

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860257

研究課題名(和文)EBウイルス感染実験を用いたDNAメチル化誘導メカニズムの解明

研究課題名(英文)Clarification of mechanism in induction of DNA methylation using Epstein-Barr virus infection experiment

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究におけるゲノムワイドな解析により、EBV感染早期において遺伝子の転写開始点周囲とgenebody、intergenic regionにどのように新規DNAメチル化が誘導されるかが明らかとなった。転写開始点周囲については、CpGアイランドの辺縁から誘導されることが示された。遺伝子発現解析では、宿主細胞とEBVのダイナミックな発現の変化が観察され、これらが新規DNAメチル化誘導のメカニズム解明につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Genome-wide DNA methylation analysis in early phase of Epstein-Barr virus infection revealed how aberrant DNA methylation could be induced around transcription start sites (TSSs) or in genebody and intergenic regions. DNA methylation occurred from the CpG shore or shelves to CpG islands. In expression analysis by RNA-sequencing, dynamic expression alteration of both host cells and EBV could be observed. These findings should be significant clues to elucidate the mechanisms of induction of aberrant DNA methylation.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：エピジェネティクス 胃癌 Epstein-Barr virus

1. 研究開始当初の背景

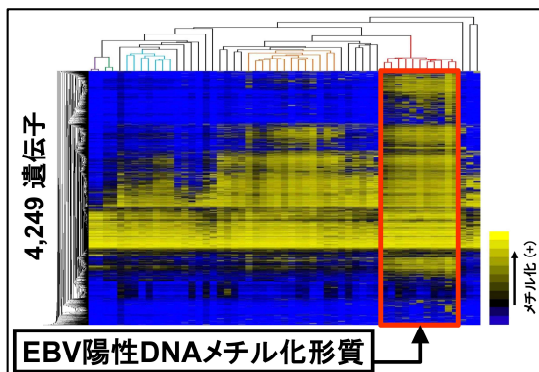
<学術的背景>

(1) EBウイルスと腫瘍：EBウイルスはヒトヘルペスウイルス科に属し、ゲノムに約170kbpの二本鎖DNAを有する。成人の90%以上に潜伏感染しており、人類との共存に最も成功したウイルスの一つといえるが、稀に腫瘍の発生に関わる側面も知られている。我々が研究対象とするEBウイルス関連胃癌もその一例であり、世界中に地域性なく一定の頻度で発症する。本邦でも胃癌全体の約7%、すなわち毎年約7,000人の新規発症が推定されており、これはリンパ腫など他のEBウイルス関連悪性腫瘍の中でも最も頻度が高い。

(2) EBウイルスとエピジェネティクス：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の総称であり、DNAメチル化やヒストン修飾などに代表される。生理的には発生や分化に重要な役割を果たすが、悪性腫瘍においても癌関連遺伝子の発現に影響し、癌の発生や進行に寄与する。また、興味深いことにDNAウイルスであるEBウイルスも自身のゲノムにエピジェネティック修飾を受け、潜伏感染の維持に不必要な遺伝子発現を制御するという宿主細胞のメカニズムを巧妙に利用する側面が知られている。

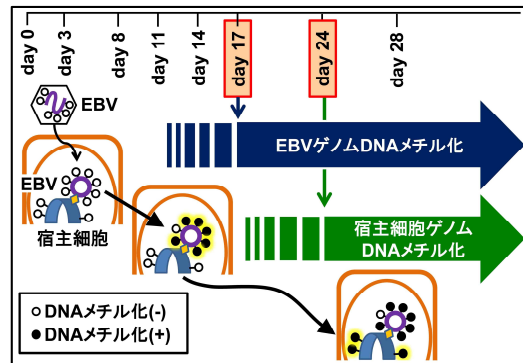
<これまでの研究成果>

(1) EBウイルス感染により宿主細胞に新規DNAメチル化が誘導される：申請者は胃癌臨床検体におけるDNAメチル化の網羅的解析によりEBウイルス関連胃癌は超高メチル化群を形成すること、さらにin vitroでのEBウイルス感染実験により胃癌細胞にゲノムワイドな新規DNAメチル化が誘導され、結果としてEBウイルス関連胃癌と同様のメチル化形質が獲得されることを明らかにした(Matsusaka et al., Cancer Research 2011)。この成果の意義は、これまでエピジェネティック修飾に短時間かつ効率的に変化をもたらす実験系は知られておらず、そのメカニズム解明の突破口となり得るところにある。



