

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07270

研究課題名(和文)ピロリ菌による炎症を基盤とした発癌メカニズムの解明

研究課題名(英文)Gastric carcinogenesis caused by Helicobacter pylori-induced inflammation

研究代表者

濱田 文彦 (Hamada, Fumihiko)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：70252707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ピロリ菌感染、特に CagA 毒素を持つピロリ菌感染が炎症を遷延化させるメカニズムは未だ不明の部分が多い。本研究では、ショウジョウバエを用いたゲノム規模の遺伝学的スクリーニングを行い、CagA の標的として炎症を促進する脂質メディエーターを発見した。胃培養細胞に CagA を強制発現または CagA 陽性ピロリ菌を感染させたところ、炎症性脂質メディエーター量の顕著な増加が認められた。さらにこれらの細胞の培養上清においてもメディエーター量が顕著に増加することから、細胞内で増加したメディエーターが細胞外へ放出されることが強く示唆された。現在これらの結果の生理学的意義の検証を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ピロリ菌感染、特に CagA 毒素を持つピロリ菌感染では炎症が長く続き、本来の胃粘膜の特性が徐々に失われ、萎縮性胃炎から胃癌の発生へと向かうと考えられている。ピロリ菌感染が炎症を長引かせるメカニズムについては未だ結論が得られていない。本研究では、胃細胞に CagA を発現させたり、CagA 陽性ピロリ菌を感染させたりすると、炎症を促進する脂質メディエーター量が細胞内で顕著に増加し、これが細胞外へも放出されることが明らかになった。薬剤耐性のピロリ菌の出現が広く確認される中、我々の研究成果はピロリ菌感染に対する新たな治療法の開発に結び付くことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Helicobacter pylori infection is known to be a risk factor of stomach cancer. Strains harboring the CagA (cytotoxin-associated gene A) virulence factor strongly stimulate host inflammatory response. However, the mechanisms through which CagA induces prolonged inflammation remain elusive. Based on a genome-wide genetic screen using *Drosophila*, we discovered a lipid mediator of inflammation was significantly increased by ectopic expression of CagA and by infection of CagA-positive *H. pylori* in gastric epithelial cells. Furthermore, the increased mediator was released into the surrounding tissues, which may recruit immune cells into sites of infection and promote inflammation. These results suggest that the lipid mediator of inflammation may play a major role in *H. pylori*-mediated inflammation leading to gastric cancer.

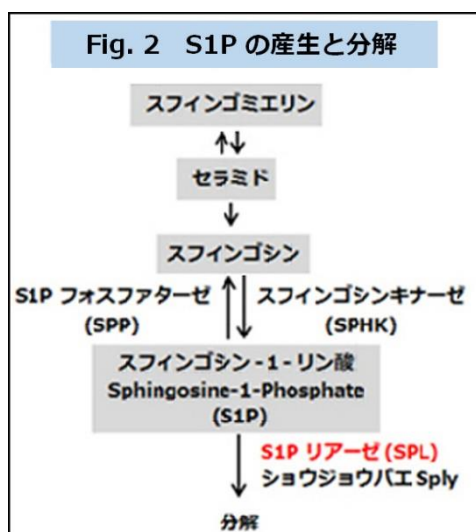
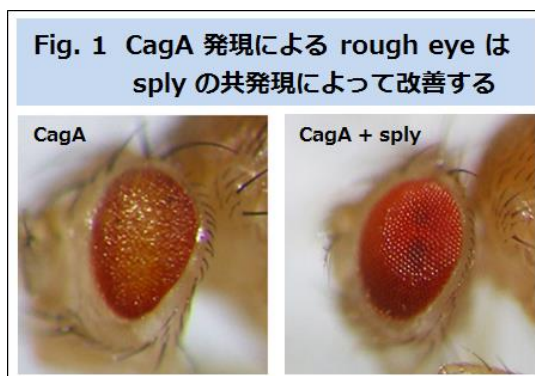
研究分野：組織学 微生物学

キーワード：ピロリ菌 炎症性脂質メディエーター CagA

1. 研究開始当初の背景

ピロリ菌感染、特に菌体から宿主細胞に注入される CagA 毒素をもつピロリ菌感染は慢性胃炎、萎縮性胃炎をベースとして胃癌を引き起こすことが知られている。これまで CagA 毒素をもつピロリ菌感染が激しい炎症を引き起こし、これを遷延化させるメカニズムについて多くの報告がなされてきたが、そのメカニズムの全貌は今日に至るまで明らかになっていない。

