

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月13日現在

機関番号：11301  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23790766  
 研究課題名（和文） 胃粘膜上皮における自然免疫応答と分化制御・発癌のクロストークの  
 解明  
 研究課題名（英文） Cross talk between the innate immune response and trans-  
 differentiation/carcinogenesis in the gastric epithelium  
 研究代表者  
 浅野 直喜（ASANO NAOKI）  
 東北大学・病院・助教  
 研究者番号：20526454

## 研究成果の概要（和文）：

胃粘膜上皮細胞への *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 感染は、NF- $\kappa$ B の活性化を介して Cdx2 の発現を誘導することが明らかとなった。一方、NOD1 発現の抑制は *H. pylori* 感染による Cdx2 の誘導発現を増強し、逆に NOD1 リガンドへの暴露や TRAF3 の発現はそれを抑制することが判明した。*H. pylori* を感染させたマウスの胃を用いた検討では NOD1 の欠損は腸上皮化生の発生と Cdx2 の発現を増強した。

## 研究成果の概要（英文）：

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection induced Cdx2 expression via the activation of NF- $\kappa$ B in gastric epithelial cells. On the other hand, knocking down NOD1 enhanced this induction whereas pre-stimulation with NOD1 ligand and over-expression of TRAF3 had a suppressive role on this induction. *In vivo* studies with *H. pylori* infected mice revealed that the absence of NOD1 leads to enhanced formation of intestinal metaplasia and induction of Cdx2.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：上部消化管学（食道、胃、十二指腸）

## 1. 研究開始当初の背景

現代では *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 感染が胃癌の癌原性因子であることは広く認識されるようになった。その感染は胃粘膜萎縮や腸上皮化生を経て分化型胃癌発生を引き起こすという sequence が Correa らにより提唱されたが、その詳細な機序は未だ解明されていない。

胃の腸上皮化生の進展には、腸の発生・分化に重要なホメオボックス遺伝子 Cdx2 の発現が深く関与していることが報告されている。Cdx2 は腸の発生・分化に深く関与しているホメオボックス遺伝子であり、正常胃粘膜には発現していない。しかしながら、腸上

皮化生を起こした胃粘膜には Cdx2 が発現していることが知られており、その transgenic mouse の胃粘膜には腸上皮化生が生じることも報告されている。

このように腸上皮化生の発生に対して trigger となっている可能性が考えられている Cdx2 だが、*H. pylori* 感染がどのような機序によって Cdx2 の発現に結びつくかに関しては未だ報告はない。

一方で、*H. pylori* が胃粘膜に感染すると IV 型分泌機構によりその菌体成分が胃粘膜上皮細胞内に注入されるが、この注入された菌体成分が胃粘膜上皮細胞内のパターン認識受容体である nucleotide-binding

oligomerization domain 1 (NOD1)によって認識されることが *H. pylori* の排除には重要な役割を果たしているとの報告がある。本研究代表者も培養細胞株およびマウスを用いた実験により *H. pylori* 感染の初期には NOD1 の活性化が TNF receptor associated factor 3 (TRAF3) を介して NF- $\kappa$ B の抑制および type I IFN や IP-10 の産生を引き起こし、菌体の排除に重要な役割を果たしていることを報告している。

このように *H. pylori* 感染初期に重要な役割を果たす NOD1 だが、慢性期にどのような役割を果たすのかに関しては未だ報告がない。

## 2. 研究の目的

*H. pylori* 感染による分化型胃癌発生のメカニズムを解明するために、*H. pylori* 感染による前癌病変である腸上皮化生の進展機序を解明すること、そして自然免疫応答分子である NOD1 がその過程でどのような役割を果たすか検討することを目的とした。

慢性炎症が発癌を引き起こすことは、胃に限らず、肝臓や大腸などの他臓器でも広く知られており、NOD1 が胃における前癌病変の発生に関与している機序を解明することは重要な意味をもつと考えられる。

