

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461605

研究課題名(和文) 小児期の慢性消化管炎症から消化器癌への進展に関与するDNAメチル化異常の解析

研究課題名(英文) DNA methylation of microRNA genes in gastrointestinal mucosa from pediatric patients with chronic gut inflammation

研究代表者

杉山 佳子(中山佳子)(Sugiyama(Nakayama), Yoshiko)

信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・講師

研究者番号：20600498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヘリコバクター・ピロリ菌感染および潰瘍性大腸の小児患者を対象に、miR124aのメチル化異常をMethylation Specific-PCR(MSP)法を用いて定量的に測定した。  
小児のヘリコバクター・ピロリ菌感染のある胃粘膜では、全例でメチル化レベルは軽度であるが上昇し、除菌後の症例では低下していた。  
小児の潰瘍性大腸炎の直腸粘膜では、罹病期間や活動性に関係なく、メチル化レベルは低かった。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the methylation status of miR124a in pediatric patients with Helicobacter pylori infection or ulcerative colitis.  
The prevalence of methylation of gastric mucosa was greater in patients with active Helicobacter pylori gastritis and decreased after eradication therapy.  
In the rectal mucosa with ulcerative colitis in children, the methylation level was not increased irrespective of disease duration or clinical severity.

研究分野：小児消化器

キーワード：methylation Helicobacter pylori ulcerative colitis epigenetic

### 1. 研究開始当初の背景

慢性消化管炎症はエピジェネティック異常を誘発し、消化器癌発症に主要な役割を果たすことが近年明らかにされた。炎症の持続期間と発癌リスクは相関し、小児期に慢性消化管炎症を発症した患者は、発癌の高リスク群と考えられている。本研究はヘリコバクター・ピロリ菌感染と潰瘍性大腸炎の小児を対象とし、これまでわが国の小児科領域で十分に研究されることのなかった、消化器癌の進展に影響する消化管粘膜の DNA メチル化異常の解析を目的としたものである。加齢・生活習慣による影響が少ない小児の研究は、慢性炎症によるエピジェネティック異常を純粹に反映し、この領域の研究に新たな知見をもたらす可能性がある。そして将来の消化器癌の予防、リスクを層別化した検診プログラムの構築や患者の生命予後の改善に寄与することが期待される。

### 2. 研究の目的

ヘリコバクター・ピロリ菌感染のある小児の胃粘膜生検組織を用いて、わが国の成人で胃癌との関連が指摘されている DNA メチル化異常を評価し、小児期に発癌の素地となるエピジェネティックな変化がどの程度進行しているかを明らかにする。さらに臨床像、内視鏡所見、病理組織所見との関連についても解析する。除菌治療前・後に DNA メチル化異常がどのように変化するかを検討する。潰瘍性大腸炎の小児例において、炎症のある直腸粘膜における DNA メチル化異常を定量的に評価し、治療後の寛解期との比較を行う。潰瘍性大腸炎関連大腸癌の予防という観点から、リスクを層別化した潰瘍性大腸炎関連腫瘍の早期発見のための検診プログラムを考案したい。

### 3. 研究の方法

ヘリコバクター・ピロリ菌感染と胃粘膜 DNA メチル化異常に関する検討

対象症例は小児期に、消化器症状があり内視鏡検査によってヘリコバクター・ピロリ菌感染による慢性胃炎を認める患者、および中学生のピロリ菌検診の陽性者のうち除菌治療を希望し内視鏡検査を施行した症例、除菌治療後に十二指腸潰瘍の治癒または胃炎の改善の確認のため内視鏡検査を行なった患者のうち、本研究への同意が得られた症例である。ヘリコバクター・ピロリ菌の感染は、除菌治療前の症例では培養検査が陽性であること、除菌後の症例では病理組織、尿素呼吸試験、便中抗原が陰性であることから除菌成功の判定を行なった。

内視鏡検査時に慢性胃炎を有する胃前庭部から生検組織を採取し、DNA を抽出した。今回、microRNA (miR) 124a-3 遺伝子を標的として、Methylation Specific-PCR (MSP) 法を用いてメチル化異常を評価した。

