

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460925

研究課題名(和文) 胃における自然免疫応答が前癌病変発生を制御する機序の解明

研究課題名(英文) Innate immunity-mediated regulation on the induction of precancerous lesions in the stomach.

研究代表者

浅野 直喜 (Asano, Naoki)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：20526454

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：自然免疫関連分子NOD1はその下流分子であるTRAF3を介して、Helicobacter pylori (H. pylori)感染による胃粘膜上皮におけるCdx2やMuc2の誘導発現、NF- κ B p65の活性化を抑制していた。反対に、ATP4aに関しては、NOD1はその発現維持に寄与していた。H. pylori感染による遺伝子発現の変化はNOD1ノックアウト(KO)マウスの胃における腸上皮化生や胃粘膜萎縮といった前癌病変の発生として現れた。NOD1KOマウスの胃におけるTRAF3の発現は野生型マウスのそれより有意に低く、胃前癌病変発生の一因となっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Innate immunity-related molecule NOD1 suppressed Helicobacter pylori (H. pylori) infection induced Cdx2 and Muc2 induction and NF- κ B p65 activation in gastric epithelial cells. On the other hand, NOD1 was required for the maintenance of ATP4a expression. The changes in gene expression upon H. pylori infection were observed as induction of intestinal metaplasia and gastric mucosal atrophy in the stomachs of H. pylori-infected NOD1-deficient mice 12 months after infection. The expression of TRAF3 was lower in these mice compared to NOD1-intact mice and this could be one of the causes for the induction of precancerous lesions in H. pylori-infected stomach.

研究分野：消化器内科

キーワード：NOD1 Helicobacter pylori

1. 研究開始当初の背景

胃の *H. pylori* (*Helicobacter pylori*) 感染により起こる腸上皮化生や萎縮性胃炎は分化型胃癌の発生源となることは広く知られており、さらに、*H. pylori* 除菌後胃癌は酸分泌が回復しない胃粘膜から発生することが報告されている (Iijima K et al: *Tohoku J Exp Med*, 2012)。腸上皮化生の発生にはホメオボックス遺伝子 *Cdx2* の発現誘導が重要であり (Sakamoto H et al: *Scand J Gastroenterol*, 2010)、本応募者も、*Cdx2* の発現には、これと相補的に制御される遺伝子の1つである *Sox2* の発現が抑制されることが不可欠であることを報告している (Asonuma S, Imatani A, Asano N et al: *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2009)。しかしながら、*H. pylori* によりこれら前癌病変が発生する分子生物学的なメカニズムの詳細は未だ不明である。

ところで、NOD1 (Nucleotide-binding Oligomerization Domain 1) は、細菌成分 (主に PGN (peptidoglycan)) を認識する細胞内受容体で、近年の研究により、Toll 様受容体とならんで自然免疫において重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。*H. pylori* 感染においては、宿主の上皮細胞に IV 型分泌機構を介して、*H. pylori* の菌体成分である CagA および PGN が注入されることが知られており、注入された CagA は NF- κ B を活性化する (*Proc Natl Acad Sci*, 2005; *EMBO*, 2009)。一方で、注入された PGN も NOD1 に認識されることにより、NF- κ B を活性化すると今までは考えられていた (Viala J et al: *Nat Immunol*, 2004)。しかしながら、本応募者らは、実際の生体内では *H. pylori* 感染においては、NOD1 は NF- κ B に対して寧ろ抑制的に働くことが明らかとした (Watanabe T, Asano N et al: *J Clin Invest*, 2010)。

以上のように、*H. pylori* 感染の急性期における自然免疫応答に関しては、その詳細が解明されつつあったが、実際に前癌病変が発生する慢性感染において、自然免疫応答がどのような役割を果たすかに関しては不明であった。臨床現場で問題となるのは、*H. pylori* の慢性感染による胃の前癌病変の発生およびそれを背景とした胃発癌であるため、*H. pylori* 慢性感染によりそれらの病変発生する分子生物学的なメカニズムの解明が重要であると考えられた。

