

平成21年 6月15日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18590386
 研究課題名（和文）ピロリ菌感染によるヒト細胞のエピジェネティクス変異の研究
 研究課題名（英文）A study on the epigenetic alterations of human cellular DNA caused by the infection with *Helicobacter pylori*.

研究代表者

常吉 俊宏 (TSUNEYOSHI TOSHIHIRO)
 静岡理科大学・理工学部・教授
 研究者番号：40236930

研究成果の概要：ヒト正常皮膚繊維芽細胞(NHDF)とピロリ菌(HP)を混合培養し、ヒト DNA のメチル化(エピジェネティクス変異)を検出したところ、HP 混合で NHDF のメチル化(最大 44%)・脱メチル化(同 8%)が起こった。緑茶カテキンを混合培養系に添加すると脱メチル化方向に変化した。マイクロアレイを用いたところヒトの DNA メチル化酵素、ヒストン脱アセチル化酵素など重要遺伝子が HP 混合でメチル化されることがわかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,500,000	0	1,500,000
2007年度	600,000	180,000	780,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	330,000	2,930,000

研究分野：遺伝子工学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：腫瘍、ピロリ菌、遺伝子、癌、食品、微生物、病理学

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究代表者の所属大学の立地する静岡県特産の緑茶が癌抑制効果を持つか否かについては、まだ十分な規模の検証データがなく確定的な結論が得られていない。

(2) 80年代に小國らにより静岡県のお茶所の川根3町における胃癌死亡率が全国平均の5分の1と特異に低く、その原因が同地域に根付く茶葉を食べる習慣にあると推定された。

(3) 胃癌発症原因の大半はピロリ菌(HP)感染にあることが判明し、除菌効果が認定された。

(4) 緑茶カテキン単独では HP 除菌が困難であることもわかってきた。

(5) 胃癌の初期段階では各種遺伝子がメチル化され、HP 除菌によりメチル化が元に戻ることもわかってきた。

(6) HP は宿主細胞に感染する際、自ら注射針様の構造物を作り、CagA、VacA 等の自製タンパク質を宿主に注入(IV型分泌機構)、これらが癌化を引き起こすことが判明してきた。

(7) HP は他細菌に突出して多種類の DNA メチル化酵素(DNMT)を発現する能力を持つ。

(8)カテキンは DNMT を強力に競合阻害する。

上記背景から、HP は感染宿主に DNMT をIV型分泌し宿主 DNA をメチル化し癌化誘導、カテキン投与では除菌は無理でも DNMT 阻害で癌化を阻止する、との仮説を立てた。

2. 研究の目的

(1)ヒト細胞とHPの混合培養とゲノムワイドなDNAメチル化検出 ヒトの正常培養細胞とHPとの混合培養を行い、混合培養物からDNAを抽出、染色体DNA全体にわたるDNAメチル化を網羅的に検出する。

(2)カテキン効果の検証 カテキン添加によりDNAメチル化傾向にどのような変化が起こるかを観測する。

(3)マイクロアレイによるゲノムワイドなDNAメチル化検出 メチル化検出用マイクロアレイに抽出DNA反応物をハイブリダイズしHPとの混合培養でどのような遺伝子にメチル化変化が起こっているかを同定する。

(4)その他の遺伝子のメチル化検出 上記(1)、(3)の網羅的検出あるいはマイクロアレイ検出では、遺伝子プロモーターCpGアイランド内に、使用するメチル化感受性制限酵素の認識部位がない重要遺伝子のメチル化挙動をメチル化特異的PCR(MSP)、あるいはCOBRA法、重亜硫酸シーケンシング法等で検出する。

(5) HP由来DNMT発現の検出 混合培養に伴いHPからHP由来のDNMTの発現が上昇しているかどうかを検出する。

3. 研究の方法

(1)ヒト細胞とピロリ菌 ヒト正常培養細胞として正常ヒト成人皮膚繊維芽細胞(NHDF: クラボウ製・培養フラスコ出荷)を用い、HPとしてはCagA、VacA陽性でゲノムが全て解読されているJ99株をATCCから購入して培養した。なお、研究途中でヒト細胞NHDFの製造メーカー側で汚染が起こり、それ以降培養フラスコ出荷が停止となったため凍結細胞の形で購入・受け入れを行った。

