

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08155

研究課題名(和文)ピロリ菌による胃粘膜上皮細胞の粘液分泌異常と極性崩壊のメカニズムの解明

研究課題名(英文)Helicobacter pylori disrupts gastric mucus secretion

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ピロリ菌は胃粘膜傷害や慢性炎症を引き起こし、これを基盤として胃癌の発生に関与することが知られているが、ピロリ菌、特にその病原因子 CagA を持つピロリ菌が強い粘膜傷害作用や炎症惹起作用を示す分子メカニズムには不明の部分が多い。本研究において我々はCagAが胃粘液分泌を制御する蛋白質と直接結合することにより、粘液分泌過程を阻害することを発見した。この結果から、CagA を持つピロリ菌が粘液分泌を阻害し、これによって塩酸やペプシンから胃粘膜を守る粘液層の形成が損なわれ、粘膜傷害から胃炎、胃潰瘍、さらに胃癌へと進展する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Helicobacter pylori is a Gram-negative bacterium infecting approximately 50% of the humankind and its strains harboring a virulence factor CagA are associated with progressive and persistent gastritis that eventually results in gastric cancer. In this study we have identified a novel CagA target molecule which regulates gastric mucus secretion. We show that CagA physically binds to the molecule and inhibits mucus secretion from mouse gastric surface mucous cells. Thus, our results suggest that CagA disrupts mucous barrier against luminal acid and pepsin by inhibiting mucus secretion, which promotes mucosal damage and inflammation leading to cancer.

研究分野：解剖学

キーワード：ピロリ菌 胃粘液分泌

1. 研究開始当初の背景

胃の粘液層は胃酸やペプシンなどの消化酵素の攻撃から胃粘膜を保護しているが、胃粘膜に感染したピロリ菌は表層粘液細胞からの粘液の分泌を減少させることによって急性粘膜傷害を引き起こすことが知られている (Hidaka et al, Gut 49, 474, Nabavi et al, Infect Immun 81, 829)。特に菌体から胃粘膜上皮細胞へ直接注入される発癌蛋白質 CagA を持つピロリ菌は、激しい胃粘膜病変を惹起し、消化性潰瘍、慢性胃炎、さらには胃癌の発生に強く関連することが明らかにされている (Kuipers et al, J Natl Cancer Inst 87, 1777, Correa, Cancer Res 52, 6735)。このような背景から、近年 SHP-2, PAR1b (Higashi et al, Science 295, 683, Saadat et al, Nature 447, 330) などをはじめとする様々な CagA の標的分子が報告されてきたが、ピロリ菌感染による急性粘膜傷害や炎症の遷延化、さらには胃癌が惹起される機序には未だ不明の部分が多く残されている。

2. 研究の目的

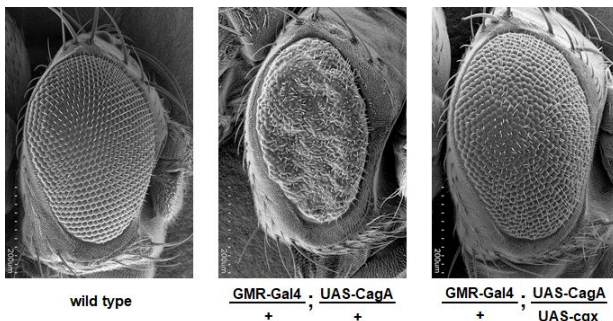
我々はショウジョウバエを用いたゲノム規模の遺伝学的スクリーニングを行い、複数の CagA の標的候補分子の同定に成功した。本研究では、これらの標的候補分子のうち、胃粘膜上皮細胞からの粘液の開口放出に関与すると考えられる蛋白質 CGx2 (仮称) に着目し、「CagA が CGx2 と結合し、その機能を阻害することにより、ピロリ菌感染による急性粘膜傷害、慢性胃炎、さらには胃癌の発生に重要な役割を果たす」ことを証明したい。

3. 研究の方法

(1) CGx2 のショウジョウバエホモローグ cgx を発現すると考えられる系統において、実際に cgx が過剰発現することを証明する。

CGx2 のショウジョウバエホモローグ cgx を過剰発現すると考えられる系統と CagA 発現系統とを交配すると、CagA 発現系統の示す凸凹の複眼 (いわゆる rough eye) が正常化される【図1】。

【図1】



この cgx を過剰発現すると考えられる系統において、cgx mRNA の量が実際に増加していることを、Real-Time quantitative Reverse Transcription PCR (RT-qPCR) 法によって証明

する。

(2) 共免疫沈降法によって CagA、CGx2 が細胞内で物理的に結合することを証明する。さらに、CagA が CGx2 と結合するために必要とされる領域を同定する。

