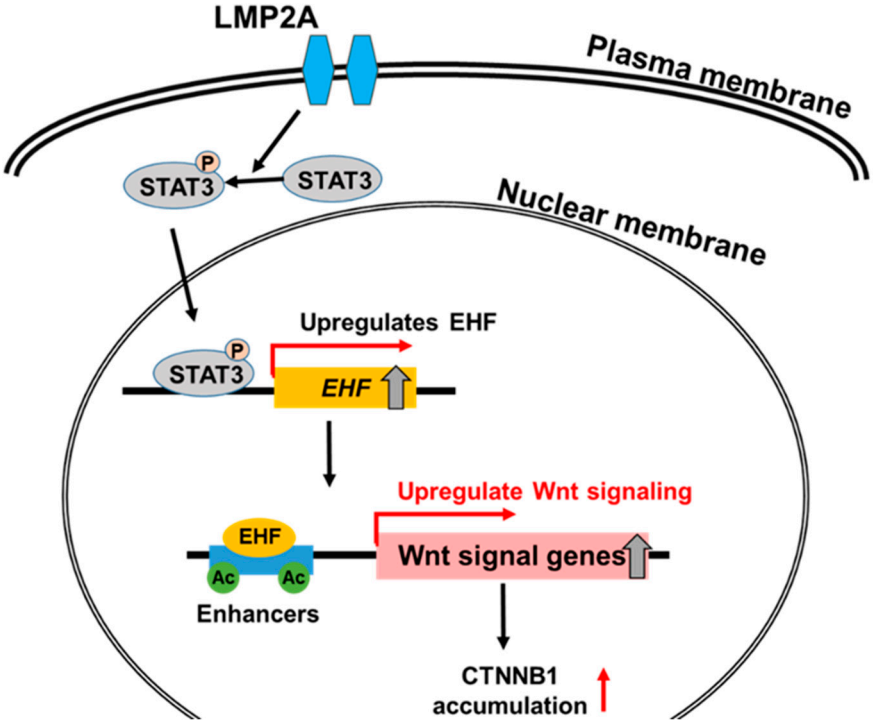
31　外来ウイルスDNAがもたらすエピゲノム発癌機構の解明	金田　篤志

【目的】ウイルス感染がもたらす特異なエピゲノム変化とエンハンサー異常活性化を解明し、ウイルス陽性癌におけるエピゲノム発癌分子機構を明らかにすることを目的とする。

【方法】EBV、HPV などウイルス感染により発癌する悪性腫瘍のうち、EBV 陽性胃癌を対象に臨床胃癌標本および細胞株を用いて解析を行った。トランスクリプトーム解析を RNA-seq 法により行った。エピゲノム解析についてヒストン修飾および転写因子結合領域を ChIP-seq 法より行った。3D クロマチン構造を Hi-C 法にて解析した。候補となる因子について siRNA あるいは shRNA を用いたノックダウンを行い、機能解析を行った。蛋白発現量について、細胞株に対してウエスタンブロッティング法により、臨床標本に対して免疫染色法によりそれぞれ検証した。

【結果】EBV 胃癌のトランスクリプトーム解析により、正常胃上皮細胞と比較して EBV 胃癌細胞株は有意に Wnt シグナル関連遺伝子が発現上昇しており、βカテニンの活性化を伴って Wnt シグナルが亢進していることを認めた。正常胃上皮細胞や EBV 陰性胃癌細胞株に EBV を感染したモデルにおいても同様にβカテニンの活性化を伴った Wnt シグナルの亢進を認めた。EBV 胃癌細胞株および *in vitro* EBV 感染モデルの網羅的エピゲノム解析により、活性化したエンハンサー領域において転写因子 EHF モチーフが有意に濃縮していること、および EHF の発現が亢進していることを認めた。EBV 蛋白 LMP2 が、STAT3 をリン酸化し、p-STAT3 が EHF 遺伝子のプロモーターおよびエンハンサーに結合することにより EHF 発現を誘導していた。EHF の下流標的遺伝子は有意に Wnt シグナル関連遺伝子を含み、STAT3、EHF、下流標的遺伝子のノックダウンにより EBV 胃癌細胞株の増殖は有意に低下した。また STAT3 ノックダウンによる増殖低下は、EHF の強制発現によりレスキューされた。EBV 胃癌において LMP2A-STAT3-EHF axis によるエンハンサー領域の異常活性化が重要であることを示唆された。