(2)混合培養 NHDFとHPを各々単独でそれぞれの最適条件で培養を行い、NHDFの1~2代継代までの間に混合培養を開始した。HP菌数とNHDF細胞数の比率が約20対1から100対1の条件でNHDFの最適条件培養液にHP液体培養液を5%添加した。混合培養(37℃、加湿、5%CO₂ インキュベーター中、開栓)は48~72時間程度まで実施した。

(3)MS-AFLP(メチル感受性増幅断片多型)ゲル電気泳動法 培養フラスコ内NHDFを洗浄、SDSとProteinaseK処理、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿で染色体DNAを抽出した。続いてメチル化感受性制限酵素Not Iと非感受性制限酵素Mse IでDNAを消化、Not I、Mse Iそれぞれの消化末端に結合するアダプター2種類をライゲート、Not Iアダプタープライマー(あらかじめ蛍光標識)とMse IアダプタープライマーでPCR増幅した。精製後、シーケンサー(島津DSQ2000)のポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、Not Iアダプタープライマーの蛍光標識PCR産物バンドの蛍光強度を検出した。続いて、NHDFとHPの混合培養の際に緑茶カテキンのエピガロカテキンガレート(EGCG)を20 μM添加した実験、NHDFにHPを混合培養せずにEGCGだけを添加して培養した実験、そしてNHDF単独で培養した対象実験についてもMS-AFLP電気泳動を行った。

(4)MS-AFLP・DNAマイクロアレイ法 前述と同様の最後の段階のPCR産物(蛍光標識なし)と、別途HPを混合せずに独立に培養しておいたNHDFから前述同様にDNA抽出と制限酵素消化、アダプターライゲート、PCR増幅(同じく蛍光標識なし)したコントロール産物、の2種類を並行して精製した。これらをランダムプライマーとそれぞれCy5(赤蛍光色素標識、HP混合培養PCR産物用)-dCTPあるいはCy3(緑蛍光色素標識、コントロールPCR産物用)-dCTP入りdNTPとKlenowフラグメントを反応させて各PCR産物を別々に蛍光標識し、限外ろ過精製した。続いて両者を混合し、あらかじめヒトゲノム全体のNot I認識部位9654箇所と近傍のMse I認識部位の間の配列を固定化したマイクロアレイに共ハイブリダイズ後、洗浄、各スポットの蛍光を検出し、Cy3、Cy5、のどちらの蛍光が強いかでHPとの混合培養による各遺伝子のメチル化(Cy3増加)、脱メチル化(Cy5増加)を判定した。

4. 研究成果

(1) MS-AFLP電気泳動によるゲノムワイド・メチル化解析 HPと凍結細胞由来のNHDFとの混合培養を48時間、100対1の菌数・細胞数比で行い(①)、並行して対照実験としてNHDFのみを48時間単独培養した場合(②)、HPとNHDFの48時間、100対1混合培養にEGCGを20 μM添加した場合(③)、NHDF単独48時間培養にEGCGを20 μM添加した場合(④)の4種類の培養実験を行い、②を対照として各培養後の抽出DNAに対しMS-AFLP電気泳動解析を行った。①、③、④の電気泳動クロマトグラムで②のクロマトグラムに対応するバンドの蛍光強

度が2倍以上増加したPCR産物を青色で(脱メチル化)、2分の1以下に減少したPCR産物を赤色(メチル化)で、2倍増と2分の1減少の間の変化のPCR産物を白色で、一緒にPCR産物のサイズが大きくなる順に下から並べた(図1)。

