

令和 5 年 4 月 23 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K15806

研究課題名（和文）Oncostatin Mシグナル抑制に着目した胃癌発生メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of gastric carcinogenesis mechanism focusing on suppression of oncostatin M signal

研究代表者

南條 宗八（Nanjo, Sohachi）

富山大学・学術研究部医学系・助教

研究者番号：70649285

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトのOSMR遺伝子はプロモーター領域のDNAメチル化で発現が制御されていることを示した。ヒトの正常胃粘膜ではほとんど発現しておらず、ピロリ菌が感染した胃粘膜でもほとんど発現していないことがわかった。一方で、胃癌の一部ではOSMRが高発現しており、高発現のがんはいずれもびまん型胃癌であった。また、ラット正常胃上皮細胞RGEをOSMで刺激すると細胞増殖速度が増え、OSMには細胞増殖を促進する作用があることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

びまん型胃癌の増殖にOSMとOSMRが結合することで細胞内に伝わるシグナルが関与している可能性が示唆された。びまん型胃癌の発生や進展のメカニズムの解明につながる可能性があり、さらには治療方法の開発にもつながる可能性がある。一般的にびまん型胃癌は悪性度が高く予後が悪いことから、びまん型胃癌の発生・進展メカニズムの解明および治療方法の開発は胃癌患者の予後改善につながる点で社会的な意義が大きい。

研究成果の概要（英文）：The expression of human OSMR gene was shown to be regulated by DNA methylation in the promoter region. It was found that it was hardly expressed in the normal human gastric mucosa, and was hardly expressed in the gastric mucosa infected with Helicobacter pylori. On the other hand, OSMR was highly expressed in some gastric cancers, and all of the highly expressed cancers were diffuse-type gastric cancers. Stimulation of rat normal gastric epithelial cells RGE with OSM increased the cell proliferation rate, indicating that OSM has the effect of promoting cell proliferation.

研究分野：発がん

キーワード：胃癌 DNAメチル化 OSMR

1. 研究開始当初の背景

Helicobacter pylori (*H. pylori*) は胃がんの主な原因であるが、胃がん発生メカニズムは十分に解明されていない。これまでの知見から、胃がんの半数以上で Wnt シグナルが亢進しており、Wnt シグナル亢進は胃がん発生に重要であると考えられている (Oshima et al. *Cancer Science*. 2009)。また、*H. pylori* 感染によりマクロファージから分泌される TNF は Wnt シグナルを活性化し、胃がん発生を促進することが報告されている (Oguma et al. *Future Oncology*. 2010)。また、*H. pylori* 感染はマクロファージから腫瘍促進作用の Wnt シグナルを活性化する TNF と同時に、腫瘍抑制作用をもつ Oncostatin M (OSM) を分泌させることが分かっている。

また、*H. pylori* 感染による慢性炎症は胃粘膜上皮で、遺伝子のプロモーター領域の DNA メチル化異常を誘発し、下流の遺伝子の転写を抑制する(メチル化サイレンシング)。最近、Oncostatin M (OSM) は消化管がんで腫瘍抑制作用をもつが、OSM 受容体遺伝子 OSMR がメチル化サイレンシングされると、OSM のシグナルが遮断され、腫瘍増殖が促進されることが報告された (Kim et al. *PLoS One*. 2009)。

申請者は、*H. pylori* 感染胃粘膜と非感染胃粘膜それぞれ 8 検体を DNA メチル化アレイ (HumanMethylation450K, Illumina) で解析し、OSMR 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 ($P < 0.001$, t 検定)。

以上のことから、*H. pylori* 感染による胃がん発生メカニズムに OSM および OSMR、Wnt シグナルが関与していることが推察される。しかし、これまで胃がん発生メカニズムの研究は、Wnt シグナルやそれを活性化する TNF、または *H. pylori* 病原因子である CagA タンパクなど腫瘍促進因子に注目しており、腫瘍抑制因子に注目した研究は少なかった。また、胃がん発生と OSM シグナルの関係を示した論文は無い。

2. 研究の目的

H. pylori による胃がん発生メカニズムの解明を最終的な目的とし、下記 3 点の研究を行うこととした。

1. *H. pylori* 感染による OSMR メチル化サイレンシングの解明
2. ノックダウンによる OSMR の機能解析
3. OSM シグナルと Wnt シグナルの相互作用

今回、申請者は腫瘍抑制作用をもつ OSM に注目し、胃がん発生との関係を初めて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

