



## Alterations in metabolic pathways in gastric epithelial cells infected with *Helicobacter pylori*

Matsunaga, Shinsuke

---

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2019-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7587号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007587>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

## 学位論文の内容要旨

### Alterations in metabolic pathways in gastric epithelial cells infected with *Helicobacter pylori*

ヘルコバクター・ピロリ菌感染による胃上皮細胞での代謝物変動

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

消化器内科学

(指導教員：児玉 裕三教授)

松永 心祐

#### 背景

*Helicobacter pylori* (*H.pylori*) は B.Marshall と R.Warren により 1984 年に報告されたグラム陰性らせん状微好気性細菌であり、世界人口の約半数が感染する世界最大の感染症である。*H.pylori* は消化性潰瘍、胃がん、慢性胃炎、MALT リンパ腫などの病原因子となり、International Agency for Research on Cancer の group 1 carcinogen にも分類されている。*H.pylori* の胃上皮細胞への侵入は様々なシグナル伝達を介して行われ、その病原因子は多様な生物学的反応を引き起す。また、近年、*H.pylori* 感染は、糖尿病や心血管疾患、神経疾患、自己免疫疾患など様々な疾患との関連も示唆されている。このことから *H.pylori* の病原因子に関する研究が広く行われている。

近年、*H.pylori* 研究にゲノミクスやプロテオミクスが採用されはじめている。しかし、特に、*H.pylori* の病原性の多彩さに関しての理解は不十分であり、また、生体内代謝の観点からの研究もほとんどなされていないため、本研究では、メタボロミクスを用いて *H.pylori* に起因する生体内代謝変動について検討した。

メタボロミクスは、生体内の低分子代謝物を包括的に解析する手法である。代謝物の総体であるメタボロームは、DNA、RNA、そして、タンパク質への流れ、すなわち、セントラルドグマの下流に位置するため、メタボロミクスにより、細胞中におけるその瞬間の状態を直接的に評価できる可能性があると考えられている。そこで本研究では、培養細胞を用いた *in vitro* における *H.pylori* 感染実験を実施し、*H.pylori* 感染した胃上皮細胞において、代謝物がどのように変動するのかを検討し、*H.pylori* 感染に対して新たな知見を得ることを目的とした。

#### 手法

病原因子である CagA の western-type と、VacA の s1-a1-type を有する *H.pylori* ATCC43504 株を使用し、胃上皮細胞として、ヒト胃がん細胞株 AGS 細胞を用いた。AGS 細胞に *H.pylori* ATCC43504 株を感染させ、感染 2、6、12 時間後に AGS 細胞から代謝物を抽出し、ガスクロマトグラフィー質量分析 (Gas Chromatography Mass spectrometry: GC/MS) により代謝物解析を実施した。さらに、生体内代謝に関連する酵素に対する mRNA 分析、活性測定、siRNA ノックダウン実験を実施した。

#### 結果

はじめに、AGS 細胞において、*H.pylori* 感染が成立するか否かについて検討した。*H.pylori* 感染 6 時間後には、特徴的な elongation phenotype を示す AGS 細胞が 40.0% 存在し、感染 12 時間後では、その割合が 68.8% に増加した。また、*H.pylori* 感染した AGS 細胞において、CagA タンパク質が検出され、そのリン酸化も確認できた。これらの結果は、我々のこれまでの研究結果と合致しており、CagA タンパク質が *H.pylori* の IV 型分泌機構を介して、AGS 細胞内に挿入されたことを示している。

次に *H.pylori* 感染した AGS 細胞中の代謝物を GC/MS により分析した。その結果、67 種類の代謝物が同定された。感染 2 時間後では、*H.pylori* 感染 AGS 細胞において、非感染細胞と比較して asparagine のみが有意に低下した。感染 6 時間後では、非感染細胞と比較して 2-aminopimeric acid, citric acid+isocitric acid, valine, malic acid が有意に高値を示し、asparagine と 1,6-anhydroglucose が低値を示した。感染 12 時間後では、非感染細胞と比較して citric acid + isocitric acid, serine, glycine, threonine, taurine, valine, 2-aminoethanol が有意に増加した。

統いて、代謝物分析結果を代謝経路にあてはめて評価した結果、*H.pylori* 感染 AGS 細胞では、解糖系を構成する代謝物の多くは検出できなかったものの、解糖系、TCA 回路、そして、これらの代謝経路に付随するアミノ酸代謝において特徴的な変動を認めた。

