

平成 21 年 6 月 30 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007-2008

課題番号：19590712

研究課題名(和文) 胃粘膜傷害における蛋白質レベルでのイニシャルイベント -ポストゲノムの病態-

研究課題名(英文) Initial event of protein degeneration during the gastric mucosal injury

研究代表者

大高 道郎 (OTAKA MICHIRO)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：30250872

研究成果の概要：

ストレス誘発性胃潰瘍では胃粘膜傷害の生ずる前より胃粘膜上皮細胞内の蛋白質変性は始まっており、HSP70 アフィニティークロマトグラフィーに結合する 200-kDa および 45-kDa の 2 種類の蛋白質の高次構造の変化が、ストレスによる胃粘膜傷害の initial event であると考えられた。また、そのアミノ酸配列よりこれらの蛋白質はミオシン重鎖およびアクチンであることが明らかになった。これまで、胃粘膜傷害の initiator や initial event は全く不明であったが、約十数秒の間に変性した蛋白質に結合し、高次構造を正常化する HSP の性質を利用することにより、潰瘍治療の標的と成り得る分子を同定できた。この成果は将来の分子医学的あるいはポストゲノム時代の潰瘍治療の開発に寄与するものと考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床系医学・消化器内科学

キーワード：(1) 胃粘膜傷害 (2) 胃潰瘍 (3) 分子シャペロン (4) ポストゲノム
(5) 熱ショック蛋白質 (6) HSP 結合蛋白質 (7) 消化性潰瘍

1. 研究開始当初の背景

Helicobacter pylori 菌関連潰瘍の問題が解決された現在、*Helicobacter pylori* 菌の関与しない難治性消化性潰瘍の病態のさらなる解明、治療法の開発が今後の潰瘍学に残された課題で不明な点が多い。その一因は、実際に胃粘膜傷害、潰瘍形成の引き金となっている分子や、その後の細胞内環境の変化等の

解明が未だなされていないことが一因であると考えられる。しかし、外因性の傷害物質や環境変化による粘膜(細胞)傷害の超急性期に生じている蛋白質の物理的、構造的な傷害や変化は、遺伝子によって制御されているわけではなく、その詳細を解明することは、極めて困難であった。熱ショック蛋白質(heat shock proteins 以下 HSP)は、細胞内

の変性蛋白質や、新生蛋白質などの構造的に不安定な分子を極めて短時間のうちに認識し結合し、そのシャペロン機能により、その蛋白質の立体構造を正常化することにより細胞内の環境を正常化し、細胞保護作用を増強させる。

HSP のシャペロン機能の第一段階である、細胞内の変性蛋白質を認識して、その蛋白質に極めて短時間で結合するという性質を利用すれば、粘膜（細胞）傷害の超急性期に生ずるイニシャルイベントとして傷害を受ける蛋白分子が「HSP 不足状態」の時期には Un-folding 状態の蛋白質 (HSP と結合していない)として存在するため HSP アフィニティークロマトグラフィーで変性蛋白質分子を同定できる可能性がある。

HSP の標的分子、すなわち変性に陥る蛋白質を同定することにより、これまでに知られていなかった粘膜傷害の蛋白質レベルでの病態の解明が可能となることに加え、傷害物質や粘膜傷害の病因の種類による傷害蛋白質の差異が認められれば、それぞれの病因に応じたポストゲノムレベルでの分子医学的治療法、薬剤の開発が可能となり、真の EBM に基づいた治療法の開発につながるものと考えられる。

2. 研究の目的

胃粘膜に傷害機転が加わった後、病理学的変化の生ずる前（超急性期）の、細胞内蛋白質の立体構造の変化をとらえるため、変性に陥った蛋白質を認識し、極めて短時間で結合する HSP70 ファミリー、HSP60 ファミリーに結合する蛋白質を同定する。そのためには、native form で精製した HSP を結合させたアフィニティークロマトグラフィーを用い、病理学的変化の生ずる前（超急性期）の胃粘膜の homogenate をアプライし、ATP で溶出される特異的結合蛋白質を、コントロールの胃粘膜をアプライした際に溶出されてくる蛋白質のパターンと比較検討することにより、変性蛋白質を同定する。この結合蛋白質を精製し、そのアミノ酸配列を解析することにより、胃粘膜傷害の超急性期に、まず最初に傷害を受ける蛋白質を同定する

3. 研究の方法

胃粘膜上皮細胞における HSP70 特異的結合蛋白質の同定

1) HSPアフィニティークラムの作製

既に我々が報告している HSP70 (HSC70) の精製方法により、ラット胃粘膜上皮細胞より

精製し、精製した蛋白質が機能を損なわず精製されたかを確認するため、そのシャペロン機能を確認する。シャペロン機能の評価は、我々の報告した方法 (*Eur J Biochem* 269, 5632-5641, 2002)で行う。すなわち、citrate synthase の熱による凝集抑制作用、rhodanase の guanidinium-Cl による化学的変性抑制作用を、それぞれの蛋白質分子の optical wavelength (500 nm) の経時的变化を spectrophotometer でモニターすることにより評価する。

