

松島 加代子 論文内容の要旨

主 論 文

MicroRNA signatures in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa

ヘリコバクターピロリ菌感染胃粘膜における
マイクロ RNA の発現

松島 加代子、磯本 一、井上 直樹、中山 敏幸、林 徳真吉、
中山 真彰、中尾 一彦、平山 壽哉、河野 茂

(*International Journal of Cancer*, 23rd March 2010, published online)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科
博士課程
新興感染症病態制御学系専攻
(主任指導教員：河野 茂 教授)

緒 言

microRNA (miRNA) は 18~25 塩基からなる non-coding RNA であり、ヒトでは現在までに 700 種を超える miRNA が報告されている。3'非翻訳領域に相補性の高い配列を有する messenger RNA (mRNA) を標的として結合し、翻訳阻害（もしくは標的 mRNA を分解）することによる蛋白発現の制御が miRNA に共通する epigenetic mechanism である。miRNA は組織特異的な発現パターンを示し、細胞の発生、分化、増殖、細胞死といった種々の生命現象における遺伝子発現のファインチューナーとして重要な役割を果たしている。ゆえに、その発現異常は様々な疾患の発症や病勢に関与しうる。とくに癌においては癌遺伝子や癌抑制遺伝子の発現を制御する miRNA がいくつか同定されており、実際 RAS 蛋白の発現

を制御する let-7 (肺癌), 抗アポトーシス蛋白 Bcl-2 の発現を制御する miR-15a, miR-16-1 (白血病やリンパ腫) などが知られる。しかし, 胃癌においては癌関連 miRNA はほとんど解明されていないのが現状である。そこで本研究では, まず胃発癌の最大の原因である *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) 感染に着目し, *H.pylori* 感染に伴う胃粘膜および胃癌細胞株における miRNA の発現変動を解析することとした。

対象と方法

研究 1: *H.pylori* 陽性・陰性者別に病変を認めない前庭部胃粘膜から生検し, RNA を抽出後マイクロアレイ法(アジレント社)により miRNA を網羅的に解析した。有意 (2 倍以上) に変動を来した miRNA については発現定量をさらに realtime RT-qPCR (アプライドバイオシステム社) にて確認した。次にこれらの miRNA の発現変動と胃炎の病理スコア (シドニー分類に基づく) とを対比検討した。

研究 2: ヒト胃腺癌細胞株 AZ-521 に *H.pylori* 野生株 (ATCC49503) 及びその変異株を感染させる *in vitro* 感染実験を行い, miRNA の発現変動の病原特異性を調べた。

結 果

研究 1: 胃粘膜組織 (対象 19 例, *H.pylori* 陽性 10 例—陰性 9 例) におけるマイクロアレイ解析の結果, *H.pylori* 感染の有無により 55 種の miRNA が有意な変動を示していた。うち 53 種が低発現を示し, 2 種のみが高発現であった。次に, マイクロアレイで変動を示した 55 種の miRNA のうち 46 種類について realtime RT-qPCR 法により定量し発現変動を確認した (対象 36 症例, *H.pylori* 陽性 22 例—陰性 14 例)。*H.pylori* 陽性胃粘膜では 30 種の miRNA が低発現を示し, 1 種 (miR-223) のみ高発現を示していた。*H.pylori* 陽性者で低発現であった 30 種のうち 14 種では除菌後 3 カ月には陰性者と同等のレベルに発現が回復していた。また miR-223, -200a, -31, -141, -203, -204, -455, let-7e の 8 種の miRNA では *H.pylori* 感染の有無を判別可能であった。また, これらの miRNA はシドニー分類との対比検討で胃炎の活動度や慢性炎症との関連性が認められた。

研究 2: *cagA*, *cagPAI* 欠損株と野生株の感染実験の結果から, let-7a, d, f, miR-125a, -500 の 5 種類の miRNA では *cagA* 依存的に有意な発現低下を来していた。

考 察

本研究によって *H.pylori* 感染における miRNA の発現変動が明らかとなった。*H.pylori* 感染の有無により 31 種の miRNA において発現の差異がみられていた。さらに、いくつかの miRNA において *H.pylori* 菌量や胃炎の活動度と相関がみられていたこと、除菌によって発現の回復がみられたことから、*H.pylori* は直接的に或いは持続感染による慢性胃炎を介して胃粘膜における種々の miRNA 発現異常を惹起していると考えられた。

CagA は *H.pylori* による発癌の病原因子といわれているが、本研究では let-7 など がこれらの菌体成分依存性に変動する miRNA として挙げられた。肺癌では let-7 の発現低下は RAS の過剰発現を惹起し、予後や悪性度に関与していることが明らかとなっている。これらのことから miRNA は、胃においても炎症、免疫応答のみならず発癌機序にも少なからず関与している可能性がある。本研究において明らかとなった *H.pylori* 関連 miRNA の機能を個々に解析していくことは胃発癌の機序解明および診断治療につながる可能性が考えられ、今後の検討課題である。