

審査の結果の要旨

氏名 氣駕 恒太朗

本研究はピロリ菌の慢性感染過程において重要な役割を演じていると考えられるmicroRNAの機能を明らかにするため、in vitro、in vivoにおける本菌の感染過程において、発現変動するmicroRNAの同定とその機能解明を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. in vitroピロリ菌感染において発現上昇するmicroRNAとしてmiR-210を同定した
in vitroピロリ菌感染におけるmiRNAの網羅的発現解析の結果から、ピロリ菌感染で宿主胃上皮細胞のmiR-210が顕著に発現上昇することを突き止めた。さまざまなピロリ菌株をヒト胃上皮由来細胞株であるAGS細胞に感染させた場合あるいは、マウス胃上皮細胞に対するex vivoのピロリ菌感染においてもmiR-210の発現上昇がreal-time PCR法により認められた。ピロリ菌の感染依存的にHIF-1 α のタンパク質量が増強され、miR-210のpromoterを活性化することが、western blot、luciferase assayの結果から示された。
2. miR-210はピロリ菌の慢性感染時にはDNAメチル化によるサイレンシングを受ける
スナネズミにピロリ菌を感染させ、感染初期段階の14日後と、慢性感染期の63日後でmiR-210の発現量をreal-time PCR法で定量化したところ、14日後では発現上昇していたのに対し、63日後ではmiR-210の発現の減少が観察された。この結果を確かめるために、ヒト臨床検体の胃上皮細胞におけるmiR-210の発現量を調べた。その結果、ピロリ菌に感染した胃では、感染していない胃上皮細胞と比較し、miR-210の発現が減少していることが示された。また、ピロリ菌に慢性感染している胃ではmiR-210のCpG islandが高度にメチル化されていることがMethylation specific PCR及びBisulfite sequencingにより示された。CpG islandのDNAメチル化がmiR-210の発現を負に制御していることが、in vitro DNA methyltransferaseによるmiR-210発現アッセイと、DNAメチル化阻害薬を用いた実験から示された。
3. miR-210は胃上皮細胞の増殖を制御している
miR-210を胃上皮由来細胞株に発現させると、細胞の増殖抑制が認められた。一方、miR-210の発現を抑制した細胞では増殖の亢進が確認された。事実、miR-210を強制発現させたMKN45細胞の細胞周期をDNA染色薬であるPropidium Iodideを用いて計測すると、G1期の細胞が増加し、細胞分裂が抑制されていることが示された。
4. miR-210はSTMN1、DIMT1L、METTL13を標的として細胞の増殖を制御している
マイクロアレイとバイオインフォマティクス、レポーターシステムを用いたシステムティックな遺伝子同定法により、miR-210の直接の標的として、NDUFA4、FGFRL1、RPL22、INPP5A、ERP27、STMN1、DIMT1L、METTL13、VAMP7、NFIC、PPP1R2、RAB27、C22orf9、FOXN3、H2AFY、EHD2、SH3BGRL、ATP11Aを同定した。さらに、

胃上皮細胞の増殖を制御する遺伝子として、STMN1、DIMT1L、METTL13を特定した。miR-210の発現が低下しているピロリ菌保有者の胃上皮では、対照となるヒトの胃上皮と比較し、STMN1、DIMT1L、METTL13の発現量が増加していることが示された。

以上、本論文はピロリ菌の感染において、miR-210 の発現制御機構と機能を明らかにした。本研究は、ピロリ菌慢性感染における発癌メカニズムの解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。