精製された、シャペロン機能を有する HSP70 を CH-activated Sepharose 4B とカップリングさせ HSP70 アフィニティークラムを作成する。HSP70 の精製方法、カラム作製は基本的には、既に我々が報告した方法に基づいて行う (*J Biol Chem* 279, 17295-17300, 2004)。

2) HSP70 特異的結合蛋白質の同定

in vivo の系でストレス負荷、エタノール、塩酸、NSAID 投与等による粘膜傷害モデルを用い、in vitro と同様の実験を行う。すなわち、胃粘膜に病理学的変化の生ずる前の時間帯の胃粘膜を採取し、コントロールの胃粘膜とアフィニティークロマトグラフィーの結果を比較検討し、蛋白変性のため HSP に認識される蛋白質も同定をおこなう。

4. 研究成果

水浸拘束ストレス負荷 4-5 時間後より組織学的に胃粘膜傷害が生ずるが、標的分子への HSP70 の結合反応はストレス負荷直後（1 時間後）より生じることが明らかとなり、ATP で溶出される 200-kDa および 45-kDa の 2 種類の蛋白質の高次構造の変化が、ストレスによる胃粘膜傷害の initial event であると考えられた。アミノ酸配列よりこれらの蛋白質はミオシン重鎖およびアクチンであることが明らかになった。これまで、胃粘膜傷害の initiator や initial event は全く不明であったが、約十数秒の間に変性した蛋白質に結合し、高次構造を正常化する HSP の性質を利用することにより、潰瘍治療の標的と成り得る分子を同定できた。この成果は将来の分子医学的あるいはポストゲノム時代の潰瘍治療の開発に寄与するものと考えられた。

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 20 件)

1. Izumi Y, Otaka M, Takahashi T, Takada M, Shimada Y, Asaoka D, Nagahara A, Itoh H, Watanabe S. Specific induction of a 72-kDa heat shock protein protects esophageal mucosa from reflux esophagitis. *Life Sci.* 2009 Apr 10; 84 (15-16):517-522.
2. Otaka M, Odashima M, Izumi Y, Nagahara A, Osada T, Sakamoto N, Takada M, Takahashi T, Shimada Y, Tamaki K, Asaoka D, Itoh H, Watanabe S. Target molecules of molecular chaperon (HSP70 family) in injured gastric mucosa in vivo. *Life Sci.* 2009 May 8;84(19-20):664-667.
3. Hirata I, Naito Y, Handa O, Hayashi N, Mizushima K, Adachi S, Omatsu T, Okayama T, Kishimoto E, Ichikawa H, Takagi T, Kokura S, Otaka M, Yoshikawa T. Heat shock protein 70 over-expressing gastric epithelial cells are resistant to indomethacin-induced apoptosis. *Digestion.* 2009 Apr 28;79(4):243-250.
4. Koizumi S, Odashima M, Otaka M, Jin M, Linden J, Watanabe S, Ohnishi H. Attenuation of gastric mucosal inflammation induced by indomethacin through activation of the A2A adenosine receptor in rats. *J Gastroenterol.* 2009;44 (5):419-425.
5. Ishida R, Takaoka Y, Yamamoto S, Miyazaki T, Otaka M, Watanabe S, Komatsuda A, Wakui H, Sawada K, Kubota H, Itoh H. Cisplatin differently affects amino terminal and carboxyl terminal domains of HSP90. *FEBS. Lett.* 2008 Nov 26;582(28):3879-3883.
6. Otaka M, Yamamoto S, Ogasawara K, Takaoka Y, Noguchi S, Miyazaki T, Nakai A, Odashima M, Matsuhashi T, Watanabe S, Itoh H. The induction mechanism of the molecular chaperone HSP70 in the gastric mucosa by Geranylgeranylacetone (HSP-inducer). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007 Feb 9;353(2):399-404.
7. Kato S, Otaka M (Equal contribution to the first author), Odashima M, Sato T, Jin M, Matsuhashi T, Konishi N, Watanabe S. Mitigation of stress-induced gastric mucosal lesion by specific type IV phosphodiesterase inhibitor. *Dig. Dis. Sci.* 2007 Mar;52(3):711-716.
8. Odashima M, Otaka M (Equal contribution to the first author), Ohba R, Jin M, Horikawa Y, Matsuhashi T, Hatakeyama N, Oyake J,

