

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16476

研究課題名(和文)ピロリ菌感染に関連する高コレステロール血症の発症メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation mechanism of hypercholesterolemia associated with *H. pylori* infection

研究代表者

二宮 遼 (Ninomiya, Ryo)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：00794041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではピロリ菌産生タンパク質であるCagA蛋白質がLDLRとの結合を介してLDLの細胞内への取り込みを阻害することの証明を目的とし研究を進めてきた。

本研究の成果として、細胞内でCagAとLDLRが物理的に直接結合することや、両者が細胞内で共局在することを確認した。さらに、細胞株でCagAを発現させると、細胞内へのLDL取り込みが有意に低下することを証明した。ピロリ菌感染が全身性疾患を引き起こす機序は明らかになっていなかったが、本研究によって、CagAをもつピロリ菌感染と高コレステロール血症およびこれに伴う虚血性心疾患との因果関係の一端を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ピロリ菌感染、特にCagA蛋白質をもつピロリ菌感染は胃炎、胃潰瘍、さらに胃癌を引き起こすばかりでなく、胃以外の全身性疾患の発症に関連することが知られていた。しかしながら、その臨床的重要性にも関わらず、ピロリ菌感染が全身性疾患を引き起こす機序は明らかになっていなかった。

本研究によって、CagAがLDLRとの物理的結合を介してLDLRの機能を阻害することが明らかとなり、ピロリ菌感染が高コレステロール血症から虚血性心疾患を引き起こすメカニズムの一端が解明された。この成果は、ピロリ菌によって全身性疾患が発症するメカニズムの最初の報告となり、今後新たな治療法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)： *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection mainly causes gastroduodenal diseases, including chronic gastritis, peptic ulcer disease and gastric cancer. Recently, some studies have demonstrated that infection with *H. pylori*, especially strains harboring the virulence factor CagA (cytotoxin-associated gene A), contribute to the development of non-gastric systemic diseases, including hypercholesterolemia and atherosclerotic cardiovascular diseases. However, the mechanism of *H. pylori* infection which causes systemic disease yet to be revealed.

This study confirmed that CagA and LDLR cause direct physical bonding to each other, and both proteins co-localize in the cell. Furthermore, we demonstrated that expression of CagA significantly reduced LDL uptake into the cells. This study provided some insight into the causal relationship between CagA-positive *H. pylori* infection, hypercholesterolemia and its association with ischemic heart disease.

研究分野：解剖学，分子細胞生物学

キーワード：ピロリ菌 CagA LDL受容体 高コレステロール血症

1. 研究開始当初の背景

ピロリ菌感染、特に菌体から宿主細胞に注入される CagA 蛋白質をもつピロリ菌感染は胃炎、胃潰瘍、さらに胃癌を引き起こすばかりでなく、胃以外の全身性疾患の発症に関連することが知られているが、ピロリ菌感染が全身性疾患を引き起こす機序は明らかになっていない。

また、我々は本研究に先立ち、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により、CagA の標的分子として Low density lipoprotein receptor (LDL 受容体) を同定し、細胞内で CagA と LDLR が物理的に結合することを発見した。

2. 研究の目的

先述の背景を踏まえて、本研究では CagA 蛋白質が LDLR との結合を介して LDL の細胞内への取り込みを阻害することを証明することを目的とした。

CagA による高コレステロール血症およびこれに伴う虚血性心疾患との因果関係を分子レベルから解明することを通して、ピロリ菌感染を原因とする全身性疾患の発症メカニズム解明の先駆けとしたいと考えた。

具体的には以下の戦略により研究を進めた。

- (1) CagA と LDLR の細胞内での結合様式を明らかにする
- (2) CagA が LDLR を介して、LDL-C の細胞内への取り込みを阻害することを証明する
- (3) ピロリ菌感染スナネズミを用い、個体レベルで CagA と LDLR の関連性を解明する

