

機関番号：34419

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590097

研究課題名 (和文) 胃粘膜上皮のプロテアーゼ活性化受容体発現と機能に対する
ピロリ菌感染の影響について研究課題名 (英文) Study on effects of Helicobacter pylori infection on expression and
function of proteinase-activated receptors in gastric mucosal epithelium.

研究代表者

関口 富美子 (SEKIGUCHI FUMIKO)

近畿大学・薬学部・准教授

研究者番号：90271410

研究成果の概要 (和文)：胃癌患者の癌化した胃粘膜組織では、ヘリコバクター・ピロリ (H. pylori) 感染が高い部位で proteinase-activated receptor-1 (PAR1) 発現量が増加している傾向が見られ、H. pylori 感染による胃癌の発生や進行にと PAR1 発現増加が関与する可能性が考えられた。一方、H. pylori のもつプロテアーゼについて種々の細胞を用いて反応性を検討した結果、PAR1、PAR2、PAR4 を活性化するプロテアーゼの存在は認められなかった。

研究成果の概要 (英文)：In the cancer area of gastric mucosal epithelium from gastric cancer patients, we found a tendency that expression of proteinase-activated receptor-1 (PAR1) was positively correlated with infection levels of Helicobacter pylori (H. pylori), suggesting involvement of increased expression of PAR1 in the development of H. pylori-related gastric cancer. We also determined if H. pylori might possess PAR-activating proteinases in various cell lines. However, we did not find any proteinases that activate PAR1, PAR2 or PAR4, in the H. pylori extracts.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：薬理学

1. 研究開始当初の背景

Proteinase-activated receptor (PAR) はトロンピンやトリプシンなど特定のセリンプロテアーゼによって細胞外 N 末鎖が特定の部位で切断され、新たに現れた N 末鎖の配列が tethered リガンドとしてその受容体に結合することで活性化される。また、PAR1 から PAR4 の 4 つのメンバーのうち、PAR1、PAR2、PAR4 はそれぞれの tethered リガンドの配列に基づいた 5～6 個のアミノ酸から

なるペプチド (PAR 活性化ペプチド) によっても非酵素的に活性化される。PAR は生体内に広く分布しており、血小板凝集、各種平滑筋運動、痛み、炎症、外分泌などの調節を含む種々の生理的・病態生理的役割を担っていることから、新しい治療ターゲット分子として広く研究が進められている。

消化器系において PAR は消化管および種々の外分泌腺を含む消化器系全体に分布しており、消化液分泌、消化管運動、消化管

における炎症や内臓痛の調節に関与している。胃ではこれまでに PAR1、PAR2 および PAR4 の機能的発現が認められており、その中でも PAR1 と PAR2 のアゴニストは胃粘膜保護作用を有することが *in vivo* の実験系において当研究室により明らかにされている

(Kawabata et al. 2004 Gastroenterology, 126, 208-219; Kawabata et al. 2001 J. Clin. Invest., 107, 1443-1450)。また、ラット正常胃粘膜上皮細胞 RGM1 において、PAR2 ではなく PAR1 の活性化により prostaglandin E₂ (PGE₂) 産生亢進が誘起されることも報告しており、先に示した *in vivo* のデータと一致する結果を得ている (Sekiguchi et al. 2007 Biochem. Pharmacol. 73 103-114)。一方で、炎症や癌の発症・転移において PAR の関与を示唆する報告や、癌組織における PAR 発現の増加を示す報告もあり、胃粘膜の正常状態維持における PAR の役割は二面性を持つことが示唆されている。

ヘリコバクター・ピロリ (*H. pylori*) は強いウレアーゼ活性によりアンモニアを産生するため胃粘膜に定着できるグラム陰性らせん状細菌であり、その感染は慢性的な胃炎や胃潰瘍を引き起こし、胃癌の発症にも関与している可能性が強く示唆されている。最近の研究により、'cag' pathogenicity islands (cagPAI) 陽性の *H. pylori* は cagPAI 陰性のものに比べ高い有害性を示すこと、また、cagPAI に含まれる 31 個の遺伝子のひとつ cagA 遺伝子から作られる cagA タンパクが胃粘膜細胞に注入されると、宿主細胞において炎症誘起サイトカインの interleukin (IL) -6 や IL-8 産生の亢進や、炎症シグナルのひとつである NF-κB 活性化が誘起されることも報告されている。最近、宿主細胞に注入された cagA タンパクにより NF-κB 活性化を介して DNA や RNA 修飾に関わる activation-induced cytidine deaminase (AID) が異常なレベルで高発現し、その結果、癌抑制遺伝子 TP53 の変異を起こすことが報告され (Matsumoto et al. 2007 Nat. Med. 13, 470-476)、胃癌発生リスク増加への cagA 陽性 *H. pylori* の関与が強く示唆されている。*H. pylori* の病原因子には、ウレアーゼや cagPAI 以外に、リポ多糖 (LPS)、heat-shock protein-60 (HSP-60)、接着因子アドヘジン、空胞化毒素 VacA、カタラーゼなどが知られているが、エラスターゼを含む様々なプロテアーゼも粘膜傷害に直接関与すると考えられている。さらに、培養系のヒト胃癌細胞では、*H. pylori* との共培養により宿主細胞から matrix metalloproteinase-1 (MMP-1)、MMP-7、MMP-9 などのプロテアーゼ産生が促進されることも報告されており、これら *H. pylori* 由来および宿主細胞由来のプロテアーゼが PAR 活性化を引き起