EBV 胃癌におけるエンハンサー領域活性化と Wnt シグナル亢進



31. 外来ウイルス DNA がもたらすエピゲノム発癌機構の解明

金田　篤志

千葉大学 大学院医学研究院 分子腫瘍学

Key words：Epstein-Barr ウイルス，胃癌，エピゲノム，エンハンサー，Wnt シグナル

緒　言

癌は我が国で生涯に半数が罹患し 1/3 の者の死因となる、喫緊の対策が必要な疾患であり、疾患予後を改善し不要な治療費を削減する戦略が社会上・経済上強く要請される。癌はゲノム異常とエピゲノム異常の蓄積により発症する。エピゲノム異常が発癌の原因として確かに貢献する点は、正常細胞に蓄積したエピゲノム異常が癌リスクを上昇させることを我々が世界に先駆けて証明し、またそれを標的とする癌発症リスク低減療法が可能なことも証明した［1]。細胞に蓄積したエピゲノム異常は治療標的も可能なドライバー変異であり、エピゲノム変異に基づいた発癌の本態はゲノム異常と並びさらなる解明が期待される。

異常なエピゲノム修飾は、ウイルスや細菌などの病原体感染、慢性炎症、低酸素、低栄養などの環境要因により誘導される。これらの環境要因は、癌 Hallmark の 1 つとして炎症が発癌の重要な要因であり［2]、また癌の微小環境において低栄養によるαケトグルタール酸の低下が脱メチル化反応を阻害し癌組織の空間的なエピゲノム可塑性の原因となるなど［3]、その重要性は広く認識されている。ヒト腫瘍で最も高いレベルで DNA 異常メチル化を呈する EBV 陽性胃癌が、ユニークなエピゲノム異常を呈する独立した胃癌サブタイプの 1 つであることは我々が初めて証明し、独自の *in vitro* 感染モデルを活用し、EBV 感染が胃上皮細胞に DNA 異常メチル化を誘導する原因であることを証明した［4]。近年、DNA メチル化情報とは別に Hi-C 解析にてユークロマチン、ヘテロクロマチンなどのゲノム 3D 構造情報を網羅的に解析すると、EBV 胃癌はやはり他の胃癌や正常胃サンプルとは独立したユニークなサブクラスターを形成し、網羅的エピゲノム解析、発現解析、および胃上皮に対する我々の EBV *in vitro* 感染モデルを用いた時系列的解析により、このユニークなエピゲノム形質は、全く新たなエピゲノム発癌機構によりもたらされていることを証明している［5]。

本研究ではウイルス感染がもたらす特異なエピゲノム変化とエンハンサー異常活性化を解明し、ウイルス陽性癌におけるエピゲノム発癌分子機構を明らかにすることを目的とする［6]。

方　法

1. 臨床胃癌標本および胃癌細胞株

東京大学医学部附属病院において外科切除された胃癌症例（EBV 陽性胃癌、EBV 陰性胃癌）に対し、十分な説明と同意書を取得の上手術標本から解析検体を取得し解析に使用した。EBV 陽性胃癌細胞株 SNU719、YCC10、NCC24、EBV 陰性胃癌細胞株 MKN7、正常胃上皮細胞 GES1、を細胞株としてそれぞれ用いた。千葉大学および東京大学において倫理審査を受け承認を得て研究を行った。

