

平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19317

研究課題名(和文)オートファジーに着目したH.pyloriによる胃がん発生メカニズムの解明

研究課題名(英文)Gastric carcinogenesis by autophagy impairment via Helicobacter pylori infection

研究代表者

南條 宗八(Nanjo, Sohachi)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号：70649285

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：1) MAP1LC3A遺伝子がプロモーター領域のDNAメチル化で制御されていること、2) そのDNAメチル化はHelicobacter pylori感染によって、胃粘膜に誘導されること、3) ラット正常胃粘膜細胞の実験において、map1lc3a遺伝子をノックダウンすると、オートファジーが誘導される環境(血清なし)で、細胞増殖能、遊走能、浸潤能が亢進することを示した。以上から、Helicobacter pylori感染はMAP1LC3Av1のメチル化サイレンシングによりオートファジーを破綻させ、胃がんを促進することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：This study showed the followings; 1) MAP1LC3A gene is regulated by DNA methylation of its promoter region, 2) The DNA methylation is induced by Helicobacter pylori infection in the stomach, 3) Knock-down of map1lc3a gene increases cell proliferation, migration and invasion. Therefore, Methylation silencing of MAP1LC3Av1 is induced by H. pylori infection, and may impair autophagy, facilitating gastric carcinogenesis.

研究分野：慢性炎症発がん

キーワード：胃がん オートファジー DNAメチル化

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19(共通)

1. 研究開始当初の背景

A. *H. pylori* 感染者のうち約 1 割の胃がん発生者を予測できない
H. pylori 感染は胃粘膜に DNA メチル化異常を誘発し、胃がんの主な原因となる。しかし、胃がんは *H. pylori* 感染者の約 1 割にしかならず、現時点では胃がん発生者と非発生者を事前に予測できない。胃がん高リスク患者同定のため、*H. pylori* による胃がん発生メカニズムの解明が必要である。

B. *H. pylori* 感染によるオートファジー関連遺伝子 *MAP1LC3A* のメチル化サイレンシング
DNA メチル化異常が遺伝子のプロモーター領域に生じると転写が抑制され (メチル化サイレンシング)、重要な腫瘍抑制遺伝子で生じると胃がん発生に寄与する (1)。また、オートファジー関連遺伝子 *MAP1LC3A* のメチル化サイレンシングはがん細胞で高頻度である (2)。
我々は、*H. pylori* 感染胃粘膜と非感染胃粘膜それぞれ 8 検体をメチル化アレイ (HumanMethylation450K, Illumina) で解析し、*MAP1LC3A* が *H. pylori* 感染胃粘膜で有意に高メチル化状態であることを確認した ($P=0.003$, t 検定、図 1)。

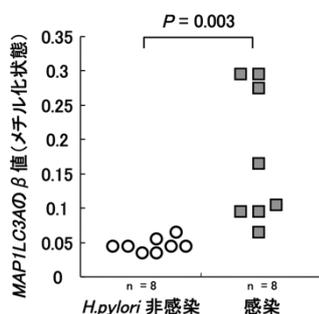


図1. *H. pylori* 感染による高メチル化

C. 胃がん患者の *H. pylori* 株がオートファジー誘導能を持つ
オートファジーは、活性酸素種などの DNA 損傷により誘発され、DNA を守る働きがある。我々は、*H. pylori* 感染している胃がん患者 1 人と非がん患者 2 人から *H. pylori* を分離培養しラット正常胃上皮細胞に感染させたところ、病原タンパクである CagA や VacA は共に陽性であるにもかかわらず、胃がん患者から分離した *H. pylori* 株だけがオートファジーを誘導した (LC3 I 型が II 型に変換された、図 2)。つまり、胃がん患者から分離した *H. pylori* 株だけがより強い病原性をもち、オートファジー誘導能をもつ可能性が示唆された。

D. オートファジー誘導には MAP1LC3A が必要である

我々は、ラット正常胃粘膜細胞で *MAP1LC3A* をノックダウンし、オートファジー誘導能を持つ *H. pylori* 株を感染させたところ、ノックダウン細胞ではオートファジーが誘導されなかった (図 2)。つまり、オートファジーには MAP1LC3A が必須であり、MAP1LC3A を発現していない細胞はオートファジー機構が働かないために DNA 損傷が蓄積しやすく、発がん高リスクであることが示唆された。