我々は、ショウジョウバエの複眼で CagA を発現する系統(ヒト胃粘膜上皮細胞で CagA を発現させた際と同様に上皮構造の構築が損なわれ、複眼が凸凹の状態となる、いわゆる rough eye を呈する、Fig. 1, CagA) を用いたゲノム規模の遺伝学的スクリーニングを実施し、既知の CagA 標的分子のほか、sply 遺伝子の共発現によっても CagA 発現による rough eye が改善することを発見した (Fig. 1, CagA + sply)。sply 遺伝子は細胞膜の構成成分スフィンゴミエリンから産生される生理活性脂質 S1P を分解する S1P リアーゼ (SPL) をコードすることから (Fig. 2)、CagA の発現によって細胞内の S1P が増加して rough eye を呈するが、ここに SPL を共発現させると増加した S1P が分解され、rough eye が正常化するのではないかと考えられた。



2. 研究の目的

以上の研究結果を踏まえ、本研究では「なぜ CagA をもつピロリ菌は炎症を基盤とした強い発癌活性を示すのか？」という問いに答えを見出すため、具体的には以下の2点を柱として研究を実施した。

- (1) CagA の発現による細胞内 S1P の増加が一般的に認められる現象であることを確認し、S1P 増加の分子メカニズムを明らかにする (細胞レベルの実験)。
- (2) CagA をもつピロリ菌感染による炎症を基盤とする発癌過程における S1P の役割を解明する (細胞レベルおよびスナネズミを用いた個体レベルの実験)。

3. 研究の方法

- (1) CagA の発現による細胞内 S1P の増加が一般的に認められる現象であることを確認し、S1P 増加の分子メカニズムを明らかにする (細胞レベルの実験)。

複数の胃の細胞株 (AGS, MKN74 etc) で CagA を発現させ、細胞内外の S1P 量の測定 (LC-MS 方による) や、S1P の生合成に関わるキナーゼ (SPHK)、リアーゼ (SPL) およびフォスファターゼ (SPP) の発現解析 (real time PCR、Western blot) や活性の評価 (SPHK activity assay kit) を行い、S1P の増加が一般的に認められる現象であることを確認し、そのメカニズムを解明する。CagA 陽性ピロリ菌の遺伝子を改変し、CagA 遺伝子のみを欠失する変異型株を樹立する。これらを用いて CagA 陽性および陰性ピロリ菌を用いた感染実験を行い、同様に細胞内外の S1P 量の測定を行う。

- (2) CagA による炎症を基盤とする発癌過程における S1P の役割を解明する (細胞レベルおよびスナネズミを用いた個体レベルの実験)。

CagA 陽性ピロリ菌を感染させた胃細胞株の培養上清を回収し、単球細胞株 THP-1 の遊走に与え

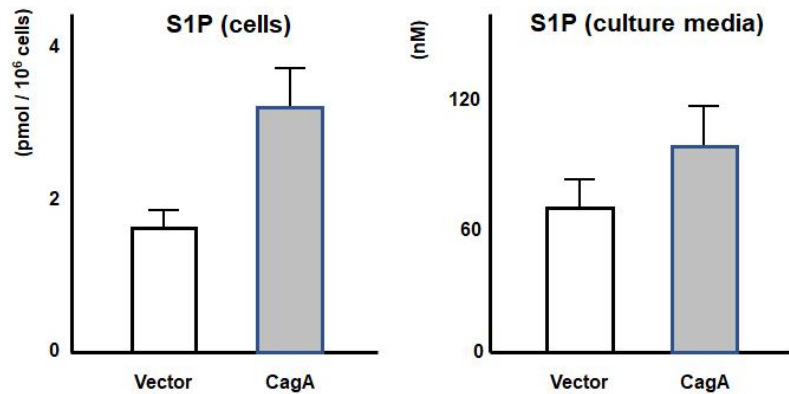
る影響を調べる (方法の詳細は Fig. 7)。CagA をもつピロリ菌をスナネズミに感染させることによって惹起される炎症が SKI-II あるいは FTY720 などの S1P 阻害剤の経口投与によって、抑制されることを証明する。胃粘膜の炎症の程度はヘマトキシリン・エオジン染色した胃の粘膜上皮の形態、炎症細胞の集積の観察、抗 Ki-67 抗体による免疫染色による増殖中の細胞の検出、採取した胃組織中の S1P 量、リン酸化型 STAT3、p65 の発現定量などによって評価する。