2. 次世代シーケンサーを用いた網羅的解析

網羅的遺伝子発現を RNA-seq 法により行い、各遺伝子の発現量を定量的 RT-PCR 法にて検証した。エピゲノム解析についてヒストン修飾（H3K4me1、H3K4me3、H3K27ac、H3K9me3）および転写因子結合領域を ChIP-seq 法より行い、特定の領域については定量的 ChIP-PCR 法にて検証した。3D クロマチン構造を Hi-C 法にて解析した。

3. 機能解析

候補となる因子について siRNA あるいは shRNA を用いたノックダウンを行い、蛋白発現量についてウエスタンブロッティング法にて検証した。細胞増殖について WST-8 アッセイにより検証した。

4. 免疫染色

EBV 陽性胃癌、EBV 陰性胃癌、および非癌胃粘膜上皮における EHF および p-STAT3 の蛋白発現について免疫染色法にて検証した。

結果および考察

1. EBV 胃癌細胞株における Wnt シグナルの亢進

EBV 胃癌細胞株 SNU719、NCC24、YCC10、および正常胃上皮細胞 GES1 における遺伝子発現を RNA-seq 法にて網羅的に比較解析し、有意に発現上昇した遺伝子をそれぞれ 957、845、897 遺伝子抽出した。3 つの胃癌細胞株に共通して、また臨床胃癌標本においても Wnt シグナルに関連する遺伝子が有意に上昇しており、βカテニンの活性化を伴って Wnt シグナルが亢進していることを認めた（図 1）[6]。

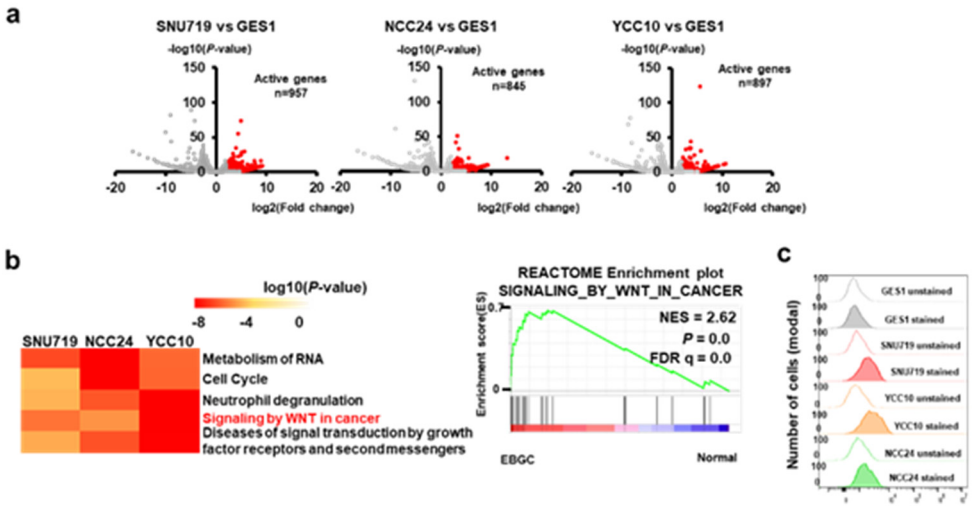


図 1. Wnt シグナルの亢進

a) RNA-seq 法による遺伝子発現解析により EBV 陽性胃癌細胞株において有意に発現上昇する遺伝子を抽出した。

b) 3 つの EBV 陽性胃癌細胞株において発現上昇する遺伝子について、Metascape を用いて GO 解析したところ Wnt シグナル関連遺伝子が有意に濃縮していた（左）。臨床胃癌標本の RNA-seq データを用いた GSEA 解析でも Wnt シグナル関連遺伝子は有意に発現上昇していた（右）。

c) 活性化βカテニンは EBV 胃癌細胞株において高いレベルで染色され、CytoFLEX flow cytometer で検出したところ GES1 と比べて右へのシフトが認められた。