こす可能性は非常に高く、*H. pylori* 感染と胃粘膜の炎症および癌の発生・転移の過程に PAR の関与が強く示唆される。

2. 研究の目的

本研究は、胃において機能的発現が認められている PAR1 および PAR2 が、*H. pylori* 感染による慢性胃炎、その結果発症すると考えられている胃癌に対する治療ターゲットとなり得るのか否かを、分子、細胞および組織レベルにおける実験系を駆使して明らかにすることを目的として行なった。

3. 研究の方法

(1) ヒト胃癌組織における *H. pylori* 感染と PAR1 および PAR2 発現量の検討

同意書を得られた胃癌患者 10 名より提供された胃粘膜組織の癌部位および正常部位において *H. pylori* 感染レベル (ウレアーゼのタンパク量を指標として評価) と PAR1、PAR2 発現量と間の相関の有無を調べるため、これら受容体の発現量をウェスタンブロット法およびリアルタイム PCR 法を用いてタンパクおよび mRNA レベルで検討した。

さらに、各種胃粘膜上皮細胞株 (MKN45、KATO-III、AGS、RGM1) を用いて、cagA 陽性株の *H. pylori* の抽出液および生菌との共培養による PAR1、PAR2 発現量の変化についても検討を行い、ヒト胃癌組織で見られた傾向が細胞レベルでも再現できるかについて検討を行った。

(2) *H. pylori* 抽出液による各種反応における PAR 関与の検討

H. pylori 抽出液中に PAR1、PAR2 および PAR4 を活性化するプロテアーゼが含まれている可能性について検討するため、これまでに我々や他のグループから報告されている以下の反応系を用いて評価を行った。PAR1 活性化作用は、正常ラット胃粘膜上皮由来 RGM1 細胞を用いた PAR1 刺激による PGE₂ 産生亢進反応を指標として評価した (Sekiguchi et al., 2007, Biochem. Pharmacol. 73, 103-114)。PAR2 活性化作用は、ヒト肺胞上皮由来 A549 細胞を用いた PAR2 刺激による PGE₂ 産生亢進反応 (Kawao et al., 2005, J. Pharmacol. Exp. Ther. 315, 576-589)、あるいはヒト結腸癌由来 HCT-15 細胞を用いた PAR2 刺激による IL-8 産生亢進反応 (Tanaka et al., 2008, Biochem. Biophys. Res. Commun. 377, 622-626) を指標として評価した。PAR4 活性化作用は、ラット血小板の凝集反応を指標に検討した (Kahn et al., 1998, Nature 394, 690-694)。*H. pylori* 刺激で反応が見られた場合は、その反応メカニズムを検討するため種々の阻害薬の効果を検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト胃癌組織における *H. pylori* 感染と PAR1 および PAR2 発現量の検討

同意書を得られた胃癌患者 10 名より提供された胃粘膜組織の正常部位および癌部位について *H. pylori* のマーカーであるウレアーゼ A およびウレアーゼ B のタンパクレベルと、PAR1 および PAR2 のタンパクおよび mRNA 発現レベルの相関について検討したところ、癌部位において PAR1 タンパク発現量とウレアーゼ A および B の間に正の相関が見られた (図 1A-C)。一方、PAR2 の発現レベルとウレアーゼタンパクレベルの間には相関は認められなかった (図 1A, D, E)。

