

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：82654

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19315

研究課題名(和文) Cre発現ピロリ菌を用いた新たな胃癌モデルマウスの開発

研究課題名(英文) New stomach cancer model mouse using Cre expression H. pylori

研究代表者

鈴木 伸三 (Nobumi, Suzuki)

公益財団法人朝日生命成人病研究所・その他部局等・教授(移行)

研究者番号：30723746

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ピロリ菌の感染が胃癌を引き起こすことは周知の事実である。一方、マウス実験においては、遺伝子改変マウスの元となるC57BL/6系マウスに感染可能なピロリ菌に限られ、障害となっていた。近年PMSS1株が感染可能なことが、報告された。我々は、PMSS1株がB6系マウスに感染可能なことを確認し、それにより引き起こされる胃炎マウスを使用して、IL-1シグナルとSOX9が腸上皮化生に関与していることを導き出した。続いて、PMSS1株はCreを発現しなかったが、PMSS1株のCagAをKOし、ストレスMAPKの活性化がCagAに依存することを確認した。

研究成果の概要(英文)：It is a well-known that H. pylori infection causes stomach cancer. On the other hand, H. pylori that can not infect C57BL / 6 mice, which is the source of genetically modified mice. This was a obstacle in mouse experiments. Recently it has been reported that PMSS 1 strain can infect. We confirmed that the PMSS 1 strain can infect B6 mice. Then we made the gastritis mice model by useing PMSS1 strain and we reported a paper that IL - 1 signal and SOX 9 are involved in intestinal metaplasia. Subsequently, PMSS 1 strain did not express Cre, but we make CagA of PMSS1 to be KO and we confirmed activation of stress MAPK was dependent on CagA.

研究分野：消化器内科

キーワード：ピロリ菌 胃癌

1. 研究開始当初の背景

ピロリ菌感染が胃癌の原因となっていることは、周知である。しかし、遺伝子改変マウスに使用される B6 系マウスへ感染可能なピロリ菌に限られていた。近年 PMSS1 株の報告により、B6 系マウスでもピロリ菌感染実験が可能とされた。B6 系マウスに感染可能な特徴を活かし、ピロリ菌胃炎の解明やピロリ菌がデリバリーする Cre による胃癌モデルの開発を目指した。

2. 研究の目的

ピロリ菌胃炎の病態解明と胃癌モデルマウスの開発。

3. 研究の方法

ピロリ菌 PMSS1 株を使用したマウス感染モデルを樹立する。PMSS1 株をゲノム組み換えし、Cre を発現させる。

4. 研究成果

ピロリ菌 PMSS1 株を B6 系マウスに感染させたところ、B6 系マウスにて胃炎を引き起こすことに成功した。また、長期に観察すると、胃炎に引き続き腸上皮化成を引き起こすことも確認できた。このことは、一般的なヒトピロリ菌感染胃炎と類似した経過であり、このモデルが、ピロリ菌感染胃炎、腸上皮化成の研究に有用であると思われる。胃炎粘膜から RNA を抽出し、各種サイトカイン遺伝子の発現を解析したところ、IL-1b、TNFa の上昇が確認できた。また、腸上皮化成が引き起こされた胃粘膜において、各種幹細胞マーカーを免疫染色したところ、幹細胞マーカーである、CD44、SOX9 発現細胞が、腸上皮化成胃粘膜で増加していることが確認された。続いて、上昇していた IL-1 シグナルが、腸上皮化成に果たす役割を検証するため、IL-1R ノックアウトマウスに、PMSS1 株を感染させた。IL-1R ノックアウトマウスでは、腸上皮化成変化は減弱し、WT では増加していた SOX9 の発現細胞も減少していた。このことから、腸上皮化成変化には、ピロリ菌感染により SOX9 陽性細胞の誘導が必要であることがわかった。

続いて、PMSS1 株に Cre タンパクを発現させるため、まず、PMSS1 株において相同組み換えが可能かどうかを検証した。組み換えの対象は、発癌に重要とされるピロリ菌毒素 CagA 遺伝子を対象とした。組み換え効率を上げるため、ピロリ菌内でも複製が可能な pHEL2 ベクターを使用し、CagA 遺伝子内にカナマイシン耐性遺伝子を挿入しピロリ菌に軽視転換した。まず、カナマイシンでセレクションし複数ラインを樹立し、続いてベクター内の相同組み換えアームの外側にクロラムフェニコール耐性遺伝子があることを利用して、クロラムフェニコール感受性のラインを選ぶことで、相同組み換え後の菌株を選び出した。目的通りの相同組み換えが起きたか

確認するため CagA 遺伝子をクローニング後、シーケンスにて確認した。また、ウェスタンプロットにて CagA タンパクの発現が消失していることも確認した(図1)。続いて、CagA の宿主上皮取り込みシグナル配列の 3' 側に Cre タンパクを融合させる設計で、ベクターを作成した。形質転換されたピロリ菌は、Cre 遺伝子を保有するもののタンパクレベルでは、Cre の発現が見られなかった。そこで、CagA 遺伝子のプロモーター部分をクローニングし、相同組み換え用ベクターに付加した。プロモーター付加後のベクターは、形成転換に成功しなかった。これらのことから、Cre 発現ピロリ菌の作成には成功せず、原因としては、ピロリ菌が Cre タンパクの翻訳ができないことが予測された。Cre タンパク発現ピロリ菌の作成はできなかったが、CagA 遺伝子のノックアウトには成功しており、CagA ノックアウトピロリ菌を胃癌細胞株 AGS に感染させた。WT ピロリ菌では、JNL のリン酸化レベルの上昇がみられ、ストレス MAPK シグナルが亢進したが、ノックアウト株では JNK のリン酸化は見られなかった(図1)。