2. 研究の目的

H. pylori 感染による分化型胃癌の発生機序を解明するために、*H. pylori* 感染により胃の前癌病変が発生するメカニズム、そして自然免疫関連分子 NOD1 がその過程でどのような役割を果たすか検討し、解明することを目的とした。

3. 研究の方法

・ *H. pylori* の培養

CagA 陽性 *H. pylori* (ATCC43504 株) を HP Columbia Agar plate に撒き、37°C 微好気性環境下にて培養後、液体 Brucella 培地に移して 37°C 微好気性環境下で培養した。菌体の活動性は鏡検下に確認し、菌量は吸光度により測定した。

・ *Cdx2* のプロモーター・アッセイ

ヒト *Cdx2* の 5'プロモーター領域から構築したルシフェラーゼベクターをウミシイタケのレポーターベクターと共に胃粘膜上皮培養細胞株に遺伝子導入し、その細胞に *H. pylori* を感染させ、ルシフェラーゼ・アッセイを行うことにより、*H. pylori* 感染が *Cdx2* の発現を誘導するか否かを検討した。さらに、NOD1 の有無が *H. pylori* 感染による *Cdx2* の発現に及ぼす影響に関しては、NOD1 に対する siRNA または control siRNA を遺伝子導入した細胞に同様にレポーターベクターを遺伝子導入し、*H. pylori* を感染させ、*Cdx2* のプロモーター活性を測定した。

・ NF- κ B レポーター・アッセイ

上記 *Cdx2* プロモーター・アッセイと同様に、NF- κ B レポーターベクターをウミシイタケのレポーターベクターと共に胃粘膜上皮培養細胞株に遺伝子導入し、*H. pylori* を感染させてルシフェラーゼ・アッセイを行った。この際、NOD1 の下流分子である TRAF3 が NF- κ B の活性化に及ぼす影響を検討するために、TRAF3 発現ベクターまたは control ベクターを遺伝子導入した細胞、および TRAF3 に対する siRNA または control siRNA を遺伝子導入した細胞に *H. pylori* を感染させ、NF- κ B レポーター・アッセイを行い、ルシフェラーゼ活性を測定した。

・ 長期 *H. pylori* 感染実験 (*in vivo*)

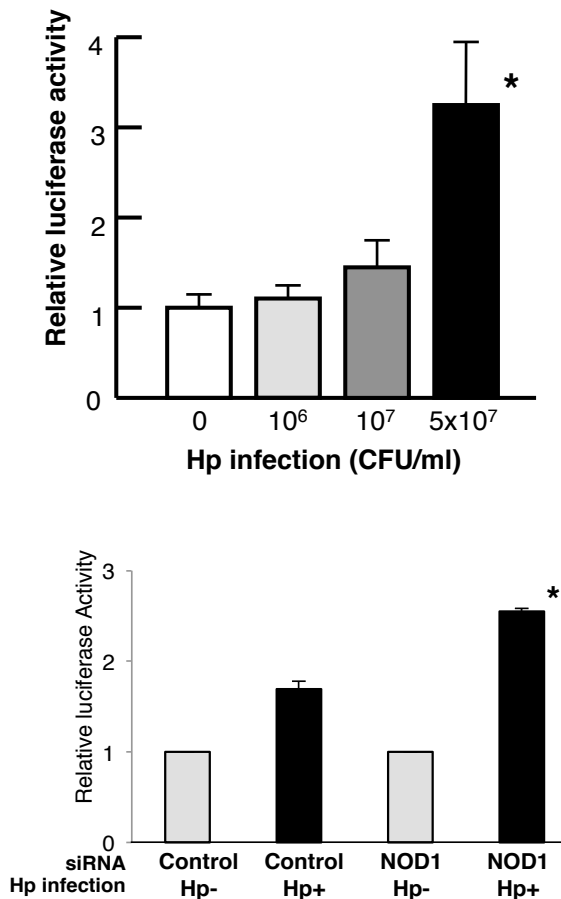
8 週齢の WT (野生型) マウスと NOD1KO (NOD1 ノックアウト) マウスを 5 匹ずつ、吸入麻酔下に経口挿管し、Day 0, 2, 4 に 1 匹あたり 2.5×10^8 CFU の *H. pylori* を感染させた。12 ヶ月後に胃を摘出、長軸方向に切開を入れることにより半分に分け、一方は組織学的な評価のために 4% パラホルムアルデヒドで固定し、残るもう一方はホモジェナイズし、RNA を抽出した。固定した組織を用いてヘマトキシリン・エオジン染色と *Cdx2*、NF- κ B p65 に対する免疫組織化学を行い、抽出した RNA を用いて TRAF3、MUC2、ATP4a に対する定量 RT-PCR を行った。

