

論文の内容の要旨

論文題目 EBウイルス関連胃癌における発癌機構

～LMP2Aに着目して～

氏名 日比谷 孝志

<序論> Epstein-Barr virus (EBウイルス)は1964年、バーキットリンパ腫の培養リンパ腫細胞内に発見された、二本鎖DNAをゲノムとするウイルスである。EBウイルスは *in vivo* では口腔咽頭部の上皮細胞で増殖し、その後Bリンパ球に感染し、そのおよそ10%が潜伏感染細胞となる。潜伏感染細胞の状態ではEBウイルスのゲノムのうち、一部のみが発現される。

1990年にBurkeらによってEBウイルスの胃癌細胞への感染が報告された。胃癌細胞に感染したEBウイルスは単クローンであることが明らかになっており、EBウイルス関連胃癌発生の初期にEBウイルスの感染が起きており、発癌の過程に関与していると考えられる。

EBウイルス関連胃癌では発現している遺伝子はEBNA-1, LMP-2A, EBER-1, EBER-2, BARF0に限られている。リンパ球の不死化や線維芽細胞の形質転換に関連するEBNA-2, LMP-1の発現を欠いており、これらの遺伝子に依存しない発癌メカニズムの存在が疑われる。

組織学的には、EBウイルス関連胃癌はリンパ上皮腫様胃癌と通常型胃癌の二つに分類される。リンパ上皮腫様胃癌は著明なリンパ球浸潤を伴う低分化腺癌の組織像を示す。通常型胃癌では、中分化から低分化腺癌の組織像を示し、様々な度合いでリンパ球浸潤を伴う。

EBウイルス関連胃癌ではマイクロサテライト不安定性や癌遺伝子の増幅、癌抑制遺伝子の変異、消失の頻度が低い一方で、DNAのプロモーター部位のメチル化が非EBウイルス関連胃癌と比較し、広範な遺伝子に高頻度に存在していることが明らかになっている。メチル化亢進のメカニズムとして、LMP-2Aの関与が明らかになっている。EBウイルス関連胃癌においてはしばしばE-cadherinの発現低下が見られ、DNAメチル化と相関が報告されている。

microRNA は 22 塩基程度の non-coding RNA で、転写後の mRNA を切断や翻訳阻害をすることで、蛋白の発現を抑制し、発生、細胞分化、増殖、アポトーシスといった様々な生物学的プロセスに関与しているが、EB ウイルス関連胃癌における microRNA の発現の変化については報告は少ない。

上皮系の形質発現に関与する microRNA として miR-200 ファミリーが知られており、epithelial-mesenchymal transition (EMT)の強力な制御遺伝子であると考えられている。近年、miR-200 プロモーター領域のメチル化による転写制御が報告されている。

<目的>本研究では、

1. EBNA-1, LMP-2A トランスジェニックマウスを用いた各潜伏感染遺伝子の胃粘膜への影響。
2. DNA メチル化による microRNA の発現の変化と EMT への関与。

以上 2 点について検討を行った。

<材料と方法>①トランスジェニックマウスを用いた実験: EBNA-1 及び LMP-2A 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作製し、生後 12 週、24 週、56 週、100 週で解剖し、胃のパラフィン固定標本を作製し、HE 染色、免疫組織化学的染色、quantitative real time PCR (qRT-PCR)で検討した。また、上記トランスジェニックマウスに化学発癌剤 N-methyl-N-nitrosourea (MNU)を経口投与し、56 週で解剖、同様に観察した。

②手術検体の検討: 東京大学医学部附属病院で切除された EB ウイルス関連胃癌 19 例、非 EB ウイルス関連胃癌 35 例の miR-141 発現量と、miR-141/200c プロモーター領域のメチル化をそれぞれ qRT-PCR とメチル化特異的 PCR (MSP)及び Bisulfite sequencing にて測定した。

③胃癌細胞株を用いた実験: 6 種類の EB ウイルス陰性の胃癌細胞株 MKN1、MKN7、NUGC3、TMK1、AGS、MKN74、及びこれらの EB ウイルス持続感染株を用いた。miR-141/200c プロモーター領域のメチル化を MSP、Bisulfite sequencing を用いて測定した。miR-141 の発現量は qRT-PCR にて測定し、miR-141 の低下を認めた TMK1、AGS、MKN74 の EB ウイルス持続感染株に対し、5AZAdC を用いた脱

メチル化、及び miR-141 導入を行った。miR-141、ZEB1、ZEB2、E-cadherin の発現を qRT-PCR、Western blotting にて測定した。また、MKN74 へ EB ウイルス潜在感染遺伝子を導入し、miR-141 の発現とプロモーター領域のメチル化をそれぞれ qRT-PCR と MSP にて測定した。

<結果>100 週で解剖した LMP-2A トランスジェニックマウスの胃に浸潤を伴う低分化腺癌、粘膜内に限局した、少量の印環細胞様細胞を伴う腺癌を 1 例ずつ認めた。低分化腺癌では DNA methyltransferase 1 (DNMT1)が背景粘膜の 1.4 倍発現していた。EBNA-1 トランスジェニックマウスの胃粘膜内に異型細胞の出現を 1 例認めた。MNU 投与マウスでは LMP-2A トランスジェニックマウスと対照群の非トランスジェニックマウスに腫瘍を認めたが、大きさ、組織型、腫瘍発生率に差を認めなかった。背景の胃底腺粘膜では EBNA-1 トランスジェニック、LMP-2A トランスジェニックマウスに萎縮を認めた。胃癌手術検体では EB ウイルス関連胃癌では非 EB ウイルス関連胃癌と比較し有意に miR-141 の発現が低下しており、miR-200c/141 プロモーター領域には EB ウイルス関連胃癌ではメチル化を認めたのに対し、非 EB ウイルス関連胃癌では症例によってメチル化の有無に差を認めた。胃癌培養細胞を用いた実験では TMK1, AGS では EB ウイルスが感染すると、miR-200c/141 プロモーター領域のメチル化を認めなかったにもかかわらず、miR-141 の発現が脱メチル化で変化を認めた。MKN74 では EB ウイルスが感染すると、miR-200c/141 プロモーター領域の著明なメチル化と miR-141 発現の低下、細胞接着性の低下を認めた。脱メチル化にて miR-141 発現の回復を認め、miR-141 導入により ZEB1 の発現低下、E-cadherin 発現の増加を認めた。

<考察>LMP-2A トランスジェニックマウスの胃粘膜に腫瘍形成することがわかった。この結果、EB ウイルス関連胃癌の発癌に LMP-2A が関与している可能性が示唆された。また、LMP-2A、EBNA-1 が EB ウイルス感染による萎縮性胃炎の原因遺伝子である可能性が明らかになった。DNMT1 発現が亢進していることから、DNMT1 が DNMT3 の働きをサポートすることによって、DNA メチル化異常を引き起こし、癌の形成に寄与している可能性がある。

EBウイルス関連胃癌手術検体の検討によって、miR-141 の発現が EBウイルス関連胃癌で有意に低下していることが明らかになった。胃癌細胞株の実験によって、EBウイルス関連胃癌が低分化な組織像を示す原因は、複数の要因によって引き起こされている可能性が示唆され、その一つにプロモーター領域の DNA メチル化による miR-141 の発現低下により EMT が引き起こされる経路があることがわかった。

今後の方針として、LMP-2A 及び EBNA-1 トランスジェニックマウス胃組織の DNA メチル化アレイを利用した網羅的解析を行う予定である。正常粘膜と比較し、メチル化の変化を解析することで、EBウイルスによる LMP-2A を介した DNA メチル化による発癌機構の解明が期待できる。