

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590928

研究課題名(和文)NSAID潰瘍のなりやすさとは? : COX2 DNAメチル化へのピロリ菌感染の関与

研究課題名(英文)COX-2 gene promoter methylation in patients infected with Helicobacter pylori.

研究代表者

安田 宏 (Yasuda, Hiroshi)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：80262129

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：COX2はプロスタグランジン産生の鍵酵素である。プロモーター領域にCpG islandが存在しepigeneticな発現制御を受ける可能性がある。各種病態における背景胃粘膜COX2メチル化とその意義を検討した。臨床例での検討ではHP陽性例では陰性例と比べて胃前庭部粘膜のCOX2メチル化が有意に亢進していた。除菌後例ではCOX2メチル化は陽性例と比べて有意に低値であった。COX2が高度にメチル化したヒト胃癌細胞KATO細胞では脱メチル化剤はCOX2発現が回復した。COX-2プロモーター領域はHP感染によりメチル化が亢進していた。HP感染における潰瘍治癒の遷延に關与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：[Aim] COX2 plays a critical role in peptic ulcer development. We evaluated COX2 methylation levels in the gastric mucosa. [Methods] DNA was extracted from endoscopic biopsy materials. The COX2 methylation levels were measured quantitatively by pyrosequencing. COX2 mRNA expression was measured using real-time PCR. [Results] COX2 methylation levels were significantly higher in H.pylori (HP)-positive cases than in HP-negative cases. COX2 methylation levels in patients in whom HP was successfully eradicated were significantly lower than that in HP-positive cases. COX2 mRNA expression was not observed in Kato III cells, despite the addition of the protein kinase C stimulator (PDBu). COX2 expression was observed after the addition of the demethylating agent and was enhanced by PDBu. [Conclusion] HP infection caused a significant increase in the COX2 methylation levels in the gastric mucosa. In addition to transcriptional regulation, COX2 expression is regulated through epigenetic mechanisms.

研究分野：消化器内科学

科研費の分科・細目：上部消化管

キーワード：胃潰瘍 COX-2 DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

NSAID 潰瘍発症にはプロスタグランジン (以下 PG) 産生の鍵酵素である COX が深く関与している。恒常的に発現する COX-1 は健常時の胃粘膜防御に、刺激によって誘導される COX-2 は潰瘍治癒に関連する。COX-2 DNA プロモーター領域には CpG island が存在し、その発現は epigenetic な制御も受ける可能性がある。NSAID が投与され COX-1 の作用が抑制され胃粘膜傷害が起きる際に、COX-2 発現が誘導され代償的に PG を産生すれば、潰瘍発症が回避される可能性があるが、COX-2 発現が DNA メチル化により抑制されていると代償不全に陥り、潰瘍発症に至る可能性があるとの仮説をたて、本研究を立案・計画した。

2. 研究の目的

HP 関連胃疾患における COX-2 DNA メチル化を検討し、病態への関与について、ヒト胃粘膜およびピロリ菌感染のモデル動物であるスナネズミを用いて、*in vivo* および *in vitro* で検討した。

3. 研究の方法

ヒト胃粘膜での検討は、聖マリアンナ医科大学病院にて、2009年3月から2011年12月までの間に、同意取得後に上部内視鏡を施行された114例を対象に行った。スクリーニング胃内視鏡症例、胃十二指腸潰瘍症例、HP除菌例において、胃前庭部胃粘膜を採取し、DNAを抽出した後、バイサルファイト・パイロシーケンス法でDNAメチル化を定量的に解析した。

in vitro 検討は、中～高度 COX-2 DNA メチル化が報告されている、ヒト胃癌細胞株 Kato III 細胞と AGS 細胞を、COX-2 DNA メチル化状態のモデル細胞として用いて、

COX-2 mRNA 発現における COX-2 DNA のメチル化の影響を検討した。胃癌細胞株において、プロテインキナーゼ C (PKC) 刺激剤であるフォルボールエステル_{12,13}の添加により COX-2 mRNA の発現が誘導される報告 (Infect Agent Cancer. 5: 27-41, 2010)があることから、 α -phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu)を用いて検討した。また脱メチル化剤としてメチルトランスフェラーゼ阻害薬である 5-Aza-dC を添加し、COX-2 mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR 法で検討した。同様の検討をスナネズミ胃癌細胞株 MGC1/2 でも行った。HP 感染モデル動物であるスナネズミを用いて、酢酸潰瘍時の HP 感染の有無時の潰瘍辺縁での COX-2 発現を検討した。