4. 研究成果

・ NOD1 は *Cdx2* の発現を抑制する

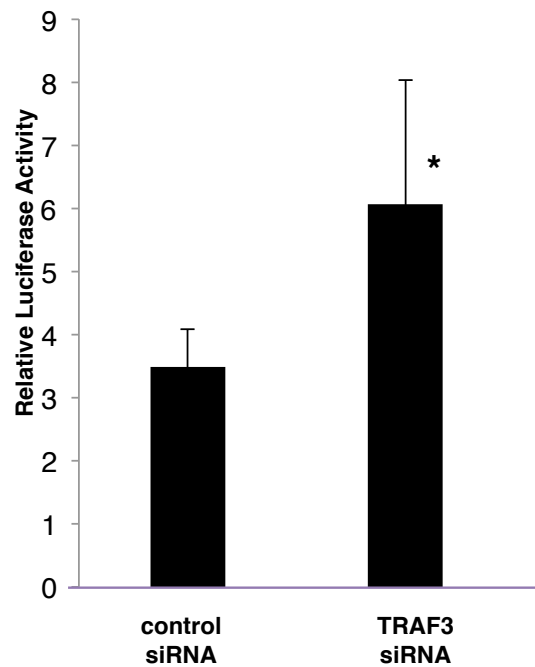
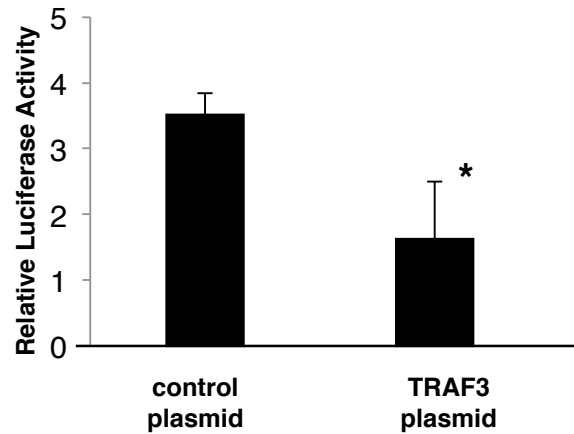
胃の前癌病変の一つである腸上皮化生はホメオボックス遺伝子 *Cdx2* の誘導発現により生じると報告されている (Silberg DC et al: *Gastroenterology*, 2002; Muto H et al: *Biochem Biophys Res Commun*, 2002)。こ

の Cdx2 の 5' promoter 領域には NF- κ B 結合部位が存在することが報告されており (Kim S et al: *Gastroenterology*, 2002)、その結合部位を含むよう構築したルシフェラーゼベクターを胃粘膜上皮細胞培養株に遺伝子導入し、*H. pylori* を感染させたところ、菌量依存性にプロモーター領域の活性化が認められた。次に、この *H. pylori* による Cdx2 プロモーターの活性化に NOD1 が及ぼす影響を検討したところ、NOD1 に対する siRNA を遺伝子導入した細胞では control siRNA を遺伝子導入した細胞よりも、Cdx2 のプロモーター活性が増強されることが確認された。