V5 tag を付加した CagA (V5-CagA) と T7 tag を付加した CGx2 (T7-CGx2) を培養細胞内 (COS-7 細胞を使用) で共発現させ、抗 T7 抗体によって T7-CGx2 を免疫沈降させる。次に、T7-CGx2 と共に沈降してくる V5-CagA を Western blotting 法によって検出する。CagA が持つ様々なドメイン構造を欠く欠失型 CagA 変異体、 Δ EPIYA, Δ CM (Δ CagA-multimerization sequence)、 Δ C-ter (Δ C-terminal region) を作製し、これらと CGx2 との共沈実験を行うことにより、両者の結合に必要な CagA のドメイン構造を同定する。

(3) CGx2 と結合できない変異型 CagA あるいは野生型 CagA をそれぞれ胃粘膜上皮細胞で発現させ、CGx2 の持つ「粘液の開口放出を制御する機能」に対する影響を形態学的に解析する。

胃粘膜上皮細胞からの粘液の開口放出を観察するため、マウス胃組織から胃オルガノイドを作製する。具体的には、Mahe らによるプロトコルに従い、通常の培養液に様々な成長因子を加えた培養液を準備し、マトリゲルを用いた 3 次元培養法によって作製する (Mahe et al, Curr Protoc Mouse Biol. 3, 217)。作製した胃オルガノイドに薬剤誘導性 (doxycycline を使用) に CagA 遺伝子を発現するコンストラクトを導入した後 (電気穿孔法を用いる)、G418 等を用いた薬剤感受性セレクトションを行い、doxycycline 依存性に CagA 遺伝子を発現する胃オルガノイドを樹立する。粘液は抗 MUC5AC 抗体を用いた蛍光免疫染色法によって検出する。

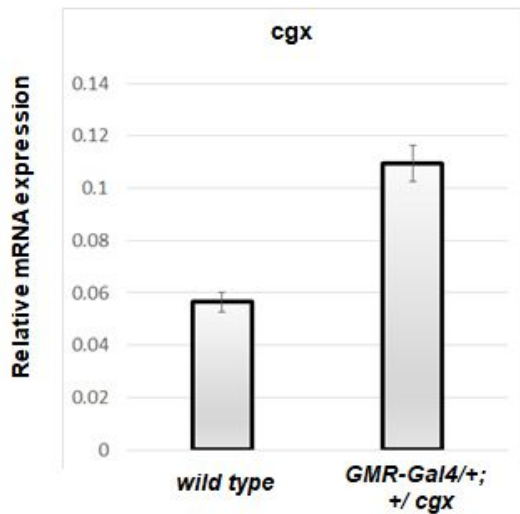
4. 研究成果

(1) CGx2 のショウジョウバエホモローグ cgx を発現すると考えられる系統では、cgx mRNA 量が顕著に増加している【図2】。

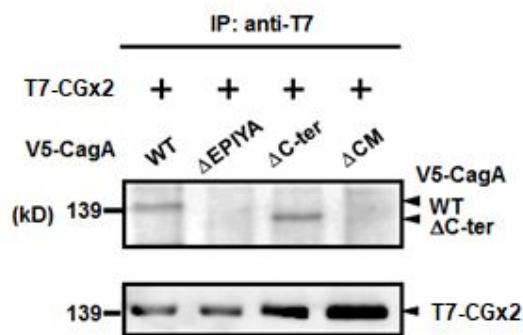
RT-qPCR 法によって、CGx2 のショウジョウバエホモローグ cgx を発現すると考えられる系統では、cgx mRNA 量が野生型と比較して約 2 倍程度まで増加していることを明らかにした。

(2) CagA は、その CM sequence を介して CGx2 と物理的に結合する【図3】。

V5-CagA と T7-CGx2 との共沈実験より、両者が細胞内で物理的に結合することを明らかにした。さらに、CM sequence を欠失させた変異体 Δ CM は CGx2 と結合しなくなることから、両者の結合には CagA の EPIYA 領域内にある CM sequence が必要であることを証明した。



