

平成22年 5月31日現在

研究種目： 特定領域研究

研究期間： 2008～2009

課題番号： 20012029

研究課題名（和文）

ヘリコバクタ胃炎から発癌に至る過程における遺伝子変異導入機構の解明

研究課題名（英文）

Role of activation-induced cytidine deaminase (AID) in the mutation induction during H. pylori-induced gastric carcinogenesis.

研究代表者

千葉 勉 (CHIBA TSUTOMU)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号： 30188487

研究成果の概要（和文）： H. pylori は胃炎を介して胃発癌を誘導する。今回の研究では、H. pylori による炎症発癌における遺伝子変異導入機序について検討を加えた。その結果 H. pylori 感染は NF κ B 依存性に APOBEC ファミリーの AID の発現を増強し、その結果様々な遺伝子変異を導入することが明らかとなった。また AID は胃粘膜において遺伝子変異のみならず、様々な領域で遺伝子の欠失、増幅も誘導することが判明した。

研究成果の概要（英文）： H. pylori enhances gastric cancer development through gastritis. In this study, we found that H. pylori infection induces AID expression, a member of APOBEC family protein, in the gastric mucosal cells, resulting in accumulation of various gene mutations. In addition, AID expression by H. pylori infection also causes not only loss but also gain of various genes, thus contributing to genome instability.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	9,000,000	0	9,000,000
2009 年度	9,000,000	0	9,000,000
年度			
年度			
年度			
総計	18,000,000	0	18,000,000

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： AID、H.pylori、胃癌、CagA、4型分泌装置、遺伝子不安定性

1. 研究開始当初の背景

- (1) H. pylori (HP) 感染から慢性胃炎を経て発癌にいたる事実は良く知られている。
- (2) 発癌過程においては、種々の遺伝子変異が生成蓄積することが知られているが、HP 感染による炎症発癌過程で、遺伝子変異が蓄積する機序は不明である。

- (3) 一方、最近 APOBEC family の一つとして同定された AID (Activation-induced cytidine deaminase) は B 細胞の免疫グロブリン遺伝子の可変領域に somatic mutation を導入することで、免疫グロブリン遺伝子の多様性獲得に関与する。ところが最近 AID とトランスジェニックマウスでは様々な癌が発

生することが明らかとなった。この事実は AID の以上発現が、遺伝子変異の生成を介して発癌に寄与する可能性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究では AID を中心に、HP 感染による胃癌発生過程における遺伝子変異生成の機序を明らかとすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) HP 感染と AID 発現、遺伝子変異の関係の解析

ヒト臨床検体で組織学的に胃炎の程度、腸上皮化生の有無、HP の菌量、分布、同時に AID の発現を免疫染色で観察する。また p53 染色をおこない AID 発現と比較する。さらに p53 遺伝子変異について laser captured microdissection (LCM) で検体を採取して検討する。胃癌組織でも同様の検討を行う。

(2) HP 感染による AID 発現の分子機構の解明

ヒト胃癌細胞株に様々な遺伝子改変 HP を感染させ AID 発現を検討する。さらに HP 抽出物 TLR, NOD リガンドを投与して AID 発現に及ぼす影響を検討する。

(3) AID によるヒト胃癌細胞における遺伝子変異導入機序の解明

AID が C to T 以外の変異も生じる機序を明らかにするためヒト胃癌細胞株を用いて HP 感染、AID 遺伝子導入実験をおこなう。そして細胞がどのような状況時にどのような変異が導入されるかを、p53 遺伝子について、AID の存在、非存在下で解析する。さらにその際の error prone DNA polymerase やミスマッチ修復遺伝子の役割を検討する。

(4) AID-KO マウスを用いた検討

AID-KO マウスに HP を感染させて慢性胃炎を発症させ、胃粘膜における遺伝子変異の頻度を正常マウスと比較する。本マウスに HP 感染と同時に発癌誘発剤である MNNG, MNU を投与して胃癌を発症させ、胃癌組織における変異導入効率、さらに発癌の程度を比較検討する。

(5) AID の標的遺伝子の同定と臓器特異的な遺伝子異常の網羅的解析

胃癌と肝癌において HP 感染、AID の導入がどのような遺伝子を標的としているかを網羅的に解析する。AID-TG マウスの肝細胞、胃上皮細胞を胎生期から経時的に分離し DNA を抽出する。同様に AID-TG マウスに発生した胃癌、肝癌、さらに HP 感染胃粘膜からも DNA を抽出し、これを鋳型として癌関連遺伝子のクローニングと塩基配列の決定を網羅的におこない