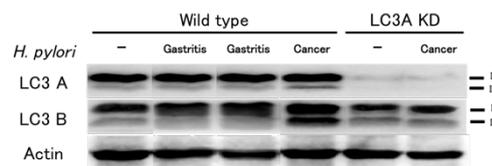


図2. 胃がん患者由来 *H. pylori* はオートファジー誘導能を持つが、LC3A KD細胞ではオートファジーは誘導されない

2. 研究の目的

A. *H. pylori* 感染胃粘膜および胃がん組織で特異的に *MAP1LC3A* が高メチル化され、発現低下していることを定量的メチル化特異的 PCR と RT-PCR で解明する。
B. オートファジー機構の破綻が細胞増殖能、遊走能、浸潤能を高めることをラット正常胃粘膜細胞株の *MAP1LC3A* ノックダウンにより解析する (図 3)。

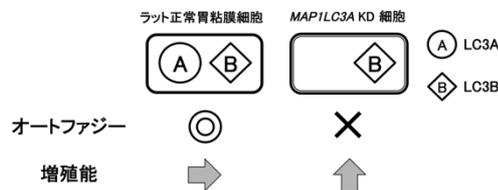


図3. オートファジー機構の破綻が増殖能を高める

3. 研究の方法

41 人の胃がん患者、11 人の健常者 (8 人の *H. pylori* 未感染者、3 人の *H. pylori* 感染者) から、胃粘膜を内視鏡的に採取した。メチル化状態と mRNA 発現はメチル化アレイ、定量的メチル化特異的 PCR (qMSP)、定量的 RT-PCR (qRT-PCR) で解析された。機能解析 (増殖、遊走、浸潤) はラット正常胃粘膜細胞で行われた。遺伝子ノックダウンは siRNA で行われた。オートファジーは LC3A/B のウェスタンブロッティングで評価された。

4. 研究成果

メチル化アレイ解析の結果、34 個のヒトのオートファジー関連遺伝子のうち、*MAP1LC3A variant1 (MAP1LC3Av1)* と *ULK2* の 2 遺伝子が、胃がん組織と *H. pylori* 感染

胃粘膜で特異的にメチル化している遺伝子として同定された(図4)。AGS、MKN45の2種の胃癌細胞株でメチル化状態と mRNA 発現レベルを qMSP と qRT-PCR で調べると、*MAP1LC3Av1* が2種の細胞株ともに高メチル化状態かつ低発現であった(図5、図6)。さらに、脱メチル化処理により、2種の細胞株ともに *MAP1LC3Av1* が脱メチル化され、かつ発現が回復した(図7)。このことは、*MAP1LC3Av1* 遺伝子がプロモーター領域の DNA メチル化で発現がコントロールされていること(メチル化サイレンシング)を証明している。

