

平成 21 年 4 月 24 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590385

研究課題名 (和文) 炎症と細胞死を制御する ASC に着目したピロリ菌感染と宿主応答の解析

研究課題名 (英文) Role of ASC, which regulates inflammation and cell death, in *Helicobacter pylori* infection

研究代表者

谷口 俊一郎 (TANIGUCHI SHUN-ICHIRO)

信州大学・医学系研究科・教授

研究者番号：60117166

研究成果の概要：

炎症と細胞死を制御する ASC のピロリ菌感染における役割を解明するために、ASC 欠損マウスにピロリ菌を感染させた所、野生型マウスに比し、感染は高率であったものの、炎症はより軽度であるという結果を得た。宿主防御反応に重要と思われる IL-1 $\beta$  産生が ASC 欠損故に無く、特に IL-18 の産生も無くそれで誘導される IFN- $\gamma$  が産生されなかったためという分子機序を示唆することが出来た。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：腫瘍、自然免疫

## 1. 研究開始当初の背景

ASC は細胞質受容体による自然免疫系において inflammasome 系を介する・カスパー 1 活性化因子として機能し、同時に apoptotic 因子として発がんにも関与すると考えられている。一方、ピロリ菌のヒト胃への感染は発がんに関わることが知られ、ASC のピロリ菌感染への関わりを明らかにすることが必要と考えられた。

## 2. 研究の目的

ASC 欠損マウスにピロリ菌を感染させ、サイトカイン産生、胃粘膜上皮における炎症等を調べ、ASC の感染防御における役割を明らかにする。

## 3. 研究の方法

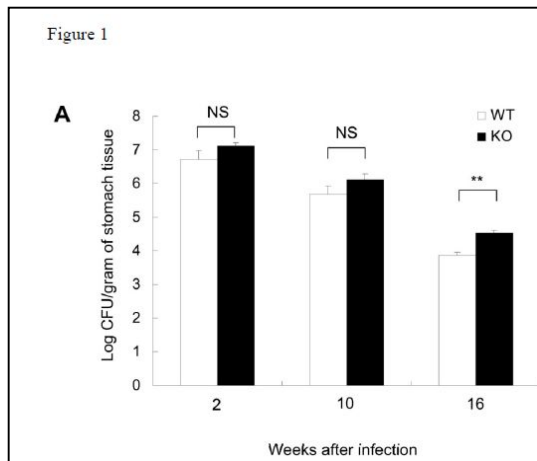
ASC 欠損マウスおよび対照として野生型マウスの胃に *H. pylori* Sydney strain 1 (*H. pylori*) を経口で感染させ、その後の胃における菌数変化、組織内コロニー形成、胃粘膜病

理組織学的検査を行い、その程度を比較検討する。また、炎症性サイトカインの産生、炎症細胞の浸潤程度等を対照マウスと比較検討する。

#### 4. 研究成果

##### (1) ASC 欠損マウスでの *H. pylori* の菌数の変化と組織内コロニー形成

ASC 欠損のマウスと野生型のマウスに *H. pylori* を経口で投与し、胃に於ける菌数を菌の投与後 2,10,16 週後に測定した。何れも ASC 欠損マウスで菌数が多い傾向にあったが、有意差をもって差を示したのは菌投与後 16 週においてであった(Figure 1A) ( $p=0.0043$ )。 *H. pylori* の組織内存在とコロニー形成は免疫染色によっても確認している。以上の結果は ASC が *H. pylori* の感染に対して抵抗性を示す働きをすることを示唆するものである。



##### (2) *H. pylori* 感染で誘導される胃での炎症は ASC 欠損マウスでは軽度である。

*H. pylori* 感染で誘導される胃における炎症は病理組織学的手法で解析した。感染 2、10 週後 野生型マウスも ASC 欠損マウスも軽度の炎症を示したが両者に差は見られなかった。一方、*H. pylori* 投与 16 週後、野生型マウスには胃の炎症が見られたが、ASC 欠損マウスでは比較的軽度であった(Figure 2)。以上、ASC は *H. pylori* 感染に対し、炎症反応を誘導し抵抗性に働くと考えられた。尚、胃組織内に萎縮や腸上皮化生は観察されなかった。