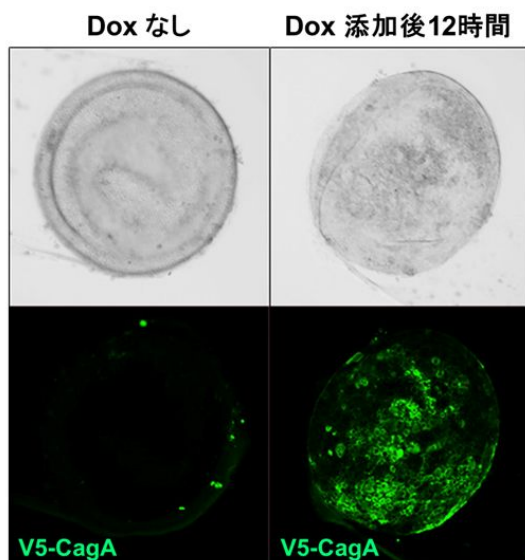
【図 2】



【図 3】

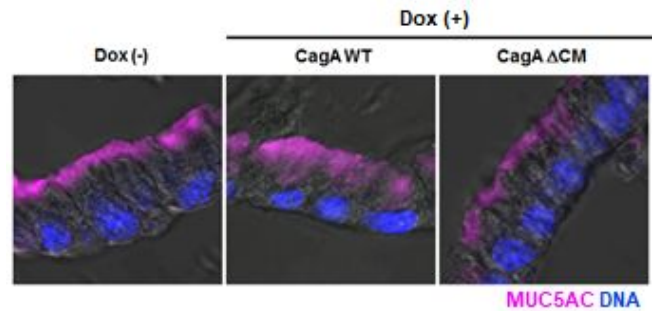
(3) 野生型 CagA を発現する胃粘膜上皮細胞では粘液分泌が阻害される【図 4・5】

doxycycline (Dox) 添加時にのみ V5-CagA の発現が誘導される胃オルガノイドを作製した(マウス抗 V5 抗体および Alexa 488 ラベル抗マウス IgG 抗体によって、V5-CagA の発現を検出している)【図 4】。



【図 4】

野生型 CagA (CagA WT) を発現する胃粘膜上皮細胞では粘液分泌が阻害され、細胞内に粘液が貯留する。一方、CGx2 と結合できない変異型 CagA (CagA ΔCM) を発現する胃粘膜上皮細胞では粘液の貯留は認められない。(マウス抗 MUC5A 抗体および Alexa 594 ラベル抗マウス IgG 抗体によって、MUC5AC の発現を検出している。DNA 染色には DAPI を用いている。)



【図 5】

【成果のまとめ】

本研究によって、CagA が CGx2 と結合し、これが持つ粘液の開口放出を制御する機能を阻害する可能性が示唆された。この阻害作用によって胃粘膜上皮の表層に形成される粘液層が破たんし、粘膜上皮傷害とこれに伴う慢性炎症、さらには胃癌が惹起される可能性が考えられた。

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 6 件)

Khan MSI, Nabeka H, Islam F, Shimokawa T, Saito S, Li X, Kawabe S, Hamada F, Tachibana T, Matsuda S. (2017) Early neonatal loss of inhibitory synaptic input to the spinal motor neurons confers spina bifida-like leg dysfunction in a chicken model. *Dis Model Mech.* 10, 1421-1432. 査読有

Kai T, Tsukamoto Y, Hijiya N, Tokunaga A, Nakada C, Uchida T, Daa T, Iha H, Takahashi M, Nomura T, Sato F, Mimata H, Ikawa M, Seto M, Matsuura K, Moriyama M. (2016) Kidney-specific knockout of Sav1 in the mouse promotes hyperproliferation of renal tubular epithelium through suppression of the Hippo pathway. *J Pathol.* 239, 97-108. 査読有

Tokunaga A, Anai H, Hanada K. (2016) Mechanisms of gene targeting in higher eukaryotes. *Cell Mol Life Sci.* 73, 523-33. 査読有

Hijiya N, Tsukamoto Y, Nakada C, Tung

Nguyen L, Kai T, Matsuura K, Shibata K, Inomata M, Uchida T, Tokunaga A, Amada K, Shirao K, Yamada Y, Mori H, Takeuchi I, Seto M, Aoki M, Takekawa M, Moriyama M. (2016) Genomic Loss of DUSP4 Contributes to the Progression of Intraepithelial Neoplasm of Pancreas to Invasive Carcinoma. *Cancer Res.* 76, 2612-25. 査読有

Nabeka H, Shimokawa T, Doihara T, Saito S, Wakisaka H, Hamada F, Kobayashi N, Matsuda S. (2015) A prosaposin-derived Peptide alleviates kainic Acid-induced brain injury. *PLoS One.* 10, e0126856. doi: 10.1371/journal.pone.0126856. 査読有

Kawakami E, Tokunaga A, Ozawa M, Sakamoto R, Yoshida N. (2015) The histone demethylase Fbxl11/Kdm2a plays an essential role in embryonic development by repressing cell-cycle regulators. *Mech Dev.* 135, 31-42. 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

濱田文彦 (2016) (招待講演) ピロリ菌による胃癌発生メカニズムの解明 日本解剖学会・第72回九州支部学術集会 長崎大学医学部ポートインホール(長崎市)(2016年10月)

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

徳永 暁憲 (TOKUNAGA, Akinori)
国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・統合加齢神経科学研究部・室長
研究者番号：70549451

二宮 遼 (NINOMIYA, Ryo)
大分大学・医学部・助教
研究者番号：00794041