

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659365

研究課題名(和文) H. pylori 関連胃発癌過程における CagA と炎症のクロストークの解析

研究課題名(英文) Crosstalk between CagA and inflammation in H. pylori-related gastric carcinogenesis.

研究代表者

辻井 正彦 (Tsujii, Masahiko)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40303937

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000 円、(間接経費) 810,000 円

研究成果の概要(和文)：H. pylori CagAが、エピジェネティック制御による let-7 発現抑制を介して Ras-MAPK 経路亢進に寄与する新たな oncogenic potential を有していることが示唆された。Ras-MAPK 経路の恒常的な活性化は様々な癌腫の重要なシグナルのひとつであることから、let-7 発現制御が胃発癌の予測因子や胃癌の治療標的のひとつとなりうると思われた。

研究成果の概要(英文)：In in vitro experiments, CagA significantly attenuated let-7 expression leading to Ras pathway activation. CagA enhanced c-myc, DNA methyltransferase 3B (DNMT3B) and Enhancer of Zeste homologue 2 (EZH2) expression and attenuated miR-26a and miR-101 expression, which resulted in the attenuation of let-7 expression by histone and DNA methylation. Experiments performed in CagA transgenic mice revealed that c-myc, EZH2 and DNMT3B expression were enhanced and let-7 expression was attenuated to induce Ras oncoprotein expression in the stomach, with no associated inflammation. It is concluded that H. pylori CagA induces aberrant epigenetic silencing of let-7 expression, leading to Ras upregulation.

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：胃癌 ヘリコバクターピロリ CagA

1. 研究開始当初の背景

Helicobacter pylori (Hp)、特に *cagA* 陽性 Hp 感染は、胃発癌を惹起させると考えられており、除菌の発癌予防効果が明らかにされてきている。しかし、慢性胃炎から胃癌までの胃病変の進展過程のうちの除菌による発癌予防が期待できる患者群の選定方法と、除菌の発癌予防が奏功しない病態に対する胃発癌予防方法に関しては、不明な点が多く、その対策は目下の急務である。

2. 研究の目的

本研究では、*CagA transgenic mouse* を作成し、腫瘍形成性、炎症反応、腸上皮化生の発症、粘膜上皮細胞でのシグナル伝達機構・microRNA 発現、DNA/ヒストンメチル化制御を詳細に検討することを目的とした。

3. 研究の方法

全身に *cagA* 遺伝子を強制発現した *CagA transgenic mouse* を作成し、野生型マウスと比較検討した。12 週齢マウスにおいて、胃より microRNA 及び蛋白を抽出し、定量的 PCR 法・ウェスタンブロット法・プルダウンアッセイ法にて解析を行った。また、18 週齢マウスにおいて、胃組織標本を作成し、Ki67 染色、CDX2 免疫染色、Alcian Blue/High Iron Diamine (AB/HID) 染色を行った。さらに、24 週齢、36 週齢、48 週齢、72 週齢マウスにおいて、腫瘍発生の有無を検討した

4. 研究成果

最初にウェスタンブロット法にて、*CagA transgenic mouse* の胃における *CagA* 蛋白の発現を確認した。12 週齢において、胃に腫瘍は認めず、組織学的に明らかな変化は認めなかった。定量的 PCR 法にて、*let-7* の発現は野生型マウスと比較して、有意に低下していた。また、同時に *Ras*、*c-myc*、*EZH2*、*DNMT3B* の発現が誘導されていることを、ウェスタンブロット法にて確認した。また、プルダウンアッセイ法にて、活性型 *Ras* が亢進しており、同時に、*ERK* のリン酸化も亢進していた。これまでの *in vitro* の研究結果と同様に、*CagA* がエピジェネティックな制御機構を介して *let-7* 発現を抑制し、標的蛋白である *Ras* の発現亢進、*MAPK* 経路の活性化を誘導している可能性が示された。

18 週齢のマウスより胃組織標本を作成し、*CagA transgenic mouse* において、野生型マウスと比較して、有意に Ki67 陽性細胞の増加を認めた。このことから、*CagA* 発現に伴い *let-7* 発現抑制を介した細胞増殖シグナルが、結果的に胃粘膜細胞の増殖亢進をもたらしている可能性が示唆された。

胃発癌過程における腸上皮化生の影響や関与の有無については不明な点が多い。腸上皮化生変化に対して、*H. pylori* 菌体の主成分にひとつである *CagA* の関与を検討するため、*CagA transgenic mouse* の胃組織標本を用い

て腸上皮化生の有無を検討した。腸上皮化生の代表的なマーカーである CDX2 は mRNA レベル、蛋白レベルともに発現していなかった。腸の粘液形質を調べるため、AB/HID 染色を行ったが、やはり *CagA transgenic mouse*、野生型マウスともに染色陽性杯細胞を認めなかった。このことから、*CagA* 発現は腸上皮化生の発生に関与しないことが示唆された。

