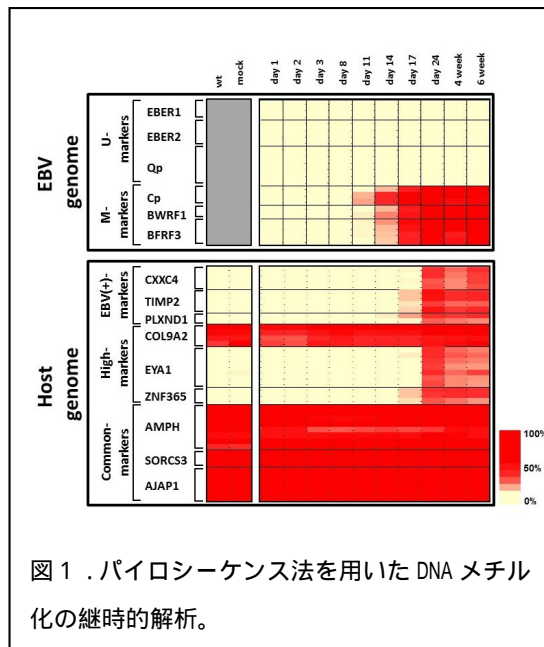


図 1. パイロシーケンス法を用いた DNA メチル化の継時的解析。

から宿主細胞のゲノムに新規 DNA メチル化が誘導され始め、24 日にメチル化が入り終えることが示された (図 1)。

この結果の興味深い点は 3 点ほど挙げられる。ウイルスゲノムの DNA メチル化は感染直後に入り始めるわけではなく、感染から 10 日ほど経ったところから誘導が開始され始め、メチル化が入り終えるまでに 1 週間程度

かかる。 宿主細胞ゲノムの DNA メチル化は感染から約 3 週間という早い時相で入り始め、さらに誘導開始から 1 週間という短期間に完了する。 ウイルスゲノムの DNA メチル化は宿主細胞のメチル化に先行する。

に関して、EBV のゲノムは感染性のウイルス粒子の状態では非メチル化状態であり、宿主細胞に感染した後に新規に DNA メチル化が誘導されるが、それは潜伏感染に不要な溶解感染の発現を抑制するために宿主細胞の防御機構を巧妙に利用したメカニズムと考えられている。また、EBV は感染性のウイルス粒子の状態では線状のゲノムを有し、宿主細胞に感染した後に末端が融合し、環状のエピソームを形成することが知られており、その変化と DNA メチル化との関係についても関連が推測される。感染から EBV のゲノムにメチル化が入り終えるまでに 2 週間程度要することから、その間に発現している EBV の遺伝子は様々な可能性が予想され、例えば溶解感染遺伝子ですら DNA メチル化誘導に寄与している可能性が考えられる。この時相での遺伝子発現を詳細に解析することで、DNA メチル化誘導因子の同定に極めて重要な情報が得られる可能性がある。

また、 の EBV ゲノムのメチル化が宿主細胞の変化に先行することに関して、その理由は現在のところ不明だが、宿主細胞の DNA メチル化誘導に何か秩序だったメカニズムが存在する可能性を強く示唆する結果として重要と考えられる。EBV ゲノムにメチル化が誘導されることが宿主細胞への DNA メチル化誘導への条件が整うことを意味しているのかもしれない。

続いて、 の宿主細胞の変化について、パイロシーケンスの解析では限られたマーカー遺伝子についての解析であり、ゲノムワイドな変化については示されていない。そこで、宿主細胞の DNA メチル化の変化について DNA メチル化アレイ Infinium (450k) を用いてゲノムワイドな解析を行った。

