

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 7日現在

機関番号：82406

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659226

研究課題名（和文） ピロリ菌と胃炎起因菌の共存が胃癌細胞の増殖に与える影響

研究課題名（英文）

Bacterial pathogen *Helicobacter pylori* may augment gene expressions of TLR4 and TLR5 on cancer cells under coexistence with another gastric bacteria *Proteus mirabilis*.

研究代表者

西川 可穂子 (NISHIKAWA KAHOKO)

防衛医科大学校・病院・助教

研究者番号：20345416

研究成果の概要（和文）：

ピロリ菌は胃潰瘍や胃癌の原因菌であるため、多くの研究者によって炎症機序などが精力的に調べられているが、その多くはピロリ菌と宿主細胞のみが存在するとの条件下で行われている。しかし実際の胃内では、ピロリ菌以外のウレアーゼ産生菌が胃炎起因菌として共存しており、これらが慢性胃炎等に関与していることが報告されている。そこで、本研究ではピロリ菌の毒性因子は胃内共存菌が存在することで減弱されるのか、または増強されるのかという点に注目した。先行研究により、ピロリ菌が宿主の TLR4 を刺激し、胃癌細胞の増殖を促すと共に細胞性免疫を活性化させないことが明らかとなっている。本研究では、まず胃内起炎菌のひとつである *Proteus mirabilis* (プロテウスミラビリス菌) と共存した時に癌細胞を増殖させるのか、また宿主癌細胞のシグナリングの上流である TLR4 と、更に鞭毛にあるフラジェリタンパクの受容体で病原菌細菌の侵入を感知する重要なセンサーである TLR5 への刺激が増強されるのか、といった点について検討した。ピロリ菌とプロテウス菌の生長速度の違いもあり、2 菌共存下における癌細胞の増殖はうまく結果を得られなかったが、ピロリ菌単独感染で胃癌細胞の増殖を確認した。この条件下では、ピロリ菌単独感染で TLR4 の mRNA 発現は、刺激なしの群と比較して高い傾向を示し、プロテウス菌共存下では更に高くなる傾向がみられた。一方、TLR5 の mRNA 発現は、ピロリ菌単独感染では TLR4 のように発現が高くなかったが、プロテウス菌と共存することにより高くなる傾向を示した。ピロリ菌は、他の胃炎起炎菌と共存すると TLR4 および TLR5 への宿主細胞への刺激が高まる傾向があることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Helicobacter pylori infection of the stomach is related to the development of diverse gastric pathologies. However, it is still unclear whether *Helicobacter pylori* would augment their virulence factor when other gastric bacteria existed together with *Helicobacter pylori* in stomach. To address this question, we investigated the cell proliferation and gene expression of both TLR4 and TLR5 of cancer cell line AGS under coexistence with another gastric bacteria *Proteus mirabilis*. We need further research in detail, but the results showed that *Helicobacter pylori* may augment gene expressions of TLR4 and TLR5 on cancer cells under coexistence with *Proteus mirabilis*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	0	2,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：病原性

1. 研究開始当初の背景

ピロリ菌が生育する胃内環境は、強酸性条件下にあり、一般細菌は生育することができない。しかし、ほとんどの場合、ピロリ菌と共に慢性胃炎起因菌が検出されている。胃から検出されるこれらの共存菌は、ピロリ菌と同様のウレアーゼ産生菌である。ウレアーゼの分泌により細胞粘膜にあるウレアを加水分解し、アンモニアを生じることにより、細菌近傍のpHを中和し生存している。保菌患者の多くは萎縮性胃炎である。ピロリ菌の宿主への病原性については、これまでよく研究されてきているが、胃内に生息するピロリ菌を含む細菌フローラ全体の病原性評価は、ほとんど知見がなかった。加えて、ピロリ菌LPSが、Toll様受容体(TLR)4を介して胃癌細胞の増殖を促すが、細胞性免疫を活性化させない状態であることが明らかとなっていた。共存菌存在下ではこのような状態はどうなっているのか不明であった。

2. 研究の目的

(1) ピロリ菌が胃炎起因菌と共存している状態では、宿主細胞である胃癌細胞に対して増殖を助長するのか、抑制的に働くのか不明であるため、これを明らかにすることを目的とし実験を行った。

(2) ピロリ菌が胃炎起因菌と共存している場合、宿主細胞のTLR4および5に対するシグナル伝達系への刺激が活性化するのか、抑制的に働くのかを検討し、共存菌存在下におけるピロリ菌の胃癌細胞への感染刺激について考察する。