AID 活性化の結果生じた遺伝子変異の全体像をとらえ、AID の臓器特異的な標的遺伝子の探索をおこなう。

4. 研究成果

(1) HP 感染と AID 発現、遺伝子変異の関係の解析

ヒト胃粘膜の検討では、HP 非感染粘膜には AID 発現は見られなかった。一方 HP 感染粘膜では AID の発現が見られたが、その発現量は炎症の程度に比例していた。また高度の萎縮性胃炎粘膜では AID 発現はあるものの強くはなかった。一方腸上皮化生粘膜では AID 発現はみられなかった。さらに胃癌細胞では AID 発現が強くみられ、胃癌の 95% 近くで発現が陽性であった。P53 蛋白の染色では、p53 は胃炎粘膜で発現が見られたが、炎症の程度とは必ずしも関連しなかった。次に p53 遺伝子の変異を cDNA をサブクローニングして、いくつかのクローンをシーケンスすることによって見たところ、胃炎粘膜では、胃癌組織に比肩しう程度の遺伝子変異が存在していた。しかしこの遺伝子変異の程度、部位と、p53 蛋白の染色とは必ずしも一致しなかった。なお胃癌組織においては、p53 染色と遺伝子変異が良く関連していた。

(2) HP 感染による AID 発現の分子機構の解明

様々な HP 菌株を用いて、マウスへの感染実験、またヒト胃癌細胞株への感染実験をおこなったところ、CagPAI 陰性株、CagE 陰性株では AID 発現は認められなかった。一方 CagA 陰性株では約 70% 程度の AID 発現が認められた。また CagA の C 末端リン酸化部位の変異株では、正常株と差はなかった。さらにこれら変異株を用いて NFκB 活性化を見たところ、AID 発現の程度とほぼ完全に関連していた。さらに遺伝子変異の程度をこれらの株でみたところ、p53 遺伝子変異の程度も、AID 発現の程度と一致していた。以上より、HP は Type 4 secretion machinery を介して菌体成分を細胞に注入し、NFκB 活性化を介して AID を発現させること、そしてその結果遺伝子変異が導入されることがあきらかとなった。なお CagA は HP による AID 活性化の約 30% 程度を担うと考えられた。またその際リン酸化は必要としないことも判明した。

(3) AID によるヒト胃癌細胞における遺伝子変異導入機序の解明

HP ならびに AID による遺伝子変異の解析では、C/G to T/A transition が最も多いことが明らかとなった (約 60%)。

しかしながらその他の変異も存在していた。次に胃癌細胞株を用いて Rev1 欠損細胞によって HP 感染、AID 発現の影響を見たところ、C to G transversion 変異が消失していた。したがって AID は基本的にその deamination 活性を介して、cytosine を uracil あるいは thymine に変換するものと考えられるが、一部は UNG, endonuclease にて uracil が除去して、Rev1 などの error prone DNA polymerase (損傷乗り越え DNA polymerase) によって修復されて別の変異が誘導されるものと考えられた。

(4) AID-KO マウスを用いた検討

AID-KO マウスと IL10-KO マウスを交配させることによって、炎症発癌における AID の役割を検討した。その結果 IL10-KO マウスでは 5/21 匹に大腸癌(盲腸がん)が発症したのに対し、IL10-KO + AID-KO マウスでは 1/22 匹にのみ大腸癌(直腸がん)が発生した。またその際 AID-KO では遺伝子変異の頻度が著明に低下していた。同様に AID-KO マウスに HP を感染させたところ、AID-KO マウスでは遺伝子変異の頻度が著明に低下していた。しかしながら炎症の程度は正常、AID-KO マウスで差は認められなかった。

(5) AID の標的遺伝子の同定と臓器特異的な遺伝子異常の網羅的解析

ヘリコバクタ感染マウス胃粘膜、HP 感染培養細胞において、CGH 解析をおこなって、遺伝子異常について網羅的解析をおこなったところ、HP 感染、AID 発現によって、様々な遺伝子の決失、増幅が確認された。またこの決失、増幅の部位は遺伝子変異の部位と一致している場合が多く、遺伝子変異と遺伝子の決失、増幅には一定の相関関係が認められた。以上より AID はある特定の遺伝子あるいは遺伝子配列を標的として作用し、変異とともに、double strand break をいれることによって決失や増幅も生じることが明らかとなった。またこれら変異が導入される遺伝子は各臓器、細胞によって同一のもの異なるもの、の両者が存在することも判明した。たとえば p53, Bcl6 はほぼすべての臓器で異常が見られた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 14 件)

