

99. ピロリ菌の持続感染と炎症惹起の分子基盤

三室 仁美

Key words : *Helicobacter pylori*, miRNA

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

緒 言

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^{1,2)}. 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^{3,4)}. 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相関している^{4,7)}. 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.

方 法

スナネズミにピロリ菌を経口的に感染させた後に胃を摘出し, 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. ヒト臨床検体の解析は, 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胃粘膜上皮 RNA を抽出して miRNA 特異的 RT-PCR による発現定量データを得た. また, 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. DNA メチル化により発現が変動する miRNA の同定は, DNA メチルトランスフェラーゼ阻害剤である 5-aza-2'-deoxycytidine などの有無による発現変動を, microRNA 網羅的プロファイリング解析に供して精査した. ゲノム領域のメチル化の頻度は, メチル化特異的 PCR (MSP) により精査した. 同定した miRNA が発現を制御する mRNA は, miRNA 過剰発現細胞の cDNA マイクロアレイ解析結果と, *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予測結果から, mRNA 候補を選定した. これらの候補 mRNA の発現変動が及ぼす宿主細胞の表現型は, 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解析した. スナネズミ感染モデルにおける胃組織の miRNA およびターゲット mRNA の発現は, *in situ* ハイブリダイゼーション法で確認した. 胃組織における細胞増殖は PCNA 染色により評価した.

結 果

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。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、miR-210 コード領域の上流には、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 領域があり、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 (図 1 および図 2) ⁸⁾。