3. 研究の方法

(1) CagA と LDLR の細胞内での結合様式を明らかにする

先述した通り、筆者はすでに CagA と LDLR が細胞内において直接結合することを発見している。CagA の C-terminal 側には、標的分子であるチロシンホスファターゼ SHP-2 との結合部位である EPIYA 領域 (Higashi et al 2002) や胃上皮の細胞極性を形成する PAR1 との結合部位である CM 領域 (Lu et al 2009) が存在する。CagA のどの領域が LDLR との結合に重要か検討するため、特にその C-terminal 領域に着目し、EPIYA 領域あるいは CM 領域を欠失した変異型 CagA と LDLR との結合実験 (共免疫沈降法) を実施した。

(2) CagA が LDLR との結合を介して、LDL-C の細胞内への取り込みを阻害することを証明する

野生型 CagA を発現させた細胞、コントロールとして発現ベクターのみを導入した細胞、さらに、結合実験より得られた LDLR に結合できない変異型 CagA を発現させた細胞を準備し、蛍光標識した LDL の細胞内への取り込みの差を解析した。

細胞内に取り込まれた LDL のみを定量するため、エンドサイトーシスにより pH が弱酸性になることで蛍光強度が増加する pHrodo Red LDL (Invitogen) を使用した。蛍光顕微鏡での蛍光標識 LDL 取り込みの観察、および蛍光プレートリーダーを用いた蛍光強度の定量にて解析を行った。

(3) ピロリ菌感染スナネズミを用い、個体レベルで CagA と LDLR の関連性を解明する

CagA 陽性ピロリ菌、CagA を欠失させた同一株のピロリ菌 (陰性コントロールとして使用) をそれぞれスナネズミに経口投与にて感染させる。このピロリ菌感染スナネズミについて、高 LDL-C 血症が誘発されるかどうか解析を行う。さらに、ピロリ菌除菌後に HDL-C が優位に増加することが報告されていることから (Hubert et al 2004)、本モデルについても同様の結果が得られるかどうか検討する。

4. 研究成果

(1) CagA は C-terminal 領域で LDLR と直接結合した

CagA の LDLR 結合領域を明らかにするため、変異型 CagA をいくつか作製した。これら変異型 CagA と LDLR を細胞内にて共発現させ、共免疫沈降実験を実施した結果、CagA の C-terminal を欠失した変異型 CagA (N-ter) が LDLR と結合できないことが明らかとなった (図 1)。