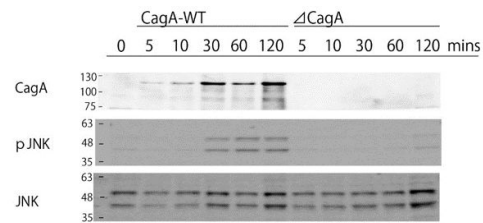


図1. CagAノックアウトPMSS1株によるJNKリン酸化レベル

今後、CagA ノックアウト PMSS1 株を B6 系マウスに感染させて、CagA 毒素がマウスモデルにおいて果たす役割を検証する予定である。

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 11 件)

1. Nakagawa H*, Suzuki N*, Hirata Y, Hikiba Y, Hayakawa Y, Kinoshita H, Ihara S, Uchino K, Nishikawa Y, Ijichi H, Otsuka M, Arita J, Sakamoto Y, Hasegawa K, Kokudo N, Tateishi K, Koike K. Biliary epithelial injury-induced regenerative response by IL-33 promotes cholangiocarcinogenesis from peribiliary glands. Proc Natl Acad Sci U S A. May 9;114(19):E3806-E3815. doi: 10.1073/pnas.1619416114. 2017

2. Ota Y, Yamada A, Kobayashi Y, Niikura R, Shimpoh T, Narita A, Yoshida S, Suzuki N, Watabe H, Hirata Y, Ishihara S, Sunami E, Watanabe T, Koike K. Diagnostic capability of colon capsule endoscopy for advanced colorectal cancer: A pilot study. *Dig Endosc.* Mar 10. doi: 10.1111/den.12862 2017
3. Yoshikawa T, Wu J, Otsuka M, Kishikawa T, Suzuki N, Takata A, Ohno M, Ishibashi R, Yamagami M, Nakagawa R, Kato N, Miyazawa M, Han J, Koike K. Repression of microRNA Function Mediates Inflammation-associated Colon Tumorigenesis. *Gastroenterology.* Nov 5. pii: S0016-5085(16)35322-7 2016
4. Hirata Y, Serizawa T, Shichijo S, Suzuki N, Sakitani K, Hayakawa Y, Yamada A, Koike K. Efficacy of triple therapy with esomeprazole, amoxicillin, and sitafloxacin as a third-line *Helicobacter pylori* eradication regimen. *Int J Infect Dis.* Oct;51:66-69. 2016
5. Shichijo S, Hirata Y, Niikura R, Hayakawa Y, Yamada A, Mochizuki S, Matsuo K, Isomura Y, Seto M, Suzuki N, Suzuki H, Yamamoto S, Sugimoto T, Omae T, Okamoto M, Watabe H, Togo G, Takano N, Fukui K, Ito Y, Koike K. Vonoprazan versus conventional proton pump inhibitor-based triple therapy as first-line treatment against *Helicobacter pylori*: A multicenter retrospective study in clinical practice. *Journal of Digestive Diseases.* 10.1111/1751-2980.12398 2016
6. Ihara S, Hirata Y, Serizawa T, Suzuki N, Sakitani K, Kinoshita H, Hayakawa Y, Nakagawa H, Ijichi H, Tateishi K, Koike K. TGF- β Signaling in Dendritic Cells Governs Colonic Homeostasis by Controlling Epithelial Differentiation and the Luminal Microbiota. *The Journal of Immunology*196 (11):4603. 2016
7. Serizawa T, Hirata Y, Hayakawa Y, Suzuki N, Sakitani K, Hikiba Y, Ihara S, Kinoshita H, Nakagawa H, Tateishi K, Koike K. Gastric Metaplasia Induced by *Helicobacter pylori* Is Associated with Enhanced SOX9 Expression via Interleukin-1 Signaling. *Infection and Immunity* 84(2):562. 2015
8. Sakitani K, Hirata Y, Hikiba Y, Hayakawa Y, Ihara S, Suzuki H, Suzuki N, Serizawa T, Kinoshita H, Sakamoto K, Nakagawa H, Tateishi K, Maeda S, Ikenoue T, Kawazu S, Koike K. Inhibition of autophagy exerts anti-colon cancer effects via apoptosis induced by p53 activation and ER stress. *BMC Cancer* (15):795. 2015
9. Sakitani K, Hirata Y, Suzuki N, Shichijo S, Yanai A, Serizawa T, Sakamoto K, Akanuma M, Maeda S, Yamaji Y, Iwamoto Y, Kawazu S, Koike K. Gastric cancer diagnosed after *Helicobacter pylori* eradication in diabetes mellitus patients. *BMC Gastroenterology* (15):143. 2015
10. Suzuki N, Murata-Kamiya N, Yanagiya K, Suda W, Hattori M, Kanda H, Bingo A, Fujii Y, Maeda S, Koike K, Hatakeyama M. Mutual reinforcement of inflammation and carcinogenesis by the *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein. *Scientific Reports* (5) :10024. 2015
11. Suzuki H, Hirata Y, Suzuki N, Ihara S, Sakitani K, Kobayashi Y, Kinoshita H, Hayakawa Y, Yamada A, Watabe H, Tateishi K, Ikenoue T, Yamaji Y, Koike K. Characterization of a new small bowel adenocarcinoma cell line and screening of anti-cancer drug against small bowel adenocarcinoma. *The American Journal of Pathology* 185 (2): 550–562. 2015

{学会発表}(計 1件)

1. Suzuki N, et al ; Metastatic gastric signet ring cell carcinoma organoids generated from normal mouse stomach (2017/8 GESAAGW 2017, Brisben)

{図書}(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0件）

取得状況（計 0件）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 伸三(Suzuki Nobumi)

公益財団法人朝日生命成人病研究所

その他部局等, 教授

研究者番号：研究者番号 30723746