(2) 宿主細胞とEBウイルスのエピジェネティック修飾変化は感染後11~24日に起こる：胃癌細胞株MKN7を用いて感染早期の

宿主細胞とEBウイルス両者のDNAメチル化を継時的に解析したところ、EBウイルスゲノムのメチル化誘導は宿主細胞の修飾に先行する形で感染から11~17日目に起こり、続いて17~24日目に宿主細胞の修飾が誘導されることを示した。また、非腫瘍性胃粘膜上皮由来細胞株であるGES1でも同様の結果が得られた。この結果は、宿主細胞とEBウイルスとの間に存在する秩序だったメカニズムの存在を強く印象づけるものである。



2. 研究の目的

本研究はEBウイルス感染によりエピジェネティック修飾にゲノムワイドな変化が起こる現象を利用し、DNAメチル化誘導メカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

<平成26年度の計画：宿主細胞とEBウイルスのエピジェネティック修飾因子の候補を抽出>

(1) Akataシステムを用いたEBウイルス感染実験：Akata細胞はEBウイルス陽性Burkittリンパ腫由来の浮遊細胞株である。Akata細胞は細胞表面にIgGを発現しており、抗IgG抗体を交叉反応することで潜伏感染から溶解感染に移行させられる。被感染細胞株と共培養し、細胞間での接触を経てEBウイルス感染が成立させられる(Imai S, et al., 1998)。

(2) rEBV\_GFPがDNAメチル化誘導機能を保持していることの確認：GFPを組み込んだEBウイルスでも従来と同様のエピジェネティック修飾機能を保持していることを確認する。既にrEBV\_GFPを感染させることで、MKN7とGES1に緑色蛍光発色を得られることを確認しており、続いてDNAメチル化の変化をパイロシーケンスにて確認する。

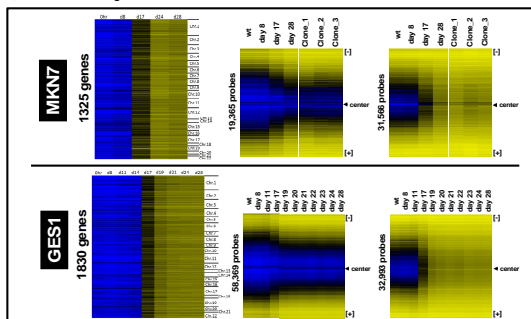
(3) FACSを用いた早期の感染細胞の選別：緑色蛍光発色を呈する感染細胞をFACSにて選別する。感染細胞(GES1, MKN7)は接着細胞であり、トリプシンにて剥離した状態で選別を行う。

(4) 感染早期細胞の遺伝子発現プロファイルの同定：選別した感染早期細胞からRNAを抽出し、それらを次世代高速シーケンサーを用いたRNA-sequenceにて解析する。RNA-sequenceにより宿主細胞とウイルス両者の因子を包括的に解析することが可能と

考えられる。前述のとおり、GES1 はもともと不均一な集団であり、EB ウイルス感染により DNA メチル化が誘導される感受性株と変化の起こらない抵抗性株が混在している。既にクローニングし EB ウイルス感染により確認してある感受性株と抵抗性株とを同じ条件下で感染実験を行い、両者の比較を行うことでエピジェネティック修飾を引き起こす因子の同定を試みる。

#### 4. 研究成果

パイロシーケンスの結果から、正常胃粘膜由来の不死化細胞 GES1 に EBV 感染後、11~24日の間に新規 DNA メチル化が誘導されることが示されていたため、8、11、17、19、20、21、22、23、24、28日と継時的に DNA 抽出したうえで、Infinium 450k にて DNA メチル化を網羅的に解析した。メチル化は 0 から 1.0 までの  $-value$  と呼ばれる定量的な数値で表される。



