

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19077

研究課題名(和文)ピロリ菌感染に関連した胃癌発癌機構におけるグルタチオン分解酵素CHAC1の役割

研究課題名(英文) Helicobacter pylori induces somatic mutations in TP53 via overexpression of CHAC1 in infected gastric epithelial cells

研究代表者

伊藤 崇 (ITO, Takashi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：20516314

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)：本研究ではcagA陽性ピロリ菌の感染細胞内にてグルタチオン新規分解酵素CHAC1の過剰発現が誘導され、さらに細胞内グルタチオンの低下や活性酸素種の蓄積を導くことを発見した。酵素活性のあるCHAC1の過剰発現細胞ではTP53の塩基置換が誘導され、一方、酵素活性のないCHAC1の過剰発現細胞ではその変異は一切認められなかった。また、感染によるCHAC1の過剰発現によっても変異が誘導されたが、siRNAによりCHAC1発現を抑制すると、感染による遺伝子変異は完全に抑制された。これより、感染により誘導されるCHAC1過剰発現が、TP53の変異を誘導し、ピロリ菌感染胃癌の発生に寄与していると推測される。

研究成果の概要(英文)：Cation transport regulator 1 (CHAC1) has γ -glutamylcyclotransferase activity that degrades glutathione. We found that cagA-positive *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection triggered CHAC1 overexpression in human gastric epithelial (AGS) cells leading to glutathione degradation and the accumulation of reactive oxygen species (ROS). Nucleotide alterations in the TP53 tumour suppressor gene were induced in AGS cells overexpressing CHAC1, whereas no mutations were detected in cells overexpressing a catalytically inactive mutant of CHAC1. A high frequency of TP53 mutations occurred in *H. pylori*-infected AGS cells but this was prevented in cells transfected with CHAC1 siRNA. These findings indicate that *H. pylori*-mediated CHAC1 overexpression degrades intracellular glutathione, allowing the accumulation of ROS which subsequently causes mutations that could contribute to the development of gastric cancer.

研究分野：病理学

キーワード：cagA CHAC1 グルタチオン *H. pylori* p53 ROS

1. 研究開始当初の背景

近年、発癌と酸化ストレスとの関連が注目されている。Cation transport regulator-like protein 1 (CHAC1) タンパクはグルタチオン (抗酸化物質) の分解酵素としての機能を担うことが新たに判明したが、発癌メカニズムにおける役割は明らかとなっていない。本教室にて予備検討を行ったところ、ピロリ菌感染細胞や胃癌組織で本タンパクの発現上昇が観察された。このことから、ピロリ菌感染に伴い上昇した本タンパクはグルタチオンを分解し、それに続く細胞内 ROS 量の上昇が癌抑制遺伝子の変異を惹起することで発癌に至ると推察される。本研究では、この仮説に基づき、ピロリ菌感染に関連した発癌メカニズムにおける CHAC1 タンパクの機能的役割、および CHAC1 抗体の病理診断における癌マーカーとしての応用性を明らかにする。

2. 研究の目的

ピロリ菌感染に伴う細胞内活性酸素種 (ROS) の蓄積やグルタチオン (GSH) の分解については多くの研究がなされており、感染細胞内におけるこれらの変化が最終的に酸化ストレスによる DNA ダメージとなり、胃癌発生に寄与していると考えられている。GSH は ROS によって誘導される酸化ストレスに対抗する抗酸化分子としての機能を有することは知られているが、ピロリ菌感染に伴う細胞内 GSH の低下が ROS 蓄積によって誘導されるのか、GSH 分解により ROS 蓄積が誘導されるのか、未だにはっきりとは分かっていない。近年、 γ -glutamylcyclotransferase 活性を持つ γ -glutamylcyclo 内の新たな酵素として、Cation transport regulator 1 (CHAC1) が同定された。CHAC1 は GSH を 5-oxoproline と cystenylglycine にダイレクトに分解できるため、数少ない細胞内に存在する redox balance を維持する上で重要な GSH 分解酵素の 1 つであると考えられている。また、CHAC1 は ER ストレス応答経路の構成分子の 1 つとしての機能も知られており、先行研究では、乳癌や卵巣癌においては mRNA レベルにおける CHAC1 発現の上昇が予後不良因子となることがわかっている。そこで、本研究では CHAC1 が GSH 分解能を有することから、ピロリ菌感染に伴う GSH の分解は CHAC1 発現によるものであると考え、ピロリ菌感染細胞内の GSH 及び ROS 量を測定し、さらに ROS 蓄積による DNA ダメージがもたらす TP53 遺伝子変異の誘導について解析を行った。

