

ヘリコバクターピロリ感染による疾患発症の分子基盤

東京大学医科学研究所 感染症国際研究センター
感染制御系 細菌学分野
三室 仁美

1. はじめに

ヘリコバクターピロリ (*Helicobacter pylori*, ピロリ菌) は、幼少期に経口的にヒト体内に侵入し、胃粘膜に定着感染するグラム陰性細菌であり、胃炎、胃潰瘍、MALTリンパ腫、胃がんの形成に関与している。これまでの臨床的知見から、胃がんの発症は、ピロリ菌の持続感染による胃粘膜の異常増殖と慢性炎症に起因すると考えられている。ピロリ菌は、感染ステージに応じて宿主応答を微調整することで、宿主に排除されることなく長期間の感染を成立させることが予想される。しかしながら、その微調整のメカニズムの詳細は、未だ明らかにされていない。

一方、宿主応答の微調整を司る分子としてのmicroRNA (miRNA) の重要性が、近年のポストゲノム解析によって、明らかになりつつある。さらに、様々な遺伝子発現は、エピジェネティックな修飾によって、時空間的に制御されていることが最近明らかにされてきた。また、正常組織での遺伝的およびエピジェネティックの変異の蓄積は、がん化を誘導することが報告されている。非がん胃粘膜細胞の数パーセントの細胞では特異的遺伝子のメチル化がみられ、遺伝子メチル化の程度は胃がん発症のリスクと関連している。また、ピロリ菌の胃粘膜長期感染によって、異常なDNAメチル化が胃粘膜上皮に誘導されることが知られている。メチル化修飾がプロモーター部分で付加されると遺伝子発現がサイレンスとなることから、ピロリ菌感染胃粘膜では、種々遺伝子発現がサイレンスとなっている可能性が考えられる。従って、ピロリ菌感染によるエピジェネティクスにより、宿主miRNAの発現が調節されることが、宿主応答制御に重要である可能性が考えられる。

そこで本研究では、ピロリ菌感染による宿主miRNA発現制御とエピジェネティクスによる疾患誘発の分子機構の統合的解釈を目指して、ピロリ菌持続感染の過程で発現変動するmiRNAを同定し、その機能解析を行った。

2. 方法

1) 動物モデルでのmiRNA解析

実験動物を用いたピロリ菌病原性研究において、スナネズミは、ヒト病態に類似した胃炎や胃がんを呈することが知られている。そこで、スナネズミにピロリ菌を経口的に感染させて9週間後の胃を摘出し、胃上皮細胞に発現するmiRNAを、microRNAマイクロアレイ解析により解析した。有意に発現が変動したmicroRNAに関しては、さらにrealtime RT-PCRにより発現変動を精査した。

2) 臨床検体でのmiRNA解析

miRNAの発現変動が、ヒトの胃上皮においても見られるかどうかを検討するために、ピロリ菌慢性感染患者および非感染患者の臨床サンプルよりヒト胃粘膜上皮RNAを抽出し、miRNA発現を定量した。有意に発現が変動したmicroRNAに関しては、realtime RT-PCRにより発現変動を精査した。さらに、miRNA特異的RT-PCRによる各臨床検体の発現定量データと、各検体の病理組織学的胃炎判定基準 (Sydney system) による萎縮、単核球浸潤、好中球浸潤、腸上皮化成の程度を対比検討して、miRNAとピロリ菌による疾患との関連を精査した。

3) 培養細胞のmiRNA発現解析

DNAメチル化により発現が変動するmiRNAを同定するために、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤であ

る5-aza-2'-deoxycytidineなどの存在下での細胞よりtotal RNAを抽出し、microRNA網羅的プロファイリング解析に供した。有意に発現が変動したmiRNAに関しては、さらにrealtime RT-PCRにより発現変動を精査した。

4) 臨床検体でのメチル化解析:

ゲノム配列よりCpGアイランドを同定し、実際の臨床サンプルにおける当該ゲノム領域のメチル化の頻度を、メチル化特異的PCR (MSP)により精査した。

5) microRNAが制御するターゲットmRNAの同定

同定したmiRNAが実際に発現を制御するターゲットmRNAを、miRNA過剰発現細胞のcDNA マイクロアレイ解析により同定した。さらに、*in silico*解析により当該miRNA結合領域を保持するターゲット遺伝子を予測し、両者の共通遺伝子を、当該microRNAが制御するターゲットmRNA候補として同定した。次に、これらの候補mRNAの発現変動が及ぼす宿主細胞の表現型を、遺伝子機能解析予測と、siRNAノックダウン細胞もしくは過剰発現細胞を用いた各種機能解析により同定した。