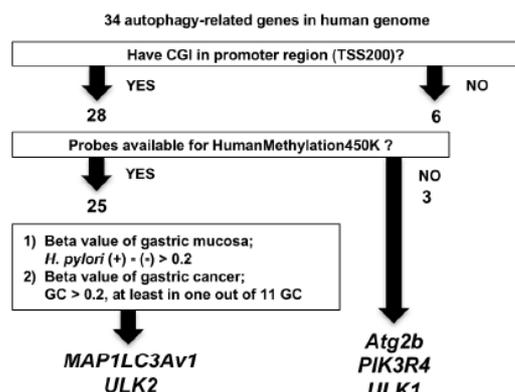


図4. オートファジー関連遺伝子のメチル化アレイ

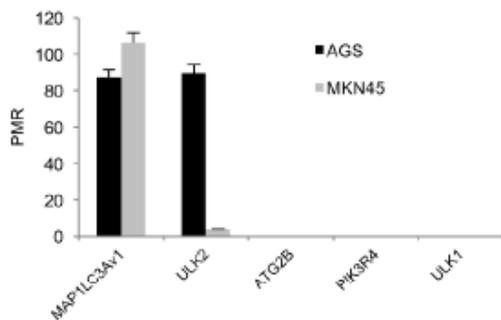


図5. 胃癌細胞株でのメチル化状態

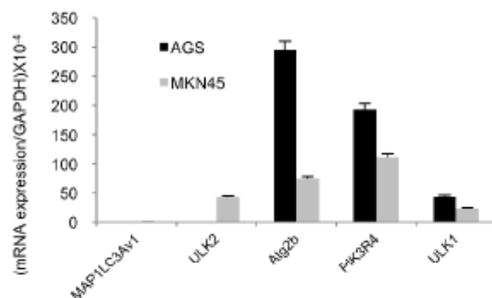


図6. 胃癌細胞株での mRNA 発現

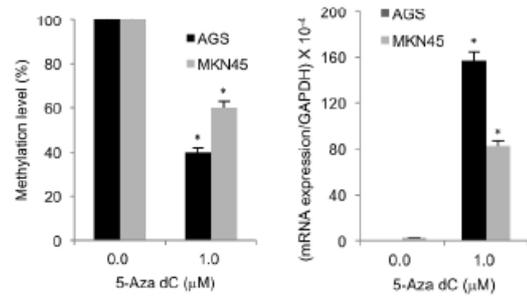


図7. 脱メチル化処理による発現回復

ラット正常胃粘膜細胞で、*MAP1LC3Av1* のラット相同遺伝子である *map1lc3a* をノックダウンすると、LC3A または LC3B タンパクの I 型から II 型への変換が抑制された。つまり、オートファジー機構は破綻した。(図8、図9)