潰瘍性大腸炎と直腸粘膜 DNA メチル化異

### 常に関する検討

対象症例は小児期発症の潰瘍性大腸炎で、潰瘍性大腸炎の診断もしくは定期検査として大腸内視鏡検査を施行した患者のうち、本研究への同意の得られた症例の直腸から生検組織を採取、DNA を抽出した。潰瘍性大腸炎関連腫瘍における癌抑制遺伝子として知られる *miR124a* 遺伝子 (Koukos G, et al. Gastroenterol 2013) の DNA メチル化異常を MSP 法で評価した (図 1、2、3)。

図 1a Amplification chart1 メチル化

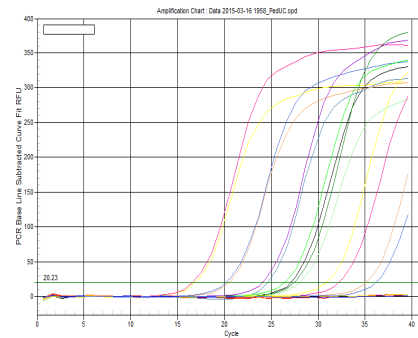


図 1b Amplification chart1 アンメチル

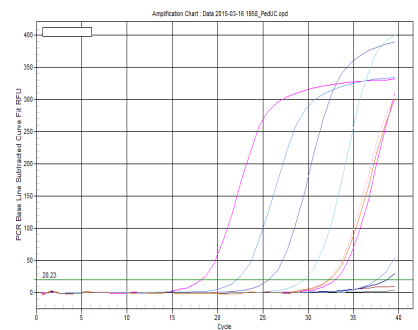


図 3

図 2a メチル化レベル

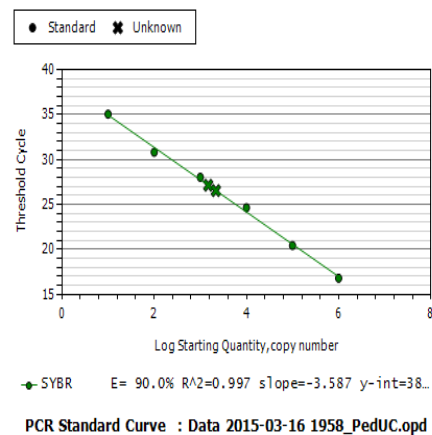


図 2b メチル化レベル

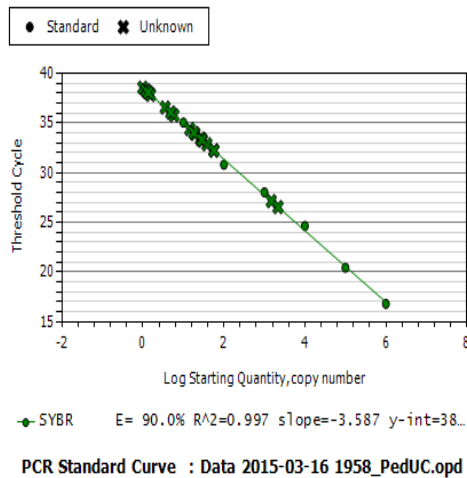


図 3a アンメチル化レベル

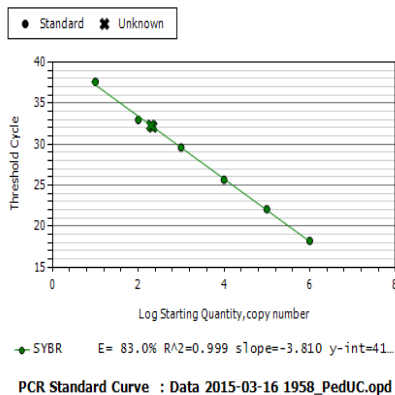
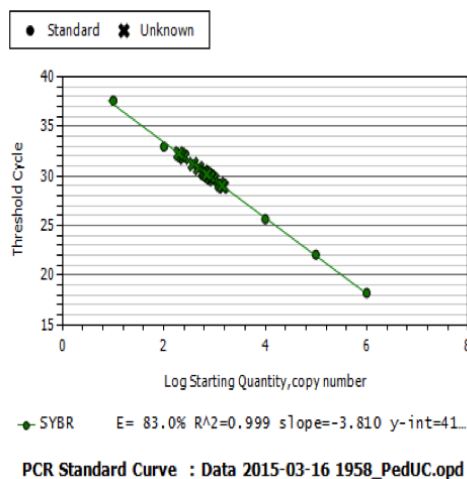