・ TRAF3 は NF- κ B の活性化を抑制する

上記、Cdx2 プロモーターを含んだレポーター・ベクターを用いたルシフェラーゼ・アッセイにより、腸上皮化生発生の trigger となる Cdx2 の発現に NF- κ B の活性化が関与していることが判明した。そこで、NOD1 の下流分子である TRAF3 が NF- κ B の活性化に及ぼす影響を検討するため、TRAF3 の発現ベクターあるいは TRAF3 の siRNA を NF- κ B のルシフェラーゼベクターと共に胃粘膜上皮培養細胞株に遺伝子導入し、*H. pylori* を感染させてルシフェラーゼ・アッセイを行った。結果、NOD1 の下流分子である TRAF3 には NF- κ B の活性化を抑制する作用があることが判明した。



Cdx2 の誘導発現には NF- κ B の活性化が必要であるため、NOD1 が Cdx2 の発現に対して TRAF3 を介して抑制的に働いている可能性が判明した。

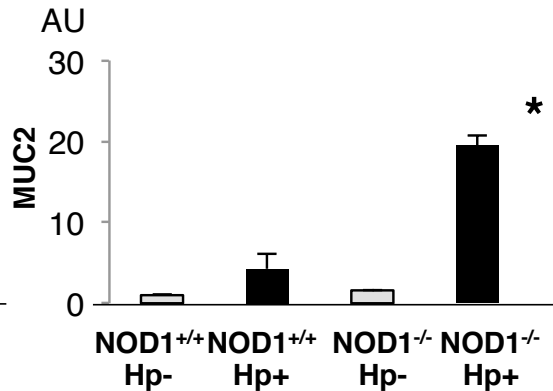
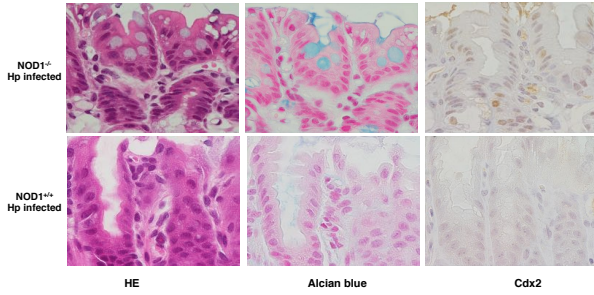
・ NOD1 は *H. pylori* 感染による胃の前癌病変の発生を抑制する

上記 *in vitro* の実験から、胃粘膜上皮細胞において、NOD1 がその下流分子である TRAF3 を介して *H. pylori* 感染による Cdx2 の誘導発現に対して抑制的に働くことが判明した。

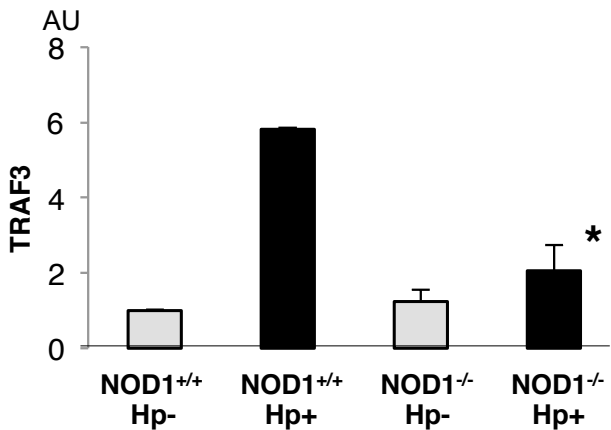
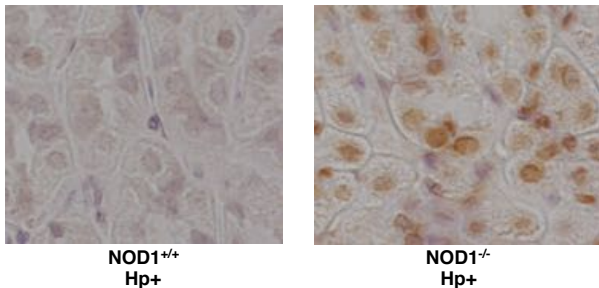
そこで *in vivo* でも同様に NOD1 が *H. pylori* 感染による胃の前癌病変の発生を抑制するか否かを検討するため、WT (野生型) マウスと NOD1KO (NOD1 ノックアウト) マウスに経口的に *H. pylori* を感染させ、感染から 1 年後に胃を摘出し、検討した。