3. 研究の方法

(1) ピロリ菌と *Proteus mirabilis* が胃癌細胞の増殖に与える影響。

ウレアーゼ産生菌であり腸内細菌科に属する通性嫌気性のグラム陰性桿菌で、胃炎起因菌として胃からも分離される *Proteus mirabilis* (以下プロテウスミラビリス菌とする。JCM1669株)およびピロリ菌(NCTC11637株)の存在が、ヒト胃癌AGS細胞の増殖速度に与える影響を測定した。細胞増殖速度は、cell counting kit (同仁化学)を用いて測定を行った。96 well plateにAGS細胞を播種(1,000 cells/well)し、AGS細胞:細菌(ピロリ菌単独、プロテウスミラビリス菌単独、ピロリ菌とプロテウスミラビリス菌を1:1に混和したもの)=1:100となるように接種した。接種した細菌は、前日に液体培養(ピロリ菌はBrain heart infusion 液体培地加10%馬血清、プロテウスミラビリス菌はnutrient broth)にて前培養したものを使用した。1日後と3日後に細胞増殖速度を測定した。これらの培養は全て、微好気嫌気パッ

クをいれた培養ジャーを湿潤環境にした状態で、37°Cで培養を行った。

(2) ピロリ菌とプロテウスミラビリス菌の共感染がAGS細胞のTRL4およびTRL5に与える影響

TLR4は主にグラム陰性菌のリポ多糖(LPS)を認識し、TLR5は細菌の鞭毛のタンパク質フラジェリンを認識する受容体で、ピロリ菌感染によって共に刺激される。プロテウスミラビリス菌のような共存菌存在下で、これらの受容体への刺激が増強するのかを検討するため、AGS細胞を直径6mmシャーレに播種

(6×10^5 cells/plate)し、細菌(ピロリ菌単独、プロテウスミラビリス菌単独、両細菌を1:1に混和したもの)を2時間感染させた(感染濃度は胃癌細胞の増殖速度の実験

(1)と同様)。感染後、すぐに培養上清を除き、3回ほど新しい培地(RPMI medium 1640加10%FBS、GIBCO社)で洗浄をした後に、0.025%Trypsin (Invitrogen社)で細胞を処理し、試験管に集めた。培地に再度懸濁し細胞を洗った後に、Rneasy Micro Kit(50)(キゲン社)を用いてRNAを抽出し、cDNAはSuperScript IIIファーストストランドスーパーミックス定量PT-PCR(Invitrogen社)を用いて作製した。これらの試料をTagMan Gene Expression Assaysシステム(Applied Biosystems社)を用い、プライマーとしては

TLR4(AssayID:Hs00152939_m1)とTLR5(AssayID:Hs01019558_m1), Human Gus(AssayID:Hs00939627)を用いてmRNAの発現を調べた。

4. 研究成果

(1) ピロリ菌とプロテウスミラビリス菌が胃癌細胞の増殖速度に与える影響について、前述の実験方法では、試行錯誤を繰り返したがうまくデータが得られなかった。主な原因のひとつとして、ピロリ菌とプロテウスミラビリス菌の増殖速度の差がある。胃内環境ではpHが低いため、プロテウスミラビリス菌の増殖速度は著しく低下すると思われるが、*in vitro*の本実験条件下では、胃癌細胞培養のためにRPMI medium 1640加10%FBS(GIBCO社)を用いており、pHはほぼ中性である。この条件下では、腸内細菌科であるプロテウスミラビリス菌は、24時間後にはウェル内を白濁するまで増殖し、ウェル内環境が一変したため胃癌細胞が死滅してしまった。接種濃度を振って薄い濃度でも試みたが、96ウェル内の容量(200 μ L)では、一晩で定常状態にまで増殖することが多く、胃癌細胞を死滅させる結果となった。生菌でプロテウスミラビリス菌を用いた本実験条件では、日をまたぐ実験は難しいことが明らかとなった。一方、ピロリ菌感染をした場合は、プロテウスミラ