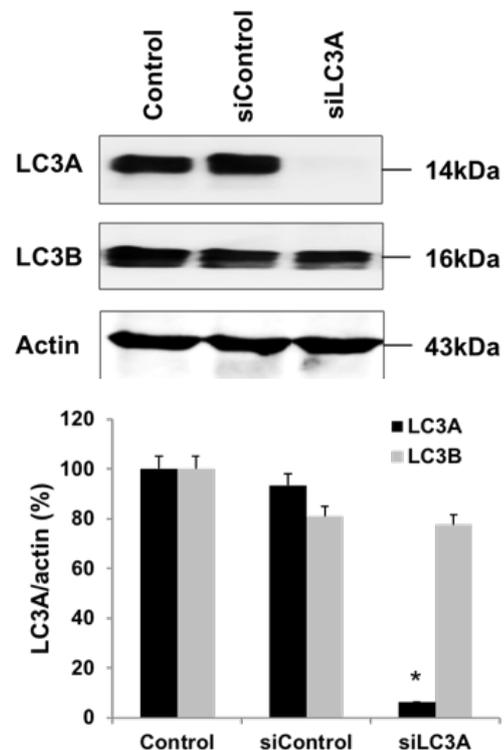


図8. LC3A ノックダウンの確認

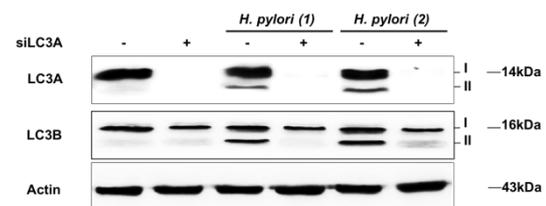


図9. LC3A ノックダウン細胞でのオートファジー機構の破綻

また、LC3A ノックダウン細胞では、細胞増殖能、遊走能、浸潤能が亢進した(図 10)。

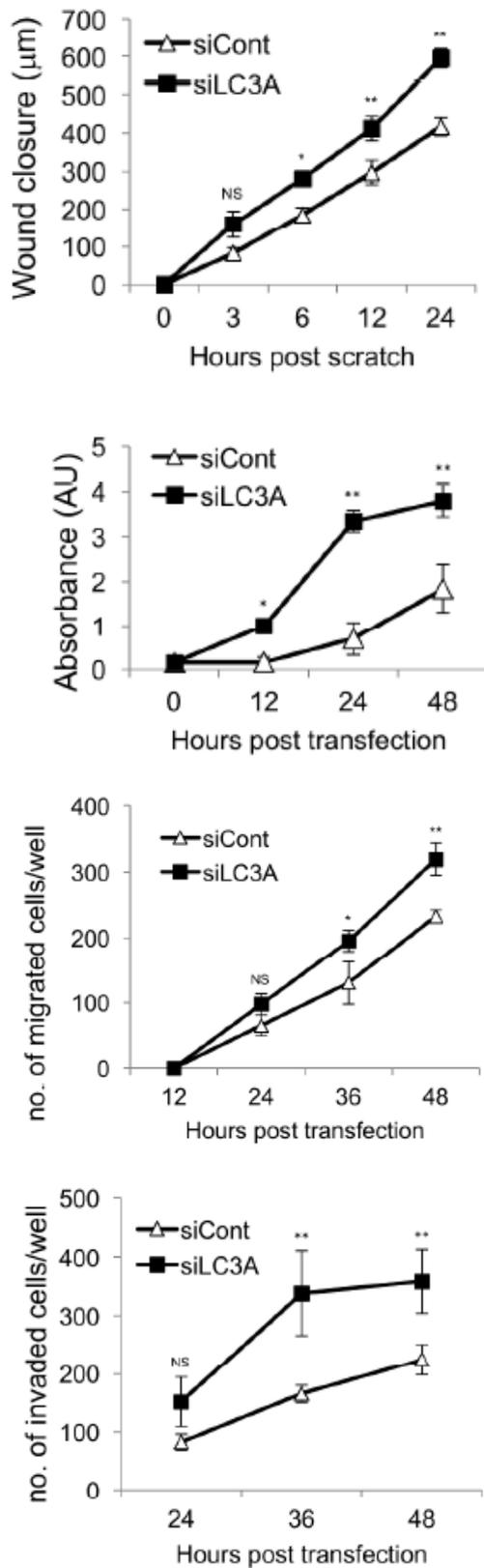


図 10. LC3A ノックダウン細胞での増殖能、遊走能、浸潤能の亢進

更に、胃癌組織の 23.3%、*H. pylori* 感染非胃癌粘膜の 40%で *MAP1LC3Av1* がメチル化サイレンシングされていた(表 1、図 11)。

	<i>H. pylori</i> -uninfected mucosa (n=5)	<i>H. pylori</i> -infected	
		non-cancerous (n=30)	cancerous (n=30)
Methylated	0% (0)	70% (21)	50% (15)
Methylation-silenced	0% (0)	40% (12)	23.3% (7)

表 1. 臨床検体でのメチル化頻度

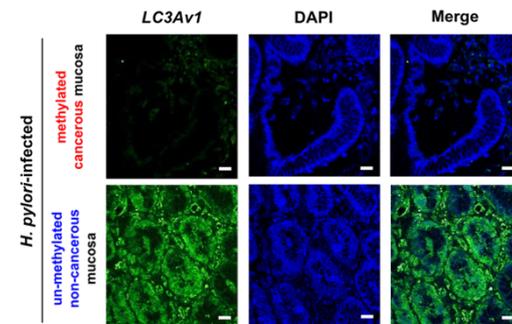


図 11.

以上から、*H. pylori* 感染は *MAP1LC3Av1* のメチル化サイレンシングによりオートファジーを破綻させ、胃癌を促進する。

<引用文献>

- Ushijima T. Epigenetic field for cancerization. *J Biochem Mol Biol.* 2007 40(2):142-50.
- Bai H, Inoue J, Kawano T, Inazawa J. A transcriptional variant of the LC3A gene is involved in autophagy and frequently inactivated in human cancers. *Oncogene.* 2012 31(40):4397-408.

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)

Muhammad JS, Nanjo S, Ando T, Yamashita S, Maekita T, Ushijima T, Tabuchi Y, Sugiyama T. Autophagy impairment by *Helicobacter pylori*-induced methylation silencing of *MAP1LC3Av1* promotes gastric carcinogenesis. *International Journal of Cancer.* 2017, 15;140(10):2272-2283.

[学会発表] (計 3 件)

- ① 南條宗八、ジブラン・スアレー・ムハンマド、安藤孝将、杉山敏郎. ヘリコバクター・ピロリ感染はDNAメチル化によりオートファジーを破綻させ、胃発がんを促進する. 第23回日本ヘリコバクター学会学術集会, 2017年.
- ② Sohachi Nanjo, Jibrán Sualeh Muhammad, Takayuki Ando, Toshiro Sugiyama. Helicobacter pylori infection causes autophagy impairment by epigenetic alteration, promoting carcinogenesis in the stomach. 第14回日韓合同ヘリコバクター感染シンポジウム(国際学会), 2017年.
- ③ 南條宗八、安藤孝将、杉山敏郎. ヘリコバクター・ピロリ慢性胃炎はMAP1LC3A variant1のメチル化サイレンシングによりオートファジーを破綻させ、胃発がんを促進する. 第25回日本消化器関連学会週間, 2017年.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南條 宗八 (Nanjo, Sohachi)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号: 70649285