2. EBV 胃癌における活性化領域

ヒストン修飾について ChIP-seq 解析を行い 3 つの EBV 陽性胃癌細胞株において GES1 よりも H3K27ac レベルが高いプロモーター領域およびエンハンサー領域を抽出した。有意に濃縮して認められるモチーフを検索し、またそのモチーフに結合し得る転写因子の遺伝子発現を RNA-seq データにより検証した。EHF を発現上昇し有意にモチーフが活性化領域に濃縮する転写因子として同定した。EBV 陰性胃癌細胞株 MKN7 に EBV を *in vitro* 感染し H3K27ac レベルが上昇するプロモーター領域およびエンハンサー領域を同様に抽出したところ、EHF モチーフが最も濃縮して同定された。臨床胃癌標本を用いて EHF 発現を免疫染色法にて検証し、EBV 陽性胃癌において発現上昇していることを確認した（図 2）[6]。

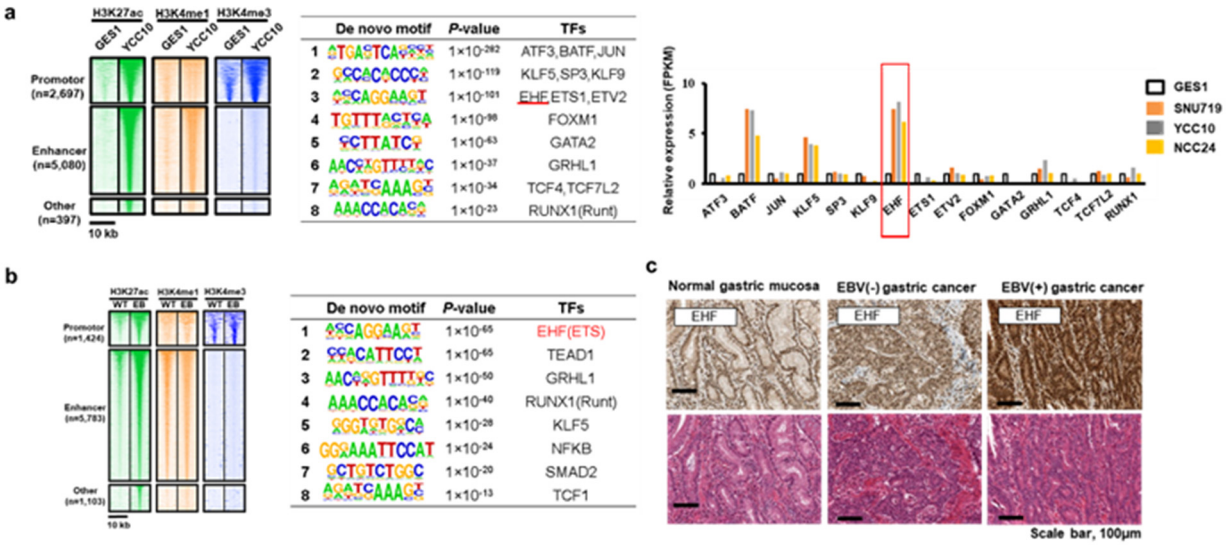


図 2. 転写因子 EHF の抽出

a) ChIP-seq 解析の結果、EBV 陽性胃癌細胞株において GES1 よりも H3K27ac レベルが高い領域を抽出し有意に濃縮して認められるモチーフを HOMER findMotifsGenome program を用いて検索し、またそのモチーフに結合し得る転写因子の遺伝子発現を RNA-seq データにより検証した。