18 週齢、24 週齢、36 週齢の *CagA transgenic mouse* では、腫瘍形成を認めなかったが、48 週齢、72 週齢の *CagA transgenic mouse* では、全身に腫瘍形成を認めた。特にリンパ系腫瘍の発生が目立った。

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 28 件)

1. Mukai A, Iijima H, H, Nishida T(15),

Tsujii M(16), Takehara T(17). 12名削除

Regulation of anergy-related ubiquitin E3 ligase, GRAIL, in murine models of colitis and patients with Crohn's disease. *J Gastroenterol.* in press

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24356810>

2. Hiyama S, Iijima H, Tsujii M(20),

Takehara T(21). 17名削除 Peyer's Patches

Play a Protective Role in Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug-induced Enteropathy in Mice. *Inflamm Bowel Dis.* in press

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24651581>

3. Inoue T, Iijima H, Nishida T(10), Tsujii M(12), Takehara T(13). 8名削除

Amelioration of small bowel injury by switching from nonselective nonsteroidal anti-inflammatory drugs to celecoxib in rheumatoid arthritis patients: a pilot study. *Digestion.* 89, 2014, 124-132

doi: 10.1159/000357229

4. Inoue T, Nishida T, Iijima H(12), Tsujii M(13), Takehara T(14). 9名削除
Clinical features of post-polypectomy bleeding associated with heparin bridge therapy. *Dig Endosc.* 26,2014,243-249
doi: 10.1111/den.12123
5. Saito Y, Nishida T, Iijima H(10), Tsujii M(11), Takehara T(12). 7名削除
Esophageal pyogenic granuloma developed after short-term follow-up. *Dis Esophagus.* 26,2013,343-344
doi: 10.1111/j.1442-2050.2012.01351.x.
6. Fujinaga T, Nishida T, Iijima H(12), Tsujii M(13), Takehara T(14). 9名削除
Acute suppurative pancreatic ductitis associated with pancreatic duct obstruction. *Endoscopy.* 45,2013,E135
doi: 10.1055/s-0032-1326450
7. Kawai S, Nishida T, Iijima H(11), Tsujii M(12), Takehara T(14). 9名削除
Choroidal and cutaneous metastasis from gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol.* 19, 2013,1485-1488
doi: 10.3748/wjg.v19.i9.1485
8. Shinzaki S, Iijima H(3), Tsujii M(11), Takehara T(17), 14名削除.
Lectin-based immunoassay for aberrant IgG glycosylation as the biomarker for Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 19,2013,321-331
doi: 10.1097/MIB.0b013e318280eade
9. Yamamoto S, Nishida T, Iijima H(10), Tsujii M(11), Takehara T(12). 7名削除
Evaluation of endoscopic ultrasound image quality is necessary in endosonographic assessment of early gastric cancer invasion depth. *Gastroenterol Res Pract.* 2013, 194530
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=endosonographic+assessment+of+yamamoto+s>
10. Hayashi Y, Tsujii M, Nishida T(9), Iijima H(10), Takehara T(14). 9名削除
CagA mediates epigenetic regulation to attenuate let-7 expression in *Helicobacter pylori*-related carcinogenesis. *Gut.* 62,2013,1536-1546
doi: 10.1136/gutjnl-2011-301625
11. Kato M, Nshida T, Iijima H(17), Tsujii M(18), Takehara T(19). 14名削除
Scheduled endoscopic surveillance controls secondary cancer after curative endoscopic resection for early gastric cancer: a multicentre retrospective cohort study by Osaka University ESD study group. *Gut.* 62, 2013,1425-1432
doi:10.1136/gutjnl-2011-301647
12. Tsujii Y, Nishida T, Iijima H(11), Tsujii M(12), Takehara T(13). 8名削除
Mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma of the esophagus. *Dis Esophagus.* 26,2013,349-350
doi: 10.1111/j.1442-2050.2012.01387.x
13. Nishida T, Iijima H(11), Tsujii M(14), Takehara T(15). 11名削除
Managing hepatitis B virus carriers with systemic chemotherapy or biologic therapy in the outpatient clinic. *Hepatol Res.* 43,2013,339-346
doi: 10.1111/j.1872-034X.2012.01073.x.

14. Tawara S, Nishida T(3), Iijima H(7), Tsujii M(8), Takehara T(9). 4名削除
Post-transplant lymphoproliferative
disorder of the ileum diagnosed by
double-balloon enteroscopy.
Endoscopy 45,2013,E380-381
doi: 10.1055/s-0033-1344828

15. Yoshio T, Nishida T, Iijima H(10),
Tsujii M(14), Takehara T(15). 10名削除
Gastric ESD under Heparin Replacement at
High-Risk Patients of Thromboembolism Is
Technically Feasible but Has a High Risk of
Delayed Bleeding: Osaka University ESD
Study Group. Gastroenterol Res Pract.
2013,365830
doi: 10.1155/2013/365830