1. Watanabe T, Asano N, Fichtner-Feigl S, Gorelick PL, Tsuji Y, Matsumoto Y, Chiba T, Fuss IJ, Kitani A, Strober W: NOD1 contributes to mouse host defense against *Helicobacter pylori* via induction of type I IFN and activation

of the ISGF3 signaling. *J Clin Invest* 120:1645-1662:2010. 査読有

2. Yamamoto S, Nakase H, Yamashita K, Matsuura M, Takada M, Kawanami C, Chiba T: Gastrointestinal follicular lymphoma: Review of the literature. *J Gastroenterol* 45:370-388:2010. 査読有
3. Kido M, Tanaka J, Aoki N, Iwamoto S, Nishiura H, Chiba T, Watanabe N. *Helicobacter pylori* promotes the production of thymic stromal lymphopoietin by gastric epithelial cells and induces dendritic cell-mediated inflammatory Th2 responses. *Infect Immun* 52:108-114: 2010. 査読有
4. Takai A, Toyoshima T, Uemura M, Kitawaki Y, Marusawa H, Hiai H, Yamada S, Okazaki I, Honjo T, Chiba T, Kinoshita K: A novel mouse model of hepatocarcinogenesis triggered by AID causing deleterious p53 mutations. *Oncogene* 28:469-478:2009. 査読有
5. Yamagishi H, Fukui H, Sekikawa A, Kono T, Fujii S, Ichikawa K, Tomita S, Imura J, Hiraishi H, Chiba T, Fujimori T: Expression profile of REG family proteins, REG I α and REGIV in advanced gastric cancer: Comparison with mucinous phenotype and prognostic markers. *Modern Pathol* 22: 906-913:2009. 査読有
6. Chiba T, Marusawa H: A novel mechanism for inflammation-associated carcinogenesis; an important role of activation-induced cytidine deaminase (AID) in mutation induction. *J Mol Med* 87:1023-1027:2009. 査読有
7. Watanabe N, Kiriya K, Chiba T: Small intestine Peyer's patches are major induction sites of the *Helicobacter*-induced host immune responses. *Gastroenterology* 134: 642-643:2008. 査読有
8. Komori J, Marusawa H, Machimoto T, Endo Y, Kinoshita K, Kou T, Haga H, Ikai I, Uemoto S, Chiba T: Activation-induced cytidine deaminase links bile duct inflammation to human cholangiocarcinoma. *Hepatology* 47: 888-896:2008. 査読有
9. Sekikawa A, Fukui H, Fujii S, Ichikawa K, Tomita S, Imura J, Chiba T, Fujimori T: REG I α Protein Mediates an Anti-apoptotic Effect of STAT3 Signaling in Gastric Cancer Cells.

- Carcinogenesis 29:76-83:2008. 査読有
10. Iwai A, Hijikata M, Hishiki T, Isono O, Chiba T, Shimotohno K: Coiled-coil domain containing 85B suppresses the β -catenin activity in a p53-dependent manner. *Oncogene* 27: 1520-1526:2008. 査読有
 11. Endo Y, Marusawa H, Kou T, Nakase H, Fujii S, Fujimori T, Kinoshita K, Honjo T, Chiba T: Activation-induced cytidine deaminase links between inflammation to colitis-associated colorectal cancers. *Gastroenterology* 135:889-898:2008. 査読有
 12. Morisawa T, Marusawa H, Ueda Y, Iwai A, Okazaki IM, Honjo T, Chiba T: Organ-specific profiles of genetic changes in cancers caused by activation-induced cytidine deaminase expression. *Int J Cancer* 123:2735-40:2008. 査読有
 13. Chiba T, Marusawa H, Seno H, Watanabe N: Mechanism for gastric cancer development by *Helicobacter pylori* infection. *J Gastroenterol Hepatol* 23:1175-1181:2008. 査読有
 14. Vorobjova T, Watanabe T, Chiba T: *Helicobacter pylori* immunology and vaccine. *Helicobacter* 13(Suppl 1): 18-22:2008. 査読有

[学会発表] (計 21 件)

1. Tsutomu Chiba: Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID) plays an important role in induction of gene mutation and genomic instability during inflammation-associated carcinogenesis. The 25th Radiation Biology Center International Symposium Genomic Instability, 京都, 2009. 12. 1.
2. 千葉 勉, 丸澤宏之: 炎症からの発癌における新しい遺伝子変異導入機構. 第 82 回日本生化学会大会・シンポジウム, 神戸, 2009. 10. 21.
3. Tsutomu Chiba, Yuko Matsumoto, Hiroyuki Marusawa: A novel mechanism for mutagenesis in *Helicobacter pylori*-associated carcinogenesis -roles of activation-induced cytidine deaminase(AID) as a genome mutator-. 15th International Workshop on Campylobacter, Helicobacter, and Related Organisms, 新潟, 2009. 9. 2.
4. Tsutomu Chiba: Role of AID in *H. pylori*-induced gastric cancer development. 2009 29th International