b) 胃癌細胞株 MKN7 に EBV を *in vitro* 感染し H3K27ac レベルが上昇する領域を同様に抽出し、EHF モチーフの濃縮を確認した。

c) 臨床胃癌標本を用いた免疫染色。EBV 陽性胃癌において EHF が発現上昇していた。

3. EHF ノックダウンによる検証

胃癌細胞株 MKN7 に EBV を *in vitro* 感染させた MKN7_EB 細胞に対し、shRNA を用いて EHF をノックダウンすると、有意に細胞増殖が低下した。発現低下した遺伝子には Wnt シグナル関連遺伝子が有意に濃縮しており、それらの Wnt シグナル関連遺伝子の中で最も発現低下した下流遺伝子は *FZD5* であった。EBV 陽性胃癌細胞株の Hi-C 解析により 3D クロマチン相互作用を検証し *FZD5* プロモーターと相互作用するエンハンサー領域を同定したところ、そのエンハンサー領域は EHF モチーフを含み、EBV 感染により H3K27ac レベル上昇を、EHF ノックダウンでは H3K27ac レベル低下を示した（図 3）[6]。

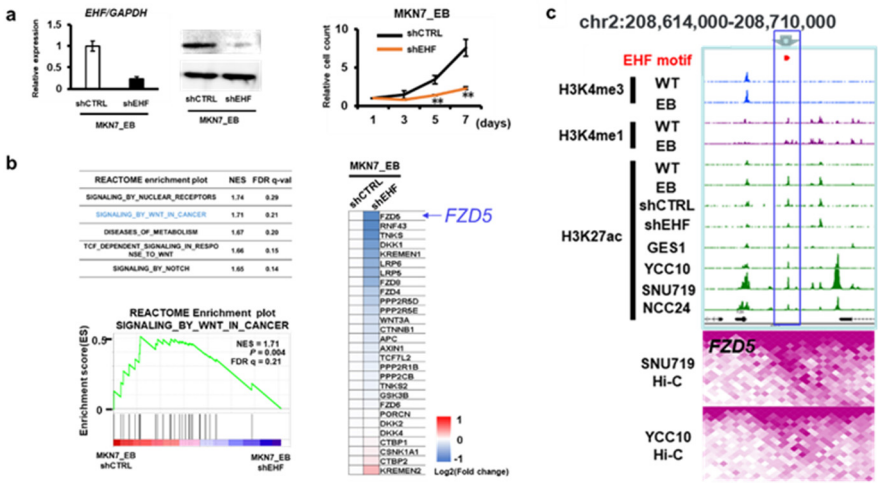


図 3. 転写因子 EHF ノックダウンと下流標的遺伝子

a) MKN7_EB 細胞における shRNA を用いた EHF ノックダウン（左）。細胞増殖を WST-8 アッセイにより検証し有意な低下を確認した（$^{**}P<0.01$、*t*-test）（右）。

b) 発現低下した遺伝子に Wnt シグナル関連遺伝子が有意に濃縮していることを、Metascape を用いて検証し同定した（左）。Wnt シグナル関連遺伝子で最も発現低下した下流遺伝子は *FZD5* であった（右）。

c) EBV 陽性胃癌細胞株の Hi-C 解析により *FZD5* プロモーターと相互作用するエンハンサー領域を同定。そのエンハンサー領域は EHF モチーフを含み、EBV 感染により H3K27ac レベル上昇を、EHF ノックダウンでは H3K27ac レベル低下を示した。

4. EBV 胃癌細胞株における Wnt シグナルの亢進

EHF ノックダウンにより、*EHF* および *FZD5* の発現低下を認めた。また FZD5 を siRNA によりノックダウンすると細胞増殖の有意な低下を認めた（図 4）[6]。

