

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590418

研究課題名(和文)ピロリ菌感染胃炎の調節因子A20の機能解析

研究課題名(英文)Analysis of A20, modulator of H. pylori associated gastritis.

研究代表者

内田 智久(Uchida, Tomohisa)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：70381035

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ピロリ菌感染胃炎の強さの程度を決定するのはNF- κ B経路である。本研究では、ピロリ菌-胃上皮の相互作用における、NF- κ Bを制御する因子であるA20の役割を検討した。H.pylori感染により、A20は時間およびMOI依存的に発現が亢進した。cagAベクターとペプチドグリカンを変染すると、A20発現の有意な増加をもたらした。本研究で、A20がピロリ菌感染胃炎でNF- κ Bを介して炎症を抑制する働きを有することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：H. pylori is capable to induce inflammatory responses from host cells through NF- κ B. However, little has been known about the process by which gastric epithelial cells counteract H. pylori induced-NF- κ B activation to avoid overreactions. A20 is well-known as a NF- κ B suppressor and proapoptotic protein. In this study, we investigated the role of A20 in H. pylori-gastric epithelium interaction. We found that upon H. pylori infection, A20 was upregulated in a time- and MOI-dependent manner. A20 mRNA increased sharply within 3 hours and then decreased gradually to the baseline after 36 hours. We transfected cagA vector and H. pylori peptidoglycan into gastric epithelial cells. We found that the transfection of these two agents resulted in a significant increase of A20 expression. These findings indicate that H. pylori induces A20 expression in host cell to restrain H. pylori-activated NF- κ B. This negative feed-back loop will establish the balance between host and infectant.

研究分野：消化器病理学

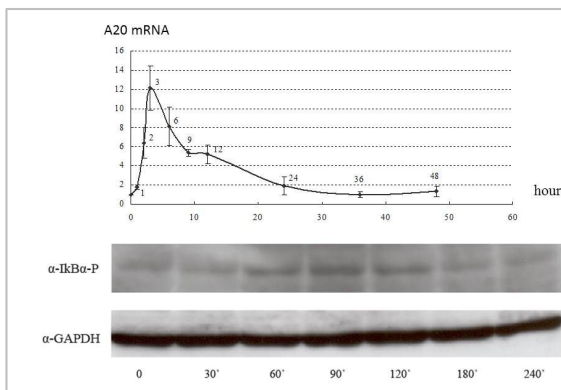
キーワード：ヘリコバクターピロリ 胃炎 消化器病理 NF- κ B

1. 研究開始当初の背景

ヘリコバクター・ピロリ(ピロリ菌)感染により急性・慢性炎症が引き起こされ、その一部は数十年の慢性炎症を経て胃がんを発症する。これまでの報告により胃粘膜に炎症を惹起させ持続するメカニズムとして NF-κB 経路が重要な働きをすることが明らかになってきた。すなわち、ピロリ菌の胃粘膜への感染を契機として、細胞内の NF-κB 経路が活性化し、各種サイトカインが産生されることで炎症が生じる(下図)。



一方、慢性炎症を持続させるためには、炎症を促進的に機能する NF-κB と同時に、炎症を抑制する機構の存在が必要と考えられるが、ピロリ菌感染に伴う NF-κB の活性化を調節する因子についての研究はこれまで報告がない。これまでに報告されている NF-κB を調節する分子の中で、A20 に焦点を当てピロリ菌感染に伴う A20 の発現を preliminary に検討したところ、興味深いことに **ピロリ菌感染によって A20 が発現上昇すること、さらに A20 が発現上昇すると NF-κB の活性化レベルが下がる**ことを発見した(下図)。このことから、ピロリ菌感染によって生じる NF-κB の活性化は A20 によって調節されている可能