## 3. 研究の方法

### ・ *H. pylori* 感染による Cdx2 の誘導発現

ヒト胃癌培養細胞株 GCIY および AGS に *H. pylori* を感染させ、Cdx2 が発現するか検討した。さらに、NOD1 が Cdx2 の誘導に及ぼす影響を見るために NOD1 siRNA を遺伝子導入した上で *H. pylori* を感染させて Cdx2 の発現を検討した。また、実験によっては細胞を NOD1 のリガンドで前処理した後に *H. pylori* を感染させて検討した。

### ・ ルシフェラーゼアッセイ

ヒト Cdx2 の 5' プロモーター領域を解析し、PCR によって得たそのフラグメントをルシフェラーゼ・レポーター・ベクターに組み込んだ上でヒト胃癌培養細胞に遺伝子導入し、*H. pylori* 感染により Cdx2 のプロモーターが活性化されるか検討した。実験によっては NOD1 の siRNA を用いて NOD1 をノックダウンした上で *H. pylori* を感染させ、レポーター活性の変化を検討した。

### ・ Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

*H. pylori* を感染させた GCIY の核蛋白を抽出し、consensus NF- $\kappa$ B oligonucleotide あるいは Cdx2 プロモーター領域の NF- $\kappa$ B 結合部位に特異的に設計した oligonucleotide の結合を検討した。

### ・ NOD1 ノックダウン GSM06 細胞の樹立

マウス正常胃粘膜培養細胞株である GSM06 にマウス NOD1-shRNA ベクターを遺伝子導入した後に puromycin で selection をかけ、限界希釈法でこの shRNA を恒常的に発現する単クローンを得た。

・ GSM06 および上記のように樹立した NOD1 をノックダウンした GSM06 に *H. pylori* を感染させ、Cdx2 の発現を定量 RT-PCR で検討した。

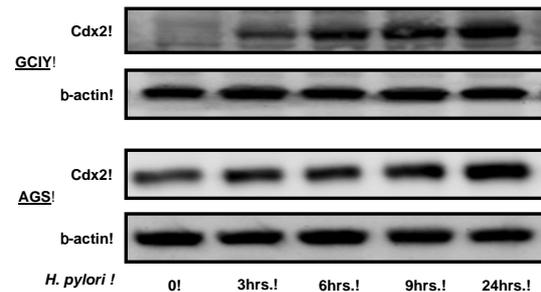
### ・ *in vivo* の *H. pylori* 感染実験

C57BL/6J マウスと NOD1 ノックアウトマウスに経口的に *H. pylori* を感染させ、12 ヶ月語に胃を摘出し、腸上皮化生の発生、Cdx2、MUC2 そして Tff3 の発現を免疫組織化学と定量 RT-PCR にて検討した。菌量に関しては培養法を用いて定量した。

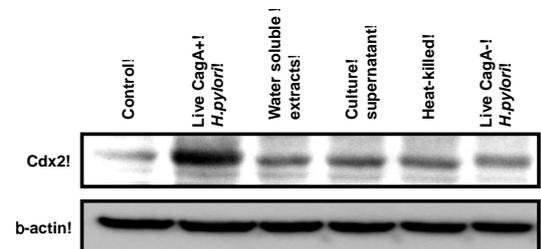
## 4. 研究成果

### ・ *H. pylori* 感染は Cdx2 の誘導発現

GCIY および AGS に *H. pylori* を感染させることにより経時的に Cdx2 が発現することが確認された。



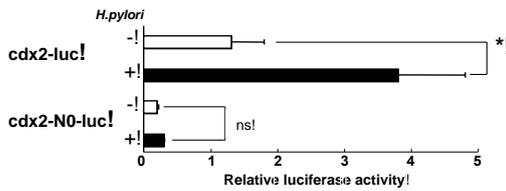
次に、*H. pylori* 感染による Cdx2 の誘導に必要な条件に関して検討したところ、CagA を有する生菌において Cdx2 が誘導されることが判明した。このことから *H. pylori* の IV 型分泌機構が重要な役割を果たしていることが示唆された。