16. Hiyama S, Iijima H, Nishida T(9),
Tsujii M(10), Takehara T(11). 6名削除
Narrow band imaging with magnifying
endoscopy for Peyer's patches in patients
with inflammatory bowel disease.
Digestion. 87, 2013,269-280
doi: 10.1159/000349953

17. Nakabori T, Nishida T(4), Iijima H(5),
Tsujii M(5), Takehara T(10). 6名削除
Atypical duodenal ulcer and invagination
caused by a large pedunculated duodenal
Brunner's gland hamartoma. Gastrointest
Endosc. 79,2013,679-680
doi: 10.1016/j.gie.2013.11.002

18. Yamamoto S, Nishida T, Tsujii M,
Takehara T(11番目)7名削除. Epstein-Barr
virus-associated early gastric cancer
presenting as an elevated lesion.Endoscopy.
2012, E222-223

doi: 10.1055/s-0032-1309353

19. Shinzaki S, Iijima H, Tsujii M(10番目),
Takehara T(14番目),12名削除. Altered
oligosaccharide structures reduce colitis
induction in mice defective in
-1,4-galactosyltransferase.Gastroenter
ology. 142, 2012,1172-1182
doi: 10.1053/j.gastro.2012.02.008.

20. Yamamoto S, Tsujii M(9番目), Takehara
T(14番目)11名削除. Protective role of
adiponectin against ethanol-induced
gastric injury in mice. Am J Physiol
Gastrointest Liver Physiol. 302, 2012,
G773-780
doi: 10.1152/ajpgi.00324.2011.

21. Inoue T, Iijima H, Nishida T, Tsujii
M(15番目), Takehara T(18番目)13名削除.
Deficiency of N-acetylgalactosamine in
O-linked oligosaccharides of IgA is a novel
biologic marker for Crohn's disease.
Inflamm Bowel Dis. 18,2012,1723-1734
doi: 10.1002/ibd.22876.

〔学会発表〕(計 11件)

1. 辻井正彦, 近藤純平, 赤坂智史, 林
義人, 金 瑛, 加藤元彦, 山本俊祐,
井上拓也, 山田拓哉, 西田 勉, 渡部
健二, 飯島英樹, 竹原徹郎.
Cyclooxygenase-2 の癌幹細胞パイオロ
ジー、DNA 異常メチル化に及ぼす影響。
ワークショップ; 消化管がん分子病態
診断学の進歩. 第8回日本消化管学会,
2012, 仙台.
2. 加藤元彦, 西田 勉, 山本克己, 北村
信次, 由雄敏之, 中村剛之, 小森真人,
河相直樹, 西原彰浩, 中西文彦, 中原
征則, 荻山秀治, 木下和郎, 辻井正彦,
竹原徹郎. ESD後の適切なフォローアッ
プ方法 ~多発胃癌に対するサーベイ
ランスの観点から~ ESD フォーラム;
Where is our destination? 第8回日本
消化管学会, 2012, 仙台.
3. 井上拓也, 辻井正彦, 竹原徹郎. ヘパ
リン置換療法下での大腸内視鏡的粘膜
切除後出血の検討. シンポジウム; 抗

凝固薬・抗血小板薬服用患者の内視鏡診療を検証する. 第 83 回日本消化器内視鏡学会総会, 2012, 東京.

4. Kato M, Tsuji M, Takehara T.
Long-term outcomes of ESD for patients with early gastric cancer and liver cirrhosis: a multicenter study by Osaka University ESD Study Group. 2012 Digestive Disease Week and the Annual Meeting of the American Society for Gastrointestinal Endoscopy. 2012 May 19-22; San Diego, USA.
5. Hiyama S, Nishida T, Tsuji M, Takehara T. Narrow band imaging with magnifying endoscopy for Peyer's patches in patients with inflammatory bowel disease. 2012 Digestive Disease Week and the Annual Meeting of the American Society for Gastrointestinal Endoscopy. 2012 May 19-22; San Diego, USA.
6. Kondo J, Nishida T, Watabe K, Tsuji M, Takehara T. Role of DNA methylation on epithelial mesenchymal transition (EMT)-like phenotype of colon cancer cells. 2012 Digestive Disease Week and the 113rd Annual Meeting of the American Gastroenterological Association. 2012 May 19-22; San Diego, USA.
7. Inoue T, Iijima H, Tsuji M, Takehara T. Clinical features of late bleeding associated with heparin replacement after endoscopic resection for colorectal neoplasms. 2012 Digestive Disease Week and the 113rd Annual Meeting of the American Gastroenterological Association. 2012 May 19-22; San Diego, USA.

〔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

辻井 正彦 (TSUJII MASAHIKO)
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号 : 40303937

(2) 研究分担者

竹原 徹郎 (TAKEHARA TETSUO)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号 : 70335355
飯島 英樹 (IIJIMA HIDEKI)
大阪大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号 : 90444520
西田 勉 (NISHIDA TSUTOMU)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号 : 20467575

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

〔図書〕(計 0 件)