*H. pylori* 感染した胃組織への浸潤炎症細胞を Fig.3 に示しているが単球細胞、多核白血球細胞は *H. pylori* 感染後 16 週においてその数が ASC 欠損マウスで低値であった。

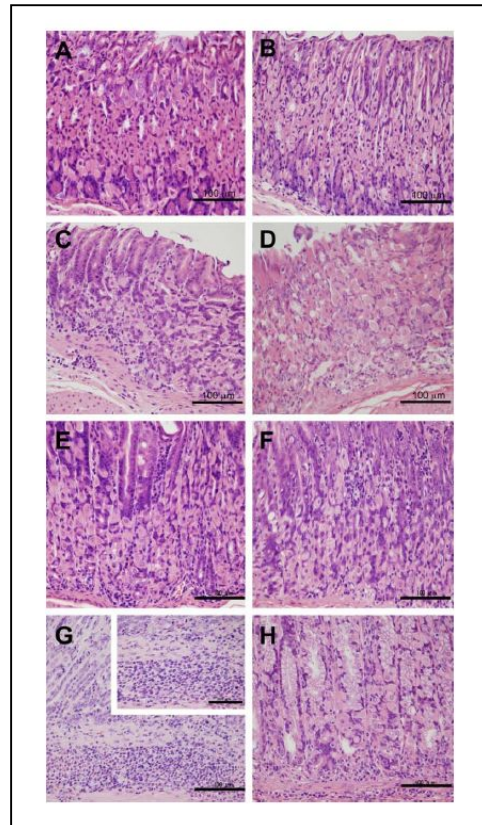
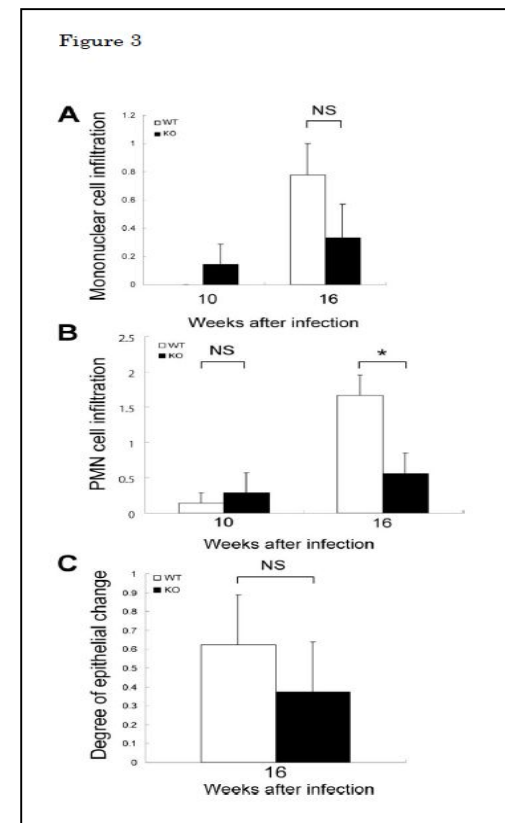
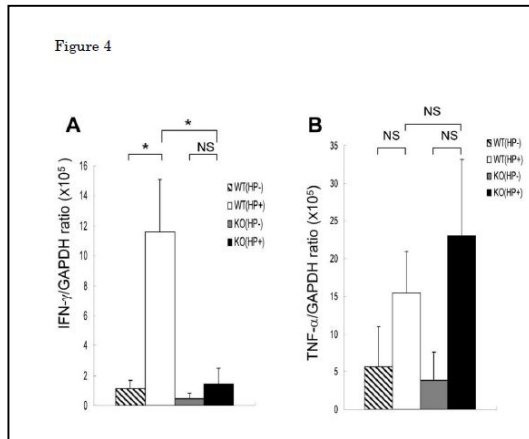