4. 研究成果

胃粘膜における COX-2 DNA のメチル化を、HP 陽性例 (n=65) 及び HP 陰性例 (n=30) で比較すると、HP 陽性例で有意に高かった (27.5% vs 8.1%, $p < 0.001$)。また、HP 陽性例には胃炎 (n=26)、胃潰瘍 (n=39) が含まれており、両群間で有意差はみられない ($p = 0.26$) もの、潰瘍例で COX-2 DNA のメチル化が高い傾向にあった (26.7%、28.4%)。HP 陽性の胃潰瘍患者の中で 10 人が NSAID 使用しており、COX-2 DNA メチル化レベルは、非 NSAID 潰瘍患者 (n=29) と比較して有意差はみられなかった (27.9% vs 29.6%, $p = 0.45$)。HP 除菌例 (n=19) と HP 陽性例を比較すると、COX-2 メチル化レベルは HP 除菌例で有意に低かった (18.7% vs 27.5%, $p < 0.001$)。次に、COX-2 DNA メチル化の COX2 mRNA への影響を *in vitro* で検討した。Kato III 細胞及び AGS 細胞の COX-2 mRNA の発現は低値であったが、5-Aza-dC を添加すると、Kato III 細胞では 88% から 65%、AGS 細胞では 45% から 40% に COX-2 DNA のメチル化は低下し、Kato III 細胞 ($p < 0.01$)、AGS 細胞 ($P < 0.05$) 両方で、COX-2 mRNA

の発現は有意に増強した。また、Kato III 細胞においては、5-Aza-dC を添加した後に、PDBu を添加すると、COX-2 mRNA の発現は 5-aza-dC 単独と比べて、有意に増強した (P<0.01)。次に、COX-2 DNA メチル化の COX2 mRNA への影響を *in vitro* で検討した。Kato III 細胞及び AGS 細胞の COX-2 mRNA の発現は低値であったが、5-Aza-dC を添加すると、Kato III 細胞では 88% から 65%、AGS 細胞では 45% から 40% に COX-2 DNA のメチル化は低下し、Kato III 細胞 (p<0.01)、AGS 細胞 (P<0.05) 両方で、COX-2 mRNA の発現は有意に増強した。また、Kato III 細胞においては、5-Aza-dC を添加した後に、PDBu を添加すると、COX-2 mRNA の発現は 5-aza-dC 単独と比べて、有意に増強した (P<0.01)。

次に COX2 メチル化と潰瘍治癒についてスナネズミで検討を試みた。まず DNA walking 法でスナネズミ COX-2 ゲノムのプロモーター領域をクローニングした。すると興味深いことに、ヒトよりも更に豊富な CpG island が認められた。スナネズミ由来胃癌細胞 MGC1/2 細胞を用いて COX-2 プロモーター領域を検索すると CGI にメチル化を認めた。MGC1/2 細胞でも 5-aza-dC 添加により COX-2mRNA 発現が著明に増強した。

HP 感染・非感染スナネズミに酢酸潰瘍を作成して経時的な治癒過程と潰瘍辺縁での COX-2mRNA 発現を検討した。HP 感染スナネズミでは潰瘍治癒は非感染スナネズミと比べて遷延する一方で COX2mRNA 発現は低値であった。

以上、COX-2 プロモーター領域は HP 感染によりメチル化が亢進していた。HP 感染者における潰瘍治癒の遷延に参与している可能性がある。

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 12 件)

1. Michikawa Y, Yasuda H, Watanabe Y, Oikawa R, Ohishi Y, Maehata T, Itoh F. COX-2 gene promoter methylation in patients infected with Helicobacter pylori. Clinical Medicine Insights: Gastroenterology. 2013; 6: 13-19.(査読あり)
2. Watanabe Y, Maeda I, Oikawa R, Wu W, Tsuchiya K, Miyoshi Y, Itoh F, Tsugawa K, Ohta T. Aberrant DNA methylation status of DNA repair genes in breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. Genes Cells 2013, 18 : 1120-1130. (査読あり)
3. Ishigooka S, Nomoto M, Obinata N, Oishi Y, Sato Y, Nakatsu S, Suzuki M, Ikeda Y, Maehata T, Kimura T, Watanabe Y, Nakajima T, Yamano HO, Yasuda H, Itoh F. Evaluation of magnifying colonoscopy in the diagnosis of serrated polyps. World J Gastroenterol 2012;18: 4308-16. (査読あり)
4. Hiraishi T, Watanabe Y, Oikawa R, Hara M, Kiyokawa H, Yoshida Y, Yamada N, Okuse C, Suzuki M, Yotsuyanagi H, Itoh F. A New Detection Method for Integration of Hepatitis B virus DNA in PLC/PRF/5 Cells. Journal of St.Marianna University 3: 63-72, 2012. (査読あり)
5. Okuse C, Yotsuyanagi H, Yamada N, Ikeda H, Kobayashi M, Fukuda Y, Takahashi H, Matsunaga K, Matsumoto N, Okamoto M, Ishii T, Sato A, Koike K, Suzuki M, Itoh F. Change in levels of hepatitis B virus

