

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590925

研究課題名(和文) アンチエイジング分子Klothoに着目した慢性胃炎および胃がんの病態解明

研究課題名(英文) The role of Klotho, anti-aging molecule, in chronic gastritis and gastric carcinogenesis

研究代表者

谷川 徹也(Tanigawa, Tetsuya)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：70423879

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：胃疾患における老化抑制分子Klothoの意義を検討した。胃潰瘍とヘリコバクター・ピロリ(Hp)感染には密接な関連がある。胃潰瘍組織においてKlothoの発現は低下すること、Klothoを投与することにより潰瘍治癒は促進することを明らかにした。Hp誘発胃炎におけるTLR9シグナルの意義TLR9欠損マウスを用いて検討し、TLR9シグナルはHp誘発胃炎の初期過程において抗炎症的に作用することを明らかにした。Hp感染により、マウス胃粘膜におけるKlotho mRNAの発現レベルは低下しており、Hp感染は胃粘膜におけるKlothoの発現を低下させ、胃粘膜萎縮に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The klotho gene was originally identified as an aging suppressor gene. We investigated whether Klotho is involved in pathophysiology in the stomach diseases. (Study 1) Gastric ulcer is associated with Helicobacter pylori (Hp) infection. During gastric ulcer healing, expression of mRNA for Klotho in gastric epithelial cells at the ulcer margin was reduced compared with normal gastric tissue. Administration of recombinant Klotho accelerated gastric ulcer healing. (Study 2) We investigated the expression and role of TLR9 in H. pylori-induced gastritis in mice. Our findings suggest that TLR9 signaling plays important roles in the suppression of H. pylori-induced gastric mucosal inflammation in the early phase via downregulation of TNF-alpha modulated by IFN-alpha1. (Study 3) Expression of mRNA for Klotho was downregulated in Hp-infected mice compared uninfected mice, suggesting the promotion of atrophy and carcinogenesis of the stomach.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：Klotho ヘリコバクター・ピロリ 萎縮性胃炎 胃潰瘍 TLR9 胃発がん 炎症 老化

### 1. 研究開始当初の背景

Klotho は多彩な老化症状類似の表現形をもつマウスの研究から老化抑制分子として同定されたタンパクである。その主な生理機能は腎におけるカルシウムの輸送制御およびリン代謝の内分泌制御であるが、その他にも抗炎症作用などの多彩な作用が解明されつつある。

### 2. 研究の目的

(研究1) 胃潰瘍治癒過程における Klotho の発現動態と意義の検討:

胃潰瘍とヘリコバクター・ピロリ (Hp) 感染には密接な関連がある。本研究では胃潰瘍治癒過程における Klotho の発現動態と潰瘍治癒に及ぼす影響について検討した。

(研究2) Hp 感染胃炎における Toll-like receptor 9 の意義:

Toll-like receptor (TLR) は微生物由来の分子を認識し自然免疫を発揮するが、そのなかで TLR9 は微生物由来のオリゴヌクレオチドを認識する。本研究では Hp 誘発胃炎における Klotho の意義を解明する上の予備的検討として、Hp 誘発胃炎における TLR9 シグナルの意義を TLR9 欠損マウスを用いて検討した。

(研究3) Hp 感染による胃粘膜 Klotho の発現動態:

マウスに Hp を感染させ、胃における Klotho 遺伝子の発現を検討した。

### 3. 研究の方法

(研究1)

実験動物および実験潰瘍の作成

本研究では実験動物として 7 週齢雄性 C57BL/6 マウスを使用した。マウスを開腹して胃を露出させ、直径 4mm の円形枠を用いて 60%酢酸を 30 秒間漿膜側胃壁に接触させることにより潰瘍を作成した。酢酸潰瘍作成 3 日目を潰瘍発生日 (Day 0) とし、潰瘍発

生日 4 日目 (Day 4) および 7 日目 (Day 7) に胃を摘出した。

胃粘膜組織における Klotho の発現と局在胃組織を 4%パラホルムアルデヒドで固定し凍結薄切標本を作成し、抗 Klotho 抗体を用いた免疫染色法により胃粘膜における Klotho タンパクの局在を検討した。

潰瘍組織における Klotho および FGF23 の mRNA 発現

胃組織から mRNA を抽出し、real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction 法により潰瘍組織における Klotho および FGF23 の mRNA の発現状態を検討した。

Klotho の外因性投与が胃潰瘍治癒過程に及ぼす影響

潰瘍発生日 (Day 0) よりマウスリコンビナント Klotho (10 and 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  body weight/日、1 日 2 回投与、R&D Systems, Minneapolis, MN) を腹腔内投与し、Day4 および Day7 における潰瘍面積を vehicle (PBS) 群と比較した。

