

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21590788

研究課題名（和文）microRNA 発現の網羅的解析に基づいた CagA の細胞形質に及ぼす影響の検討

研究課題名（英文） Investigation of the effects of CagA on phenotype using microRNA array analysis

研究代表者

辻井 正彦 (TSUJII MASAHIKO)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号 40303937

研究成果の概要（和文）：培養細胞・トランスジェニックマウスいずれにおいても、胃粘膜上皮細胞で、*H.pylori* の CagA は DNA・ヒストンの異常メチル化を介し、microRNA let-7 発現を抑制し、癌遺伝子 Ras タンパクの発現を亢進させることが明らかとなった。*H.pylori* 感染の胃癌発生に関わる機構において、ヒストンメチル化異常・DNA メチル化異常と microRNA の発現異常が関与している可能性が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：In the cultured epithelial cells derived from gastric mucosa and the gastric epithelial cells of transgenic mice, *H.pylori*-CagA accelerated Ras expression via aberrant methylation of DNA and histone and resultant let-7 expression downregulation. These results indicated that aberrant methylation in histone and DNA and dysregulated microRNA expression play a pivotal role in CagA-related carcinogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：消化器内科学上部消化管学（食道、胃、十二指腸）

キーワード：microRNA, ヘリコバクター, CagA, 胃癌

## 1. 研究開始当初の背景

*Helicobacter pylori* (Hp) は、1994年にWHOより胃癌の1群のdefinite carcinogenに認定された。その後も動物感染モデルや早期胃癌患者における除菌の胃癌発生予防効果などの検討から、Hp感染と胃癌との密接な関係が証明されているが、そのメカニズムについては不明な点が多い。

Hpのゲノムの外来性遺伝子群に細胞空胞化毒素関連蛋白(CagA)の遺伝子cagAを有する株がある。CagA抗体陽性は陰性者に比べ、胃癌のリスクが41倍も高いこと、CagAのトランスジェニックマウスでは、胃癌・小腸癌が有意に発生することから、CagAは胃癌発生に関わる細菌由来のoncoproteinとされている。一方、近年、

microRNAは他の遺伝子の発現を制御することにより細胞の増殖・分化において重要な役割を果たしていることが明らかにされ、癌遺伝子や癌抑制遺伝子のような働きをして腫瘍形成に深く関わっている microRNA も同定されてきている。

## 2. 研究の目的

Hp 感染の胃癌発生機構を明らかにする目的で、CagA の胃粘膜での microRNA 発現に及ぼす影響について検討する。

## 3. 研究の方法

①ラット胃粘膜上皮由来培養細胞株 RGM-1 細胞に、CagA を遺伝子導入した細胞株を樹立し、microRNA array を用いて CagA により発現が変化する microRNA を探索する。発現が 50% 以下に低下した microRNA のうち、let-7 に関して、CagA による発現抑制機序を解析する。CagA による let-7 発現低下の下流シグナルに及ぼす影響を検討する。

②CagA トランスジェニックマウスを作成し、let-7 発現、シグナル伝達機構を検討する。

## 4. 研究成果

非腫瘍性胃粘膜上皮由来培養細胞を用いて、CagA 発現に伴う let-7 の発現の変化を Real Time RT-PCR 法にて定量的解析したところ、let-7 の発現は有意に減少し、Ras 発現が有意に上昇すること、CagA 発現に伴い、let-7 発現が減少した細胞に let-7 を強制発現させたところ、CagA 発現により発現亢進した Ras 発現が抑制されることを認めた。CagA 発現による let-7 の発現制御機構を検討したところ、CagA 発現細胞に脱メチル化剤を作用させると、let-7 の発現が回復すること、CagA 発現に伴って DNA methyl transferase(DNMT)3B の発現誘導が誘導されること、let-7c のプロモーター領域のメチル化解析から DNA メチル化の亢進が誘導されることを認め、CagA により let-7 のプロモーターにおける DNA メチル化が亢進することが示唆された。さらに、histone methyltransferase である EZH2 の発現が CagA で亢進すること、DNMT3B・MYC と複合体を形成するとともに、let-7 プロモーター領域のヒストンのメチル化が亢進すること、siRNA で EZH2 や MYC の発現を抑制すると、CagA を発現させても let-7 の発現は減少しないことを認めた。

