

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 6 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430127

研究課題名(和文)ピロリ菌感染により幹細胞レベルで誘発されるメチル化の同定

研究課題名(英文) Distribution of gastric epithelial cells with DNA methylation by Helicobacter pylori

研究代表者

浅田 潔 (Asada, Kiyoshi)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：50311410

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、除菌後に存在するDNAメチル化異常は幹細胞レベルで誘発されたものであることを示し、幹細胞レベルで誘発されたDNAメチル化異常の量が発がんに重要であることを明らかにすることを目的とした。しかしながら、特定遺伝子のDNAメチル化を組織レベルで観察することはできない。そこで、DNAメチル化の存在と発現の消失が1:1に対応するX染色体上の遺伝子 SMARCA1, FHL1等を利用した。胃癌切除症例の胃粘膜を用いて、これらの遺伝子の免疫組織染色を試みたが、腺管毎に、染色される腺管と染色されない腺管が存在するような、期待される染色パターンは得られなかった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to clarify aberrant methylation, induced in gastric epithelial stem cell, plays crucial roles in carcinogenesis. For that purpose, we tried to show distribution of gastric epithelial cells with DNA methylation, induced by Helicobacter pylori infection. However, methylation of a specific gene cannot be quantified in tissue sections along with visualization of their spatial distribution. Taking advantage of direct correlation between aberrant methylation and gene silencing in genes on chromosome X, we performed immunohistochemistry of genes on the chromosome X, such as FHL1 and SMARCA1. Unfortunately, specific staining patterns of these genes in gastric glands with and without aberrant methylation were not obtained.

研究分野：消化器内科学

キーワード：DNAメチル化 胃粘膜幹細胞 ピロリ菌 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

DNA メチル化異常は、がんが発生する前の一見正常な組織に既に存在する。これまでに胃癌をはじめ、乳がん、肝臓がん、大腸がん、食道がん、腎臓がん等、様々ながんの非がん部で、既にメチル化異常が蓄積していることが示されている [J Biochem Mol Biol, 40:2, 2007]。申請者の研究室では、非がん部胃粘膜に注目し、*H. pylori* 感染が非常に強くメチル化異常を誘発すること、また *H. pylori* 現感染陰性者では、メチル化の蓄積量が胃癌リスクと相関することを世界に先駆けて見出してきた [Clin Cancer Res, 16:989, 2006; CEBP, 15:2317, 2006]。これらの事実から *H. pylori* 感染者の胃粘膜では早期からエピジェネティック異常の蓄積による“発がんの素地”が形成されていると考えられる。

H. pylori 感染者の胃粘膜で強く誘発されたメチル化異常は、除菌により一定レベルまで減少する [J Gastroenterol, 45:37, 2010; Cancer Res, 70:1430, 2010]。このことは、DNA メチル化異常には、一過性のメチル化と、除菌後も残る永続的なメチル化とがあることを示す。しかしながら、メチル化がどの細胞で誘発され、除菌後どの細胞に残るのかは全く不明である。申請者は、「永続的なメチル化は、幹細胞レベルで誘発されたものであるため、新たな前駆細胞が幹細胞から供給されても消えない。一方、前駆細胞レベルで誘発されたメチル化は、幹細胞からの新鮮な前駆細胞の供給により消失する。」と考えている (図1)。

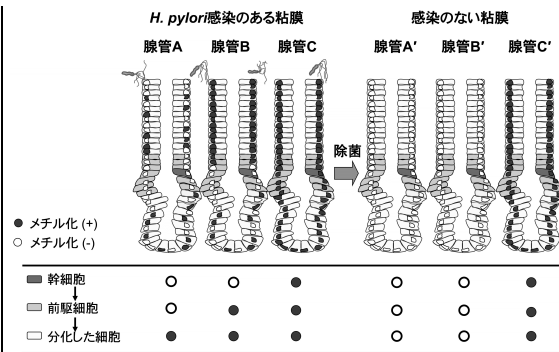


図1 除菌前後の胃粘膜におけるメチル化状態 (仮説)

2. 研究の目的

申請者らが同定した、胃癌における X 染色体上のがん抑制遺伝子、*FHL1* [Oncogene, 32:2140, 2012]等、メチル化サイレンシングされる遺伝子の免疫染色により、除菌後も残存する DNA メチル化異常は幹細胞レベルで誘発されたものであることを明らかにする。

3. 研究の方法

早期胃癌の胃切除症例で、*H. pylori* 既感染例の非がん部胃粘膜を採取し、凍結組織切片を作製する。この切片を用いてメチル化サイレンシングされる遺伝子の発現を免疫染色で解析する。この解析により、腺管単位で組織幹細胞にメチル化がない (染色される) 腺管と、ある (染色されない)腺管を鑑別し、除菌後も残存する DNA メチル化異常は幹細胞レベルで誘発されたものであることを明らかにする。