Fig. 2: 胃の病理組織像：左列が野生型マウス、右列が ASC 欠損マウスを表し、A, B は非感染対照マウス、感染後 2 週 (C and D)、10 週 (E and E)、16 週 (G, H) を示している。



(3) *H. pylori* 感染 ASC 欠損マウスでは IL-18 と INF- $\gamma$  の発現が見られなかった。*H. pylori* 感染後 16 週で IL-10, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , and IL-18 などの発現を RT-PCR と ELISA で調べ、ASC 欠損マウスでは INF- $\gamma$  の mPNA 発現が有意に ( $p=0.0286$ ) 低く、一方 IL-10 と TNF- $\alpha$  mRNA には感染有無による発現の差が見られなかった (Figure 4)。

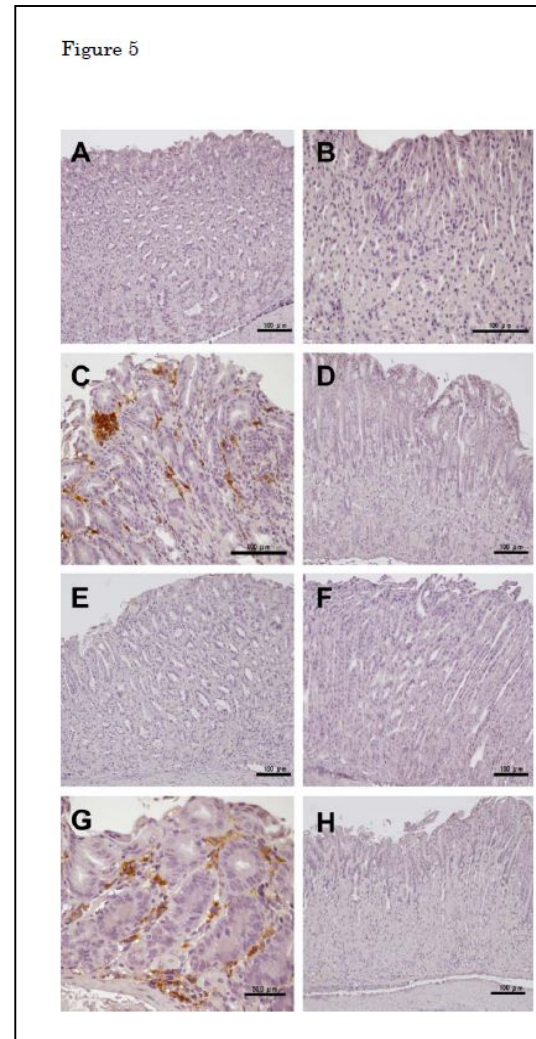


血中の IL-1 $\beta$  と IL-18 を ELISA で *H. pylori* 感染 16 週後に測定すると、IL-18 の発現が野生型マウスではみられるのに対し、ASC 欠損マウスで認められなかった。IL-1 $\beta$  発現はいずれのマウスでも検出できなかった。

Fig. 5 で示すように胃組織での IL-1 $\beta$ , IL-18 の発現を免疫染色で示した。AB と EF はコントロール血清での染色、ACEG は野生型マウス、BDFH は ASC 欠損マウスで、CD は IL-1 $\beta$  GH は IL-18 に対する抗体でそれぞれ染色したものである。写真から分かるように ASC 欠損マウスは全くこれらのサイトカインを発現していないことが分かる。

### 結論

以上、ASC は *H. pylori* 感染に対して炎症反応を誘導し、防御的に働いている事を明らかにした。今後、細胞計画死誘導にも関わる ASC の機能にも着目して ASC が胃癌の発生にどの様に関わるかを解明するため、この感染実験に加え、化学発がん系で発がん率を調べる事が今後の課題である。また ASC による inflammasome の分子構成と形成機序、また ASC の多面的機能解明について検討する予定である。