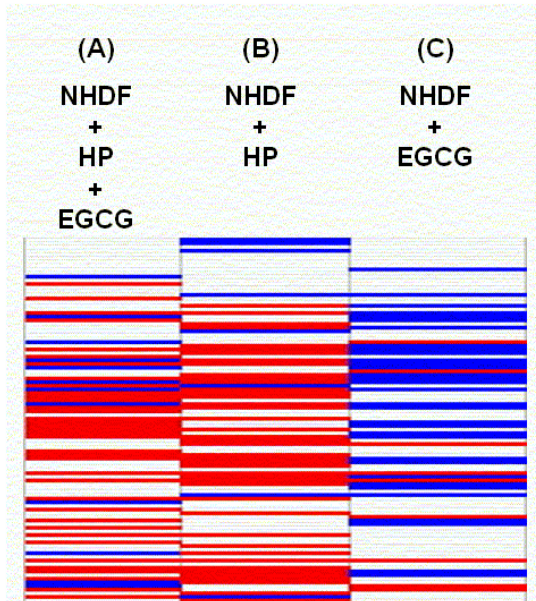


図1 NHDF・HP混合培養によるヒトDNAメチル化状態変化のゲノムワイドMS-AFLP電気泳動解析。赤はメチル化。青は脱メチル化。

これによると NHDF に HP を混合培養すると観測遺伝子の44%がメチル化、8%が脱メチル化を示した(図1(B))。また、混合培養時に EGCG を添加するとメチル化が32%に減少、脱メチル化が23%に増加した(図1(A))。対照として NHDF の単独培養時に EGCG を添加すると9%のメチル化、33%の脱メチル化が見られた(図1(C))。

これらの結果から、HP が概ねメチル化に寄与すること、EGCG は脱メチル化に寄与すること、EGCG 添加でも HP によるメチル化影響を全て回復するには至らない様子が伺えた。HP との混合培養あるいは「感染」による正常ヒト遺伝子へのメチル化の影響が広範なことと、緑茶カテキンの代表的な物質である EGCG の添加がグローバルな脱メチル化を引き起こすことなど、想像以上の効果があり、他の研究機関からはまだ報告のない極めてユニークな結果が得られたと考えられる。また残念ながら EGCG 単独では HP によるメチル化を打ち消すほどの回復効果がないことも明らかとなった。

(2) MS-AFLP・DNAマイクロアレイ法によるゲノムワイド・メチル化解析 NHDF細胞数とHP菌数比が30:1と100:1で72時間混合培養したヒトDNAでは2分の1以下への

信号強度変化を起こした、すなわちメチル化したCpG部位が4~6%、2倍以上への変化を起こしたすなわち脱メチル化したCpG部位比率が6~8%となった。図2に代表例として細胞数比100対1の72時間混合培養前後の蛍光強度のデータ例を示した。