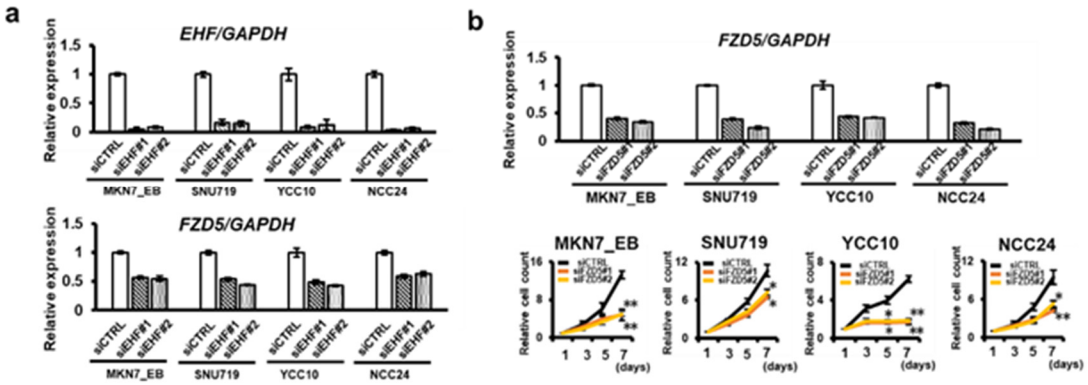


図 4. 下流標的 FZD5 遺伝子の検証

a) EHF ノックダウンによる *EHF* および *FZD5* の発現低下。

b) FZD5 ノックダウンによる EBV 陽性細胞の増殖低下（$^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, *t*-test）。

5. EHF を活性化する上流因子

EBV 感染がもたらす EHF 発現上昇およびその標的領域のエピゲノム活性化について、その原因となる上流因子を探索する目的で EBV 因子を MKN7 細胞に強制発現した。胃に感染した EBV は 3 型潜伏感染し、潜伏遺伝子と呼ばれる BARF、EBER1、EBNA1、LMP2A のみ発現することが知られ、これらの因子について強制発現すると、*EHF* および *FZD5* を最も発現誘導する因子は LMP2A であった。EBV 蛋白 LMP2 は STAT3 をリン酸化することが報告さ

れており、MKN7_EB および MKN_LMP2A 細胞においても STST3 がリン酸化されていることをウエスタンブロッティングにより確認した。臨床胃癌標本の免疫染色を行い、EBV 陽性胃癌標本において p-STAT3 が強く発現していることを同定した。RNA-seq 解析を行い、MKN7_EB や MKN7_LMP2A 細胞において STAT3 シグナル関連遺伝子が有意に発現上昇していることも確認した。*EHF* プロモーターおよび上流に存在する 2 つのエンハンサー領域には STAT3 モチーフが存在し、EBV 感染により H3K27ac レベルが上昇することを ChIP-seq により、STAT3 がそれぞれの領域に結合することを STAT3 に対する ChIP-PCR 解析により確認した［6］。

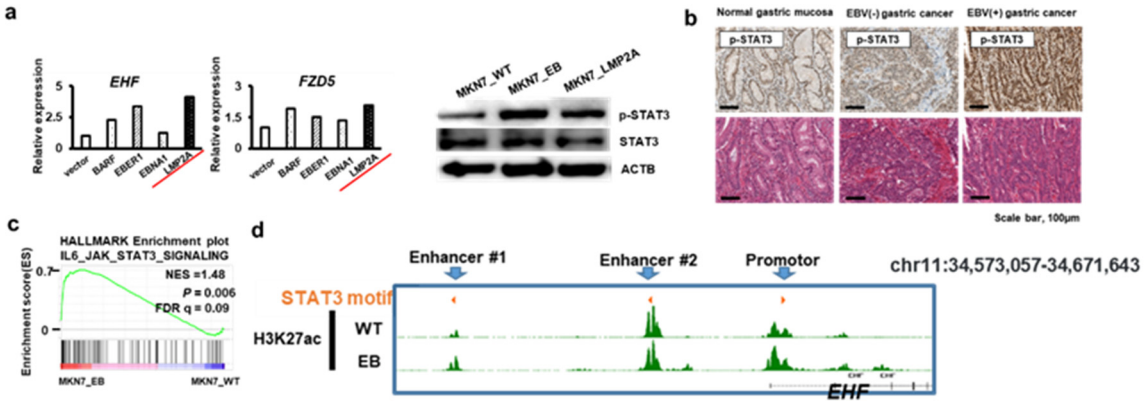


図 5. EHF を活性化する上流因子 LMP2A と STAT3

a) MKN7 に EBV 潜伏遺伝子を強制発現し、*LMP2A* 発現により *EHF* およびその下流遺伝子 *FZD5* が発現上昇した（左）。EBV 感染および LMP2A 発現により STAT3 がリン酸化することを確認した（右）。