まず初めに、*H. pylori* 感染によって胃粘膜上皮細胞で OSMR 遺伝子のメチル化サイレンシングが起こることを確かめることとした。ヒトの *H. pylori* 非感染胃粘膜、感染胃粘膜、および胃がん組織を採取し、それぞれの検体から DNA、RNA を抽出して、OSMR 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化状態を定量的メチル化特異的 PCR、OSMR 遺伝子の mRNA 発現を RT-PCR で解析した。

次に、ラット正常胃粘膜細胞 RGE にリポフェクション法で siRNA を導入し、RNA を抽出したのち RT-PCR で *Osmr* 発現を解析することで、コントロールと比較して siRNA 導入によって *Osmr* 発現が低下しているか確認した。

4. 研究成果

ヒトの *H. pylori* 非感染胃粘膜 5 検体、胃がん患者の胃がん組織および (*H. pylori* 感染) 非がん胃粘膜 16 対の検体で OSMR 遺伝子の mRNA 発現レベル、DNA メチル化レベルを解析した。mRNA 発現レベル ($/\text{GAPDH} \times 10^{-4}$) の平均値について、*H. pylori* 非感染胃粘膜で 14.0、胃がん患者の (*H. pylori* 感染) 非がん胃粘膜で 47.3、胃がん組織で 194.1 であり、胃がん組織は胃がん患者の非がん胃粘膜や非感染胃粘膜よりも OSMR 遺伝子の mRNA 発現レベルが高かった (それぞれ $p < 0.01$, $p < 0.01$, t 検定)。DNA メチル化レベルの平均値 (percentage of the methylated reference: PMR) について、*H. pylori* 非感染胃粘膜で 0.6%、胃がん患者の (*H. pylori* 感染) 非がん胃粘膜で 3.5%、胃がん組織で 1.4% であり、胃がん患者の非がん胃粘膜は非感染胃粘膜や胃がん組織より DNA メチル化レベルが高かった (それぞれ $p = 0.03$, $p = 0.02$, t 検定)。また、胃がん患者の非がん胃粘膜は非感染胃粘膜や胃がん組織より DNA メチル化レベルが高かった。また、OSMR 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化レベルと同 遺伝子の mRNA 発現レベルは逆相関関係にあった ($r = 0.23$)。

H.pylori 非感染胃粘膜の DNA メチルレベル (PMR) の範囲は 0% から 2.2% で、mRNA 発現レベル ($/\text{GAPDH} \times 10^{-4}$) の範囲は 10 から 24 と、すべての検体において低 DNA メチル化状態かつ mRNA 発現も低レベルであった。胃癌患者の非がん胃粘膜の DNA メチル化レベル (PMR) は 0.3% から 10.3% と低 DNA メチル化状態から高メチル化状態まで分布していたが、mRNA 発現レベル ($/\text{GAPDH} \times 10^{-4}$) の範囲は 7 から 108 で、100 を超えるのは 2 検体 (12.5%) のみと総じて低かった。また、胃癌組織の DNA メチル化レベル (PMR) の範囲は 0.1% から 3.9% とほとんどの検体で低 DNA メチル化状態で、mRNA 発現レベル ($/\text{GAPDH} \times 10^{-4}$) で 100 を超えるのは 10 検体 (62.5%) と頻度が高く、特に 300 を超える mRNA 高発現の検体は 3 検体 (18.8%) であった。OSMR mRNA 高発現の 3 検体の胃癌組織はいずれもびまん型の組織型であった。

ラット正常胃上皮細胞 RGE に TNF、オンコスタチン M (以下、OSM) 刺激を加え、細胞増殖の変化を確認した。TNF (25ng/ml) または OSM (10ng/ml) 単独の刺激では細胞増殖速度は上昇した。一方、TNF、OSM の共刺激では、それぞれの単独刺激に比べて細胞増殖速度が低下した。特に、day5-7 にかけて細胞数の低下した。TNF、OSM 濃度を変えても (TNF 12.5ng/ml、OSM 5ng/ml) 同様の結果であった。

次に、ラット正常胃上皮細胞 RGE において OSMR のノックダウン実験を行うために siRNA を 3 種類作成し、それぞれ 10nM、30nM、100nM の濃度で作用させて RT-PCR にて OSMR の発現量を測定したが、結果として、3 種類の siRNA とともに OSMR の発現を低下させることができなかった。

びまん型胃癌の増殖に OSM と OSMR が結合することで細胞内に伝わるシグナルが関与している可能性が示唆された。びまん型胃癌の発生や進展のメカニズムの解明につながる可能性があり、さらには治療方法の開発にもつながる可能性がある。一般的にびまん型胃癌は悪性度が高く予後が悪いことから、びまん型胃癌の発生・進展メカニズムの解明および治療方法の開発は胃癌患者の予後改善につながる点で社会的な意義が大きい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------