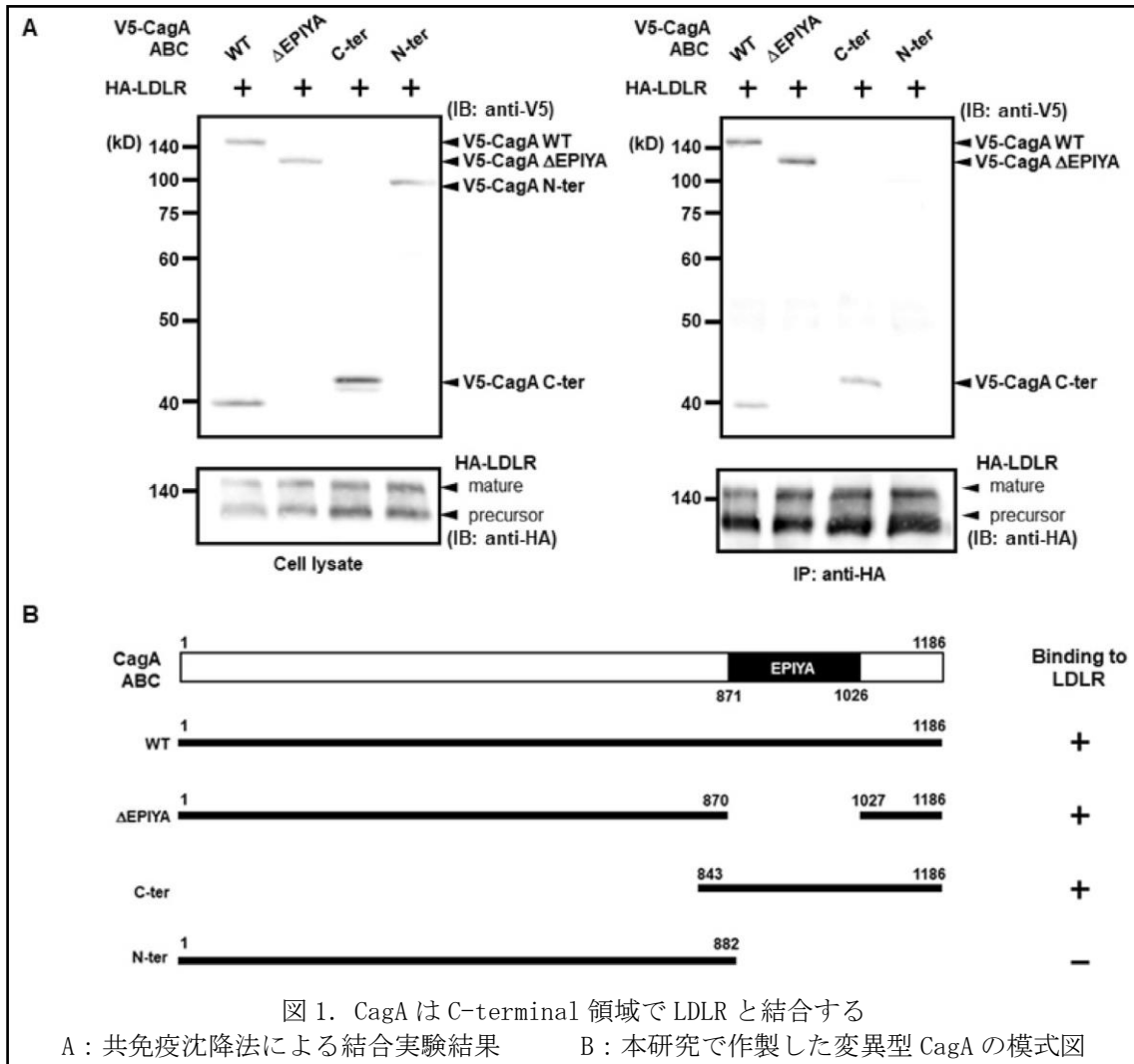


図 1. CagA は C-terminal 領域で LDLR と結合する

A : 共免疫沈降法による結合実験結果

B : 本研究で作製した変異型 CagA の模式図

(2) CagA は LDLR との結合を介して、LDL-C の細胞内への取り込みを阻害した

CagA を LDLR 高発現のヒト肝癌細胞株である HepG2 細胞へ発現させ、LDL の取り込みを観察した。その結果、蛍光顕微鏡観察下において、細胞内に取り込まれる LDL が顕著に減少した (図 2A)。蛍光プレートリーダーによる定量においても、LDL 取り込みが優位に低下した (図 2B)。