b) 免疫染色により臨床 EBV 陽性胃癌標本にて p-STAT3 が強く発現していることを確認。

c) GSEA 解析により MKN7_EB 細胞において STAT3 シグナル関連遺伝子が有意に発現上昇していることを同定。

d) *EHF* プロモーターおよび上流に存在する 2 つのエンハンサー領域には STAT3 モチーフが存在する。ChIP-seq 法を用いて、EBV 感染により H3K27ac レベルが上昇することを確認した。

6. STAT3 ノックダウンおよび EHF 強制発現による検証

STAT3 を siRNA によりノックダウンし、*STAT3* の発現低下、結合標的である *EHF* の発現低下、その下流標的遺伝子である *FZD5* の発現低下を同定した。また STAT3 ノックダウンにより EBV 胃癌細胞株の増殖は低下した。EHF 強制発現によるレスキュー実験を行うと、STAT3 ノックダウンによる細胞増殖低下は、EHF 発現により部分的にレスキューされた。STAT3 ノックダウンによる *FZD5* 発現も、EHF 発現により部分的にレスキューされた（図 6）。

EBV 胃癌において、LMP2A-STAT3-EHF axis を介した転写因子 EHF の発現上昇と、その下流標的領域のエピゲノム活性化、Wnt シグナル上昇が発癌・癌進展に寄与すると考えられた［6］。