CagA トランスジェニックマウスでは、胃粘膜や腸間膜リンパ節において、野生型と比較して let-7 の発現が抑制され、Ras の発現が亢進すること、72 週間観察を行うとリンパ腫・腺癌が高率に発生することを認めた。

以上のことから、胃粘膜上皮細胞において、CagA は DNA・ヒストンの異常メチル化を介

し、let-7 発現を抑制し、Ras タンパクの発現を亢進させることが明らかとなった。*H.pylori* 感染の胃癌発生に関わる機構において、ヒストンメチル化異常・DNA メチル化異常と microRNA let-7 発現異常が関与している可能性が明らかとなった。

## 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 19 件)

1. Tsuji M. Search for novel target molecules for the effective treatment or prevention of colorectal cancer. *Digestion* 85 (2): 99-102, 2012.(査読有)
2. Yamamoto S, Watabe K, Araki H, Tsuji M., et al. Protective role of adiponectin against ethanol-induced gastric injury in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 302 (8): G773-80, 2012. (査読有)
3. Nishida T. Tsutsui S. Iijima H. Tsuji M., et al. Treatment strategy for gastric non-invasive intraepithelial neoplasia diagnosed by endoscopic biopsy. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2: 93-99, 2012. (査読有)
4. Shinzaki S, Iijima H. Tsuji M., et al. Altered Oligosaccharide Structures Reduce Colitis Induction in Mice Defective in beta-1,4-Galactosyltransferase. *Gastroenterology* 142: 1172-1182, 2012. (査読有)
5. Inoue T, Iijima H. Nishida T. Tsuji M., et al. Deficiency of N-acetylgalactosamine in O-linked oligosaccharides of IgA is a novel biologic marker for Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*, in press 2012. (査読有)
6. Abe T, Yunokizaki H, Iijima H. Tsuji M., et al. *Schistosoma japonicum* showing flat colon polyp appearance. *Gastrointest Endosc* 73: 820-822, 2011. (査読有)
7. Kato M, Nishida T. Tsutsui S. Iijima H. Tsuji M., et al. Endoscopic submucosal dissection as a treatment for gastric noninvasive neoplasia: a multicenter study by Osaka University ESD Study Group. *J Gastroenterol* 46: 325-331, 2011. (査読有)
8. Akasaka T, Nishida T. Iijima H. Tsuji M., et al. Short-term outcomes of endoscopic submucosal dissection (ESD) for early gastric neoplasm: multicenter survey by osaka university ESD study

group. *Dig Endosc* 23: 73-77, 2011. (査読有)

9. Kondo J, Endo H, Okuyama H, Tsuji M, et al. Retaining cell-cell contact enables preparation and culture of spheroids composed of pure primary cancer cells from colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 6235-6240, 2011. (査読有)

10. Nakajima S, Iijima H, Egawa S, Nishida T, Kanto T, Tsuji M, et al. Association of vitamin K deficiency with bone metabolism and clinical disease activity in inflammatory bowel disease. *Nutrition* 27: 1023-1028, 2011. (査読有)

11. Terabe F, Fujimoto M, Serada S, Shinzaki S, Iijima H, Tsuji M, et al. Comparative analysis of the effects of anti-IL-6 receptor mAb and anti-TNF mAb treatment on CD4+ T-cell responses in murine colitis. *Inflamm Bowel Dis* 17: 491-502, 2011. (査読有)

12. Tsuji M, Iijima H, Takehara T. Search for molecular marker/target molecule useful for colorectal cancer treatment. *Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi* 108: 1354-1362, 2011. (査読有)