図 3b アンメチル化レベル



#### 4. 研究成果

##### ヘリコバクター・ピロリ菌感染

除菌治療前および除菌治療2か月後までの症例(8例、年齢中央値12.5歳、男性5例)において、ごく軽度のメチル化を認めた(中央値4.2、レンジ2.8-6.4)。対象症例のうち、2例に十二指腸潰瘍、全例に慢性胃炎(前庭

部結節性胃炎を含む)の内視鏡所見を認めた。除菌前の症例の病理組織所見は、前庭部に活動性炎症を認めたものの、高度の胃粘膜萎縮はなく、腸上皮化生は認めなかった。除菌後4ないし10年を経過した2例におけるメチル化レベルは、それぞれ0.1、0.8であった。がん抑制作用がある*miR124a*遺伝子がDNAメチル化により不活化されることで、胃がん発生の素地を形成することが日本の成人の研究で報告されている(Ando T, et al. Int J Cancer 2009)。少ない症例数の検討であるものの、思春期の除菌治療が将来の発癌に予防的に作用する可能性を示唆していると考えられた。一方、成人では十二指腸潰瘍から胃がんの発症が少ないとされている(Uemura N, et al. N Engl J Med 2001)。今回、小児期に十二指腸潰瘍を合併した2症例において、メチル化レベルは軽度上昇していた。小児期に十二指腸潰瘍を発症した症例の発癌のリスクについては、さらなる検討が必要であると考えられた。近年、中学生における胃がん予防を目的としたヘリコバクター・ピロリ菌スクリーニング検査と除菌治療が、一部の自治体において行なわれている。当研究は、症状があり内視鏡検査を施行した症例を原則として対象としており、無症状の小児において同様のメチル化異常があるかについては、本研究の結果からは明らかではない。

##### 潰瘍性大腸炎

小児期発症潰瘍性大腸炎患者の、直腸粘膜のメチル化異常を4例(中央値14.5歳、罹病期間中央値27.5ヶ月、男性3例、全て全大腸炎型)で検討した。いずれの症例も潰瘍性大腸炎関連腫瘍の合併は大腸内視鏡検査で観察した限りではなく、非癌部直腸粘膜で評価した。メチル化レベルは中央値0.1(0-0.2)、罹病期間および大腸粘膜の炎症の活動性の程度に関わらずメチル化のレベルは低かった。colitic cancerのハイリスク症例を、今回の検討から予想することは難しいと考えられた。治療との関係については、およそ半数の症例においてアザチオプリン、抗TNF抗体などの免疫調節薬を使用していた。近年、Toiyamaらは、小児と成人の潰瘍性大腸炎症例における直腸粘膜のメチル化異常を複数の遺伝子を含むパネルを用いて検討し、メチル化レベルが年齢、炎症の期間に応じて高いこと、潰瘍性大腸炎関連腫瘍の合併例において高いこと、*miR137*遺伝子のメチル化が潰瘍性大腸炎関連腫瘍合併の独立した危険因子であることを報告している(Toiyama Y, et al. Gastroenterology 2017)。小児においては、今後さらに症例数を増やし、*miR124*遺伝子以外の遺伝子のメチル化の検討を含めさらなる検討が必要であると考えられた。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

杉山(中山) 佳子

(SUGIYAMA(NAKAYAMA),

Yoshiko)

信州大学・学術研究院医学系(医

学部附属病院)・講師

研究者番号: 20600498

(2)研究分担者

坂下 一夫 (SAKASHITA, Kazuo)

信州大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号: 10345746

日高 奈緒 (HIDAKA, Nao)

信州大学・医学部附属病院・医員

研究者番号: 30626023

加藤 沢子 (KATO, Sawako)

信州大学・医学部附属病院・助教(診療)

研究者番号: 80762814

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

草刈 麻衣 (KUSAKARI, Mai)

信州大学・医学部附属病院・医員

研究者番号: なし