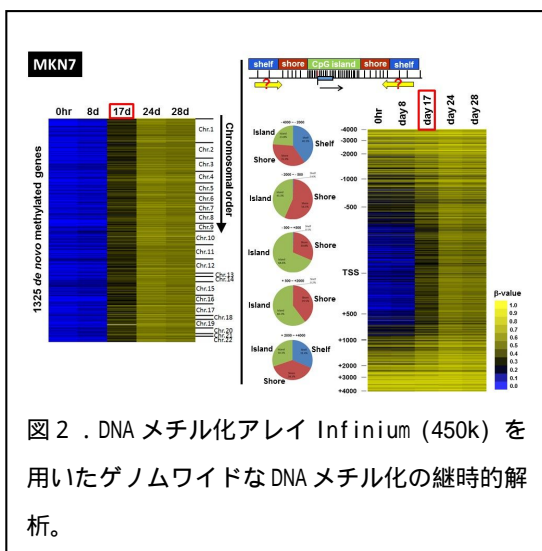


図 2 . DNA メチル化アレイ Infinium (450k) を用いたゲノムワイドな DNA メチル化の継時的解析。

その結果、新規に DNA メチル化の誘導される約 1,300 遺伝子が抽出できた。まず、それらをクロマチン順に並べたところ、メチル化の誘導はゲノム内での局在に無関係に、ゲノム全体で同時に誘導されることが示された (図 2)。このことは、遺伝子の中で優先的に DNA メチル化が誘導される領域が存在するわけではなく、感染後 17 日目の時相で一斉にメチル化が誘導されることを意味しており、時間的に同調した変化を意味している。また、個々の遺伝子に着目した場合、転写開始点領域の距離に応じてプロンプを並べ、CpG アイランドと呼ばれる CpG 配列の密集した領域とその周辺の領域 (CpG ショア・シェルフと呼ばれる) の変化を解析した。すなわち、CpG アイランドの辺縁から徐々に DNA メチル化が誘導され始めるのかどうかに着目したわけだが、結果、CpG の辺縁部・中心部問わず一斉にメチル化が誘導されることが示された (図 2)。すなわち、空間的にも同調した DNA メチル化誘導であることが示された。

この結果から、EBV 感染が発揮する DNA メチル化誘導の圧力は非常に強力であり、宿主細胞に対して時間的・空間的に同調した変化をもたらすことが証明された。

現在のところ DNA メチル化が誘導されるメカニズムは不明であることから、DNA メチル化の誘導される時相に着目し、遺伝子の発現プロファイルの詳細な解析を進め、DNA メチル化誘導因子の同定を試みる予定である。

## 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 1 件)

Matsusaka K, Funata S, Fukayama M, Kaneda A. DNA methylation in gastric cancer, related to Helicobacter pylori and Epstein-Barr virus. World Journal of Gastroenterology. 査読あり 20(14): 3916-3926. 2014  
DOI: 10.3748/wjg.v20.i14.3916.

[学会発表](計 7 件)

Matsusaka K, Epstein-Barr virus infection induces global DNA methylation in gastric cells. Epstein-Barr virus 50<sup>th</sup> Anniversary Conference, Oxford, U.K. 23-25 March, 2014

Matsusaka K, Funata S, Aburatani H, Fukayama M, Kaneda A. Time-series DNA methylation analysis in gastric cell following Epstein-Barr virus infection. The 4th JCA-AACR Special Conference. Dec. 16-18, 2013. Tokyo Bay Maihama Hotel Club Resort, Chiba, Japan.

Matsusaka K, Funata S, Aburatani H, Fukayama M, Kaneda A. Time-series DNA

methylation analysis in gastric cell following Epstein-Barr virus infection. 第72回日本癌学会学術総会 2013年10月3-5日 横浜.

Matsusaka K, Kaneda A, Funata S, Takada K, Aburatani H, Fukayama M. DNA methylation alteration of Epstein-Barr virus genome and host cellular genome in EBV infection to gastric cells. 第71回日本癌学会学術総会 2012年9月19-21日, 札幌

松坂恵介, 金田篤志, 永江玄太, 牛久哲男, 宇於崎宏, 瀬戸泰之, 高田賢藏, 油谷浩幸, 深山正久. EBV陽性胃癌におけるDNAメチル化の網羅的解析. 第9回EBウイルス研究会 2012年7月6日 米子.

阿部浩幸, 前田大地, 日野るみ, 大嶽雄也, 磯貝まや, 牛久綾, 松坂恵介, 国田朱子, 牛久哲男, 宇於崎宏, 岩崎善毅, 立石陽子, 比島恒和, 石川俊平, 深山正久. Epstein-Barr virus関連胃癌及び非関連胃癌におけるARID1A発現消失の臨床病理学的検討. 第9回EBウイルス研究会. 2012年7月6日 米子.

阿部浩幸, 前田大地, 日野るみ, 大嶽雄也, 磯貝まや, 牛久綾, 松坂恵介, 国田朱子, 牛久哲男, 宇於崎宏, 岩崎善毅, 立石陽子, 比島恒和, 石川俊平, 深山正久. Epstein-Barr virus関連胃癌及び非関連胃癌におけるARID1A発現消失の臨床病理学的検討. 第101回日本病理学会総会 2012年4月26-28日 東京.

#### 〔図書〕(計2件)

阿部浩幸, 松坂恵介, 深山正久. 感染症と癌, 病理からのメッセージ, EBVと胃癌, 病理と臨床, 文光堂. 31(2): 133-137, 2013.

松坂恵介, 深山正久. 成人病と生活習慣病, 東京医学社. 43(9) 1121-1126, 2013

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松坂 恵介 (MATSUSAKA, Keisuke)  
千葉大学・大学院医学研究院・助教  
研究者番号: 40610150