13. Nakajima S, Iijima H, Shinzaki S, Nishida T, Tsuji M, et al. Functional analysis of agalactosyl IgG in inflammatory bowel disease patients. *Inflamm Bowel Dis* 17: 927-936, 2010. (査読有)

14. Kondo J, Iijima H, Abe T, Tsuji M, et al. Roles of double-balloon endoscopy in the diagnosis and treatment of Crohn's disease: a multicenter experience. *J Gastroenterol* 45: 713-720, 2010. (査読有)

15. Kato M, Nishida T, Tsutsui S, Iijima H, Takemasa I, Hiramatsu N, Tsuji M, et al. Collision tumor of a carcinoid and carcinoma in the rectum. *Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi* 107: 61-69, 2010. (査読有)

16. Nishida T, Tsutsui S, Yamamoto K, Iijima H, Tsuji M, Takeda Y, et al. Phase I trial of gemcitabine dose escalation with concurrent radiotherapy for patients with locally advanced pancreatic cancer. *Pancreatol* 10: 60-65, 2010. (査読有)

17. Yoshio T, Morita T, Tsuji M, et al. MRTF-A/B suppress the oncogenic properties of v-ras- and v-src-mediated transformants. *Carcinogenesis* 31: 1185-93, 2010. (査読有)

18. Abe T, Yoshidome K, Iijima H, Tsuji M, et al. Metastatic breast cancer mimicking primary depressed gastric cancer. *Gastrointest Endosc* 70: 1241-1242,

2009. (査読有)

19. Ishii S, Tsuji S, Tsuji M, Nishida T, Watabe K, Iijima H, et al. Restoration of gut motility in Kit-deficient mice by bone marrow transplantation. *J Gastroenterol* 44: 834-841, 2009. (査読有)

[学会発表] (計 40 件)

1. 辻井正彦、近藤純平、赤坂智史、林義人、金 瑛、加藤元彦、山本俊祐、井上拓也、山田拓哉、西田 勉、渡部健二、飯島英樹、竹原徹郎。Cyclooxygenase-2の癌幹細胞バイオロジー、DNA異常メチル化に及ぼす影響 第8回日本消化管学会総会 2012/2/10 宮城
2. 林 義人、辻井正彦、赤坂智史、近藤純平、考藤達哉、竹原徹郎。ヘリコバクターピロリ起因性発癌におけるEZH2の重要性 日本癌学会 2011/10/5 愛知
3. 辻井正彦、井上拓也、山本俊祐、加藤元彦、林 義人、赤坂智史、近藤純平、渡部健二、西田 勉、飯島英樹、筒井秀作、竹原徹郎 Cyclooxygenase-2はDNA異常メチル化を惹起し、癌幹細胞の機能に影響を与える。日本癌学会 2011/10/3 愛知
4. 井上隆弘、飯島英樹、白石衣里、他。炎症性腸疾患におけるIgAO結合型糖查異常の機序について 第97回日本消化器病学会総会 2011/5/13 東京
5. 中島佐知子、飯島英樹、日山智史、白石衣里、向井章、井上隆弘、新崎信一郎、赤坂智史、林義人、近藤純平、西田勉、辻井正彦。炎症性腸疾患患者におけるMannan Binding Lectinの分布とガラクトース欠損IgGの役割。日本潰瘍学会 2010/11/20 大阪
6. 中島佐知子、飯島英樹、向井章、井上隆弘、新崎信一郎、柄川悟志、赤坂智史、林義人、近藤純平、西田 勉、辻井正彦、林 紀夫。炎症性腸疾患患者におけるMannan Binding Lectinの分布とガラクトース欠損IgGの役割 JDDW 2010/10/13-16 横浜