(1) 対象及び検体について

対象は、早期胃癌による胃切除症例で、*H. pylori* 感染陽性例 10 例、既感染例 10 例とする。既感染の基準は、1) 現感染陰性であること、2) 除菌歴が明らかであること、または

術前内視鏡検査で萎縮性胃炎と診断されていることとする。

胃切除検体の非がん部胃粘膜より、4 個の組織片を採取し、1 個は凍結組織標本作成用、3 個は腺管分離を行った後 DNA、RNA、蛋白質の抽出用に用いる。また PCR 法にて *H. pylori* 感染の有無を確認する。

(2) 免疫染色を行う候補遺伝子の選出

申請者の研究室では、胃がん細胞株でメチル化サイレンシングされる遺伝子を 495 個同定した [Cancer Sci, 97:64, 2006]。申請者は、495 個の遺伝子のうち、1 ヒットで不活化され、メチル化異常と発現消失が 1:1 で対応する X 染色体上の遺伝子を 5 個 (*FHL1*, *CXorf26*, *MAOA*, *MAOB*, *SMARCA1*) 同定した。特に *FHL1* は、がん抑制遺伝子の機能があり、発がんの素地形成にも貢献していることを明らかにした [Oncogene, 32:2140, 2012]。本研究では、これらの X 染色体上の遺伝子 5 個を免疫染色の候補とする。

(3) 腺管単位のメチル化状態の鑑別

H. pylori 感染のある胃粘膜では (図 1 左)、メチル化異常は様々な細胞で誘発され、分化した細胞、前駆細胞、幹細胞で誘発された場合、それぞれ腺管 A、B、C の様に分布し、同じ胃粘膜の中で、A、B、C のような腺管が混在していると考えられる。一方、*H. pylori* 感染のない胃粘膜では、分化した細胞、あるいは前駆細胞で誘発されたメチル化は、幹細胞からの新鮮な前駆細胞の供給により消失する (図 1 右、腺管 A', B')。これに対して幹細胞で誘発されたメチル化は腺管全体に残

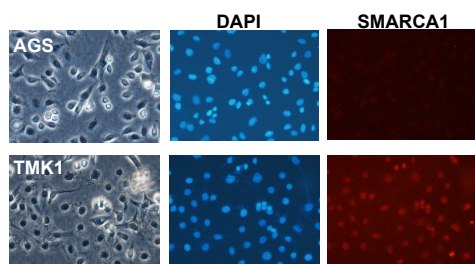
る (図 1 右、腺管 C')。その結果、腺管単位でメチル化がある腺管とない腺管に分かれると考えられる。

本研究では、免疫染色により、*H. pylori* 感染のある胃粘膜では、一つの腺管の中に染色される細胞とされない細胞が混在する染色パターンを示す腺管があり、様々な細胞でメチル化が誘発されていることを明らかにする。一方、*H. pylori* 感染のない胃粘膜では、腺管毎に染色される腺管と染色されない腺管に分かれ、幹細胞レベルでメチル化が誘発された腺管のみ染色されず、抜けてみえることを明らかにする。

4. 研究成果

平成 25 年度は *FHL1* の免疫組織染色を試みた。その結果、粘膜筋板は強く染まったが腺管上皮の染色は弱く、上記の染色パターンは得られなかった。平成 26 年度は *SMARCA1* に着目した。研究の竹島らは、本研究とは別に、*SMARCA1* が正常胃腺管で発現していること、複数の胃がん細胞株ではメチル化サイレンシングしていることを報告した [Cancer Lett, 357:328, 2015]。そこで、免疫組織染色の準備として、胃がん細胞株 AGS (メチル化(+))、TMK1 (メチル化(-))を用いて *SMARCA1* の免疫染色を行い、良好な染色結果を得た (図 2)。平成 27 年度は胃粘膜組織を用いて *SMARCA1* の免疫組織染色を試みたが、良好な染色が得られなかった。*LOX* や *ALDH1A3* 等の遺伝子についても免疫組織染色を試みたところ、粘膜上皮は染色されたが、腺管毎に染色される腺管と染色されない

腺管に分かれる様な染色パターンは得られなかった。



SMARCA1はAGS (メチル化(+))では発現消失、TMK1 (メチル化(-))では発現していることが示された。

図2. SMARCA1の免疫細胞染色

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 特記事項なし

〔学会発表〕 特記事項なし

〔図書〕 特記事項なし

〔産業財産権〕

○出願状況 特記事項なし

○取得状況 特記事項なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

浅田 潔 (ASADA, Kiyoshi)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：50311410