

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670065

研究課題名(和文) 消化管内病原細菌特異的排除型新規分子標的療法の確立

研究課題名(英文) Exploitation of pathogenic gastrointestinal bacteria specific molecular targeting therapy

研究代表者

鈴木 秀和 (Suzuki, Hidekazu)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：70255454

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：H. pyloriのSodB活性はメトロニダゾール耐性に関与し、その活性化には菌体膜鉄トランスポーターFecA1による鉄イオン供給が必須である。in silico検索よりFecA1結合性化合物として同定したnordihydroguaiaretic acid (NDGA)は、H. pyloriのSodB活性を抑制し、酸化ストレス感受性を、fecA1遺伝子欠損株と同レベルまで高めた。また、H. pylori感染マウスへのNDGA投与は感染菌量を低下させ、H. pyloriの感染能破綻を招来すると考えられた。さらに、NDGAは、サルモネラ及び病原性大腸菌に対しても酸化ストレス感受性を高めた。

研究成果の概要(英文)：Superoxide dismutase (SodB) of H. pylori plays an indispensable role in the development of drug resistance against metronidazole. The activation of SodB requires Fe²⁺ supply through FecA1, suggesting that FecA1 is a possible target for a novel eradication therapy. By in silico screening, we explored FecA1-binding compounds and identified nordihydroguaiaretic acid (NDGA), that reduced intrabacterial Fe²⁺ levels and SodB activity and then increased the H₂O₂ sensitivity to the same levels observed in fecA1-deletion mutants. NDGA decreased the colonization density of H. pylori in the mouse stomach, indicating the repression of gastric mucosal-colonization of H. pylori via inhibition of intracellular Fe²⁺ uptake by FecA1. In addition, NDGA also increased the in vitro H₂O₂ sensitivity of Salmonella typhimurium and enteropathogenic E. coli. These results suggest that NDGA might be effective for the development of a novel therapy selectively against inflammogenic enteropathogenic bacteria.

研究分野：消化器内科学

キーワード：Helicobacter pylori 鉄 FecA1 除菌療法 酸化ストレス in silico メトロニダゾール

1. 研究開始当初の背景

外来病原体の侵入に対し生体は、多形核白血球等の遊走と活性酸素種 (Reactive Oxygen Species; ROS) の産生を介して病原体の排除応答を開始する。胃粘膜上皮に感染した *H. pylori* も生体が認知し、胃粘膜微小循環系より多形核白血球を遊走させ、ROS 産生を介した激的な *H. pylori* 排除応答を惹起する。しかし、*H. pylori* はこの ROS 依存的な異物排除応答に抵抗性を発揮し、慢性感染を樹立させている。*H. pylori* の排除が完遂しない胃粘膜上皮では、慢性的に多形核白血球の遊走が刺激され ROS 産生を持続させる。結果として、本来 *H. pylori* の排除目的に産生された過剰な ROS は、宿主胃粘膜上皮細胞を傷害し、*H. pylori* 感染に伴う慢性胃炎を惹起する。では、「なぜ、宿主 (ヒト) は、ROS を介した異物排除機構で *H. pylori* を除去 (除菌) することが出来ないのか?」という疑問が生じる。これまでに、研究代表者らは、*H. pylori* の iron-cofactored superoxide dismutase (SodB) による抗酸化活性発現が宿主の ROS 依存的異物排除応答抵抗性に強く関与することを明らかとしてきた (Antioxid. Redox Signal. 14; 15-23, 2011, Free Rad. Biol. Med. 52; 1003-1010, 2012)。さらに、SodB 活性発現には細菌特異的な鉄取り込みトランスポーター FecA1 による SodB の活性中心鉄の効率的供給が必須であり、*H. pylori* の慢性感染能は fecA1 遺伝子欠損により、解除されることも明らかにした (Free Rad. Biol. Med. 52; 1003-1010, 2012)。つまり、鉄トランスポーター FecA1 を標的に阻害することにより、病原細菌を宿主異物排除応答依存的に除菌することが可能になる。

2. 研究の目的

Helicobacter pylori の superoxide dismutase (SodB) の抗酸化活性は、感染時の炎症性宿主異物排除応答抵抗性に寄与し、慢性感染の樹立に必須である。SodB 活性発現には、FecA1

が必須で、fecA1 欠損により SodB 活性が抑制され、慢性感染能は消失する。本研究課題では、宿主が異物と認識する病原細菌を標的とし、鉄トランスポーター阻害により同細菌の抗酸化活性を破綻させた上で、宿主の炎症性異物排除応答依存的に排除するという論理に基づき、バイオインフォマティクス解析から予測した *H. pylori* の抗酸化活性を有意に抑制させる FecA1 阻害性化合物の *H. pylori* の除菌効果を評価し、さらに、菌交代現象の誘発抑制及び消化管内フローラ変化によって誘導される炎症抑制効果を評価し、病原細菌のみを宿主応答で排除する新規消化管内細菌制御法を確立するための基盤を構築する。

