

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590911

研究課題名(和文)ヘリコバクター・ピロリ除菌後胃粘膜のマイクロRNA発現解析による除菌後胃癌の解明

研究課題名(英文)Analysis of microRNA expression in the gastric mucosa after successful eradication of Helicobacter pylori

研究代表者

大野 秀樹 (Ohno, Hideki)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：30396866

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヘリコバクター・ピロリの除菌後に低いながらも胃癌発症のリスクがあることが知られている。本研究ではピロリ除菌成功後患者とピロリ未感染患者の胃粘膜をmiRNAマイクロアレイ法により比較し、いかなるmiRNAの発現異常が除菌成功後にも存在しているかについて検討した。その結果、除菌後胃粘膜においてmiR-155などの発現が未感染者と比較し上昇していた。これらのmiRNAの中には細胞増殖や発癌に関与するとされるものが含まれており、miRNAの発現異常が除菌後胃癌の発症に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The onset of gastric cancer after successful eradication of Helicobacter pylori was reported in recent several studies. We have investigated the dysregulation of micro-RNAs in gastric mucosa of the patients after successful eradication of H. pylori by miRNA microarray. The expression of some miRNAs such as miR-155 were higher in the gastric mucosa of patients after successful eradication than in those not infected with H. pylori. Some of these miRNAs are known to have effects on cell proliferation and carcinogenesis. This result suggests the possibility that the dysregulation of miRNAs in gastric mucosa is involved in the onset of gastric cancer after successful eradication of H. pylori.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 消化器内科学

キーワード：ヘリコバクター・ピロリ 除菌 胃癌 マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

(1) 胃癌予防目的の *H. pylori* 除菌治療

胃癌発症機構に関しては *H. pylori* 感染によって生じた萎縮性胃炎を母地に癌が発生するモデルが提唱されている。以前より *H. pylori* は発癌因子の一つに挙げられていたが、2008年に Fukase らにより早期胃癌治療後の異所性再発が *H. pylori* 除菌に抑制されることが示され、胃癌と *H. pylori* 感染の関連はより明白となった。これを受けて日本ヘリコバクター学会は「*H. pylori* 感染の診断と治療のガイドライン」2009改訂版」の中で、胃癌等の疾患予防目的で全ての *H. pylori* 感染者に対する除菌療法を強く推奨した。これを受けて、近年 *H. pylori* 除菌患者が激増している。

(2) *H. pylori* 除菌後胃癌

除菌によりその後の胃癌発症を抑制できるとされる一方で、除菌後にも一定の確率で胃癌が発見されることがこれまで報告されている (Take et al. *Am J Gastroenterol.* 2005)。しかしながら、除菌後は胃癌にならないという誤解が一般の方に広まっている。このため最近では、除菌後にも胃癌発症のリスクが残ることを説明し、除菌後のフォローアップを徹底させることが学会等でも重要視されている。この除菌後のフォローアップを効果的に行うために、除菌後胃癌の発症危険群を同定し囲い込む手法が有用と考えられる。現在、この発癌リスクを示すバイオマーカーを同定するために、除菌後胃癌の発症機構の解明が求められている。

(3) miRNA と胃炎、胃癌

最近になり miRNA と疾患との関連についての報告が増えている。miRNA は発生、分化のみならず、炎症や発癌などの病態にも関与しているとされる。胃癌においても miRNA の発現異常が認められ、癌遺伝子や癌抑制遺伝子として作用する例が報告されている (WKK Wu et al. *Oncogene.* 2010)。また、*H. pylori* と miRNA の関連を示す報告もみられる (C. Belair et al. *Clin Microbial Infect.* 2009)。しかしながら、*H. pylori* 感染から萎縮性胃炎、腸上皮化生、発癌、また *H. pylori* 除菌という過程で miRNA がどのような発現変化を生じるかについては未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究は *H. pylori* 除菌に伴い生じる胃粘膜の病態変化を明らかにし、除菌後胃癌のリスク評価に有用なバイオマーカーを提示することを目的とした。

(1) *H. pylori* 除菌成功後患者と *H. pylori* 未感染者の胃粘膜を miRNA マイクロアレイ法によって比較検討し、除菌後胃癌の発生母地である胃粘膜上皮における miRNA の発現異常を明らかにする。発現異常を認めた miRNA について、それぞれデータベースを用いその標的遺伝子を明らかにする。

(2) 以上より、除菌後胃癌のリスク評価に

有用なバイオマーカーとしての遺伝子・蛋白発現や遺伝子変異を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) *H. pylori* 除菌と自覚症状の変化

対象

当院にて *H. pylori* 感染診断や除菌治療を行った患者を対象とした。患者背景等は診療録を用い後ろ向きに解析した。

H. pylori 感染診断および除菌治療

日本ヘリコバクター学会ガイドラインに基づき行った。主に *H. pylori* 抗体、尿素呼気試験、便中抗原、鏡検法、迅速ウレアーゼ試験を感染診断用い、2種以上の方法で陰性であったものを *H. pylori* 陰性と診断した。除菌療法は、1次除菌は PPI+AMPC+CAM、2次除菌は PPI+AMPC+MNZ にて行い、約2ヶ月後に尿素呼気試験にて除菌判定を行った。