感染 2 時間後では、*H.pylori* 感染 AGS 細胞において、非感染 AGS 細胞と比較して TCA 回路やアミノ酸代謝を構成する多くの代謝物が低下し、感染 6 時間後、あるいは、12 時間後では、これらの代謝物の多くが、非感染 AGS 細胞と比較して増加した。また、興味深いことに、他のアミノ酸とは異なり、asparagine のみが、感染後 2、6、12 時間すべてにおいて持続的に低値を示したことから、asparagine に関してさらなる検討を行った。

asparagine は、アスパラギン合成酵素 (ASNS) により、aspartic acid から產生される。そこで、AGS 細胞において、siRNA により ASNS をノックダウンした。なお、ASNS のノックダウンについては、ASNS タンパク質発現抑制と mRNA 発現抑制を確認している。次に、ASNS 発現抑制が、*H.pylori* 感染により誘導される IL-8 発現に与える影響について検討した。その結果、*H.pylori* 感染 AGS 細胞において、ASNS 発現は非感染 AGS 細胞より増加傾向であった。また、*H.pylori* 感染による IL-8 発現誘導は、ASNS 発現抑制により抑制されることが確認できた。

また、*H.pylori* 感染 AGS 細胞では、感染 6 時間後と 12 時間後において、多くのアミノ酸が高値を示したという結果から、*H.pylori* 感染によりタンパク質分解が促進される可能性を考え、次の実験を実施した。AGS 細胞に、プロテアソーム、ならびに、カルバインの阻害剤である MG132 を処理し、統いて、*H.pylori* を感染させ、TNF- $\alpha$  と IL-8 の mRNA 発現について検討した。その結果、MG132 により、*H.pylori* 感染により誘導される TNF- $\alpha$  と IL-8 の mRNA 発現増加が抑制されることを確認した。次に、MG132 処理した AGS 細胞中の代謝物を分析した。その結果、非感染 AGS 細胞への MG132 処理による多くの代謝物の増加が確認できたものの、*H.pylori* 感染 AGS 細胞へ MG132 を処理した場合でも同様な結果が得られ、*H.pylori* 感染により誘導される生体内代謝物変動に対して、MG132 の特徴的な影響は観察できなかった。

*H.pylori* 感染 6 時間後と 12 時間後の AGS 細胞では、citric acid+isocitric acid の上昇が確認された。細胞内の citric acid+isocitric acid レベルは、イソクエン酸デヒドログナーゼ (IDH) により制御されることから、*H.pylori* 感染が IDH に与える影響について検討した。IDH には、IDH1、IDH2、IDH3 の 3 種類のアイソフォームが存在するため、はじめに、

IDH1、IDH2、IDH3a の mRNA 発現について検討した。その結果、感染 6 時間後において、*H.pylori* 感染による IDH 発現の減少傾向が確認できたものの有意な変動ではなかった。また、感染 12 時間後の IDH 発現は、増加傾向であった。次に、*H.pylori* 感染が IDH 酵素活性に与える影響を検討した。この実験では、NAD+ 依存型 IDH と NADP+ 依存型 IDH とに分けて IDH 活性を評価した。NAD+ 依存型 IDH では感染後 6 時間と 12 時間において、NADP+ 依存型 IDH では感染後 12 時間において、その酵素活性が有意に低下した。

## 考察

*H.pylori* 感染 AGS 細胞では、感染 2 時間後に多くのアミノ酸レベルが低下し、感染 6 時間後、あるいは、12 時間後にはその多くが上昇した。この結果は、*H.pylori* 感染により宿主細胞内で様々な反応が引き起こされることでアミノ酸が消費されること、アミノ酸低下をきっかけとしてアミノ酸供給の必要性が高まりアミノ酸レベルが増加すること、その増加にはタンパク質分解が *H.pylori* 感染により促進されることを示唆していると考えた。そこで、MG132 によりタンパク質分解を抑制することで AGS 細胞のアミノ酸レベルが低下すると予想して実験を実施したが、予想とは異なり、MG132 処理により非感染 AGS 細胞で対象代謝物が上昇し、*H.pylori* 感染 AGS 細胞でも同様の結果であった。すなわち、*H.pylori* 感染によるアミノ酸レベルの上昇は MG132 により抑制できなかったが、その一方で、MG132 は、*H.pylori* 感染による TNF- $\alpha$  と IL-8 の mRNA 発現を抑制したことから、*H.pylori* 感染におけるアミノ酸レベルの上昇は、*H.pylori* 感染による炎症反応惹起とは関連していない可能性がある。