3. 研究の方法

鉄トランスポーターである FecA1 を阻害する化合物の細菌に対する抗酸化活性破綻機構を *in vitro* で評価した後、*H. pylori* 感染動物モデルを用いて、宿主異物排除応答依存的 *H. pylori* 除菌法の効果を、従来の除菌レジメンで使用される抗菌薬であるメトロニダゾール (Mtz) の効果と比較検討する。特に、*H. pylori* の菌体内鉄イオンレベル及び増殖能と酸化ストレス感受性 (ROS 感受性) を同時に評価する。加えて、抗菌療法による菌交代現象で異常増殖した消化管内細菌が、FecA1 阻害化合物投与により、その異常増殖が抑制され、消化管内フローラが速やかに改善されるかについて、従来より当研究室で確立してきた C57BL/6 マウスにおける *H. pylori* 感染動物実験で明らかにする。以上の解析により、FecA1 阻害化合物による、病原細菌を標的した宿主排除応答依存的な新規の除菌法の基盤を構築し、さらには、菌交代現象の予防並びに治療法の基盤を構築する。

4. 研究成果

H. pylori の SodB 活性は、菌体内 superoxide 産生依存的に抗菌活性を発揮する二次除菌レ

ジメンの主たるコンポーネントである Mtz への耐性を誘導する。sodB 遺伝子欠失では感染能は減弱した。活性中心に鉄を担う SodB 活性解析から、菌体膜の鉄トランスポーター FecA1 依存的な鉄イオン供給系を明らかにし、fecA1 遺伝子欠損にて ROS 依存的宿主異物排除応答に対する抵抗性の消失を介した感染能の破綻と Mtz 耐性の解除が招来された。分担研究者の榊原康文教授による COPICAT プログラムで in silico 検索した FecA1 結合化合物から抽出した数件の候補化合物より、nordihydroguaiaretic acid (NDGA) を選択し、その機能を解析した。100 μ M NDGA では H. pylori の増殖を抑制したが、50 μ M では抑制せず、SodB 活性のみを有意に低下させた。50 μ M NDGA は、H. pylori の酸化ストレス感受性を、fecA1 遺伝子欠損株と同レベルまで高めた。菌体内で superoxide を産生し抗菌活性を發揮する Mtz に対し、SodB 強発現株は耐性を示した。Mtz 耐性株に対し、NDGA 50 μ M は、菌体内の鉄イオンのレベルを低下させ、結果的に Mtz 耐性は解除された。この Mtz 耐性株は fecA1 遺伝子欠損株と同レベルまで ROS 感受性が亢進していた。さらに、H. pylori を 3 カ月間感染させた C57BL/6 マウスへ 0.01w/v% の NDGA を 7 日間連続経口投与することで感染菌数が低下傾向となり、NDGA 投与により ROS 依存的宿主異物排除応答抵抗性消失による感染能破綻を招来するものと考えられた。また、NDGA 50 μ M は、Salmonella typhimurium 及び病原性大腸菌においても、その増殖を抑制することなく、ROS 抵抗性を有意に低下させた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 17 件)

すべて査読あり

1. Nishizawa, T., Suzuki, H., Sakitani, K., Yamashita, H., Yoshida, S., Hata, K., Kanazawa, T., Fujiwara, N., Kanai, T., Yahagi, N., Toyoshima, O. Family history is an

independent risk factor for the progression of gastric atrophy among patients with Helicobacter pylori infection. United European Gastroenterology Journal 2016 Mar 24. doi:10.1177/2050640616642341. [Epub]