除菌にともなう自覚症状の解析

除菌前と2か月後に F スケール (Frequency Scale for the Symptoms of GERD) を用い解析した。

(2) *H. pylori* 除菌後の胃粘膜における miRNA の発現異常の解析

H. pylori 感染診断陰性の未感染群と *H. pylori* 除菌成功後群の2群に分け、miRNA マイクロアレイにより胃粘膜における miRNA の発現変化について比較検討した。

対象者からの胃粘膜上皮の採取

当院にて上部消化管内視鏡検査を施行予定の患者の中で、本研究参加に関する同意を得た方を対象とした。採取方法は、上部消化管内視鏡検査時に前庭部小彎と胃体中部小彎より粘膜上皮を生検鉗子により採取した。採取した検体はマイクロアレイに使用する RNA 抽出のために凍結保存した。

除菌後胃粘膜を用いた miRNA マイクロアレイ

採取した胃粘膜検体より total RNA を精製した。次に精製した total RNA を用いて、miRNA マイクロアレイを行った。miRNA の発現異常解析には 3D Gene miRNA チップ (Human_miRNA_V20, TORAY, 東京) を用いた。

マイクロアレイデータ解析

得られた miRNA マイクロアレイデータは、DIANA-mirPath や Target Scan 等のデータベースを用いて、標的遺伝子や制御機能の解析を行った。

4. 研究成果

(1) *H. pylori* 除菌率

解析対象はピロリ菌専門外来において、感染検査と除菌治療を希望した患者であり、除菌対象疾患のほとんどが萎縮性胃炎であった。まず、内視鏡検査によるウレアーゼ試験、鏡検法、血清抗体や便中抗原法等により *H. pylori* 感染診断を行い、陽性者に対し除菌治療を行った。除菌率に関する集計結果は2013年末までの当院での1次除菌成功率75.1%、2次除菌成功率83.8%であった。な

お、今回経過観察中に除菌後胃癌発症例は認められなかった。

(2) *H. pylori* 除菌に伴う消化管症状の変化

次に、除菌成功者における除菌前後での上部消化管症状、特に胃炎や食道炎に伴う自覚症状の変化についての検討を行った。今回は F スケール (Frequency Scale for the Symptoms of GERD) を用いて除菌後の胃酸分泌の回復の影響について検討した。対象は 27 名の除菌成功患者であり、平均年齢は 62.3 (42-85) 歳、男性 16 名、女性 11 名であった。F スケール合計スコアは除菌前 8.7 ± 6.7 (mean \pm SD) から、除菌成功後 4.7 ± 5.2 へ低下していた ($p=0.005$)。症状別に分類すると、酸逆流関連症状スコアは除菌前後で 4.5 ± 3.6 から 2.9 ± 3.5 へ低下し ($p=0.046$)、同様に運動不全症状スコアは 4.1 ± 3.5 から 1.8 ± 2.1 へ低下していた ($p=0.002$)。ただし、年齢別に分類した場合、65 歳未満の患者群では有意に除菌後の F-スケール合計スコアが改善していたものの ($p=0.0028$)、65 歳以上の患者群では有意差を認めず不変であった ($p=0.63$)。

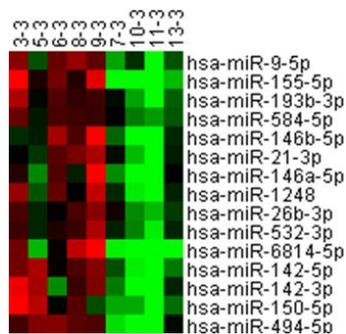
以上より、除菌による胃酸分泌の回復は短期間では症状を増悪させないことが明らかになり、特に高齢者よりも若年者の自覚症状に対して *H. pylori* 除菌はより有効であることが示された。

(3) *H. pylori* 除菌後の miRNA 発現異常

以上のように除菌により胃炎症状の多くは軽快するにも関わらず、除菌後に胃癌を発症する例があることは、何らかの異常が除菌成功後も胃粘膜に残存していることを示唆した。可能性として胃粘膜における遺伝子発現異常を考え、除菌後も残存する発現異常を検討する方針とした。今回は特に miRNA を解析対象とし、マイクロアレイ法による網羅的検索を行った。

上部消化管内視鏡検査の際、研究同意を得た 9 例より胃体部小弯と胃前庭部小弯の胃粘膜の生検検体を採取し、発現解析に用いた。対象者の内訳は *H. pylori* 未感染群が 4 例、*H. pylori* 除菌成功群が 5 例であり、平均年齢は未感染群が 42 歳、除菌成功群が 46 歳であった。なお、今回対象の除菌成功患者における胃炎の内視鏡所見と炎症細胞浸潤の組織所見は、全例除菌前と比較し改善を認めていた。