Klotho および FGF23 が細胞増殖に及ぼす影響

胃上皮培養細胞株 (MKN7 および AGS) に FGF23 (10 ng/mL, R&D Systems) およびヒトリコンビナント Klotho (50 ng/mL, R&D Systems) を培地に添加し、MTT assay により細胞増殖能を検討した。

(研究2)

実験動物

野生型 (WT) および TLR9 欠損マウス (background: C57BL/6J) を使用した。

Hp 感染モデルマウスの作成

Hp (シドニー株 (1.0 X 10<sup>8</sup> CFUs/ml)) 培養菌液 (培地: ブルセラブロス) をマウスに計 3 回隔日経口投与した。菌接種後 2, 4 および 6 ヶ月後にマウスを解剖し胃組織をサンプリングした。

胃組織 myeloperoxidase (MPO) 活性の測定

胃粘膜への好中球浸潤の指標である MPO 活性を Bradley らの方法により測定した。

定量的リアルタイム RT-PCR によるサイトカイン遺伝子発現の検討

TLR9, IFN- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , interleukin (IL)-4, 5 の遺伝子発現を定量的リアルタイム RT-PCR 法を用いて検討した (TaqMan Gene Expression Assay Mix (PE Applied Biosystems, Inc.) ) .

免疫組織学的検討による TLR9 の発現部位の検討

TLR9 の発現と局在、マクロファージ、樹状細胞、CD3+T 細胞、血管内皮との関連を免疫組織染色法および蛍光抗体二重染色法により検討した。

(研究3)

マウスに Hp を感染させ、胃粘膜における Klotho mRNA の発現を検討し、非感染マウスと比較した。

#### 4. 研究成果

(研究1)

胃組織における Klotho タンパクおよび mRNA の発現と局在

胃において Klotho の発現は主に胃上皮細胞に認められた(図2)。胃潰瘍組織における Klotho の mRNA 発現は健常組織に比較して約 1/5 に低下していた。一方、胃潰瘍組織における FGF23 の mRNA 発現は健常胃組織に比較して著明に mRNA の発現が亢進していた。

Klotho の外因性投与が胃潰瘍治癒過程に及ぼす影響

マウスリコンビナント Klotho の腹腔内投与は Day 7 における潰瘍面積をコントロール群に比し有意に縮小させた。

Klotho および FGF23 が細胞増殖に及ぼす影響

Klotho および FGF23 の添加は胃上皮細胞 (MKN7 および AGS) の細胞増殖を有意に亢進させた。

以上の結果から、胃潰瘍治癒過程において胃組織中の Klotho の発現は低下すること、Klotho の外因性投与は潰瘍治癒を促進させることが明らかとなった。Klotho の胃潰瘍治癒促進作用の機序として上皮細胞増殖能亢進作用によるものである可能性が示唆された。

(研究2)

Hp 感染胃粘膜における TLR9 遺伝子の発現動態

Hp 感染により胃粘膜における TLR9 の遺伝子発現は経時的に増強した。

免疫組織学的検討による TLR9 の発現部位の検討

TLR9 の局在を免疫組織学的に検討したところ、主に粘膜固有層および粘膜下層の炎症細胞と血管内皮細胞に TLR9 に対する免疫反応性が認められた。

マクロファージ、樹状細胞、CD3+T 細胞、血管内皮における TLR9 の発現を蛍光抗体二重染色法により検討したところ、マクロファージ、樹状細胞 CD3+T 細胞および血管内皮細胞に TLR9 の発現を認めた。

Hp 感染 WT マウスおよび TLR9 欠損マウスにおける胃粘膜好中球浸潤 および組織学的胃炎の比較

Hp 感染により胃組織における好中球浸潤が誘導された。Hp 感染 2 および 4 ヶ月後においては TLR9 欠損マウスでは野生型マウスに比し胃組織の好中球浸潤はより高度であった。Hp 感染 6 ヶ月後には両者同レベルであった。HE 染色による胃粘膜組織を検討したところ、TLR9 欠損マウスにおいては主に粘膜下層の炎症細胞浸潤が野生型マウスに比し高度であることが確認された。

Hp 感染 WT マウスおよび TLR9 欠損マウスの胃粘膜における IFN- $\gamma$  および TNF- $\alpha$  の mRNA 発現

Hp 感染は胃組織における IFN- $\gamma$  および TNF- $\alpha$  遺伝子発現を増強させた。Hp 感染 2 および 4 ヶ月後においては TLR9 欠損マウスでは野生型マウスに比し、IFN- $\gamma$  および TNF- $\alpha$  遺伝子発現の程度はより高度であった。Hp 感染 6 ヶ月後にはそれらのサイトカインの発現レベルは両者同レベルであった。