性が示唆された。

一方、アジア諸国においては、ピロリ菌感染頻度に大きな差がないにも関わらず胃癌発症頻度は国によって大きな違いがある。この点に関して、感染しているピロリ菌の違い(菌側因子)がアジア各国で異なり、それがピロリ菌感染症の重症度や続発する疾病の発生に影響する可能性が指摘されている。我々は異なる胃癌発症率を示す東アジアで蔓延しているピロリ菌の遺伝子型の違いについて、フィールド調査により自ら採取したピロリ菌を用いて日本、タイ、ベトナム、ブータン、ミャンマーのピロリ菌株について調査した。その結果、ピロリ菌の毒性因子である *cagA*, *vacA* に構造的な差があり、さらに *vacA*, *m1* type が胃癌発症に強く関わっている可能性を示すと共に、ピロリ菌が有する遺伝子のうち、最も病原性に関与しているとされる東アジア型 CagA 蛋白質のアジア各国(日本、韓国、ベトナム、タイ)における出現頻度を明らかにし、胃がんとの関連性を報告してきた。

また、アジアの多数の胃炎標本の組織学的な検討から、ピロリ菌の遺伝子型の違いにより胃炎の強さが異なっていることを明らかにしてきた。すなわち、本邦ではピロリ菌感染により高度の好中球浸潤を伴った組織学的胃炎が観察されるが、タイではピロリ菌が感染しているにもかかわらず炎症浸潤がほとんどない等、ピロリ菌感染により惹起される炎症反応の強さがピロリ菌の採取地域に依存している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

- (1)ピロリ菌感染に伴う炎症反応の調節に A20 が関与している。
 - (2)A20 の誘導能はピロリ菌の採取場所で異なっている。
- をより詳細に解析するために以下の実験を行い、アジアのピロリ菌胃炎に対する

A20 の関与を明らかにし胃癌発症率の多様性を考察する。

3. 研究の方法

(1) ピロリ菌感染胃炎における A20 の役割

胃上皮細胞株(AGS 細胞、MKN45 細胞等)に、様々な濃度でピロリ菌株を感染させ(MOI=0 ~ 1000)、A20 の mRNA 発現を real-time PCR で、蛋白質レベルでの発現をウェスタンブロットで検討する。次に、感染時にピロリ菌と胃粘膜の接着に重要な役割を担う Type IV secretion system (T4SS)の関与について、現在保有している T4SS ノックアウトピロリ菌株を用いて検討する。

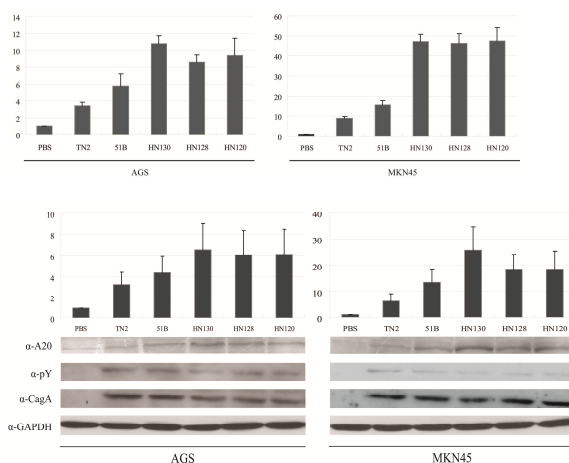
(2) アジアのピロリ菌での評価

これまでのフィールド研究により、ベトナムのピロリ菌株を保有している。標準株ピロリ菌と比較して、ベトナムのピロリ菌の A20 誘導能を比較検討する。

4. 研究成果

(1) ピロリ菌感染による A20 の誘導

胃癌細胞株 AGS 細胞、MKN45 細胞に各種ピロリ菌株 (TN2, 51B: 日本株、HN130, HN128, HN120:ベトナム分離株)を感染させ、mRNA 発現(下図上)、蛋白質発現(下図下)をそれぞれ real-time PCR, ウェスタンブロット法で検出した。

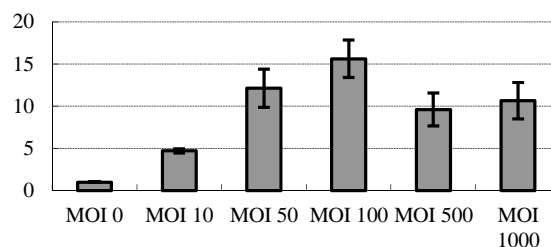


その結果、ピロリ菌感染により A20 が mRNA

レベル、蛋白質レベルで発現更新していることが明らかになった。また、日本の臨床分離株とベトナムの臨床分離株の A20 の発現誘導能を比較検討したところ、ベトナムの臨床分離株が A20 の発現誘導能が高く、ピロリ菌株による胃炎の程度の違いに A20 が関与している可能性が示唆された。このことは、アジアで蔓延しているピロリ菌の胃炎の程度の違いに A20 が重要な役割を果たしていることを示唆している。