2. Stanghellini, V., Chan, F. K-L, Hasler, W.L., Malangelada, J.R., Suzuki, H., Tack, J., Talley, N.J. Gastrointestinal Disorders. Gastroenterology 150(6), 2016, 1380-1392. doi:10.1053/j.gastro.2016.02.011.
3. Suzuki, H., Mori, H. Helicobacter pylori: Helicobacter pylori gastritis-a novel distinct disease entity. Nature Rev. Gastroenterol. Hepatol. 12(10), 2015, 556-557 doi:10.1038/nrgastro.2015.158.
4. Mori, H., Suzuki, H., Matsuzaki, J., Tsugawa, H., Fukuhara, S., Miyoshi, S., Hirata, K., Seino, T., Matsushita, M., Nishizawa, T., Masaoka, T., Kanai, T. Efficacy of 10-day and 14-day triple therapy as a third-line and fourth-line regimen for Helicobacter pylori eradication: a pilot study. United European Gastroenterology Journal 4(3), 2016, 380-387. doi:10.1177/2050640615618043.
5. Mori, H., Suzuki, H., Matsuzaki, J., Tsugawa, H., Fukuhara, S., Miyoshi, S., Hirata, K., Seino, T., Matsushita, M., Masaoka, T., Kanai, T. Efficacy of 10-day sitafloxacin-containing third-line rescue therapies for Helicobacter pylori strains containing the gyrA mutation. Helicobacter 2015 Nov 27. doi:10.1111/hel.12286. [Epub]
6. Akazawa, Y., Isomoto, H., Matsuda, K., Matsushima, K., Kido, Y., Yamaguchi, N., Ohnita, K., Takeshima, F., Kondo, H., Tsugawa, H., Suzuki, H., Hirayama, T., Nakao, K., Nakashima, M. Association of BH3-only protein Bim with the degree of gastritis and its localization in the mitochondria of inflammatory cells of Helicobacter pylori-infected mucosa. Int. J. Med. Microbiol. 305(6), 2015, 553-562. doi:10.1016/j.ijmm.2015.07.002
7. Tsugawa, T., Mori, H., Matsuzaki, J., Masaoka, T., Hirayama, T., Nagasawa, H., Sakakibara, Y., Suematsu, M., Suzuki, H. Nordihydroguaiaretic acid disrupts the antioxidant ability of Helicobacter pylori through the repression of SodB activity in vitro. Biomed. Res. Int. 2015: ID 734548, 8 pages, 2015 doi:10.1155//2015/734548.

8. Nishizawa, T., Maekawa, T., Watanabe, N., Harada, N., Hosoda, Y., Yoshinaga, M., Yoshio, T., Ohta, H., Inoue, S., Toyokawa, T., Yamashita, H., Saito, H., Kuwai, T., Katayama, S., Masuda, E., Miyabayashi, H., Kimura, T., Nishizawa, Y., Takahashi, M., Suzuki, H. Clarithromycin versus metronidazole as first-line *Helicobacter pylori* eradication: A multicenter, prospective, randomized controlled study in Japan. *J. Clin. Gastroenterol.* 49(6), 2015, 468-71. doi:10.1097/MCG.000000000000165
 9. Nishizawa, T., Suzuki, H. Gastric carcinogenesis and underlying molecular mechanisms: *Helicobacter pylori* and novel targeted therapy. *Biomed. Res. Int.* 2015:794378, 2015, 7 pages. doi:10.1155/2015/794378.
 10. Kawai, T., Takahashi, S., Suzuki, H., Sasaki, H., Nagahara, A., Asaoka, D., Matsuhisa, T., Masaoka, T., Nishizawa, T., Suzuki, M., Ito, M., Kurihara, N., Omata, F., Mizuno, S., Torii, A., Kawakami, K., Ohkusa, T., Tokunaga, K., Mine, T., Sakaki, N. Changes in the first line *Helicobacter pylori* eradication rates using the triple therapy – a multicenter study in the Tokyo metropolitan area (Tokyo *Helicobacter pylori* study group). *J. Gastroenterol. Hepatol.* 29(S4), 2014,29-32. doi:10.1111/jgh.12796.
 11. Nakamura, M., Takahashi, T., Matsui, H., Baniwa, Y., Takahashi, S., Murayama, S.Y., Serizawa, H., Suzuki, H., Hibi, T. Alteration of angiogenesis in *Helicobacter-heilmannii*-induced MALT lymphoma: interaction with c-Met and HGF. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 29(S4), 2014, 70-76. doi:10.1111/jgh.12776.
 12. Nishizawa, T., Nishizawa, Y., Yahagi, N., Kanai, T., Takahashi, M., Suzuki, H. Effect of supplementation with rebamipide for *Helicobacter pylori* eradication therapy: a systematic review and meta-analysis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 29(S4), 2014, 20-24. doi:10.1111/jgh.12769.
 13. Matsuzaki, J., Suzuki, H., Tsugawa, H., Watanabe, M., Hossain, S., Arai, E., Saito, Y., Sekine, S., Akaike, T., Kanai, Y., Mukaisho, K.I., Auwerx, J., Hibi, T. Bile acids increase levels of microRNAs 221 and 222, leading to degradation of CDX2 during esophageal carcinogenesis. *Gastroenterology* 145(6), 2013, 1300-1311. doi:10.1053/j.gastro.2013.08.008
 14. Nishizawa, T., Suzuki, H., Takahashi, M., Suzuki, M., Hibi, T. Delay of second-line eradication therapy for *H. pylori* can increase eradication failure. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 28(10), 2013, 1608-1610. doi:10.1111/jgh.12281.
 15. Takahashi, T., Suzuki, H., Imai, T, Shibata, S., Tabuchi, Y., Tsuchimoto, K., Okano, H., Hibi, T. Musashi-1 post-transcriptionally enhances phosphotyrosine-binding domain- containing m-Numb protein expression in regenerating gastric mucosa. *PLoS One* 8(1),2013, e53540. doi:10.1371/journal.pone.0053540.
 16. Matsuzaki, J., Suzuki, H., Okuda, S., Tanimoto, A., Asakura, K., Fukuhara, S., Okada, S., Hirata, K., Mori, H., Masaoka, T., Higuchi, H., Hozawa, S., Kuribayashi, S., Takebayashi, T., Hibi, T. Biliary findings assist in predicting enlargement of intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 11(5), 2013, 548-554. doi:10.1016/j.cgh.2012.11.027
 17. Suzuki, H., Moayyedi, P. *Helicobacter pylori* infection in functional dyspepsia. *Nature Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 10(3), 2013, 168-74. doi:10.1038/nrgastro.2013.9.
- 〔学会発表〕（計 17 件）
1. Suzuki, H. Lecture: *Helicobacter pylori* and gastric cancer: Recent advance in pathogenesis and eradication therapy. **Symposium 8 “Recent advances in Gastric cancer” APDW2015**, Dec. 5, 2015, 台北（台湾）.
 2. Suzuki, H. Special Lecture: Gastric cancer stem cells – special attention to *Helicobacter pylori* and microRNA -. The 29th Meeting of the Prof. Juei-Low Sung's Research Foundation, Aug. 1, 2015, 台北（台湾）.
 3. Suzuki, H. Autophagy of *H. pylori* derived oncoprotein CagA was specifically escaped in CD44v9-positive gastric cancer stem like cells. Symposium: Host-pathogen interaction in digestive system The 3rd JSGE International Topic Conference, Apr. 24, 2015, 仙台国際センター（宮城県・仙台市）.
 4. 森英毅、松崎潤太郎、正岡建洋、津川仁、岩崎栄典、西澤俊宏、上田真裕、柏崎有紀、金井隆典、**鈴木秀和**：Rifabutin 含有レジメンによる *H. pylori* 多剤耐性菌治療の検討.