3. 研究の方法

感染実験

ヒト胃上皮培養細胞 (AGS) を培養用シャーレにて培養し、ピロリ菌を感染させた。ピロリ菌は野生型ピロリ菌 (*cagA* 陽性ピロリ菌) と、胃癌発症の病原因子である *cagA* をノックアウトさせた変異体ピロリ菌 (*cagA* 陰性ピロリ

菌) の 2 株を使用した。CHAC1 発現の抑制には siRNA およびコントロールとして scrambled siRNA を使用し、ピロリ菌感染の 6 時間前にリポフェクタミンを用いて細胞内に導入した。遺伝子解析の実験では、3 日毎に培養細胞の蒔き直し及び siRNA の導入とピロリ菌感染を繰り返し、16 日間培養を継続させた。

CHAC1 過剰発現実験

pCMV6 より酵素活性を有する CHAC1 (CHAC1-WT) の cDNA を獲得した。酵素活性を有さない CHAC1 変異体 (CHAC1-MT) は 157 番目のアミノ酸 E を Q に置換して作成した。AGS を培養用シャーレにて培養し、それぞれの cDNA が挿入されたプラスミド DNA をリポフェクタミンにより細胞内に導入した。3 日毎に培養細胞の蒔き直し及びプラスミド DNA の導入を繰り返し行い、4, 8, 16 日間培養を継続させた。

サンプル処理

各条件の培養細胞は一定時間後、TRIzol により RNA 抽出液、Lysis buffer によりタンパク抽出液をそれぞれ回収し、以降の実験に使用した。RNA 抽出液より RNA を精製、cDNA を合成し、リアルタイム RT-PCR の解析に使用した。Western blotting では 25 μ g の各サンプルのタンパク抽出液を使用し、筆者の研究室で作成した抗 CHAC1 単クローン抗体により検出した。

細胞内 GSH 及び ROS 量の測定

GSH 濃度測定は市販のキットを使用し、細胞内より GSH を抽出し、濃度既知のスタンダードサンプルより作成した標準曲線より各サンプル中の GSH 濃度を算出した。細胞内 ROS の蓄積量は carboxy-H₂DCFDA にて細胞内染色を施し、フローサイトメトリーにてその蛍光を測定した。

TP53 遺伝子変異解析

精製された RNA より合成された cDNA を鋳型として、TP53 遺伝子の exon 2 から 11 の領域 (1179 塩基対) を PCR にて増幅後、サブクローニングを行った。ランダムに選ばれたクローンより抽出されたプラスミドを用い、シーケンズ解析を行い、変異の有無を解析した。なお独立した 2 回の実験を行った後、それぞれのサンプルにおいて解析を実施した。

4. 研究成果

cagA 陽性ピロリ菌感染した AGS では、CHAC1 の過剰発現、および細胞内 GSH の分解、さらに ROS の細胞内蓄積が誘導される (図 1 参照)

cagA 陽性ピロリ菌に感染した AGS では、CHAC1 の過剰発現が mRNA 及びタンパクレベルにおいて有意に誘導されたが ($P < 0.0001$)、*cagA* 陰性ピロリ菌に感染した AGS ではその過剰な発現は誘導されなかった。CHAC1 の過剰発現が最も強く認められた感染 24 時間後に、細胞内 GSH および ROS 量を測定したところ、*cagA* 陽性ピロリ菌に感染した AGS では GSH の分解 ($P < 0.001$) および ROS の蓄積 ($P < 0.001$)