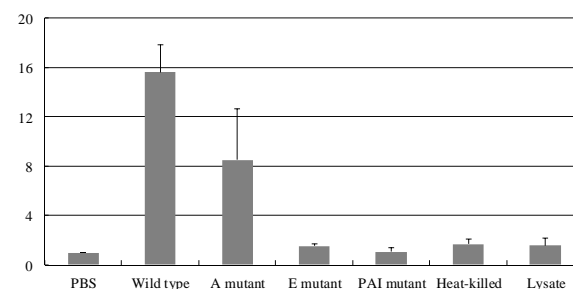
(2) A20 誘導能の感染効率の影響

MKN45 細胞に各種ピロリ菌濃度で感染させた。MOI=100 までは濃度依存性に A20 発現量が上昇したが、MOI=500, 1000 では頭打ちになった。



(3) 変異型ピロリ菌の感染実験

変異型ピロリ菌として、病原性に関与していると推測される CagA を欠損させたピロリ菌、CagE を欠損させたピロリ菌、CagPAI を欠損させたピロリ菌、熱で殺したピロリ菌、ピロリ菌のライセートを作製し、MKN45 細胞に感染させた。

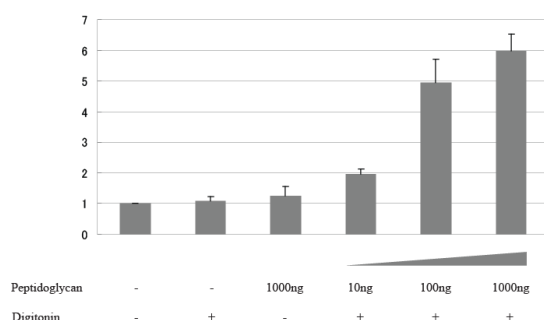


その結果、野生型と比較して、CagA 欠損ピロリ菌では、誘導効率が約半分になった。CagA が A20 の調整に重要な働きをしていることが明らかになったが、その効果は部分的

であり、CagA 以外に重要な要素がある事が示唆された。

(4)ペプチドグリカンの A20 調節機能

そこで、ピロリ菌感染に伴って 4 型分泌機構で CagA と共に細胞内に注入されるペプチドグリカンに注目し、ペプチドグリカンの A20 調整能について検討した。



ペプチドグリカンの濃度依存性に A20 の発現が上昇していることが明らかになった。ペプチドグリカンはジギトニンと同時に投与すると細胞内に高率に取り込まれるため、細胞内にペプチドグリカンが入ることが重要である。

これらの実験から、ピロリ菌が胃粘膜に感染すると A20 が誘導されることが明らかにされた。A20 の機能として NF-kB を介して炎症を抑制的に調節することから、ピロリ菌感染によって、炎症を惹起する一方で、A20 を介して行きすぎた炎症を制御することが明らかにされた。

また、ピロリ菌感染で 4 型分泌機構で細胞内に注入される CagA、ペプチドグリカンが A20 の発現調節に重要である事が明らかとなった。

日本で分離されたピロリ菌よりも、ベトナムで分離されたピロリ菌が A20 を強く発現誘導した。ベトナムでは日本と比較して胃炎が弱いことが知られているが、この原因として A20 が重要な働きをしていることが示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

Tomohisa Uchida, Upregulation of A20 is induced by Helicobacter pylori infection in gastric epithelial cells, The 102nd USCAP annual meeting, March 2013, Baltimore, USA.

Tomohisa Uchida, Helicobacter pylori induces A20 expression in gastric epithelial cells, Digestive Disease Week 2013, 2013 May, Orlando, USA

Tomohisa Uchida, A20 upregulation is induced by Helicobacter pylori induces in gastric epithelial cells, European Helicobacter Study Group, Ljubljana, Slovenia

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

内田 智久 (UCHIDA, Tomohisa)
大分大学・医学部・助教
研究者番号 : 70381035

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

()

研究者番号 :