*H.pylori* 感染 AGS 細胞において、アミノ酸の多くが *H.pylori* 感染により一過的に低下するものの、その後、増加するにも関わらず、asparagine に関しては、持続して低下した。この結果から、*H.pylori* 感染が asparagine 產生に寄与する ASNS を低下させ、asparagine レベルも減少する可能性を考えたが、*H.pylori* 感染 AGS 細胞では、ASNS レベルは上昇傾向であった。その一方、ASNS ノックダウンにより asparagine 產生が抑制された環境下で、*H.pylori* 感染による IL-8 上昇が抑制された。これらの結果は、asparagine は、*H.pylori* 感染による炎症反応、あるいは、それに関連する反応において、AGS 細胞で利用され、その結果として、濃度低下した可能性を示しており、asparagine 利用の増加は、感染 2 時間後では asparagine 低下が少なく、6 時間後、あるいは、12 時間後では大きく、かつ、経時に減少したことからも説明できるかと思われる。Yu らの実験では、ASNS のノックダウンにより、ヒト胃がん細胞株である AGS 細胞や MKN45 細胞で、腫瘍増大を抑制し、胃がん患者における ASNS の低発現は生存率改善に寄与していると報告されている。また、asparagine を aspartic acid に変換するアスパラギナーゼも存在し、この活性上昇が *H.pylori* 感染により誘導された可能性がある。asparagine は細胞増殖を活性化させることから、アスパラギナーゼは抗がん剤として使用されてきたこともあり、これらの研究と今回の実験結果から、*H.pylori* 感染による asparagine レベルの低下は、*H.pylori* 感染により

宿主細胞に引き起こされる生体反応、すなわち、細胞増殖、腫瘍増大、炎症反応などに関係している可能性がある。

*H.pylori* 感染後 6 時間、あるいは、12 時間の AGS 細胞において、citric acid と isocitric acid の上昇が著明であった。MG132 処理した AGS 細胞でも同様の変動が確認されたが、*H.pylori* 感染 AGS 細胞では、TCA 回路の下流に位置する fumalic acid や malic acid の上昇はなかった一方、MG132 処理 AGS 細胞では fumalic acid や malic acid は上昇した。この違いは、*H.pylori* 感染による IDH 制御によるものと考えられる。citric acid は TCA 回路の中間物質ではあるものの、ミトコンドリアに移送され脂肪酸合成にも使われ、citric acid が TCA 回路で活用されるのか、脂肪酸合成に活用されるのかは IDH により制御される。今回の実験では、*H.pylori* 感染により IDH 酵素活性は低下したことから、脂肪酸合成が増加した可能性があり、*H.pylori* 感染により誘導される胃上皮細胞での生体反応は、citric acid を介した脂肪酸制御も関与しているのかもしれない。

今回の研究では western-type CagA と sia-m1-type VacA を保有した *H.pylori* ATCC43504 株と、胃上皮細胞としてヒト胃がん細胞株 AGS 細胞を使用した。*H.pylori* には多種多様な株があり、また、多彩な病原因子も存在し、そして、胃がん細胞では正常胃上皮細胞と代謝が異なる可能性があるため、今後、より詳細な検証が必要ではあるものの、*H.pylori* 感染による胃上皮細胞での代謝変動が確認できた今回の研究成果は、*H.pylori* 関連胃疾患の理解に非常に重要である。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2908号	氏名	松永 心祐
論文題目 Title of Dissertation	Alterations in metabolic pathways in gastric epithelial cells infected with <i>Helicobacter pylori</i> ヘルコバクター・ピロリ菌感染による胃上皮細胞での代謝物変動		
審査委員 Examiner	主査 Chief Examiner 林 祥岡 副査 Vice-examiner 掛川 友弘 副査 Vice-examiner （手記）		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

## 要旨

*Helicobacter pylori* (*H.pylori*) は消化性潰瘍、胃がん、慢性胃炎、MALTリンパ腫などの病原因子となり、International Agency for Research on Cancer の group 1 carcinogen にも分類されている。近年、*H.pylori* 感染は、糖尿病や心血管疾患、神経疾患、自己免疫疾患など様々な疾患との関連も示唆されている。このことから *H.pylori* の病原因子に関する研究が広く行われている。本研究では、メタボロミクスを用いて *H.pylori* に起因する生体内代謝変動について検討した。

