

平成27年度 全体研究開発報告書

1. 研究開発領域：エピゲノム研究に基づく診断・治療へ向けた新技術の創出
2. 研究開発課題名： エピゲノム変異誘導に対する調整因子・抵抗因子の同定
3. 研究開発代表者： 金田篤志（千葉大学大学院医学研究院）
4. 研究開発の成果

本研究は2つの *in vitro* エピゲノム変化モデルの解析を行い、発癌分子機構を解明することを目的とする。1つは癌遺伝子活性化に際し正常細胞が細胞増殖を停止する早期細胞老化モデルである。金田Gが *Ras* 変異、*Raf* 変異におけるエピゲノム変異を網羅的に解析し、生理的エピゲノム変化により活性化する重要シグナルや、エピゲノム変化を誘導する因子の解析を行う。金田G・深山Gによる臨床悪性腫瘍の解析により、*in vitro* モデルで同定した早期細胞老化に重要な因子の悪性腫瘍における不活化を検証する。もう1つは EB ウイルス感染モデルである。深山Gが成功した胃上皮細胞への EB ウイルス感染により胃癌で認められるエピゲノム異常を誘導し、金田Gは誘導されるエピゲノム異常を時系列的に詳細に解析し、それらを誘導する因子の機能解析を行う。

マウス線維芽細胞で *Raf* 活性化により早期細胞老化を誘導し、遺伝子発現変化、エピゲノム変化を網羅的に同定して以前に報告した *Ras* 誘導性細胞老化と比較解析した。*Ras* 誘導性、*Raf* 誘導性細胞老化での変化は類似し、*Bmp2-Smad1* シグナルの活性化が細胞老化に必須な点は共通であった(Fujimoto et al. *World J Biol Chem* 2016)。臨床大腸癌を用いた解析でも、*BRAF* 変異(+)腺腫である無形性鋸歯状腺腫は、*MLH1* メチル化によるマイクロサテライト不安定性(MSI)を伴って高変異形質を獲得して発癌し、*BRAF* 変異誘導性細胞老化に必須な *BMP2-Smad1* シグナルの変異を獲得して発癌していた(Sakai et al. *Int J Cancer* 2016; Sakai et al. *Cancer Sci* 2016)。

マウス及びヒト繊維芽細胞を *Ras* 及び *Raf* 活性化により早期細胞老化する系で shRNA ライブラリーを用いて網羅的ノックダウンを行い、早期細胞老化に必須な因子の網羅的ノックダウンを進めた。*Bmp2-Smad1* シグナル以外にも重要なシグナルの候補を同定し、また臨床悪性腫瘍サンプルで不活化している因子も同定しつつある。

EB ウイルス感染により誘導されるエピゲノム異常について、DNA メチル化以外に、DNA ヒドロキシメチル化、ヒストンメチル化、ヒストンアセチル化、オープンクロマチン領域、CTCF などインシュレーター蛋白の局在、など網羅的に取得した。それらの変化を積極的に誘導しうる誘導因子候補、あるいは変化が起きないように維持しようとする抵抗性因子候補を、RNA-seq による発現網羅的解析から抽出した。候補因子のノックダウン下に EB ウイルス感染を行いエピゲノム異常の誘導を解析すると、そのノックダウンにより新規に入る DNA 異常メチル化のほとんどが誘導されなくなる因子、およびそのノックダウンにより本来異常メチル化が誘導されない領域にまでさらに異常メチル化が誘導される因子を、それぞれ有力な誘導因子、有力な抵抗性因子として同定した。

東大・畠山研究室との共同研究で、ピロリ菌 *CagA* 蛋白による発癌作用を阻害しうる脱リン酸化酵素が EB ウイルス感染により発現抑制されうることを示した。EB ウイルス陽性胃癌でピロリ菌は高頻度に共感染しており、ピロリ菌感染による慢性炎症が EB ウイルス感染成立に必須であるためと考えられるが、発癌分子機構においても協同作用しうる可能性を示した (Saju et al. *Nat Microbiol* 2016)。