- ワークショップ3「診断と治療の最先端」**
第21回日本ヘリコバクター学会学術集会
2015年6月27日, 神戸ポートピアホテル
(兵庫県・神戸市).
5. 森英毅、津川仁、**鈴木秀和**: オートファジー不全胃癌細胞株に対して H. pylori 感染が与える影響の検討. **ワークショップ11「オートファジー, ER ストレスと消化器疾患」** 第101回日本消化器病学会総会. 2015年4月25日, 仙台国際センター(宮城県・仙台市).
 6. 森英毅、正岡建洋、**鈴木秀和**: Sitafloracin 含有レジメンによる H. pylori 三次除菌療法. **シンポジウム8「HP 研究の新時代 - 病態生理から除菌まで -」** 第22回日本消化器病関連学会週間(JDDW2014). 2014年10月24日, 神戸ポートピアホテル(兵庫県・神戸市).
 7. 森英毅、松崎潤太郎、正岡建洋、津川仁、福原誠一郎、三好佐和子、岩崎栄典、西澤俊宏、鈴木雅之、**鈴木秀和**. Sitafloracin 含有レジメンによる H. pylori 多剤耐性菌治療の検討. **シンポジウム1「H. pylori 感染症の問題点を探る」** 第20回日本ヘリコバクター学会学術集会. 東京. 2014年6月28日, ステーションコンファレンス東京(東京都・千代田区).
 8. 津川仁、**鈴木秀和**、佐谷秀行. ピロリ菌感染時の胃発がんリスクを規定する宿主キャラクター. **シンポジウム4「胃癌発症とヘリコバクター感染 - 菌体成分の役割と慢性炎症の役割」** 第100回日本消化器病学会総会. 2014年4月24日, 東京国際フォーラム(東京都・千代田区).
 9. 津川仁、**鈴木秀和**、森英毅、福原誠一郎、岡田佐和子、正岡建洋、佐藤聡、井本正哉、金井隆典. がん蛋白質 CagA の細胞内安定性を規定する autophagy の発現制御システム. **ワークショップ2「H. pylori 感染と発がん」** 第10回日本消化器学会総会学術集会. 2014年2月14日, 福島ビューホテル(福島県・福島市).
 10. **鈴木秀和**. **教育講演1**: ピロリ菌感染症の診療を巡る最新知識. **第42回日本総合健診医学会大会**. 2014年1月31日, ホテルニューオータニ(東京都・千代田区).
 11. Suzuki, H. (Invited) H. pylori eradication for cancer prevention in clinical practice. **Symposium "Impact of H. pylori management on gastric carcinogenesis"** UEGW2013, Oct. 16, 2013, ベルリン(ドイツ).
 12. Tsugawa, H., Matsuzaki, J., Okada, S., Fukuhara, S., Mori, H., Masaoka, T., Sato, A., Saya, H., Hatakayama, M., Hirayama, T., Suzuki, H. Autophagy causing CagA degradation is triggered by cytoplasmic accumulation of low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP1) in gastric epithelial cells infected with H. pylori. **Symposium "Interactions between H. pylori and epithelial cells" & Basic Science Workshop 2 "Autophagy: A common pathway in GI-inflammation"** UEGW2013, Oct. 15, 2013, ベルリン(ドイツ).
 13. Michel, A., Wang, S., Zhang, W., Kist, M., Figueroa, G., Dondog, B., Suzuki, H., Pawlita, M.: Analysis of CagA serotypes with Helicobacter pylori multiplex serology. The XXVIth International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer, Sept. 14, 2013, マドリード(スペイン).
 14. Suzuki, H. Symposium (Steps towards gastric cancer) Lecture "Role of microRNA and cancer stem cells in gastric carcinogenesis". The XXVIth International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer, Sept. 13, 2013, マドリード(スペイン).
 15. 津川仁、**鈴木秀和**. ピロリ菌がん蛋白質 CagA を排除する宿主応答. **ワークショップ「せめぎ合う微生物と宿主の分子戦略」** 第36回日本分子生物学会年会. 2013年12月3日, 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市).
 16. 津川仁、**鈴木秀和**. ピロリ菌感染時の胃発がんリスクを規定するオートファジーの発現制御システム. **シンポジウム10「オートファジー: がんに対する多面性」** 第72回日本癌学会学術集会. 2013年10月3日, パシフィック横浜(神奈川県・横浜市).
 17. 津川仁、**鈴木秀和**、佐谷秀行、松崎潤太郎、平田賢郎、福原誠一郎、岡田佐和子、正岡建洋、畠山昌則、平山壽哉、日比紀文. **講演: 細胞内 CagA 安定性を規定する細胞表面 LRP1 の autophagy 制御機構**. **基礎研究推進セミナー** 第19回日本ヘリコバクター学会学術集会. 2013年6月29日, 長崎大学医学部(長崎県・長崎市).