が有意に認められたが、感染前に siRNA にて CHAC1 の発現を抑制した場合には、*cagA* 陽性ピロリ菌感染に伴うこれらの変化は認められなかった。CHAC1 が誘導されない *cagA* 陰性ピロリ菌に感染した細胞では、細胞内の GSH、ROS 量に変化は認められなかった。

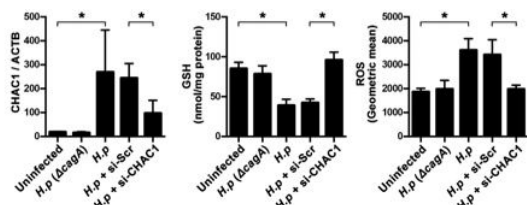


図1 ピロリ菌感染に伴う CHAC1, GSH, ROS 量

cagA 陽性ピロリ菌が感染した AGS における *TP53* 遺伝子変異の誘導には、酵素活性を有する CHAC1 の過剰発現が必要である

AGS に CHAC1-WT を 4, 8, 16 日間、継続的に過剰発現させたところ、細胞内 GSH の分解および ROS の蓄積が経時的に顕著に認められたが、CHAC1-MT を過剰発現させた AGS ではこれらの変化は認められなかった。これらの細胞の *TP53* 遺伝子を解析したところ、CHAC1-WT を過剰発現させた場合、アミノ酸置換を伴う遺伝子変異の頻度が 4, 8, 16 日と経時的に増加しており、それぞれ 0.28 /104, 1.01 /104, 1.87 /104 塩基対であった (Not significant, $P = 0.0074$, $P = 0.0001$)。一方、CHAC1-MT を過剰発現させた場合には、これらの変異は一切認められなかった。また、16 日間、ピロリ菌を継続的に感染させた AGS においては、*cagA* 陽性ピロリ菌が感染した場合、細胞内 GSH の分解および ROS の蓄積が起こり、さらには *TP53* 遺伝子変異が誘導され、アミノ酸置換を伴う変異頻度は 1.15 /104 塩基対であった ($P = 0.0037$)。しかしながら、これらの変化は *cagA* 陰性ピロリ菌が感染した場合には認められなかった。さらに、感染における CHAC1 の過剰発現を抑制するため、感染前に siRNA にて CHAC1 発現を抑制した場合には、*cagA* 陽性ピロリ菌が継続的に感染したとしても、細胞内 GSH が保たれ、ROS の蓄積も起こらず、*TP53* 遺伝子変異も全く誘導されなかった。

結論

本研究により、*cagA* 陽性ピロリ菌感染により惹起される CHAC1 の過剰発現が、感染細胞内の GSH 分解とそれに伴う細胞内 ROS 蓄積を誘導し、その結果、*TP53* 遺伝子変異を導くことが分かった。CHAC1 過剰発現に伴う感染細胞内の酸化ストレスによる DNA ダメージがピロリ菌感染胃癌の発生に寄与しているかもしれない。

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 1 件)

Yuriko Wada, Kosuke Takemura, Padmaja Tummala, Keisuke Uchida, Keisuke Kitagaki, Asuka Furukawa, Yuuki Ishige, Takashi Ito, Yukichi Hara, Takashige Suzuki, Hitomi Mimuro, Philip G. Board and Yoshinobu Eishi. *Helicobacter pylori* induces somatic mutations in *TP53* via overexpression of CHAC1 in infected gastric epithelial cells. FEBS Open Bio 2018. 査読有

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 崇 (ITO, Takashi)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教
研究者番号：20516314

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

和田友里子 (WADA, Yuriiko)

掛川智也 (KAKEGAWA, Tomoya)