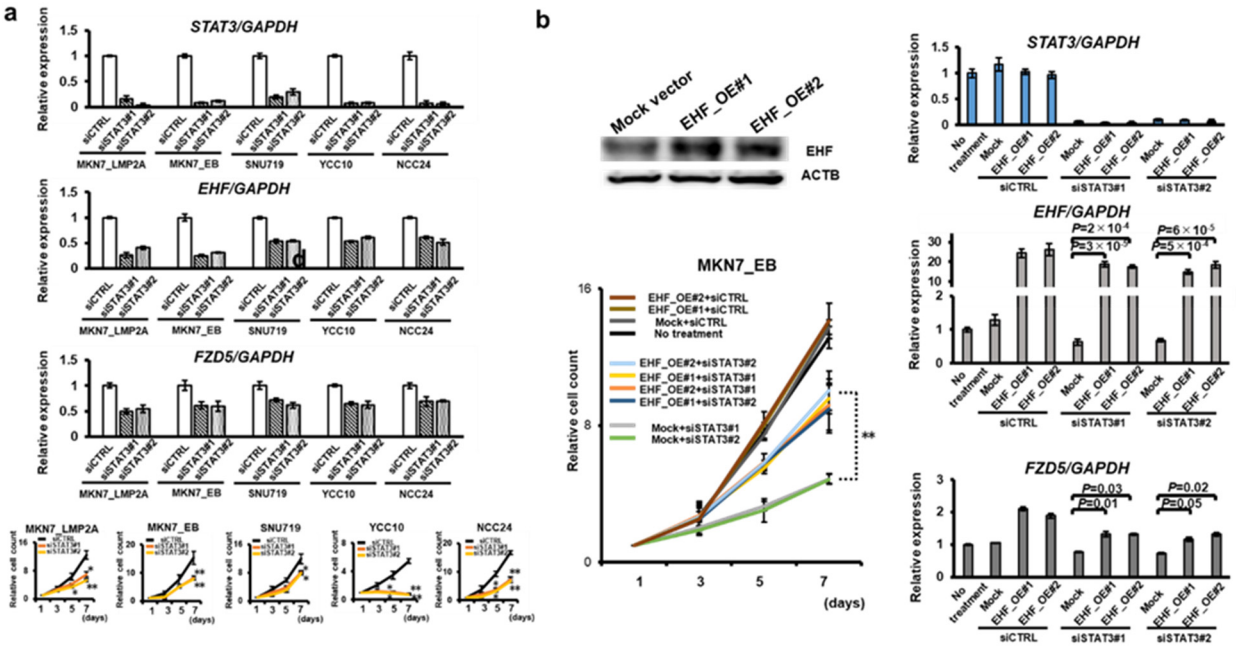


図 6. LMP2A-STAT3-EHF axis の検証

a) STAT3 を siRNA によりノックダウンし、*EHF* および *FZD5* の発現低下を確認した。EBV 胃癌細胞株 SNU719、YCC10、NCC24 だけでなく、MKN_EB および MKN_LMP2A も STAT3 ノックダウンにより有意に細胞増殖低下した（**P*<0.05、***P*<0.01、*t*-test）。

b) EHF を強制発現し、発現レベルをウエスタンブロッティング法にて確認した（左上）。
STAT3 ノックダウンによる細胞増殖低下は、EHF 発現により部分的にレスキューされた（左下）。
STAT3 ノックダウンによる FZD5 発現も、EHF 発現により部分的にレスキューされた（右）。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学大学院医学系研究科人体病理学の深山正久、牛久哲男、Duke-NUS の Patrick Tan である。

文　献

1) Sakatani T, Kaneda A, Iacobuzio-Donahue CA, Carter MG, de Boom Witzel S, Okano H, Ko MS, Ohlsson R, Longo DL, Feinberg AP. Loss of imprinting of Igf2 alters intestinal maturation and tumorigenesis in mice. Science. 2005 Mar 25;307(5717):1976-8. Epub 2005 Feb 24. PMID: 15731405 doi: 10.1126/science.1108080.

2) Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011 Mar 4;144(5):646-74. PMID: 21376230 doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

3) Pan M, Reid MA, Lowman XH, Kulkarni RP, Tran TQ, Liu X, Yang Y, Hernandez-Davies JE, Rosales KK, Li H, Hugo W, Song C, Xu X, Schones DE, Ann DK, Gradinaru V, Lo RS, Locasale JW, Kong M. Regional glutamine deficiency in tumours promotes dedifferentiation through inhibition of histone demethylation. Nat Cell Biol. 2016 Oct;18(10):1090-101. Epub 2016 Sep 12. PMID: 27617932 doi: 10.1038/ncb3410.

4) Matsusaka K, Funata S, Fukuyo M, Seto Y, Aburatani H, Fukayama M, Kaneda A. Epstein-Barr virus infection induces genome-wide de novo DNA methylation in non-neoplastic gastric epithelial cells. J Pathol. 2017 Aug;242(4):391-399. Epub 2017 May 25. PMID: 28418084 doi: 10.1002/path.4909.

5) Okabe A, Huang KK, Matsusaka K, Fukuyo M, Xing M, Ong X, Hoshii T, Usui G, Seki M, Mano Y, Rahmutulla B, Kanda T, Suzuki T, Rha SY, Ushiku T, Fukayama M, Tan P, Kaneda A. Cross-species chromatin interactions drive transcriptional rewiring in Epstein-Barr virus-positive gastric adenocarcinoma. Nat Genet. 2020 Sep;52(9):919-930. Epub 2020 Jul 27. PMID: 32719515 doi: 10.1038/s41588-020-0665-7.

6) Li W, Okabe A, Usui G, Fukuyo M, Matsusaka K, Rahmutulla B, Mano Y, Hoshii T, Funata S, Hiura N, Fukayama M, Tan P, Ushiku T, Kaneda A. Activation of EHF via STAT3 phosphorylation by LMP2A in Epstein-Barr virus-positive gastric cancer. Cancer Sci. 2021 Aug;112(8):3349-3362. Epub 2021 Jun 13. PMID: 34014591 doi: 10.1111/cas.14978.