### ・ *H. pylori* 感染による Cdx2 の誘導機序

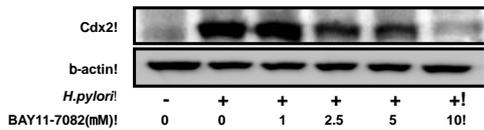
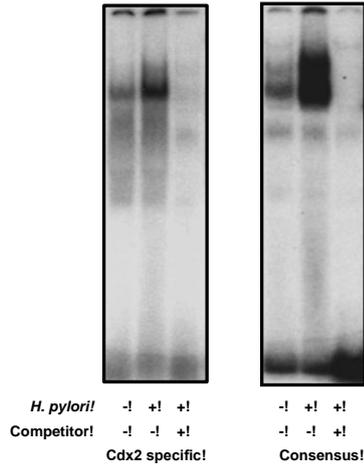
Cdx2 の発現調節機序を解明するため、その 5' promoter 領域を解析したところ、NF- $\kappa$ B 結合部位の存在が確認された。そこでこの NF- $\kappa$ B 結合部位を含むルシフェラーゼ・レポーター・ベクターと含まないベクターとを構築し、*H. pylori* 感染による転写活性の変化

を検討した。その結果、NF- $\kappa$ B 結合部位を含むベクターでのみ *H. pylori* 感染によるプロモーター領域の活性化が認められた。



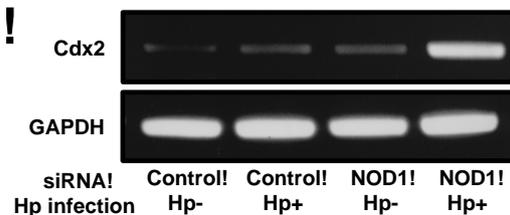
さらに、consensus NF- $\kappa$ B oligonucleotide および Cdx2 特異的に設計した

oligonucleotide を用いた EMSA と NF- $\kappa$ B 阻害剤を用いた検討からも *H. pylori* 感染による Cdx2 の誘導には NF- $\kappa$ B の活性化が必要であることが確認された。



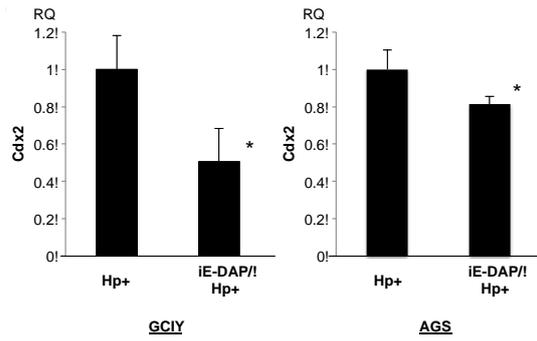
・ NOD1 が Cdx2 発現に及ぼす影響

次に *H. pylori* 感染時に重要な役割を果たす NOD1 が Cdx2 の誘導発現に与える影響に関して検討した。NOD1 を siRNA でノックダウンした AGS では Cdx2 の誘導発現はより増強されることが確認された。また、NOD1 をノックダウンした GSM06 を用いた検討でも同様に NOD1 を抑制することによる Cdx2 の発現増強が認められた。



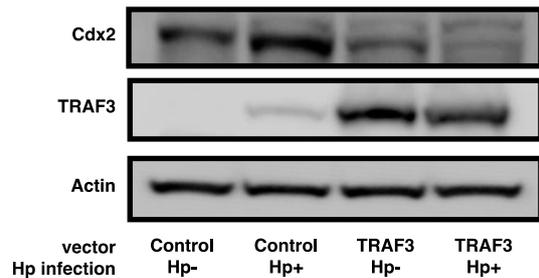
さらに予め NOD1 のリガンドで刺激した胃粘膜上皮細胞では *H. pylori* 感染による Cdx2 の発現は低下することが確認され、以上の結果からは NOD1 が Cdx2 の誘導発現に抑制的に