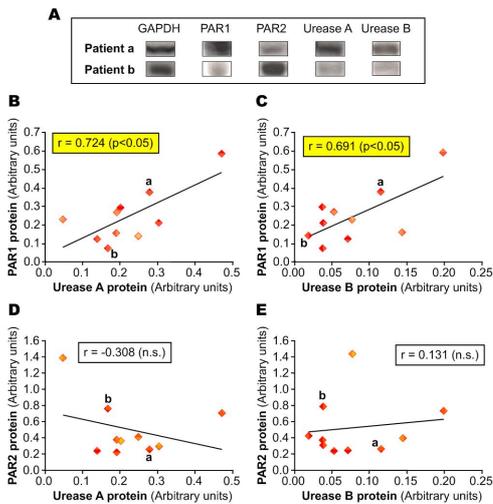


図1. 胃癌患者より抽出した癌化部位におけるPAR1、PAR2、urease Aおよびurease Bのタンパクレベルの相関
A: Western blot法の代表的な写真。Patient aおよびPatient bの各タンパクレベルの任意値はB-Eのグラフ中に示している。B-E: 各タンパクレベル間の相関関係。

正常部位では PAR1、PAR2 のタンパク発現量ともにウレアーゼとの相関は見られなかった (図 2)。PAR1 および PAR2 の mRNA レベルについても同様にウレアーゼタンパクレベルとの相関を検討したが、癌部位、正常部位いずれにおいても明らかな相関は認められなかった。

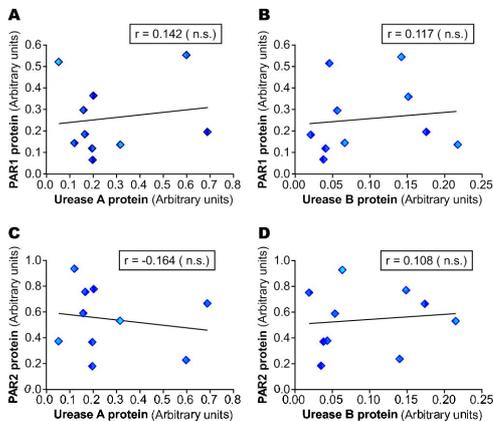


図2. 胃癌患者より抽出した正常部位におけるPAR1、PAR2、urease Aおよびurease Bのタンパクレベルの相関

これらの結果は、胃粘膜において癌の発生あるいは進行に *H. pylori* 感染による癌の発生および進行に PAR1 発現増大が関与している可能性が示唆された。

各種胃粘膜上皮細胞株 (MKN45、AGS、KATO-III、RGM1) を用いて、これら細胞の PAR1 および PAR2 発現量に対する *H. pylori* 生菌との共培養、あるいは *H. pylori* 抽出液刺激の影響をウェスタンブロット法によりタンパクレベルで検討を行ったが、いずれの細胞においても明らかな発現量の変化は認められなかった。

(2) *H. pylori* 抽出液による各種反応における PAR 関与の検討

正常ラット胃粘膜上皮由来 RGM1 細胞を PAR1 活性化ペプチド TFLLR-NH₂ で刺激すると 24 時間後に明らかな PGE₂ 産生亢進が見られたが、*H. pylori* 抽出液刺激ではまったく PGE₂ 産生は見られなかった (図 3)。この結果から、*H. pylori* 抽出液に PAR1 を活性化するプロテアーゼは含まれていないことがわかった。

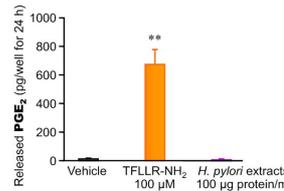


図3. 正常ラット胃粘膜上皮由来RGM1細胞におけるPGE₂産生に対するPAR1活性化ペプチドTFLLR-NH₂および*H. pylori*抽出液刺激の効果
データは平均±SEMで表示 (n = 4)。** P < 0.01 vs. vehicle。

次に、PAR2 高発現のヒト肺胞上皮由来 A549 細胞を用いて検討したところ PAR2 活性化ペプチドの SLIGRL-NH₂ 刺激と同様に *H. pylori* 抽出液刺激は PGE₂ 産生を亢進させた (図 4A)。しかし、幅広いプロテアーゼに対して阻害作用を示す nafamostat mesilate は、*H. pylori* 抽出液による PGE₂ 産生亢進を抑制せず、さらに、煮沸処理をした *H. pylori* 抽出液で刺激しても PGE₂ 産生は低下しなかった (図 4B, C)。この結果から、A549 細胞における *H. pylori* 抽出液の反応に酵素活性の関与はないと考えられ、*H. pylori* 抽出液には PAR2 を活性化するプロテアーゼは含まれていないことが示唆された。