胃粘膜生検検体から精製した total RNA を用いて miRNA マイクロアレイによる網羅的解析を行った。マイクロアレイの解析結果より、1) 各群で全てのサンプルでシグナルが検出されている、2) $p<0.01$ 、3) 各群の平均値対比で 1.5 倍以上あるいは 0.67 倍以下の変動がある、以上の 3 条件のクライテリアを全て満たす発現変動候補 miRNA をピックアップした。この結果、胃体部粘膜での比較では 19 種、同様に前庭部では 8 種の miRNA がまず抽出された。これらの miRNA 群の多くは、*H. pylori* 未感染群に比べ除菌成功群において発現が上昇していた。



図：胃前庭部粘膜での変動クラスターの一部

これら発現異常を認めた miRNA の中で、さらに変動比が 2 倍以上の遺伝子を絞り込むと、胃前庭部では miR-155-5p、miR-6814-5p、miR-142-5p、miR-494-5p 等が抽出され、胃体部小弯では miR-181b-5p、miR-142-5p、miR-142-3p、miR-150-5p、miR-155-5p、miR-361-5p、miR-3175 等が未感染者群と比較し除菌成功群で変動比 2 倍以上の発現異常を認めた。

また、前述のクライテリアを満たした miRNA について、発現制御に関わるターゲット遺伝子群をデータベース (DIANA-mirPath、Target Scan) により解析した。その結果、miR-155-5p は、今回胃体部と前庭部のいずれでも除菌成功群で発現上昇していた miRNA であったが、大腸癌など発癌に関係するパスウェイ分子との関連性が示唆された。その他、胃体部で発現が上昇していた miR-92a-3p は大腸癌等に関わるシグナル経路と、また前庭部で発現上昇していた miR-193b-3p は DNA 複製や細胞周期に関わるシグナル経路の分子との関連が認められた。その他、miR-181a-5p、miR-222-3p 等が発癌に伴うシグナル伝達分子との関連性が示唆された。

(4) 考察と今後の展望

本研究開始後の 2013 年になり *H. pylori* 感染胃炎患者に対しての除菌療法が保険適応となり、現在除菌患者は激増している。すでに *H. pylori* 除菌により内視鏡的胃炎所見が改善することは知られていたが、今回 F スケールによる検討でも、内視鏡所見のみではなく、胃炎や食道炎症状も多くの場合改善していることが示された。しかし、このように除菌により胃炎が症状、所見ともに改善するにも関わらず、一部の症例では除菌後に胃癌が発症するとされている。

今回、除菌後胃癌発症の解明を目指し、除菌後の胃粘膜に残存する遺伝子発現異常について検討した。特にこれまで詳細には解析されていない除菌後の miRNA の発現異常について検討したが、miRNA マイクロアレイの結果、miR-155-5p 等の miRNA が *H. pylori* 未感染者の胃粘膜と比較し、除菌成功後の患者において発現異常を示していた。これらの発現異常を認めた miRNA の中には細胞増殖や発癌に関与するとの報告がある miRNA が含まれていた。以上より、除菌成功後に胃炎が消退し

た胃粘膜においても、未感染者と比較した場合には miRNA の発現異常が存在しており、この異常が細胞増殖等のシグナルに影響し、除菌後胃癌の発症に関与している可能性が示唆された。

今後の課題として、すでに除菌後 10 年以降での胃癌発症例の報告もあり、より長期間での除菌後の胃粘膜の病態変化に関する解析が必要である。具体的には、除菌後に生じる胃酸分泌能の回復がいかなる影響を胃粘膜に及ぼすかについての病理学的、生理学的検討が要求される。また、今回発現異常が明らかにされた miRNA を中心に、より長期的な遺伝子の発現変動を解明することも必要である。本研究の結果は、除菌後胃癌の高リスク患者群を囲い込むために有用なバイオマーカー解明につながるものと考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

(1)Mashima H, Ohno H, Yamada Y, Sakai T, Ohnishi H: INSL5 may be a unique marker of colorectal endocrine cells and neuroendocrine tumors. *Biochem Biophys Res Commun* 432: 586-592, 2013. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.02.042. 査読有り

〔学会発表〕(計 3 件)

(1)大野秀樹, 篠崎大, 加藤直也: ピロリ菌外来での除菌療法におけるエソメプラゾールとラベプラゾールの比較検討.
第 19 回日本ヘリコバクター学会総会. 2013 年 6 月 28 日 於長崎大学医学部

(2) 大野秀樹, 畑啓介, 水野靖大, 篠崎大, 山下直秀, 加藤直也: 自由診療外来における除菌前後の自覚症状の変化に関する F スケールによる検討.
第 18 回日本ヘリコバクター学会総会(シンポジウム 3). 2012 年 6 月 29 日 於岡山コンベンションセンター

(3)大野秀樹, 水野靖大, 畑啓介, 篠崎大, 加藤直也: 当院における「ピロリ菌外来」の現況.
第 17 回日本ヘリコバクター学会学術集会. 2011 年 6 月 24 日 於富山国際会議場

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
無し

6. 研究組織

(1)研究代表者

大野 秀樹(OHNO Hideki)
東京大学・医科学研究所・助教
研究者番号：30396866

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：