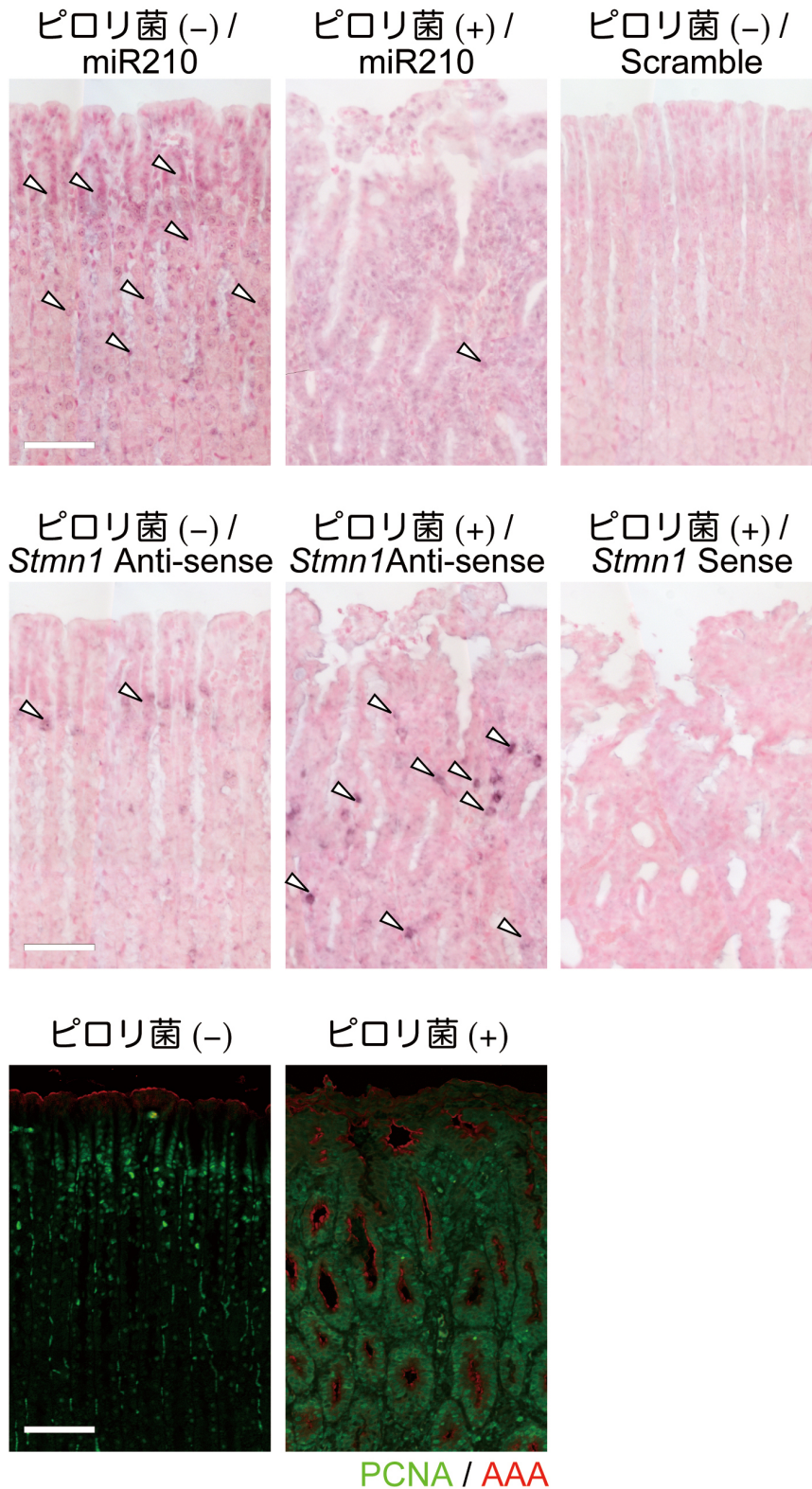


図1. ピロリ菌に感染させたスナネズミ胃粘膜の *miR-210* および *STMN1* の発現.

ピロリ菌が感染すると、*miR-210* の発現が低下し、*STMN1* の発現が上昇した。さらに、異常な細胞増殖が誘導されていることが、PCNA の染色により判明した。AAA は胃腺窩細胞を示す。スケールバーは $100\ \mu\text{m}$ を示す。

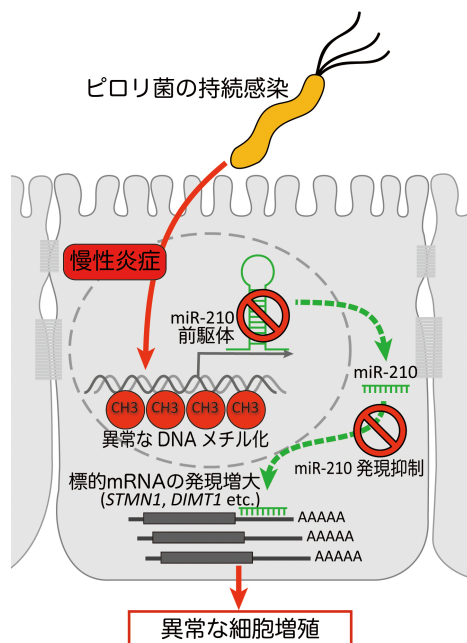


図 2. 本研究の概念図.

ピロリ菌の慢性感染で引き起こされる異常なメチル化によるサイレンシングにより，miR-210 の発現が減少し，それによって標的遺伝子の発現が増大し，異常な胃上皮細胞増殖が引き起こされる。

考 察

本研究では，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，網羅的解析により解明した。ピロリ菌の慢性感染による miR-210 の発現抑制により，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り得る可能性が示唆された。また，機能未知の *DIMT1* は，新たながん遺伝子である可能性が考えられる。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，胃癌発症の原因解明に役立つことが大いに期待される。今後はさらに，ピロリ菌による miR-210 発現調節分子機構を解明する必要がある。

共同研究者

本研究の主たる共同研究者は，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特任助教の氣駕恒太朗博士，ならびに，東京大学名誉教授笹川千尋博士である。本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Blaser, M. J. & Atherton, J. C. : *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J. Clin. Invest.*, **113** : 321-333, 2004.
- 2) Vogelmann, R. & Amieva, M. R. : The role of bacterial pathogens in cancer. *Curr. Opin. Microbiol.*, **10** : 76-81, 2007.
- 3) Backert, S. & Clyne, M. : Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, **16** : 19-25, 2011.
- 4) Kang, G. H., Shim, Y. H., Jung, H. Y., Kim, W. H., Ro, J. Y. & Rhyu, M. G. : CpG island methylation in premalignant stages of gastric carcinoma. *Cancer Res.*, **61** : 2847-2851, 2001.
- 5) Goh, K. L., Chan, W. K., Shiota, S. & Yamaoka, Y. : Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection and public health implications. *Helicobacter*, **16** : 1-9, 2011.
- 6) Baylin, S. B. & Ohm, J. E. : Epigenetic gene silencing in cancer—a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat. Rev. Cancer*, **6** : 107-116, 2006.

- 7) Kim, T. Y., Lee, H. J., Hwang, K. S., Lee, M., Kim, J. W., Bang, Y. J. & Kang, G. H. : Methylation of RUNX3 in various types of human cancers and premalignant stages of gastric carcinoma. *Lab. Invest.*, **84** : 479-484, 2004.
- 8) Kiga, K., Mimuro, H., Suzuki, M., Shinozaki-Ushiku, A., Kobayashi, T., Sanada, T., Kim, M., Ogawa, M., Iwasaki, Y. W., 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. *Nat. Commun.*, **5** : 4497, 2014.