

論文の内容の要旨

論文題目 EBV関連胃癌におけるDNAメチル化解析

指導教員 深山正久教授

東京大学大学院医学系研究科

平成18年4月入(進)学

医学博士課程

病因・病理学 専攻

氏名 松坂恵介

癌には様々な遺伝子異常の蓄積がみられるが、発癌に関わる遺伝子異常は大きくジェネティック異常とエピジェネティック異常に分けられる。ジェネティック異常はゲノム DNA の塩基配列の変化を伴う異常であり、遺伝子変異や遺伝子の増幅、欠失といったゲノムの構造異常が挙げられる。一方、エピジェネティック異常はゲノム DNA 塩基配列の変化は伴わずに DNA 修飾要素として細胞分裂の際に娘細胞に維持・伝達される情報の異常である。エピジェネティック異常は DNA メチル化やヒストン修飾など、さまざまなレベルでの異常が知られている。胃癌においては DNA メチル化異常に関する報告が数多くみられ、こうしたプロモーター領域の異常高メチル化は癌抑制遺伝子をはじめとする正常な細胞応答に必要な遺伝子の転写抑制につながり、遺伝子の突然変異や欠失などの構造異常と合わさって癌細胞への進展に寄与する癌化モデルが想定されている。

胃癌は固型癌の中でも多彩な組織像を呈する腫瘍だが、その約 10%に Epstein-Barr virus (以下、EBV とする)の潜伏感染を伴う EBV 関連胃癌 (以下、EBV(+)胃癌とする)と呼ばれる一群が存在する。EBV(+)胃癌は男性優位であること、胃底腺領域に多く発生すること、腫瘍の間質に多くのリンパ球浸潤を伴うことなど臨床病理学的に際立った特徴を有する一方で、分子生物学的にも遺伝子プロモーター領域に異常高メチル化が蓄積していることが報告されている。しかし、EBV(+)胃癌における DNA メチル化異常の解析は一部の遺伝子に限られ、エピジェネティック異常の全容とウイルス感染との関係や、メチル化異常を誘導する因子などは未だ明らかになっていなかった。

そこで本研究の第一の目的を、胃癌の中でも特殊な一群を形成するEBV(+)胃癌に着目し、そのDNAメチル化プロファイルを明らかにすることとした。胃癌臨床検体45例に対してillumina®社のInfiniumメチル化アレイ (以下、Infiniumとする) を用いることでDNAメチル

化状態を網羅的に解析した。Infiniumはメチル化DNA、非メチル化DNAに対してバイサルファイト処理後のシトシンの変換の有無に対応したプローブをそれぞれ設計し、これらのシグナル強度を比較することで27,578ヶ所のCpG配列のメチル化状態を定量する技術である。DNAメチル化の程度はシグナル強度の比から β -valueと呼ばれる0から1.0までの連続的な数値として定量的に評価される。

その結果、各胃癌症例の異常高メチル化を伴っている遺伝子の数について、EBV(+)胃癌(6例)とEBV陰性胃癌(39例、以下、EBV(-)胃癌とする)を比較したところ、EBV(+)胃癌はEBV(-)胃癌と比較して有意に多くの異常高メチル化が蓄積していることが明らかとなった。臨床病理学的情報を比較したところ、EBV(+)胃癌とEBV(-)胃癌の間に有意な偏りは認められず、EBV感染の有無が異常高メチル化の程度に大きく影響を与える因子である可能性が示唆された。

また、大腸癌でメチル化の亢進した一群との相関が報告されている*hMLH1*メチル化の有無を評価したところ、EBV(-)胃癌の中では異常高メチル化の蓄積の多い症例が*hMLH1*のメチル化陽性例を多く含み、大腸癌と同様の傾向を示した。一方、EBV(+)胃癌では6例とも*hMLH1*のメチル化は陰性であった。この結果は、EBV(+)胃癌における異常高メチル化の蓄積は、*hMLH1*メチル化陽性例とは別の機序が働いている可能性を示唆している。