働くことが判明した。



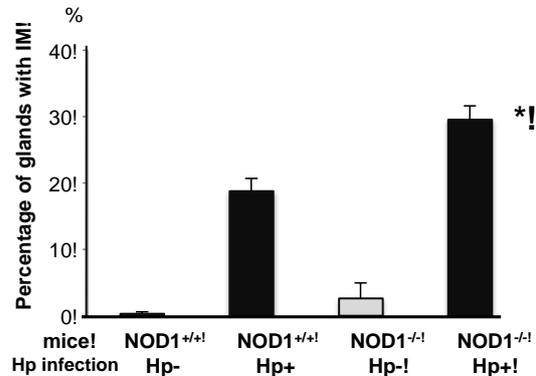
・ TRAF3 が Cdx2 の誘導発現に与える影響

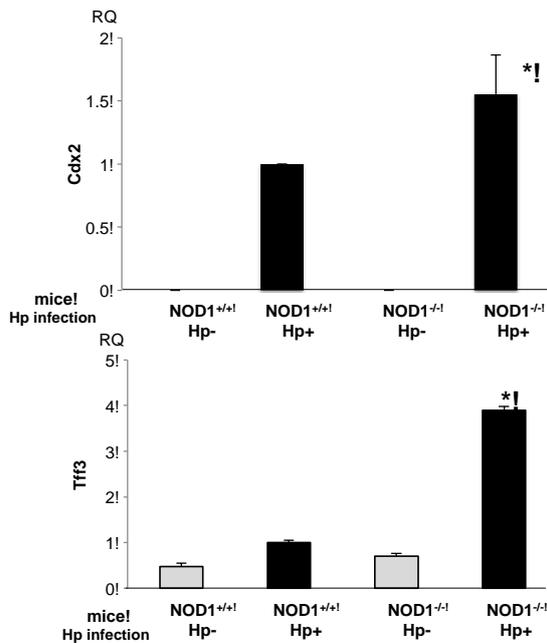
NOD1 の下流にある分子である TRAF3 は NF- $\kappa$ B の活性化を抑制する働きがあるため、NOD1 による Cdx2 の発現抑制に TRAF3 が関与しているか否かを検討した。胃粘膜上皮細胞に TRAF3 を強制発現させ、*H. pylori* を感染させたところ、Cdx2 の誘導発現は著明に抑制された。この結果から、NOD1 による Cdx2 発現抑制には TRAF3 が関与している可能性が示唆された。



・ マウスにおける腸上皮化生の発生

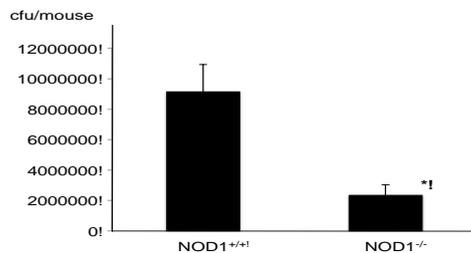
NOD1 ノックアウトマウスと C57BL/6J マウスに *H. pylori* を経口感染させ、1年後にその胃を摘出して検討したところ、NOD1 ノックアウトマウスにおいてより顕著に腸上皮化生の発生、Cdx2・MUC2・Tff3 の発現が認められた。





さらに胃粘膜上皮細胞における核内 NF- $\kappa$ B(p65)の発現も NOD1 ノックアウトマウスにおいて顕著であり、*in vitro*の実験から得られたが *in vivo*でも証明された。

胃に定着していた *H. pylori* の菌量自体は NOD1 ノックアウトマウスにおいて有意に少なく、腸上皮化生の進展が単に *H. pylori* の菌量が多いことによるものではないことが確認された。



以上の結果から自然免疫関連分子である NOD1 が *H. pylori* 感染時の胃における腸上皮化生の発生を抑制することが判明した。このことより NOD1 のアゴニストが胃癌予防に有用である可能性が示唆された。

## 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)

[学会発表] (計2件)

1. 浅野直喜、今谷晃、下瀬川徹、*Helicobacter pylori* 感染において NOD1 は Cdx2 の制御を介して腸上皮化生進展を抑制する、第 98 回日本消化器病学会総会、2012 年 4 月 19 日

東京

2. 浅野直喜、今谷晃、近藤穰、千葉隆士、伏谷淳、阿部靖彦、飯島克則、小池智幸、下瀬川徹、NOD1, the innate immunity related molecule, suppresses *Helicobacter pylori* induced gastric intestinal metaplasia through regulation of homeobox gene Cdx2, DDW 2011、2011 年 5 月 9 日、サンディエゴ・アメリカ

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅野 直喜 (ASANO NAOKI)

東北大学・病院・助教

研究者番号：20526454

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者