### 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 5 件)

① Imamura M, Tsutsui H, Yasuda K, Yumikura-Futatsugi S, Mitani K, Uchiyama R, Hayashi S, Akira S, Taniguchi S, Nico Van Rooijen, Jurg Tschopp, Yamamoto T, Fujimoto J, Nakanishi K. Contribution of TIR domain-containing adapter inducing IFN- $\beta$  mediated IL-18 release to LPS-induced liver injury in mice. J. Hepatology (In press)

② Benoit BN, Kobayashi M, Kawakubo M, Takeoka M, Sano K, Zou J, Itano N, Tsutsui H, Noda T, Fukuda M, Nakayama J, Taniguchi S

Role of ASC in the Mouse Model of Helicobacter pylori Infection.  
J.Histochem & Cytochem. 271:9-12. 2008  
(査読有)

③Yajima N, Takahashi M, Morimoto H, Shiba Y, Takahashi Y, Masumoto J, Ise H, Sagara J, Nakayama J, Taniguchi S, Ikeda U. Critical role of bone marrow apoptosis-associated speck-like protein, an inflammasome adaptor molecule, in neointimal formation after vascular injury in mice. Circulation. 17:3079-3087. 2008 (査読有)

④Takahashi Y, Katai N, Murata T, Taniguchi S, Hayashi T Development of spontaneous optic neuropathy in NF-kBp50-deficient mice; Requirement for NF-kBp50 in ganglion cell survival. Neuropath, Applied Neurobiol. 33(6):692-705, 2007 (査読有)

⑤Taniguchi S, Sagara J. Regulatory molecules involved in inflammasome formation with special reference to a key mediator protein, ASC. Semin Immunopathol. 29(3):231-238. Epub2007 Sep 6. Review. (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

①鄒健、三好征司、小林宣隆、ベノイトベカレ ニュマ、竹岡みち子、板野直樹、谷口俊一郎  
ASC regulates tumor immunity by IL-18/IFN-gamma axis.  
第 67 回日本癌学会学術総会 (名古屋)  
2008. 10/28-30

②BEKALE NGUEMA BENOIT, Michiko Takeoka, Naoki Itano, Jun Nakayama, Shun'ichiro Taniguchi  
Role of ASC protein in the mouse model of Helicobacter pylori infection.  
第 67 回日本癌学会学術総会 (名古屋)  
2008. 10/28-30

③Koki Nakajima, Michiko Takeoka, Masyuki Mori, Akihiro Sakurai, Hiroshi Nose, Keiichi Higuchi, Naoki Itano and Shun'ichiro Taniguchi  
Chronic High-Intensity Walking Exercise Alters DNA Methylation in Normal Middle-Aged and Older Subjects to

Younger State  
7th World Congress on Aging and Physical Activity, Tsukuba, July/26-29, 2008

④中島弘毅, 竹岡みち子, 森政之, 櫻井晃洋, 能勢 博, 樋口京一, 板野直樹, SUGRC, 谷口俊一郎  
ウォーキング運動のエピジェネティック効果—ASC 遺伝子のメチル化に着目して— (第 3 報)  
第 31 回日本基礎老化学会 (松本)  
2008. 6/12-13

⑤松下一彦、相良淳二、谷口俊一郎  
カスパーズ-1 活性化シグナル経路のアダプター分子 ASC スプライシング変異体 (vASC) の機能解析  
第 37 回日本免疫学会総会・学術集会 (東京) 2007. 11/20-22

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

谷口 俊一郎 (TANIGUCHI SHUN-ICHIRO)  
信州大学・医学系研究科・教授  
研究者番号: 60117166

### (2) 研究分担者

(平成 19 年度)

筒井 ひろ子 (TSUTSUI HIROKO)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 40236914

小林 基弘 (KOBAYASHI MOTOHIRO)  
信州大学・医学系研究科・講師  
研究者番号: 00362137

相良 淳二 (SAGARA JUNJI)  
信州大学・医学部・教授  
研究者番号: 10225831

板野 直樹 (ITANO NAOKI)  
信州大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号: 40257712

### (3) 連携研究者

(平成 20 年度)

筒井 ひろ子 (TSUTSUI HIROKO)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 40236914