ピロリ菌と異なり、細菌増殖速度が遅いため、1日後または3日後でもピロリ菌が胃癌細胞の増殖を損なうことなく、胃癌細胞の増殖速度の測定が可能であった。結果を図1に示す。ピロリ菌感染を行うと、胃癌細胞の増殖が、感染を行わないコントロール群に比較して、1日後、3日後と経時的に細胞増殖が促進される結果となり、先行研究の結果と一致した。前述したように、プロテウス菌の増殖速度が速いため、目的としていたピロリ菌との共存下の胃癌細胞増殖速度への影響は、プロテウスミラビリス菌単独感染の時と同様の理由から測定することはできなかった。加熱した死菌を用いた系も実施すべきか迷ったが、次のTo11様受容体(TLR)への感染刺激に関する実験は生菌を用いた影響を検討する必要があった。このため、生菌における刺激のみ実施したが、結果が得られなかった。

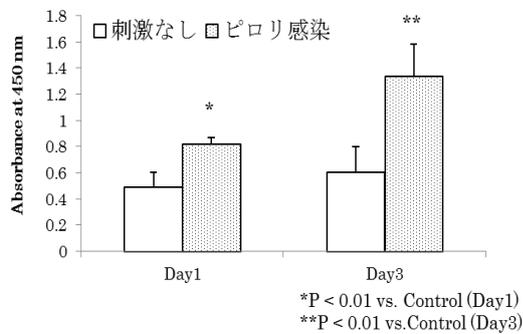


図1. ピロリ菌感染時の胃癌細胞の増殖

(2) ピロリ菌とプロテウスミラビリス菌の共感染がAGS細胞のTLR4およびTLR5に与える影響について調べた。感染期間は、(1)の結果より、長期感染は実験系として難しいことから、2時間とした。感染後のAGS細胞のTLR4およびTLR5のmRNA発現を図2に示す。この実験は繰り返し実験を4-5回(n=3)行ったが、精度が悪くばらつきが大きい結果となり、有意な差が出る結果を得ることができなかった。原因のひとつとして、感染時における宿主AGS細胞と感染細菌(特にピロリ菌)を毎回同じ状態で感染させるのが難しかったことが挙げられる。しかし、これは管理条件に工夫をすれば改善の余地があったと反省する。

しかしながら、感染による影響として一定の傾向がみられた。刺激なしの場合を1として相対比較すると、細菌感染(ピロリ菌、プロテウスミラビリス菌、2菌共感染)を行った場合は、TLR4とTLR5の共に発現が高くなった。特にピロリ菌感染の場合は宿主のTLR4への刺激が高く、2菌刺激

でより高い発現となった。プロテウスミラビリス菌感染の場合は、TLR4よりもTLR5の発現が高くなる傾向がみられた。ピロリ菌単独、またはプロテウスミラビリス菌単独感染よりも、2菌同時に感染させた場合のほうが、TLR4およびTLR5のmRNA発現が高い傾向があり、ピロリ菌単独感染よりも感染による炎症などの刺激が増強される可能性が否定できないことが示唆された。

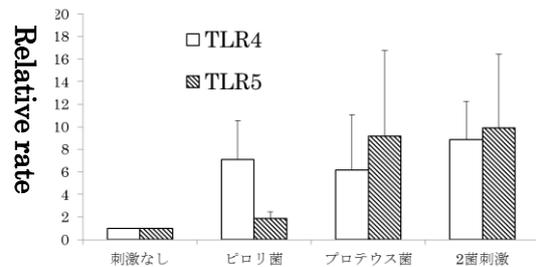
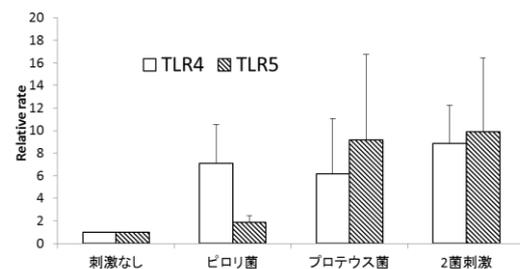


図2. 感染によるTLR4およびTLR5のmRNA発現



(1) 研究代表者

西川 可穂子 (NISHIKAWA KAHOKO)
防衛医科大学校・病院・助教
研究者番号：2034516

(2) 研究分担者

小野 聡 (ONO SATOSHI)
防衛医科大学校・防衛医学研究センター・准教授
研究者番号：30531355

木下 学 (KINOSITA MANABU)
防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・准教授
研究者番号：70531391

齋藤 大蔵 (SAITO DAIZOH)
防衛医科大学校・防衛医学研究センター・教授
研究者番号：90531632

阪本 敏久 (SAKAMOTO TOSHIHISA)
防衛医科大学校・病院・教授
研究者番号：50178571