慢性炎症における CpG アイランドの異常高メチル化は辺縁から徐々に蓄積される様式が想定されているが、EBV 感染における新規 DNA メチル化も同様のパターンを示すのか、それとも CpG アイランドのコアの部分も含めて均一に誘導されるのかという疑問に対して、DNA メチル化誘導パターンの評価を行った。そのためにはまず、Infinium に設計された約 45 万個のプローブを RefSeq gene に準じて再編成を行う必要があり、大きく以下の 3 種類に分類した；

(1) 遺伝子のプロモータ領域を含む転写開始点(TSS)から上下 4,000bp の範囲に設計されたプローブ

(2) TSS から 4,000bp 下流の gene body に設計されたプローブ

(3) (1)(2)以外の intergenic な領域に設計されたプローブ

遺伝子の転写により密接に関与するのは TSS により近い領域と考え、(1)の TSS 前後 4,000bp のプローブからさらに前後 1,000bp 以内のプローブを抽出した。EBV 感染による DNA メチル化誘導パターンに応じて以下の 4 種類の遺伝子群に分類した；

メチル化感受性遺伝子：新規 DNA メチル化によりプロモータ領域が完全にメチル化される遺伝子群、

メチル化抵抗性遺伝子：新規 DNA メチル化が誘導されるが TSS の周囲にとどまり、TSS 周囲の領域は非メチル化状態が維持される

遺伝子群、

メチル化非感受性遺伝子：新規 DNA メチル化に全く感受性を示すことなく非メチル化状態を維持する遺伝子群、

メチル化維持遺伝子：非感染状態から感染後まで完全にメチル化状態を維持し続ける遺伝子群、メチル化抵抗性遺伝子 に関してメチル化抵抗領域の中心点を定め、そこからのゲノム上の距離に応じてプローブを並べた。その結果、新規 DNA メチル化はゲノムワイドなレベルで感染後 17 日目から開始され、19 日目には入り終えることが示された。新規 DNA メチル化は CpG アイランドの辺縁から徐々に加わることが示された。また、メチル化感受性遺伝子 に関して同様に中心点を定め並べたところ、同様の結果を得た。

続いて感染後から継時的に RNA を抽出し、次世代型シーケンサーを用いた RNA-sequencing 法にて遺伝子発現の変化を定量的に解析した。その結果、約 2,000 個の遺伝子に発現の増加あるいは減少が観察された。Gene ontology 解析を行ったところ、感染後からいったん発現が上昇した後に減少していく遺伝子には細胞の増殖やアポトーシスに関連した遺伝子群が濃縮していた。また、DNA メチル化が誘導される時相に種々のヒストン構成因子の発現が変化しており、DNA メチル化の変化に伴いヒストン修飾にもダイナミックな変化が生じている可能性がうかがわれた。こうした感染早期の解析によってのみ変動が観察される遺伝子を詳細に解析することで、新規 DNA メチル化誘導メカニズムの一端が垣間見えることが期待される。

また、RNA-seq 法は塩基配列が分かっていると生物種によらない発現解析が可能であり、EBV の遺伝子についても発現解析を行った。その結果、これまで潜伏感染状態で発現する潜伏感染遺伝子のみに着目されていたが、実際に DNA メチル化が誘導される時相では、さまざまな EBV 遺伝子が発現していることが明らかとなった。DNA メチル化が誘導される時相では、宿主細胞と EBV の複雑な相互作用がうかがわれる。

本研究におけるゲノムワイドな解析により、EBV 感染早期において遺伝子の転写開始点周囲と genebody、intergenic region にどのように新規 DNA メチル化が誘導されるかが明らかとなった。転写開始点周囲については、急速な変化ではあるが CpG アイランドの辺縁から誘導されることが示された。一方、遺伝子発現解析では、宿主細胞と EBV のダイナミックな発現の変化が観察され、これらが新規 DNA メチル化誘導のメカニズム解明につながることを期待される。