4. 研究成果

(1) CagA の発現によって細胞内外で S1P が増加した

レンチウイルス感染系によって、CagA 遺伝子を発現させた AGS および MKN74 胃細胞株において、細胞内における S1P 量の増加が認められた (液体クロマトグラフィー質量分析法による分析)。さらに、培養上清中の S1P 量を測定したところ、CagA 発現によって細胞内と同様に細胞外においても S1P が増加することが明らかになった (AGS 胃細胞株を用いた・Fig. 3)。

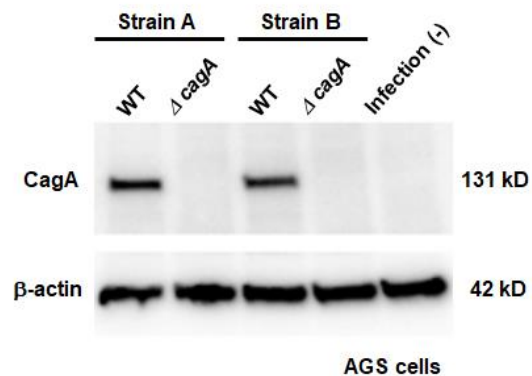
Fig. 3 CagA の発現により、細胞内・細胞外の S1P が増加する



(2) CagA 遺伝子を欠失する変異型ピロリ菌株を作製した

CagA 陽性および陰性のピロリ菌を用いた感染実験を行う目的から、CagA 陽性ピロリ菌株の遺伝子を改変し、CagA 遺伝子のみを欠失する変異型株を樹立した。CagA 遺伝子の欠失は、これらの株を AGS 胃細胞株に感染させ、細胞内に移行した CagA 毒素を抗 CagA 抗体を用いた Western blotting を行うことによって確認した (Fig. 4)。

Fig. 4 CagA 欠失変異型株の作製



(3) CagA 陽性ピロリ菌の感染によって、細胞外 (培養上清中) の S1P が増加した

AGS 胃細胞株へ野生型および CagA 欠失変異型ピロリ菌株を感染させ、細胞内および細胞外の S1P 量を測定した (方法 Fig. 5・control は菌液のみ)。細胞内 S1P 量には両者間でほとんど差が認められなかったが、野生型ピロリ菌を感染させた細胞の培養上清では、CagA 欠失変異型ピロリ菌を感染させた細胞の培養上清と比較し、S1P 量が顕著に増加した (Fig. 6)。

Fig. 5 野生型および CagA 欠失変異型ピロリ菌の感染実験 (AGS cells)

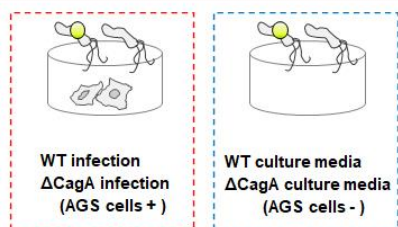
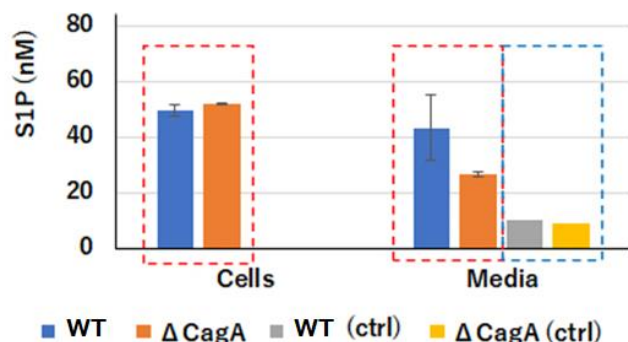