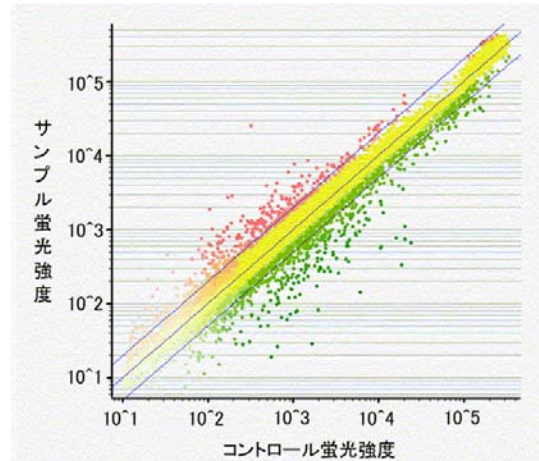


図2 NHDF・HP混合培養によるNHDFメチル化状態変化のマイクロアレイ・MS-AFLP検出。緑:メチル化。赤:脱メチル化。

図の中で黄色の領域はメチル化・脱メチル化の中間領域、 $Y=X$ に近い直線3本は上から信号強度2倍への増加、不変、および2分の1以下への減少、のそれぞれの境界線を示す。信号強度が2分の1以下への「メチル化」遺伝子の中でメチル化強度変化(コントロールに比べて試料蛍光強度が減少した率)が大きかった順に遺伝子の名前を変化率が100倍以上(100分の1以下への減少)のものをピックアップしたところ28遺伝子存在した。この中ではGTP結合タンパク質が信号伝達経路で目に付くだけで他のタンパク質が癌発症への大きな影響を受けるのかについては定かではないが、変化率の比較的小さな(2分の1以下への減少)遺伝子においてもピックアップすると、主に宿主DNAのメチル化およびそれと並行して起こるヒストンアセチル化に関連した重要な遺伝子群がHP混合でメチル化されることがわかった。すなわちHP混合により、宿主DNAの宿主自身によるメチル化あるいはメチル化による当該遺伝子発現抑制などの影響を阻止し、宿主をHP自身の制御下におき植民地化する動きに繋がると考えられる。

本研究のように、正常ヒト細胞のDNAに対するHP混合あるいは感染の影響をゲノムワイドに観測したものは極めて珍しく、これについても独自性を持ったデータが得られたと考えられる。

(3) その他の方法によるメチル化解析 上記

MS-AFLP法では検出できない、すなわち*Not I*認識部位を持たない重要遺伝子の代表例としてEカドヘリン遺伝子(CDH1)について個別のメチル化解析としてMSPやCOBRA解析、重亜硫酸シーケンシングを行っているがHP由来の20倍から100倍のコピー数を持つDNAの妨害を受けて、目的のヒト由来の染色体DNAに対するPCRがなかなかかからず、ポジティブなデータがまだ得られていない。

(4)HP由来のDNMT発現解析 HPからIV型分泌されるHP由来のDNMTの発現を検出しようと混合培養途中にmRNA抽出を予定していたが、NHDF製造メーカーのクラボウでフラスコ培養製品の汚染が起これ、研究途中で出荷停止・製品購入不能に陥った。代替策の凍結細胞購入で、3度にわたる受け入れでも培養準備段階で汚染が観測された。このためDNMT発現の追跡がまだできていない。

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)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 山本紘子、山梨隆智、小泉圭、宮木祐一郎、名倉理教、鈴木浩一、新村和也、大楢弘順、小西文雄、前川真人、梶村春彦、常吉俊宏、「ゲル電気泳動によるDNAメチレーションの検出ーピロリ菌感染による各種ヒト遺伝子メチル化検出の試み(Ⅱ)ー」(口演)、第13回LCテクノプラザ、2008年2月1日、東京理科大学薬学部(千葉県野田市)。
- ② 山本紘子、小泉圭、宮木祐一郎、鈴木浩一、新村和也、大楢弘順、小西文雄、前川真人、梶村春彦、常吉俊宏、「ピロリ菌との混合培養によるヒト細胞株のグローバルDNAメチル化変異検索」(ポスター発表)、第66回日本癌学会学術総会、2007年10月4日、パシフィコ横浜。
- ③ 山本紘子、小松郁麻、小泉圭、宮木祐一郎、名倉理教、鈴木浩一、堀井俊伸、新村和也、大楢弘順、数井暉久、前川真人、梶村春彦、常吉俊宏、「ゲル電気泳動によるDNAメチレーションの検出ーピロリ菌感染による各種ヒト遺伝子メチル化検出の試みー」(口演)、第12回LCテクノプラザ、2007年2月2日、東京理科大学薬学部(千葉県野田市)。
- ④ 山本紘子、鈴木浩一、常吉俊宏、谷岡書彦、新村和也、梶村春彦、「網羅的メチル化指標評価法としてのMethylation sensitive amplified fragment length polymorphism」(ポスター発表)、第66回日本癌学会学術総会、2006年9月28日、パシフィコ横浜。

6. 研究組織

(1)研究代表者

常吉 俊宏 (TSUNEYOSHI TOSHIHIRO)

静岡理科大学・理工学部・教授

研究者番号：40236930

(2)研究分担者

鈴木 浩一 (SUZUKI KOICHI)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：70332369