#### 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 8 件)

1. Saju P, Murata-Kamiya N, Hayashi T, Senda Y, Nagase L, Noda S, Matsusaka K, Funata S, Kunita A, Urabe M, Seto Y, Fukayama M, Kaneda A, Hatakeyama M. Host SHP1 phosphatase antagonizes Helicobacter pylori CagA and can be downregulated by EBV. Nature Microbiology. Published online: 14 March 2016. (査読あり)

2. Okumura Y, Aikou S, Onoyama H, Jinbo K, Yamagata Y, Mori K, Yamashita H, Nomura S, Takahashi M, Koyama K, Momose T, Abe H, Matsusaka K, Ushiku T, Fukayama M, Seto Y. Evaluation of (18)F-FDG uptake for detecting lymph node metastasis of gastric cancer: a prospective pilot study for one-to-one comparison of radiation dose and pathological findings. World J Surg Oncol. Dec 2;13(1):327, 2015. (査読あり)

3. Sakai E, Fukuyo M, Ohata K, Matsusaka K, Doi N, Mano Y, Takane K, Abe H, Yagi K, Matsuhashi N, Fukushima J, Fukayama M, Akagi K, Aburatani H, Nakajima A, Kaneda A. Genetic and epigenetic aberrations occurring in colorectal tumors associated with serrated pathway. Int J Cancer. Apr 1;138(7):1634-44, 2016 (査読あり)

4. Ishii T, Goto Y, Matsuzaki H, Ohishi N, Sakamoto Y, Saito R, Matsusaka K, Shibahara J, Nagase T. Pulmonary Metastasis of Combined Hepatocellular and Cholangiocarcinoma: A Unique Radiographic Presentation with Air-space Consolidation Masquerading as Pneumonia and Primary Pulmonary Adenocarcinoma. Intern Med. 54(11):1389-92, 2015. (査読あり)

5. Yamamoto K, Tateishi K, Kudo Y, Sato T, Yamamoto S, Miyabayashi K, Matsusaka K, Asaoka Y, Ijichi H, Hirata Y, Otsuka M, Nakai Y, Isayama H, Ikenoue T, Kurokawa M, Fukayama M, Kokudo N, Omata M, Koike K. Loss of histone demethylase KDM6B enhances aggressiveness of pancreatic cancer through downregulation of C/EBP. Carcinogenesis. Nov;35(11):2404-14, 2014. (査読あり)

6. Sakai E, Ohata K, Chiba H, Matsuhashi N, Doi N, Fukushima J, Endo H, Takahashi H, Tsuji S, Yagi K, Matsusaka K, Aburatani H, Nakajima A, Kaneda A. Methylation epigenotypes and genetic features in colorectal laterally spreading tumors. Int J Cancer. Oct 1;135(7):1586-95, 2014. (査読あり)

7. Kaneda A, Matsusaka K, Sakai E, Funata S. DNA methylation accumulation and its predetermination of future cancer phenotypes. J Biochem. Aug;156(2):63-72, 2014. (査読あり)

8. Matsusaka K, Funata S, Fukayama M, Kaneda A. DNA methylation in gastric

cancer, related to Helicobacter pylori and Epstein-Barr virus. World J Gastroenterol. Apr 14;20(14):3916-26, 2014. (査読あり)

〔学会発表〕(計2件)

1. Matsusaka K, Fukuyo M, Urabe M, Rahmutulla B, Sakai E, Aburatani H, Fukayama M, Kaneda A. Genetic aberration analysis combined with DNA methylome characterization in gastric cancer. 第74回日本癌学会学術総会 2015年10月8-10日 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市).

2. Matsusaka K, Funata S, Aburatani H, Fukayama M, Kaneda A. Epstein-Barr virus infection induces de novo DNA methylation in non-cancerous gastric epithelial cells. 第73回日本癌学会学術総会 2014年9月25-27日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市).

〔図書〕(計1件)

1. 松坂恵介、金田篤志. 胃癌におけるゲノム網羅的な解析から何が明らかになったか. 分子消化器病(先端医学社) 11(2): 113-118 2014

〔その他〕

千葉大学大学院医学研究院分子腫瘍学ホームページ  
<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/molonc ol/>

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