〔図書〕(計 4 件)

1. Suzuki, H., Warren,J.R., Marshall,B.J. Springer Japan, Helicobacter pylori (eds.) 2016, pp267.
2. Suzuki, H., Nishizawa, T., Academic Press, Oxidative stress in stomach cancer. eBook: OXIDATIVE STRESS AND DIETARY ANTIOXIDANTS (eds.) 2014, pp33-40.
3. 平田賢郎, 津川仁, 鈴木秀和. 診断と治療社. Section 9. Helicobacter pylori 感染症と酸化ストレス. 『**酸化ストレスの医学改訂第2版**』吉川敏一 監修、内藤裕二、豊國伸哉 編集. 2014, pp316-321.
4. 岡田佐和子, 鈴木秀和. 最新医学社. ピロリ菌除菌と胃 MALT リンパ腫. 最新医学別冊 「**新しい診断と治療の ABC** (79) **悪性リンパ腫**」 畠清彦 編集.2013, pp193-197.

〔産業財産権〕

○出願状況(計 2 件)

名称：宿主異物排除応答依存的除菌剤
発明者：鈴木秀和、津川仁、榊原康文
権利者：慶應義塾
種類：国内特許出願
番号：2014-106192
出願年月日：平成 26 年 5 月 22 日
国内外の別：国内

名称：宿主異物排除応答依存的除菌剤
発明者：鈴木秀和、津川仁、榊原康文
権利者：慶應義塾
種類：国際出願
番号：PCT/JP2015/064525
出願年月日：平成 27 年 5 月 20 日
国内外の別：国外

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 秀和 (SUZUKI HIDEKAZU)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：70255454

(2)研究分担者

榊原 康文 (SAKAKIBARA YASUBUMI)
慶應義塾大学・理工学部・教授
研究者番号：10287427

津川 仁 (TSUGAWA HITOSHI)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：30468483

(3)連携研究者
なし