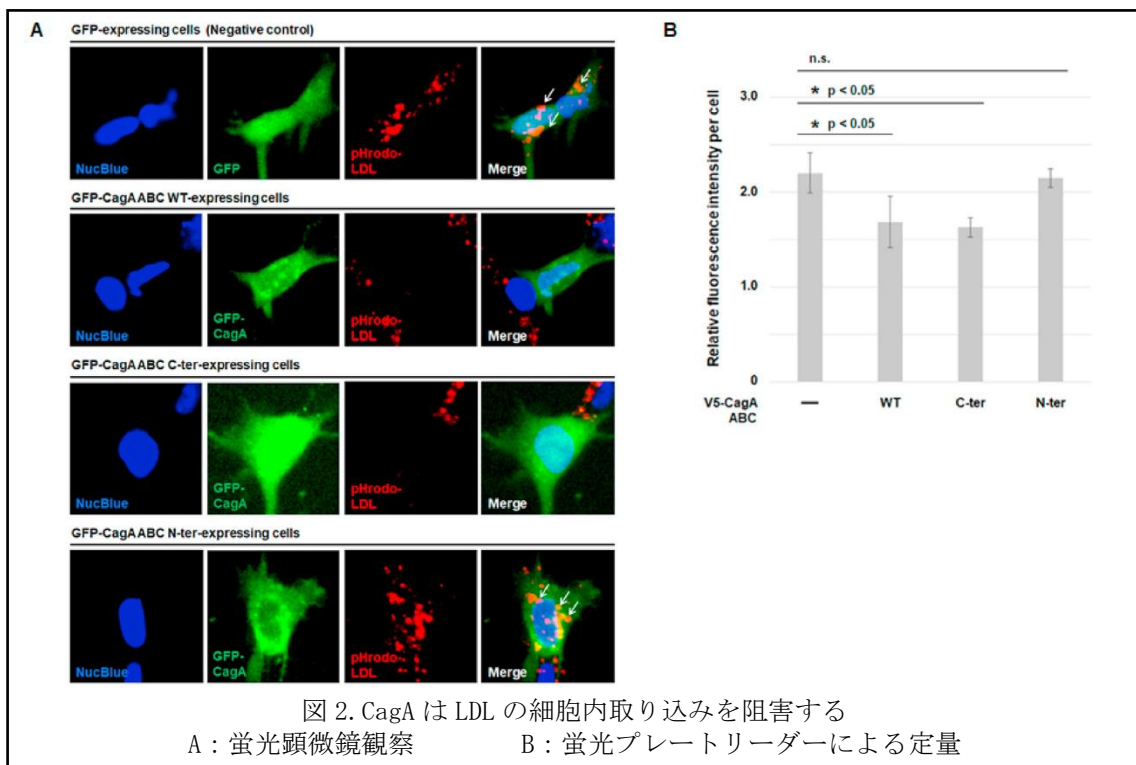


図 2. CagA は LDL の細胞内取り込みを阻害する

A : 蛍光顕微鏡観察

B : 蛍光プレートリーダーによる定量

さらに、(1) の結合実験より得られた LDLR に結合できない変異型 CagA を発現させた細胞では、CagA による LDL の取り込みが阻害されないことも確認した (図 2A, B)。

以上の結果から、CagA の C-terminal 領域と LDLR が直接結合することで、細胞内への LDL 取り込みが阻害されることが証明された。ここまでの研究成果は、論文にて報告した (R Ninomiya et al., BBRC, 2021)。

(3) ピロリ菌感染スナネズミを用い、個体レベルで CagA と LDLR の関連性を解明する (実施中)

以上の成果を踏まえて、より生理学的な検討を行うために、スナネズミへのピロリ菌感染実験を実施している。CagA を欠失させたピロリ菌を遺伝子改変技術により作製し、この変異型ピロリ菌と CagA 陽性ピロリ菌をそれぞれスナネズミに経口投与にて感染させた。

現在、スナネズミへのより効率的な感染条件を検討中である。

(4) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

これまで、CagA の標的分子として、SHP-2 や PAR1 など、胃粘膜における細胞増殖の促進や細胞極性の構造破綻を引き起こす分子が報告されてきた (Higashi et al 2002, Saadat et al 2007)。近年になって CagA 陽性ピロリ菌感染と高 LDL-C 血症をはじめとする全身性疾患との関連が報告されてきているが、これらは主に統計解析などの臨床の症例研究が中心であり、因果関係を分子レベルから解明した報告は見当たらない。

本研究により CagA が LDLR との物理的結合を介して LDLR の機能を阻害し、高 LDL-C 血症から虚血性心疾患を引き起こすメカニズムの一端を解明することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ninomiya Ryo, Kubo Shuichi, Baba Takehiro, Kajiwara Tooru, Tokunaga Akinori, Nabeka Hiroaki, Doihara Takuya, Shimokawa Tetsuya, Matsuda Seiji, Murakami Kazunari, Aigaki Toshiro, Yamaoka Yoshio, Hamada Fumihiko	4. 巻 556
2. 論文標題 Inhibition of low-density lipoprotein uptake by Helicobacter pylori virulence factor CagA	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 192 ~ 198
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.03.170	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------