7. 西田勉、筒井秀作、重川稔、柄川悟志、飯島英樹、辻井正彦、林紀夫。自己免疫膵炎の治療と予後 JDDW 2010/10/13-16 横浜
8. 荻山秀治;筒井秀作;赤坂智史;加藤元彦;山本俊祐;林義人;西田勉;渡部健二;飯島英樹;辻井正彦;林紀夫。食道癌術後再建胃管腫瘍に対する内視鏡的粘膜下層剥離術の検討。JDDW 2010/10/13-16 横浜
9. 向井 香織 西田 勉 筒井 秀作 山田 拓哉、植村 彰夫、宮略 昌典 薬師神崇行 新崎信一郎 渡部 健二 飯島 英樹 望月 圭 平松 直樹、辻井 正彦 竹原 徹郎、池添世理子。好酸球性胃腸炎に併発した急性膵炎による膵性胸水に内視鏡的膵管ドレナージが有効であった1例。第93回日本消化器病学会近畿地方会 2010/9/18 大阪
10. 渋川 成弘 西田 勉 筒井 秀作 山田 拓哉、植村 彰夫 新崎信一郎 宮崎 昌典 薬師神崇行、飯島 英樹 望月 圭 平松 直樹 辻井 正彦、竹原 徹郎。関節炎を合併した治療抵抗性の潰瘍性大腸炎に Infiximab が著効した1例第93回日本消化器病学会近畿地方会 2010/9/18 大阪
11. 西田 勉、筒井秀作、柄川悟志、飯島英樹、辻井正彦、林紀夫。長期観察例からみた分枝型膵 IPMN の手術適応に関する検討。第96回日本消化器病学会総会 2010/4/21-24 新潟
12. 柄川悟志、西田 勉、重川 稔、飯島英樹、筒井秀作、辻井正彦、林 紀夫。進行膵癌 (cStageIV) に対する治療戦略。第96回日本消化器病学会総会 2010/4/21-24 新潟
13. 西田 勉、筒井秀作、柄川悟志、飯島英樹、辻井正彦、林 紀夫。長期生存に寄与する臨床的因子に基づいた胃癌化学療法。第96回日本消化器病学会総会 2010/4/21-24 新潟
14. 新崎信一郎、飯島英樹、竜中法佳、黒木絵莉、向井 章、井上隆弘、中島佐知子、柄川悟志、考藤達哉、辻井正彦、三善英知、林 紀夫。ガラクトース転移酵素欠損マウス B 細胞の腸炎保護作用。第96回日本消化器病学会総会 2010/4/21-24 新潟
15. 日山智史、西田 勉、柄川悟志、荒木浩士、渡部健二、飯島英樹、筒井秀作、辻井正彦、林紀夫。小腸移植10年後に出現した下痢に対し小腸内視鏡観察が有用であった1症例。第84回日本消化器内視鏡学会近畿地方会 2010/3/13 大阪
16. 白石衣里、西田 勉、飯島英樹、柄川悟志、荒木浩士、渡部健二、筒井秀作、辻井正彦、竹原徹郎、林紀夫。インフリキシマブが著効した腸管型ベーチェット病の一例。第84回日本消化器内視鏡学会近畿地方会。2010/3/13 大阪
17. S. Shinzaki, H. Iijima, N. Tatsunaka, S. Egawa, S. Nakajima, T. Inoue, A. Mukai, M. Tsujii, E. Miyoshi, N. Hayashi. Regulation of oligosaccharide-associated enzymes by Infiximab In B cells of Crohn's disease. The 4th Korea-Japan Inflammatory Bowel Disease Symposium. 2010/1/23 東京
18. 辻井正彦。NSAIDs の抗腫瘍効果 第13回壁細胞研究会 2009/10/14 京都
19. Tsujii M, Hayashi Y, Kondo J, Kanto T, Takehara T, Hayashi N. Novel PKA-targeting therapy based on cancer stem cell biology. 第68回日本癌学会学術総会 2009年10月1日 横浜
20. Yoshito Hayashi, Masahiko Tsujii, Jumpei Kondo, Tatsuya Kanto, Tetsuo Takehara, Norio Hayashi. CagA induces hypermethylation of microRNA let-7 promoter to increase Ras expression. 8回日本癌学会学術総会 2009/10/1