Hp 感染 WT および TLR9 欠損マウスの胃粘膜における IL-4 および IL-5 の mRNA 発現

Hp 感染による胃組織中 IL-4 および IL-5 の有意な発現誘導は認めなかった。

Hp 感染 WT および TLR9 欠損マウスの胃粘膜における IFN- $\alpha$ 1 and IFN- $\beta$  の mRNA 発現

胃組織における IFN- $\alpha$ 1 および IFN- $\beta$  の mRNA 発現は Hp 感染により増加傾向を認めた。Hp 感染 TLR9 欠損マウスについては胃組織におけるこれらの mRNA 発現は Hp 感染野生型マウスに比し減少傾向を認めた。

以上の結果から、TLR9 シグナルは Hp 誘発胃炎の初期過程において抗炎症的に作用することが明らかとなった。

(研究3)

Hp 感染により、マウス胃粘膜における Klotho mRNA の発現レベルは非感染胃粘膜に比し約 1/10 に低下した。

以上より、Hp 感染は胃粘膜における Klotho の発現を低下させ、胃粘膜萎縮に与する可能性が示唆された。

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4件)

谷川 徹也、渡辺 俊雄、灘谷 祐二、大谷 恒史、十河 光栄、山上 博一、斯波 将次、渡辺 憲治、富永 和作、藤原 靖弘、荒川 哲男、胃潰瘍治癒過程におけるアンチエイジング分子 Klotho の発現動態と胃潰瘍治癒に及ぼす影響、潰瘍、査読無し、40 巻、2013、64-68

Otani K, Tanigawa T, Watanabe T, Nadatani Y, Sogawa M, Yamagami H, Shiba M, Watanabe K, Tominaga K, Fujiwara Y, Arakawa T. Toll-like receptor 9 signaling has anti-inflammatory effects on the early phase of Helicobacter pylori-induced gastritis. Biochem Biophys Res Commun. 査読有り、426, 2012, 342-349, 10.1016/j.bbrc.2012.08.080.

谷川 徹也、大谷 恒史、渡辺 俊雄、灘谷 祐二、岡崎 博俊、町田 浩久、山上 博一、渡辺 憲治、富永和作、藤原 靖弘、荒川 哲男、Toll-like receptor 9 シグナルは Helicobacter pylori 誘発胃炎の初期過程において抗炎症効果を有する、消化器と免疫、査読無し、48,2012, 97-100

Tetsuya Tanigawa, Toshio Watanabe, Yuji Nadatani, Koji Otani, Hirohisa Machida, Hirotohi Okazaki, Hirokazu Yamagami, Kenji Watanabe, Kazunari Tominaga, Yasuhiro Fujiwara, Tetsuo Arakawa. Klotho, an Aging Suppressor, and Fibroblast Growth Factor 23 is Involved in Gastric Ulcer Healing, Gastroenterology. 査読なし, 142,2012, Supple1, S-493.

[学会発表](計5件)

大谷 恒史、谷川 徹也 ほか、Helicobacter pylori 誘発胃炎における Toll-like receptor 9

の意義, 第 20 回日本ヘリコバクター学会学術集会, 2014 年 6 月 28 日~2014 年 6 月 29 日, 東京ステーションコンファレンス

Tetsuya Tanigawa ほか, Anti-inflammatory effect of Toll-like receptor 9 signaling on Helicobacter pylori-induced gastritis, 17th Biennial Meeting of Society for Free Radical research International (SFRRI 2014), 2014 年 3 月 24 日, 京都国際会館

谷川 徹也 ほか, 胃潰瘍治癒過程におけるアンチエイジング分子 Klotho の発現動態と潰瘍治癒に及ぼす影響、日本潰瘍学会学術集会、2012 年 07 月 13 日~2012 年 07 月 16 日、京王プラザ新宿 (東京)

Tetsuya Tanigawa ほか, Klotho, an aging suppressor, and fibroblast growth factor 23 is involved in gastric ulcer healing, DDW 2012, 2012 年 05 月 19 日~2012 年 05 月 22 日, San Diego Convention Center (San Diego, United States of America)

谷川 徹也 ほか, 胃潰瘍治癒過程におけるアンチエイジング分子 klotho の発現動態と潰瘍治癒促進作用、第 8 回日本消化管学会総会学術集会 2012 年 2 月 12 日 仙台

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

谷川 徹也 (TANIGAWA, Tetsuya)  
大阪市立大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号: 70423879

### (2) 研究分担者

渡辺 俊雄 (WATANABE, Toshio)  
大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 50336773

富永 和作 (TOMINAGA, Kazunari)  
大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号: 80336768

藤原 靖弘 (FUJIWARA, Yasuhiro)  
大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号: 40285292

町田 浩久 (MACHIDA, Hirohisa)  
大阪市立大学・大学院医学研究科・医員  
研究者番号: 00382078

荒川 哲男 (ARAKAWA, Tetsuo)  
大阪市立大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 60145779

### (3) 研究協力者

大谷 恒史 (OTANI, Koji)  
大阪市立大学・大学院医学研究科・研究医