

審査の結果の要旨

氏名 松坂 恵介

本研究の第一の目的は、胃癌の中でも臨床病理学的に特殊な一群を形成し、DNAメチル化異常が数多く報告されているEpstein-Barr virus関連胃癌（以下、EBV(+)胃癌とする）におけるDNAメチル化プロファイルを明らかにすることである。胃癌臨床検体45例に対してillumina®社のInfiniumメチル化アレイを用いた27,578ヶ所のCpG配列におけるメチル化状態の解析から下記の結果を得ている。

1. 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。

2. 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。

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、発生分化に関わることが知ら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は、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であり、胃癌細胞株に対してEBV感染実験を用いて感染細胞と非感染細胞とのDNAメチル化を比較し、下記の結果を得ている。

3. 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。

4. 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EBV感染により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。

この結果は、EBVに特異的なメチル化誘導メカニズムを解明する上で重要な手がかりにつながることを期待され、学位の授与に値するものと考えられる。