Fig. 6 CagA 陽性ピロリ菌感染により、細胞外 S1P が増加する



(4) CagA 陽性ピロリ菌を感染させた細胞の培養上清によって単球由来細胞株 THP-1 の遊走が強く誘導された



AGS 胃細胞株へ野生型および CagA 欠失変異型ピロリ菌株を感染させ、得られた培養上清の THP-1 遊走誘導活性を測定した (方法 Fig. 7)。野生型 (CagA 陽性) ピロリ菌を感染させた AGS 胃細胞株の培養上清では、CagA 欠失変異型 (CagA 陰性) ピロリ菌を感染させた細胞の培養上清と比較し、well 底まで遊走した単球細胞数が約 2.5 倍多く、高い単球遊走誘導活性を示した (Fig. 8)。

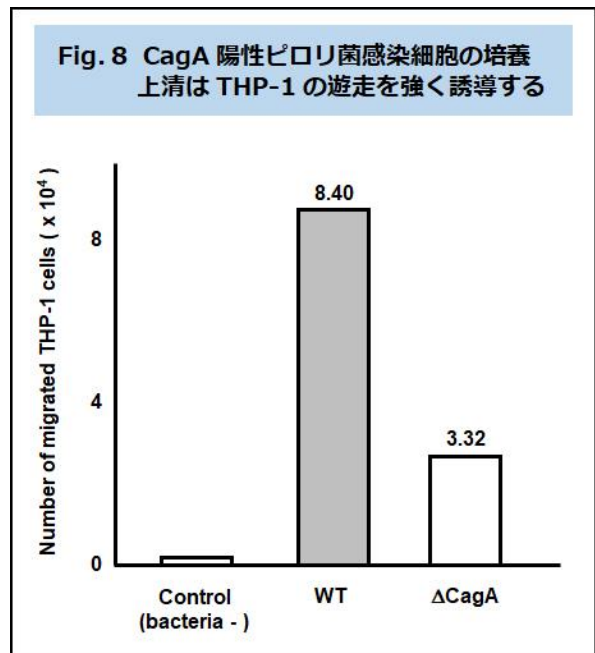
(5) その他の結果と進捗状況

CagA によって細胞内外の SIP が増加するメカニズムについては未だ結論に達していないが、これまでの解析から、野生型ピロリ菌 (CagA 陽性) を感染させた胃細胞株において SIP を分解する SIP リアーゼの発現量が減少する結果が得られている (Western blotting 法による)。

現在特に力を入れて取り組んでいるのは、CagA 陽性ピロリ菌感染細胞の培養上清が示す強い単球遊走誘導活性が、CagA 陽性のピロリ菌に感染した細胞内で増加し、放出された SIP によるものか否かを検証する実験である。THP-1 細胞に発現する SIP 受容体遺伝子や AGS 胃細胞において SIP の生合成に主要な役割を担うスフィンゴシンキナーゼ (SPHK) 遺伝子などをノックアウトすることによって (ゲノム編集技術による)、SIP の関与を排除した条件下においても同様の現象 (Fig. 8) が認められるかどうか現在解析中である。併行して、スナネズミを用いた個体レベルでの実験も行っている。

(6) 得られた成果の位置づけと今後の展望

CagA 陽性ピロリ菌の示す炎症を基盤とした強い発癌活性の機序として、これまでに SIP の関与を報告した論文は皆無であり、標的としての SIP の発見は我々が用いた独創的な遺伝学的手法によるところが大きいと考えている。胃の前癌病変である慢性および萎縮性胃炎は臨床的には経過観察のみで、現在治療の対象になっていないが、本研究により SIP を軸としてピロリ菌感染による炎症と発癌の機序が解明されることにより、前癌病変を標的とする新たな薬剤の開発がはじまることが期待される。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ninomiya R, Kubo S, Baba T, Kajiwara T, Tokunaga A, Nabeka H, Doihara T, Shimokawa T, Matsuda S, Murakami K, Aigaki T, Yamaoka Y, Hamada F.	4. 巻 556
2. 論文標題 Inhibition of low-density lipoprotein uptake by Helicobacter pylori virulence factor CagA.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 192-198
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.03.170	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	村上 和成 (Murakami Kazunari) (00239485)	大分大学・医学部・教授 (17501)	
研究分担者	二宮 遼 (Ninomiya Ryo) (00794041)	大分大学・医学部・助教 (17501)	
研究分担者	赤嶺 孝祐 (Akamine Takahiro) (60799435)	大分大学・医学部・助教 (17501)	
研究分担者	久保 修一 (Shuichi Kubo) (60898097)	大分大学・医学部・助教 (17501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------