- Watanabe S. Attenuation of gastric mucosal inflammation induced by aspirin through inhibition of the selective type III phosphodiesterase in rats. Dig. Dis. Sci. 2007 May;52 (5): 1355 -1359.
9. Matsuhashi T, Otaka M, Odashima M, Jin M, Komatsu K, Wada I, Horikawa Y, Ohba R, Oyake J, Hatakeyama N, Watanabe S. Protective effect of novel rice extract against ethanol-induced gastric mucosal injury in rat. Dig Dis Sci. 2007 Feb;52(2):434-441.
 10. Otaka M, Konishi N, Odashima M, Jin M, Wada I, Matsuhashi T, Ohba R, Watanabe S. Effect of alcohol consumption on leptin level in serum, adipose tissue and gastric mucosa. Dig. Dis. Sci. 2007 Nov;52(11):3066-3069.
 11. Horikawa Y, Otaka M, Komatsu K, Jin M, Odashima M, Wada I, Matsuhashi T, Ohba R, Oyake J, Hatakeyama N, DuBois R, Watanabe S. MEK-activation suppresses CPT11-induced apoptosis in rat intestinal epithelial cells through COX-2- dependent mechanism. Dig. Dis. Sci. 2007 Oct;52 (10): 2757-2765
 12. Odashima M, Otaka M (Equal contribution to the first author), Matsuhashi T, Jin M, Horikawa Y, Ohba R, Itoh H, Watanabe S: Mechanical strain stress suppresses expression of HSP70 and wound restoration in the gastric mucosal cells. Dig. Dis. Sci. 2007 Nov;52(11):3087-3091.
 13. Otaka M, Watanabe S. Expression and function of stress (heat shock) proteins in gastrointestinal tract. Int J Hiperthermia (2009, in press)
 14. 大高道郎: 消化管器疾患におけるストレス蛋白質 (分子シャペロン) の発現とその意義 - 分子シャペロン誘導療法への展望も含めて-. 日本ストレス学会誌, 21: 141-151, 2007.
 15. 大高道郎, 小田嶋傑, 渡辺大亮, 渡辺純夫: 高齢者消化器疾患における亜鉛の重要性 - 亜鉛による消化管粘膜保護作用も含めて-. 老年消化器病, 19: 73-78, 2007.
 16. 大高道郎, 小田嶋傑, 渡辺大亮, 三上健一郎, 渡辺純夫: 消化器疾患における亜鉛の有用性- 胃、大腸粘膜におけるHSP誘導作用を中心に-. Biomed. Res. Trace Elements 18:15-19, 2007.
 17. 大高道郎, 小田嶋傑, 渡辺大亮, 渡辺純夫: 高齢者消化器疾患における亜鉛の重要性 - 亜鉛による消化管粘膜保護作用も含めて-. 老年消化器病, 19: 73-78, 2008.
 18. 大高道郎, 渡辺純夫: 消化器疾患における亜鉛の重要性 - 亜鉛による消化管粘膜保護作用を中心に-. G. I. Research,

- 16: 164-169, 2008.
19. 伊藤英晃, 大高道郎, 渡辺純夫: 分子シャペロンと消化器疾患. 分子細胞治療, 7: 36-42, 2008.
20. 大高道郎, 和泉裕子, 渡辺純夫: 消化管上皮細胞のHSP発現機構の分子生物学. G. I. Research, 17: 154-158, 2009.

[学会発表] (計 5 件)

1. Izumi, Y., Otaka, M., Nagahara, A., Asaoka, D., Sakamoto, N., Osada, T., Kawabe, M., Ohkusa, T., Odashima, M., Itoh, H. and Watanabe, S.: Target molecules of molecular chaperone (HSP70) in injured gastric mucosal cells are cytoskeletal myosin. 109th the American Gastroenterological Association, 2008, San Diego
2. Takahashi, T., Otaka, M., Izumi, Y., Takada, M., Shimada, Y., Itoh, H. and Watanabe, S.: Contribution of heat shock proteins expression to gender difference in development of stress-induced gastric mucosal injury in rats. 110th the American Gastroenterological Association, 2009, Chicago.
3. Izumi, Y., Otaka, M., Takahashi, T., Takada, M., Shimada, Y., Asaoka, D., Nagahara, A., Itoh, H. and Watanabe, S.: Specific

- induction of a 72-kDa heat shock protein protects esophageal mucosa from reflux esophagitis. 110th the American Gastroenterological Association, 2009, Chicago.
4. Oguro, M., Nagahara, A., Asaoka, D., Nakayama, H., Izumi, Y., Otaka, M. and Watanabe, S.: Investigation of laryngo-tracheal lesion in a rat chronic acid reflux esophagitis. 110th the American Gastroenterological Association, 2009, Chicago.
5. Takada, M., Otaka, M., Takahashi, T., Izumi, Y., Shimada, Y., Itoh, H. and Watanabe, S.: Over-expression of a 70-kDa heat shock protein enhances cytoprotective function against hydrogen peroxide or NSAIDs-induced small intestinal epithelial cells injury. 110th the American Gastroenterological Association, 2009, Chicago.

[図書] (計 1 件)

1. 大高道郎: がんの温熱免疫療法, 診断と治療社, 東京, 2008, 73-77頁
6. 研究組織
(1) 研究代表者
大高 道郎 (OTAKA MICHIRO)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号: 30250872