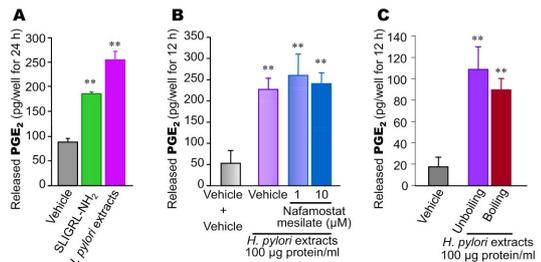


図4. ヒト肺胞上皮由来A549細胞におけるPGE₂産生に対するPAR2活性化ペプチドSLIGRL-NH₂および*H. pylori*抽出液刺激の効果と*H. pylori*抽出液刺激の効果に対するプロテアーゼ阻害薬nafamostat mesilateおよび煮沸処理の影響
Nafamostat mesilateは*H. pylori*抽出液で刺激する30分前に作用させた。データは平均±SEMで表示 (n = 4)。** P < 0.01 vs. vehicle + vehicle。

A549細胞における *H. pylori*抽出液刺激による PGE₂産生亢進は、リポ多糖 (LPS) 阻害薬 polymyxin B、IRAK-1/4 阻害薬 IRAK-1/4-I および NF-κB 阻害薬 pyrrolidinedithiocarbamate (PDTC) によりほぼ完全に抑制されたことから (図 5)、A549細胞における *H. pylori*抽出液の産生亢進には、*H. pylori*の LPSにより活性化される toll-like receptor 4 / IRAK-1/4 / NF-κB 経路の関与が示唆された。

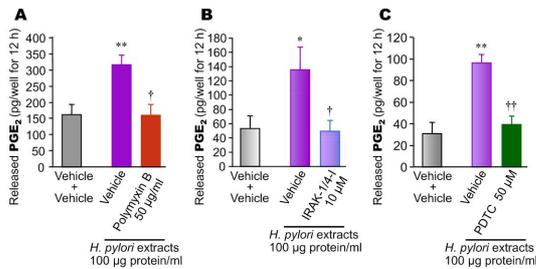


図5. ヒト肺腫上皮由来A549細胞における *H. pylori* 抽出液刺激誘起PGE₂産生亢進に対するリポ多糖阻害薬 polymyxin B、IRAK-1/4阻害薬 IRAK-1/4-IおよびNF-κB阻害薬 pyrrolidinedithiocarbamate (PDTC)の影響
Polymyxin Bは *H. pylori* 抽出液と混合した後、A549細胞に作用させた。IRAK-1/4-IおよびPDTCは *H. pylori* 抽出液で刺激する30分前に作用させた。データは平均±SEMで表示 (n = 4)。*P < 0.05, **P < 0.01 vs. vehicle + vehicle; †P < 0.05, ††P < 0.01 vs. vehicle + *H. pylori* extracts 100 μg protein/ml.

次に、A549と同様に PAR2を高発現しているヒト結腸癌由来 HCT-15細胞を用いて検討したところ、この細胞では PAR2活性化ペプチド SLIGRL-NH₂および *H. pylori*抽出液刺激により有意な IL-8産生亢進が見られたが (図 6A)、A549細胞とは異なり、この IL-8産生亢進は *H. pylori*抽出液の煮沸処理およびプロテアーゼ阻害薬 nafamostat mesilateにより約 25%程度抑制された (図 6B)。この結果から、HCT-15細胞の *H. pylori*抽出液刺激による IL-8産生亢進反応は一部プロテアーゼ依存性である可能性が示唆された。

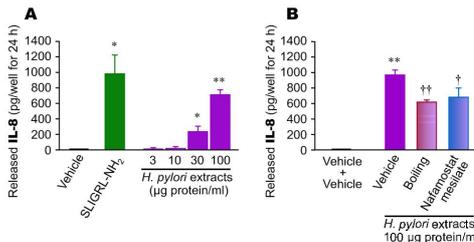


図6. ヒト結腸癌由来HCT-15細胞におけるIL-8産生に対するPAR2活性化ペプチド SLIGRL-NH₂と *H. pylori*抽出液刺激の効果および *H. pylori*抽出液刺激誘起IL-8産生増加に対する煮沸処理およびプロテアーゼ阻害薬 nafamostat mesilateの影響
Nafamostat mesilateは *H. pylori* 抽出液で刺激する30分前に作用させた。データは平均±SEMで表示 (n = 4~7)。*P < 0.05, **P < 0.01 vs. vehicle + vehicle; †P < 0.05, ††P < 0.01 vs. vehicle + *H. pylori* extracts.