NOD1KO マウスでは WT マウスに比して、有意に多くの腺管で腸上皮化生の発生、Cdx2 の発現が確認された。これを裏付けるように、NOD1KO マウスでは WT マウスに比して腸型ムチンである MUC2 の発現が有意に高値

を示していた。

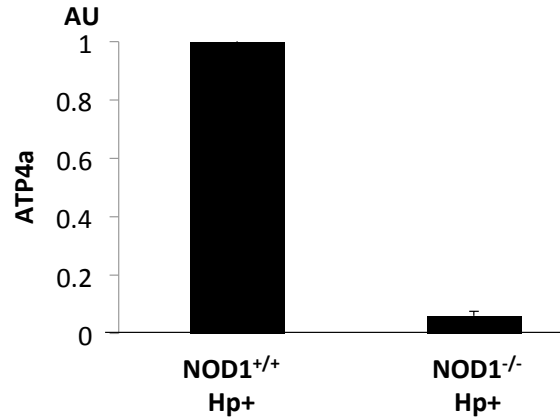


これは、NOD1KO マウスでは NOD1-TRAF3 を介した NF- κ B を抑制する機構が欠損しているためによると考えられ、実際に NOD1KO マウス胃粘膜上皮細胞では核内 p65 が強発現していること、TRAF3 の発現が低下していることが確認された。



さらに、*H. pylori* が 1 年間感染した NOD1KO マウスの胃では WT マウスのそれと比べて胃粘膜萎縮も顕著であることも判

明した。そこで、1 年間 *H. pylori* を感染させたマウスの胃から抽出した RNA を用いて胃壁細胞の指標となるプロトンポンプをエンコードする ATP4a の発現を定量 RT-PCR により検討したところ、NOD1KO マウス胃粘膜では WT マウスのそれに比べてプロトンポンプの発現が低下していることが確認された。



以上から、自然免疫関連分子 NOD1 が *H. pylori* 感染による胃の前癌病変の発生を抑制していることが判明した。慢性炎症が前癌病変の発生に寄与するメカニズムおよび自然免疫応答がそれを制御する機序が明らかとなり、今後、自然免疫関連分子 NOD1 を活性化することにより、前癌病変を抑え、結果的に胃発癌を抑制でき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)

[雑誌論文] (計 1 件)

浅野直喜、今谷晃、渡邊智裕、伏谷淳、金銅穰、金笑奕、荒誠之、宇野要、飯島克則、小池智幸、Warren Strober、下瀬川徹、*Cdx2* expression and intestinal metaplasia induced by *H. pylori* infection of gastric cells is regulated by NOD1-mediated innate immune responses、*Cancer Research*、査読有、76 巻、2016、1135-1145 doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2272

[学会発表] (計 1 件)

三上哲彦、浅野直喜、今谷晃、金笑奕、近藤穰、八田和久、荒誠之、浅沼清孝、小池智幸、下瀬川徹、NOD1 expression in gastric epithelial cells is down-regulated by *Helicobacter pylori* infection through the methylation of its CpG island by DNA methyltransferases、DDW2016、2016 年 5 月 21 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・大学病院・助教

研究者番号：20526454