6) 動物実験によるmiRNA作用検証

スナネズミ感染モデルにおいて、感染動物胃組織の組織学的解析により、miRNA-210と同定したターゲットmRNAの発現を、*in situ* ハイブリダイゼーション法により精査した。さらに、ターゲットmRNAの表現型である細胞増殖もPCNA染色により確認した。

3. 結果 研究成果

スナネズミにピロリ菌を経口感染させ、9週間後の胃上皮細胞を回収し、miRNAの発現を網羅的に調べたところ、microRNA-210 (miR-210)の発現が顕著に減少していることを確認した。この現象は、ピロリ菌慢性感染者のヒト胃上皮細胞においても観察された。さらには、miR-210の発現は、胃粘膜萎縮や好中球浸潤等の病態悪性度が高いほど減少していることが判明した。さらに研究グループは、miR-210がCpGアイランドと称される、DNAがメチル化を受け易いゲノムDNA領域にコードされており、ピロリ菌感染に起因して本領域のDNAがメチル化されることが、miR-210の発現減少を引き起こすことを見出した。

次に、miR-210の機能解析を行った。miR-210を胃上皮由来の細胞株に発現させると、細胞の増殖抑制が認められた一方で、miR-210の発現を抑制した細胞では増殖が促進された。哺乳動物におけるmiRNAは、標的遺伝子のメッセンジャーRNA (mRNA)の3'末端に位置する非翻訳領域に直接結合することにより、標的遺伝子のmRNAの発現量を抑制することが知られている。miR-210の標的遺伝子を予測するために、胃上皮細胞株にmiR-210を強制的に発現させて、発現が減少する遺伝子をマイクロアレイにより網羅的に調べたところ、28の遺伝子を見出した。このうち12の遺伝子が、miR-210の標的配列を3'末端に位置する非翻訳領域に保有していることが確認された。さらに、これら遺伝子の発現を抑える実験により、細胞増殖における影響を調べた結果、胃上皮細胞の細胞増殖を制御する遺伝子が、*STMN1* (Stathmin1)と*DIMT1* (DIM1 dimethyladenosine transferase 1)であることを明らかにした。この2つの遺伝子は、miR-210によって直接的に制御されていることを別の実験により確認した。これらの結果から、miR-210は*STMN1*と*DIMT1*を直接的に標的とし、胃上皮細胞の増殖を抑制していることが明らかになった。さらに、miR-210の発現が低下しているピロリ菌感染患者の胃上皮では、非感染患者の胃上皮よりも、*STMN1*および*DIMT1*の発現量が増加していることが判明した。*STMN1*は胃がんを始めとするさまざまながん細胞で発現が上昇し、腫瘍形成の早期に重要であると考えられている遺伝子であることから、ピロリ菌の慢性感染によるmiR-210の発現減少は、*STMN1*等を介した腫瘍形成に重要である可能性が示唆された。

4. 考察 まとめ

われわれは、ピロリ菌の感染に応答するmiRNAとして、miR-210を同定した。また、miR-210が*STMN1*と*DIMT1*を直接的な標的とし、細胞の増殖を制御していることを網羅的な方法を用いて示すことに成功した。ピロリ菌の慢性感染によるmiR-210の発現抑制が、胃上皮細胞の異常増殖とともにがん細胞の増殖を育む環境を作る可能性が示唆された。さらに、*STMN1*と同様の胃上皮増殖作用を持つ*DIMT1*の発現も、ピロリ菌慢性感染患者で上昇していたことは、*DIMT1*が新たながん遺伝子である可能性を示唆して

いる。胃病態形成の理解を大きく深めた本研究成果は、ピロリ菌による炎症誘発機構や、胃がん発症の原因解明に役立つことが大いに期待される。今後は、ピロリ菌がどのようにしてmiR-210の発現を調節しているのか、より精細な解析をするとともに、miR-210やSTMN1、DIMT1を利用した胃がん検査や治療へ応用へと展開したい。

最後に、助成金をご支援いただき、研究にクリティカルなコメントをくださった公益財団法人アステラス病態代謝研究会の諸先生や、ご担当の方々に、この場をお借りして御礼申し上げます。

5. 発表論文

Kiga K*, Mimuro H*, Suzuki M, Shinozaki-Ushiku A, Kobayashi T, Sanada T, Kim M, Ogawa M, Iwasaki YW, Kayo H, Fukuda-Yuzawa Y, Yashiro M, Fukayama M, Fukao T, Sasakawa C. Epigenetic silencing of miR-210 increases the proliferation of gastric epithelium during chronic *Helicobacter pylori* infection. Nature Communications 2014 Sep 4;5:4497. doi: 10.1038/ncomms5497. (*: Equal contribution)