- Symposium on cancer Helicobacter pylori and Gastric Cancer, 札幌, 2009. 7. 13.
5. Tsutomu Chiba: Mechanism for gastric cancer development by *H. pylori* infection. 6th International Conference of Gastroenterology, Shanghai, China, 2009. 6. 3.
 6. Norihiko Watanabe, Masahiro Kido, Junya Tanaka, Tsutomu Chiba: *Helicobacter Promote Gastric Epithelial Cells to Produce TSLP and Induce DC- Mediated Inflammatory Th2 Responses*. Digestive Disease Week and the 110th Annual Meeting of the AGA Institute, Chicago(USA), 2009. 6. 2.
 7. 千葉 勉: *H. pylori*感染による胃発癌機構. 第 106 回日本内科学会講演会, 東京, 2009. 4. 10.
 8. Tsutomu Chiba: Mechanism for mutation induction in inflammation-associated carcinogenesis. The G-COE First International Symposium Inflammation, Signal Transduction, and Cancer, 神戸, 2009. 3. 23.
 9. Tsutomu Chiba: Role of AID in *H. pylori*-induced carcinogenesis. MD Anderson Cancer Center&Kyoto Univ. Grad. School of Medicine International Symposium 2009, 京都, 2009. 3. 22.
 10. 千葉 勉, 松本裕子, 丸澤宏之: *H. Pylori* infection induces gene mutations in gastric epithelial cells via induction of AID. 第 82 回 日本細菌学会総会・シンポジウム, 名古屋, 2009. 3. 13.
 11. T Chiba: *H. pylori* and gastric cancer: from gastritis to cancer. "GASTRIC CANCER" International Multidisciplinary Meeting, Salerno (Italy), 2008. 11. 28.
 12. 遠藤容子, 丸澤宏之, 木下和生, 高忠之, 藤井茂彦, 藤盛孝博, 千葉 勉: 炎症性腸疾患からの大腸発癌過程における Activation-induced cytidine deaminase (AID) の役割. 第 67 回日本癌学会学術総会・ワークショップ, 名古屋, 2008. 10. 28.
 13. T Chiba: Mechanism of *H. pylori*-induced Gene Mutation in Gastric Carcinogenesis. AACR Symposium Chemical and Biological Aspects of Inflammation and Cancer, Oahu Hawaii (USA), 2008. 10. 15.
 14. 丸澤宏之, 松本裕子, 森田周子: 胃発癌過程における遺伝子異常発生時期から

- 見たH. pylori除菌療法の考察. 第50回日本消化器病学会大会・シンポジウム, 東京, 2008. 10. 1.
15. 木戸政博、渡部則彦、赤松拓司、田中淳也、嵯峨一行、西尾彰功、千葉 勉: Helicobacter pylori (HP) 感染に対する宿主免疫応答でのTSLPの役割. 第45回日本消化器免疫学会総会, 京都, 2008. 7. 3.
16. Y Matsumoto, H Marusawa, Y Endo, T Chiba: Helicobacter pylori infection induces gene mutations in gastric epithelial cells via induction of activation-induced cytidine deaminase(AID). 8th International Workshop on Pathogenesis and Host Response in Helicobacter Infections. Helsinki (Denmark), 2008. 7. 4.
17. Keiichi Kiriya, Yuko Matsumoto, Norihiko Watanabe, Tsutomu Chiba: Essential roles of Peyer's Patches in the development of Helicobacter-induced Gastritis. 8th International Workshop on Pathogenesis and Host Response in Helicobacter Infections. Helsinki (Denmark), 2008. 7. 3.
18. 木戸政博、渡部則彦、西尾彰功、千葉 勉: Helicobacter pylori (HP) 感染に対する宿主免疫応答でのTSLPの役割. 第14回日本ヘリコバクター学会, 神戸, 2008. 6. 26.
19. 千葉 勉: Helicobacter pylori感染によるAID発現を介した遺伝子変異生成からの胃発癌機構. 第12回腸内細菌学会・シンポジウム, 東京, 2008. 6. 12
20. 木戸政博、渡部則彦、千葉 勉: Helicobacter pylori (HP) 感染に対する宿主免疫応答でのTSLPの役割. 第94回日本消化器病学会総会, 福岡, 2008. 5. 10.
21. 丸澤宏之、松本裕子、千葉 勉: Helicobacter pylori 感染によるAID発現を介したヒトゲノム異常生成の分子機構. 第94回日本消化器病学会総会, 福岡, 2008. 5. 10.

[図書] (計1件)

1. Chiba T, Marusawa H, Seno H, Watanabe N: H. pylori infection -The route from inflammation to cancer. In Sansonetti P, ed, Infection Biology Handbook Series. Bacterial Virulence. Basic principles, models and global approaches. Willey-Blackwell 2010: 31-41. 査読無

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千葉 勉 (CHIBA TSUTOMU)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号: 30188487

(3) 連携研究者

丸澤 宏之 (MARUSAWA HIROYUKI)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号: 80324630