横浜

21. 椿尾真弓;西田勉;山本俊祐;中島佐知子;柄川悟志;荒木浩士;渡部健二;飯島英樹;筒井秀作;辻井正彦;竹原徹郎;林紀夫。食道偽憩室症の一例。第83回日本消化器内視鏡学会近畿地方会 2009/9/19 京都
22. 松本健吾;西田勉;重川稔;柄川悟志;宇田創;福武信康;荒木浩士;渡部健二;飯島英樹;筒井秀作;辻井正彦;竹原徹郎;林紀夫。当院における内視鏡下腹腔神経叢ブロックの経験。第83回日本消化器内視鏡学会近畿地方会 2009/9/19 京都
23. 新崎信一郎、飯島英樹、柄川悟志、中島佐知子、井上隆弘、考藤達哉、三善英知、辻井正彦、林紀夫。グライコミクスを用いた炎症性腸疾患診断・治療の可能性。JDDW 2009 2009/9/19 京都
24. 山本俊祐、西田勉、筒井秀作、加藤元彦、林義人、荻山秀治、山田拓哉、渡部健二、飯島英樹、辻井正彦、竹原徹郎、林紀夫。早期胃癌におけるプローブ型超音波内視鏡による深達度診断 JDDW 2009 2009/9/19 京都
25. 新崎信一郎、飯島英樹、向井章、井上隆弘、中島佐知子、柄川悟志、考藤達哉、三善英知、辻井正彦、林紀夫。炎症性腸疾患におけるIgG糖鎖異常 血清学的マーカーとしての有用性に関する検討。日本臨床検査医学会 2009/8/26 札幌
26. 飯島英樹、新崎信一郎、黒木絵莉、柄川悟志、中島佐知子、井上隆弘、向井章、考藤達哉、三善英知、辻井正彦、林紀夫。炎症性腸疾患患者の診断および治療に対するIgG糖鎖構造解析の有用性 第46回消化器免疫学会 2009/7/23 松山
27. 中島佐知子、飯島英樹、向井章、井上隆弘、新崎信一郎、柄川悟志、赤坂智史、林義人、近藤純平、西田勉、筒井秀

- 作、辻井正彦、林紀夫。炎症性腸疾患における Vitamin K と RANKL の骨密度および疾患活動性との関連 大阪骨代謝研究会 2009/6/22 大阪
28. Y. Hayashi, S. T. Masahiko Tsujii, Ying Jin, Takahiro Inoue, Jumpei Kondo, Sachiko Nakajima, Toshiyuki, S. I. Yoshio, Shinichiro Shinzaki, Satoshi Egawa, Tsutomu Nishida, Kenji Watabe, Hideki Iijima, Shusaku Tsutsui, T. Sunao Kawano, Norio Hayashi. Hypermethylation of Let-7 Promoter Is Involved in cagA-Induced RAS Upregulation in Gastric Epithelial Cells. 米国 DDW 2009/5/30 Chicago, USA
  29. S. Yamamoto, T. Nishida, S. Tsutsui, M. Kato, Y. Hayashi, T. Yamada, H. Ogiyama, T. Yoshio, H. Iijima, M. Tsujii, N. Hayashi. Clinical Factors Influence Accurate Endosonographic Assessment with Miniprobe for Early Gastric Cancer. 米国 DDW 2009/5/30 Chicago, USA
  30. S. Ishii, S. Tsuji, M. Tsujii, T. Nishida, K. Watabe, H. Iijima, T. Takehara, S. Kawano, N. Hayashi. Restoration of Gut Motility in Kit-Deficient Mice By Bone Marrow. 米国 DDW 2009/5/30 Chicago, USA
  31. S. Shinzaki, H. Iijima, S. Egawa, S. Nakajima, T. Inoue, Y. Jin, Y. Hayashi, J. Kondo, S. Ishii, T. Nishida, T. Kanto, E. Miyoshi, M. Tsujii, N. Hayashi. Deficiency of Galactosyltransferase, Indispensable Enzyme for IgG Galactosylation, Ameliorates Murine Dextran. 米国 DDW 2009/5/30 Chicago, USA
  32. M. Tsujii, J. Kondo, Y. Jin, T. Nishida, Y. Hayashi, S. Ishii, Y. Hayashi, T. Yoshio, S. Egawa, S. Shinzaki, T. Inoue, S. Nakajima, K. Watabe, H. Iijima, S. Tsutsui, N. Hayashi. Novel PKA-Targeting Therapy Based On Cancer Stem Cell Biology 米国 DDW 2009/5/30 Chicago,

