

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

路川 陽介

専攻分野：内科学

コース：消化器・肝臓内科

指導教授：伊東文生

主論文の題目：

COX-2 Gene Promoter Methylation in Patients Infected with *Helicobacter Pylori*

(ヘリコバクターピロリ菌感染患者における COX-2 遺伝子プロモーターのメチル化)

共著者：

Hiroshi Yasuda, Yoshiyuki Watanabe, Ritsuko Oikawa, Yoshichika Ohishi, Tadateru Maehata, Fumio Itoh

緒言

シクロオキシゲナーゼ (cyclooxygenase: COX) は、胃粘膜防御機構に重要な役割をもっている。恒常的に発現する COX-1 は健常時の胃粘膜防御に、COX-2 は炎症や刺激によりその発現が誘導され、粘膜治癒に関与する。COX-2 DNA プロモーター領域には CpG island が存在し、その発現はエピジェネティックな制御を受ける可能性が示唆されている。*Helicobacter pylori* (HP) 感染により胃粘膜で様々な遺伝子がメチル化されることが報告 (Am J Gastroenterol. 102: 1361-1371, 2007) されていることから、HP 関連胃疾患における COX-2 DNA メチル化を検討し、病態への関与について検討した。

方法・対象

ヒト胃粘膜での検討は、聖マリアンナ医科大学病院にて、2009年3月から2011年12月までの間に、上部消化管内視鏡を施行された114例

を対象に行った。スクリーニング胃内視鏡症例、胃十二指腸潰瘍症例、HP 除菌例において、胃前庭部胃粘膜を採取し、DNA を抽出した後、バイサルファイト・パイロシークエンス法で DNA メチル化を定量的に解析した。

in vitro での検討は、中～高度な COX-2 DNA メチル化が報告されている、ヒト胃癌細胞株 Kato III 細胞と AGS 細胞を、COX-2 DNA メチル化状態のモデル細胞として用いて、COX-2 mRNA 発現における COX-2 DNA のメチル化の影響を検討した。胃癌細胞株において、プロテインキナーゼ C (PKC) 刺激剤であるフォルボルエステル_αの添加により、COX-2 mRNA の発現が誘導される報告があることから、 α -phorbol 12, 13-dibutyrate (PDBu) を COX-2 mRNA 発現誘導剤として用いた。また、脱メチル化剤としてメチルトランスフェラーゼ阻害薬である 5-Aza-dC を添加し、COX-2 mRNA の発現をリアルタイム RT-PCR 法で検討した。

なお本研究は、聖マリアンナ医科大学生命倫理委員会（承認 1636 号）の承認を得たものである。統計は χ^2 乗検定及び Student の t 検定を用いた。p<0.05 を有意とした。

結果

胃粘膜における COX-2 DNA のメチル化を、HP 陽性例 (n=65) 及び HP 陰性例 (n=30) で比較すると、HP 陽性例で有意に高かった (27.5% vs 8.1%、p<0.001)。また、HP 陽性例における胃炎 (n=26) と胃潰瘍 (n=39) の両群間で有意差はみられない (p=0.26) もの、潰瘍例で COX-2 DNA のメチル化が高い傾向にあった (26.7%、28.4%)。HP 陽性の胃潰瘍患者の中で 10 人が非ステロイド性抗炎症薬 (non-steroidal anti-inflammatory drugs : NSAIDs) を使用しており、COX-2 DNA メチル化レベルは、非 NSAIDs 潰瘍患者 (n=29) と比較して有意差はみられなかった (27.9% vs 29.6%、p=0.45)。HP 除菌例 (n=19) と HP 陽性例を比較すると、COX-2 メチル化レベルは HP 除菌例で有意に低かった

(18.7% vs 27.5%, $p < 0.001$)。

次に、*in vitro* の検討では、KatoⅢ細胞及び AGS 細胞の COX-2 mRNA の発現は低値であったが、5-Aza-dC を添加すると、COX-2 DNA のメチル化は、KatoⅢ細胞では 88% から 65%、AGS 細胞では 45% から 40% に低下し、KatoⅢ細胞 ($p < 0.01$)、AGS 細胞 ($p < 0.05$) の両方で、COX-2 mRNA の発現は有意に増強した。また、KatoⅢ細胞においては、5-Aza-dC を添加した後に、PDBu を添加すると、COX-2 mRNA の発現は 5-Aza-dC 単独と比べて、有意に増強した ($p < 0.01$)。

考察

ヒト胃粘膜において、HP 感染により COX-2 DNA はメチル化をきたしていた。HP 除菌後の患者では COX-2 DNA メチル化レベルが低下することから、可逆的な変化と考えられた。*in vitro* の検討で、COX-2 DNA の脱メチル化により COX-2 mRNA の発現は増強した。COX-2 は潰瘍治癒に重要な因子であることから、COX-2 DNA メチル化は潰瘍を発症しやすい要因の一つである可能性がある。HP 感染者では COX-2 DNA のメチル化により、粘膜障害時に COX-2 mRNA が発現されず、粘膜修復不全となり潰瘍発症につながる可能性がある。一方、HP 陰性例あるいは除菌例では、COX-2 DNA はメチル化していないため、粘膜障害時に COX-2 が発現誘導され、粘膜修復は促進されると思われた。また、*in vitro* の検討では、COX-2 mRNA の発現は脱メチル化剤及び PKC 刺激剤により相加的に発現が亢進することから、転写調節とエピジェネティックな機序を介して制御されていると考えられた。

結論

本研究の結果から、COX-2 DNA は HP 感染患者の胃粘膜においてメチル化され、潰瘍発生に関与している可能性があると考えられた。また、COX-2 mRNA の発現は転写調節及びエピジェネティックな機序で制御されていると考えられた。