胃癌臨床検体のDNAメチル化様式を評価するために、階層的クラスタリングを行ったところ、EBV(+)胃癌はEBV(-)胃癌と比較して異常高メチル化の亢進した一群として明瞭にクラスターされた。EBV(+)胃癌の異常高メチル化のメチル化様式は、EBV(-)胃癌で共通にメチル化される遺伝子は高頻度にメチル化されており、それに加えてEBV(-)胃癌ではメチル化されにくい遺伝子に対してもEBV(+)胃癌特異的にメチル化されるパターンを示した。*hMLH1*メチル化陽性胃癌はEBV(-)胃癌の中では異常高メチル化の亢進したクラスターに属した。

続いて、どのような生物学的機能を持った遺伝子がメチル化の標的となっているかを評価するために、プローブ方向のクラスタリングに従って4つの群に分類し遺伝子アノテーション解析を行ったところ、胃癌症例45例で共通にメチル化される遺伝子は発生分化に関わる遺伝子が強く濃縮されていたのに対して、EBV(+)胃癌に特異的なメチル化遺伝子は発生分化に関わる遺伝子にやや弱い濃縮を認めるのみであった。

そこで、発生分化への関与が報告されているポリコム抑制複合体(polycomb repressive complex、以下、PRCとする)の標的遺伝子について評価したところ、胃癌全例に共通にメチル化される遺伝子におけるPRC標的遺伝子の割合は44.0%と高値だったのに対し、EBV(+)胃癌に特異性の高い遺伝子は20.5%であった。この結果よりEBV(+)胃癌はPRC標的遺伝子に加えてPRC標的遺伝子以外にもメチル化が蓄積していることが示された。

本研究の第二の目的を、EBV(+)胃癌における異常高メチル化の原因に関してEBV感染の関与の有無を明らかにすることとし、EBV感染による宿主細胞のDNAメチル化への影響を評価するために、胃癌細胞株MKN7、MKN74、AGSについてEBV非感染細胞とEBV感染細胞のDNAメチル化を解析し、両者を比較した。

その結果、MKN7においては3,000ヶ所を越えるプローブに新規に異常高メチル化が誘導

されることが明らかとなった。そこでMKN7に関してPRC標的遺伝子の割合を評価したところ、感染前からメチル化されていた遺伝子には2,493個中644個（25.8%）含まれていたのに対して、EBV感染により新規に誘導された遺伝子には3,379個中503個（14.9%）と割合が低く、新規にメチル化が誘導される遺伝子にはPRC標的以外の遺伝子が多く含まれることが示された。この結果は臨床検体で得たEBV(+)胃癌のメチル化様式がPRC標的遺伝子だけでなくPRC標的以外の遺伝子も異常高メチル化の標的となっている観察結果と同様の傾向を示している。

EBV感染によって新規にメチル化が誘導される遺伝子とEBV(+)胃癌の臨床検体で特異的にメチル化されている遺伝子とを比較するために、EBV(+)胃癌特異的メチル化プローブ（409個）を用いて解析したところ、MKN7はEBV感染により409個中232個のプローブに新規にDNAメチル化が誘導された。この結果より、MKN7において臨床検体で抽出したEBV(+)胃癌特異的メチル化プローブの多くに、EBV感染により新規に異常高メチル化が誘導されることが明らかとなった。

これらEBV(+)胃癌特異的メチル化プローブ409個について階層的クラスタリングを行ったところ、MKN7の非感染細胞はEBV(-)胃癌細胞株と近いメチル化プロファイルを示すのに対し、MKN7のEBV感染細胞はEBV(+)胃癌と近いメチル化プロファイルを示した。この結果は、MKN7がEBV感染によりEBV(+)胃癌に近いメチル化状態を獲得したことを示している。

以上、本論文は以下のことを明らかにした。

- (1) EBV(+)胃癌は、胃癌で高頻度に異常メチル化が起きる遺伝子に加えて、多数のEBV(+)胃癌特異的な異常メチル化を有する、異常メチル化の顕著に亢進した癌である。
- (2) EBV(+)胃癌特異的な異常メチル化は、EBV感染実験により新規に誘導させることが可能であり、EBV感染は異常メチル化に直接的に関与している。