USA

33. H. Iijima, S. Nakajima, S. Shinzaki, S. Egawa, T. Inoue, Y. Hayashi, J. Kondo, S. Ishii, T. Yoshio, T. Nishida, T. Kanto, E. Miyoshi, M. Tsujii, N. Hayashi. Oligosaccharide Alterations in IgG in Inflammatory Bowel Disease Is Not Associated with MBL Lectin. DDW 2009/5/30 Chicago, USA
34. H. Ogiyama, T. Nishida, S. Tsutsui, T. Yamada, T. Michida, S. Kitamura, M. Ichiba, M. Komori, O. Nishiyama, F. Nakanishi, S. Zushi, M. Yura, H. Iijima, M. Tsujii. Postoperative Pneumonia Associated with ESD Is Increased in Elderly Patients with Upper Gastrointestinal 米国 DDW 2009/5/30 Chicago, USA
35. S. Nakajima, H. Iijima, T. Inoue, S. Shinzaki, S. Egawa, Y. Hayashi, J. Kondo, S. Ishii, T. Yoshio, K. Watabe, T. Nishida, M. Tsujii, S. Tsutsui, N. Hayashi. Correlation Between Vitamin K Deficiency and Clinical Activity Index in Patients with Inflammatory Bowel. 米国 DDW 2009/5/30 Chicago, USA
36. 山本俊祐、筒井秀作、西田勉、加藤元彦、林義人、山田拓哉、荻山秀治、由雄敏之、飯島英樹、辻井正彦、林紀夫。早期胃癌におけるプローブ型超音波内視鏡による深達度診断。第77回日本消化器内視鏡学会総会 2009/5/21 名古屋
37. 新崎信一郎、飯島英樹、井上隆弘、中島佐知子、柄川悟志、石井修二、考藤達哉、三善英知、辻井正彦、林紀夫。炎症性腸疾患におけるIgG糖鎖異常ーガラクトース転移酵素欠損マウスを用いた解析。第95回日本消化器病学会 2009/5/7 札幌
38. 中島佐知子、飯島英樹、井上隆弘、新崎信一郎、柄川悟志、林義人、近藤純平、石井修二、西田勉、筒井秀作、辻井正彦、林紀夫。炎症性腸疾患患者における低カルボキ

シル化オステオカルシン(ucOC)の骨密度および疾患活動性との相関 第95回日本消化器病学会 2009/5/7 札幌

39. 林義人、西田勉、筒井秀作、山本貴洋、飯島英樹、辻井正彦、竹原徹朗、林紀夫。消化器癌悪性腹水に対する triamcinolone 腹腔内投与の症状緩和効果。第95回日本消化器病学会 2009/5/7 札幌

40. 加藤元彦、西田勉、山田拓哉、荻山秀治、由雄敏之、山本俊祐、林義人、渡部健二、飯島英樹、筒井秀作、辻井正彦、林紀夫。胃良性・悪性境界病変に対する内視鏡的粘膜下層剥離術の妥当性 第95回日本消化器病学会 2009/5/7 札幌

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

辻井 正彦 (TSUJII MASAHIKO)  
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：40303937

### (2) 研究分担者

飯島 英樹 (IIJIMA HIDEKI)  
大阪大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：90444520

西田 勉 (NISHIDA TSUTOMU)  
大阪大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：20467575

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：