- in patients positive for low-titer hepatitis B surface antigen. *Hepatol Res* 42: 1236-1240, 2012. (査読あり)
6. Hama R, Watanabe Y, Shinada K, Yamada Y, Ogata Y, Yoshida Y, Tamura T, Hiraishi T, Oikawa R, Sakurai J, Maehata T, Koizumi H, Itoh F. Characterization of DNA hypermethylation in two cases of peritoneal mesothelioma. *Tumor Biol* 33: 2031-2040, 2012. (査読あり)
 7. Oishi Y, Watanabe Y, Yoshida Y, Sato Y, Hiraishi T, Oikawa R, Maehata T, Suzuki H, Toyota M, Niwa H, Suzuki M, Itoh F. Hypermethylation of Sox17 gene is useful as a molecular diagnostic application in early gastric cancer. *Tumor Biol* 33: 383-393, 2012. (査読あり)
 8. 安田宏: プロトンポンプ阻害剤と抗血小板薬 クロピドグレル、プラスグレルの最近の話題・消化器内科の立場から(PPI併用慎重派)、*臨床薬理* 42: 369-373, 2011. (査読なし)
 9. Yasuda H. Safety and efficacy of clopidogrel before surgery. *Clinical Medicine Insights: Therapeutics* 3: 2011: 103-111. (査読あり)
 10. Kinoshita Y, Matsumoto N, Watanabe M, Takeba Y, Yoshida Y, Ohba K, Suzuki S, Itoh F, Kobayashi S. Comparison of the effects of omeprazole and rabeprazole on ticlopidine metabolism in vitro. *J Pharm Sci* 2011, 117: 19-26. (査読あり)
 11. Watanabe Y, Castro RJ, Kim HS, North B, Oikawa R, Hiraishi T, Ahmed SS, Chung W, Cho MY, Toyota M, Itoh F, Estecio MR, Shen L, Jelinek J, Issa JP. Frequent alteration of MLL3 frameshift mutations in microsatellite deficient colorectal cancer. *PLoS One* 2011, 6: e23320. (査読あり)
 12. Baba S, Oishi Y, Watanabe Y, Oikawa R, Morita R, Yoshida Y, Hiraishi T, Maehata T, Nagase Y, Fukuda Y, Nakazawa M, Ishigouoka S, Hattori N, Suzuki H, Toyota M, Niwa H, Suzuki M, Itoh F. Gastric wash-based molecular testing for antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Digestion* 2011, 84: 299-305. (査読あり)
- 〔学会発表〕(計 5 件)
1. 安田宏、渡邊嘉行、伊東文生、COX-2 メチル化と HP 感染、第 8 回日本消化管学会、会長特別企画、2012 年 2 月 10 日、仙台。
 2. 路川陽介、渡邊嘉行、安田宏、NSAID 潰瘍のなりやすさの予測：胃前庭部生検組織からの分子診断。第 81 回日本消化器内視鏡学会ワークショップ、2011 年 8 月 17 日、名古屋。
 3. 安田宏、渡邊嘉行、伊東文生、第 17 回日本ヘリコバクター学会 2011 年 6 月 25 日、富山。
 4. Yasuda H, Watanabe Y, Itoh F. COX-2 hypermethylation in H. pylori-positive NSAID-induced gastric ulcer patients. AGA Research Forum (Chicago), 2011 年 5 月 10 日。
 5. 安田宏、渡邊嘉行、大石嘉恭、佐藤義典、前畑忠輝、伊東文生。NSAID 服用者に対する予防的除菌療法：COX-2 DNA メチル化からみたエビデンス、第 7 回日本消化管学会ワークショップ、2011 年 2 月 19 日、京都。
- 〔図書〕(計 3 件)

1. 門脇孝、永井良三 総編集、カラー版「内科学」、薬物に起因する消化管障害、887-890、西村書店、2012.
2. 浅香正博、編. 「新しい診断と治療のABC 6」, 消化性潰瘍、119-123、最新医学社、2012.
3. Yasuda H, Itoh F, Role of Bile Acids in Carcinogenesis of Gastrointestinal Tract, Malay Chatterjee, Khosrow Kashfi ed., Springer, Cell Signaling & Molecular Targets in Cancer., p109-128, 2011.

研究者番号：

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

安田 宏 (Yasuda, Hiroshi)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：80262129

(2)研究分担者 伊東文生 (Itoh, Fumio)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：90223180

(3)連携研究者

()