図 5 で示した A549細胞の結果から、*H. pylori*抽出液に PAR2活性化プロテアーゼは含まれないことが示されていることから、このプロテアーゼ依存性反応には PAR2以外の PARの関与が示唆される。我々の以前の報告において、PAR1刺激は HCT-15細胞において IL-8産生を誘起しないことを示している (Tanaka et al., 2008, Biochem. Biophys.

Res. Commun. 377, 622-626)。そこで、PAR4の関与を検討するため、はじめに PAR4活性化ペプチド AYPGKF-NH₂の効果を観察したところ、PAR2刺激の場合と同様に PAR4刺激でも有意な IL-8産生亢進が見られたことから (図 7)、図 6で示した *H. pylori*抽出液によるプロテアーゼ依存性の IL-8産生に PAR4活性化が関与している可能性が示唆された。

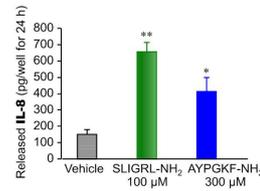


図7. ヒト結腸癌由来HCT-15細胞のIL-8産生に対するPAR2活性化ペプチド SLIGRL-NH₂およびPAR4活性化ペプチド AYPGKF-NH₂刺激の効果
データは平均±SEMで表示 (n = 4)。*P < 0.05, **P < 0.01 vs. vehicle.

そこで次に、PAR4を発現し、その活性化により凝集反応を示すラット血小板を用いて実験を行った。ラット多血小板血漿 (PRP)において、コラーゲンおよび PAR4活性化ペプチド AYPGKF-NH₂の刺激は強い凝集反応を示した (図 8)。また、これら刺激薬による凝集反応に比べると小さいが、*H. pylori*抽出液によっても凝集反応が誘起された (図 8)。しかし、この反応はプロテアーゼ阻害薬 nafamostat mesilateの影響を受けなかったことから、*H. pylori*抽出液はプロテアーゼ非依存性に血小板凝集を誘起していることが示唆された。また、洗浄血小板を用いて同様に凝集反応を観察した結果、PAR4活性化ペプチドは PRPと同程度の凝集反応を誘起したが、*H. pylori*抽出液はまったく凝集反応を誘起しなかった。これらの結果より、*H. pylori*抽出液には PAR4を活性化するプロテアーゼも含まれないことが示唆された。



図8. ラット多血小板血漿 (PRP)におけるPAR4活性化ペプチド AYPGKF-NH₂および *H. pylori*抽出液の凝集反応

以上の結果より、*H. pylori*抽出液には PAR1、PAR2 および PAR4 いずれの受容体を活性化するプロテアーゼも含まれていないことが示唆された。

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 4 件)

- ① 関口富美子, 前田優磨, 松本裕喜, 松波真帆, 西川裕之, 川畑篤史. *Helicobacter pylori* 抽出液により誘起される種々の細胞反応: Proteinase-activated receptor 関与の有無について. 第 116 回 日本薬理学会近畿部会 (滋賀) 2009 年 11 月 13 日 (口頭発表).
- ② Maeda, Y., Sekiguchi, F., Matsumoto, Y., Nishikawa, H. and Kawabata, A. Effect of *Helicobacter pylori* extracts on prostaglandin E₂ production in human lung alveolar epithelial A549 cells. XXXVI International Congress of Physiological Sciences (Kyoto), 2009 年 8 月 1 日 (ポスター発表).
- ③ Fukami, K., Sekiguchi, F., Takaoka, K., Miyake, K., Yamamoto, T., Tanaka, S., Ohno, K., Ishikura, H., Naruse, M. and Kawabata, A. Relationship between expression of PARs and infection with *H. pylori* in the stomach of gastric cancer patients. Experimental Biology 2009 (New Orleans), 2009 年 4 月 21 日 (ポスター発表).
- ④ 関口富美子, 深海和樹, 高岡香保理, 三宅建作, 山本隆嗣, 田中肖吾, 大野耕一, 石倉宏恭, 成瀬光栄, 川畑篤史. 胃癌患者より摘出した胃組織のヘリコバクター・ピロリ由来ウレアーゼ蛋白量と PAR1 あるいは PAR2 発現量の相関性について. 第 82 回 日本薬理学会年会 (横浜) 2009 年 3 月 16 日 (ポスター発表).

[その他]

ホームページ等

<http://www.phar.kindai.ac.jp/byoutai/index.files/byoutai.htm>

6. 研究組織

(1)研究代表者

関口 富美子 (FUMIKO SEKIGUCHI)
近畿大学・薬学部・准教授
研究者番号：90271410

(2)研究分担者

川畑 篤史 (KAWABATA ATSUFUMI)
近畿大学・薬学部・教授
研究者番号：20177728