メタボロミクスは、生体内的低分子代謝物を包括的に解析する手法であり、代謝物の総体であるメタボロームは、セントラルドグマの下流に位置するため、メタボロミクスにより、細胞中におけるその瞬間の状態を直接的に評価できる可能性があると考えられている。本研究では、病原因子である CagA の western-type と、VacA の s1a-m1-type を有する *H.pylori* ATCC43504 株を使用し、胃上皮細胞として、ヒト胃がん細胞株 AGS 細胞を用いた。AGS 細胞に *H.pylori* ATCC43504 株を感染させ、感染 2、6、12 時間後に AGS 細胞から代謝物を抽出し、ガスクロマトグラフィー質量分析 (Gas Chromatography Mass spectrometry: GC/MS) により代謝物解析を実施した。さらに、生体内代謝に関する酵素に対する mRNA 分析、活性測定、siRNA ノックダウン実験を実施した。*H.pylori* 感染 6 時間後には、特徴的な elongation phenotype を示す AGS 細胞が 40.0% 存在し、感染 12 時間後では、その割合が 68.8% に増加した。また、*H.pylori* 感染した AGS 細胞において、CagA タンパク質が検出され、そのリン酸化も確認され、*H.pylori* 感染した AGS 細胞中に 67 種類の代謝物が同定された。感染 2 時間後では、*H.pylori* 感染 AGS 細胞において、非感染細胞と比較して asparagine のみが有意に低下した。感染 6 時間後では、非感染細胞と比較して 2-aminopimelic acid、citric acid+isocitric acid、valine、malic acid が有意に高値を示し、asparagine と 1,6-anhydroglucose が低値を示した。感染 12 時間後では、非感染細胞と比較して citric acid + isocitric acid、serine、glycine、threonine、taurine、valine、2-aminoethanol が有意に増加した。*H.pylori* 感染 AGS 細胞では、解糖系を構成する代謝物の多くは検出できなかったものの、解糖系、TCA 回路、そして、これらの代謝経路に付随するアミノ酸代謝において特徴的な変動を認めた。感染 2 時間後では、*H.pylori* 感染 AGS 細胞において、非感染 AGS 細胞と比較して TCA 回路やアミノ酸代謝を構成する多くの代謝物が低下し、感染 6 時間後、あるいは、12 時間後では、これらの代謝物の多くが、非感染 AGS 細胞と比較して増加した。また、他のアミノ酸とは異なり、asparagine のみが、感染後 2、6、12 時間すべてにおいて持続的に低値を示した。asparagine は、アスパラギン合成酵素 (ASNS) により、aspartic acid から産生される。そこで、AGS 細胞において、siRNA により ASNS をノックダウンした。次に、ASNS 発現抑制が、*H.pylori* 感染により誘導される IL-8 発現に与える影響について検討した。その結果、*H.pylori* 感染 AGS 細胞において、ASNS 発現は非感染 AGS 細胞より増加傾向であった。また、*H.pylori* 感染による IL-8 発現誘導は、ASNS 発現抑制により抑制されることが確認できた。*H.pylori* 感染 6 時間後と 12 時間後の AGS 細胞では、citric acid+isocitric acid の上昇が確認された。細胞内の citric acid+isocitric acid レベルは、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ (IDH) により制御されることから、*H.pylori* 感染が IDH に与える影響について検討した。

感染 6 時間後において、*H.pylori* 感染による IDH 発現の減少傾向が確認できたものの有意な変動ではなかった。また、感染 12 時間後の IDH 発現は、増加傾向であった。次に、*H.pylori* 感染が IDH 酵素活性に与える影響を検討した。NAD+依存型 IDH では感染後 6 時間と 12 時間ににおいて、NADP+依存型 IDH では感染後 12 時間ににおいて、その酵素活性が有意に低下した。

*H.pylori* 感染 AGS 細胞では、感染 2 時間後に多くのアミノ酸レベルが低下し、感染 6 時間後、あるいは、12 時間後にはその多くが上昇した。この結果は、*H.pylori* 感染により宿主細胞内で様々な反応が引き起こされることでアミノ酸が消費されること、アミノ酸低下をきっかけとしてアミノ酸供給の必要性が高まりアミノ酸レベルが増加すること、その増加にはタンパク質分解が *H.pylori* 感染により促進されることを示唆していると考えた。*H.pylori* 感染によるアミノ酸レベルの上昇は MG132 により抑制できなかったが、その一方で、MG132 は、*H.pylori* 感染による TNF- $\alpha$  と IL-8 の mRNA 発現を抑制したことから、*H.pylori* 感染におけるアミノ酸レベルの上昇は、*H.pylori* 感染による炎症反応惹起とは関連していない可能性がある。

*H.pylori* 感染 AGS 細胞において、アミノ酸の多くが *H.pylori* 感染により一過的に低下するものの、その後、増加するにも関わらず、asparagine に関しては、持続して低下した。この結果から、*H.pylori* 感染が asparagine 産生に寄与する ASNS を低下させ、asparagine レベルも減少する可能性を考えたが、*H.pylori* 感染 AGS 細胞では、ASNS レベルは上昇傾向であった。その一方、ASNS ノックダウンにより asparagine 産生が抑制された環境下で、*H.pylori* 感染による IL-8 上昇が抑制された。これらの結果は、asparagine は、*H.pylori* 感染による炎症反応、あるいは、それに関連する反応において、AGS 細胞で利用され、その結果として、濃度低下した可能性を示しており、asparagine 利用の増加は、感染 2 時間後では asparagine 低下が少なく、6 時間後、あるいは、12 時間後では大きく、かつ、経時に減少したことからも説明できるかと思われる。Asparagine を aspartic acid に変換するアスパラギナーゼも存在し、この活性上昇が *H.pylori* 感染により誘導された可能性がある。asparagine は細胞増殖を活性化させることから、アスパラギナーゼは抗がん剤として使用されてきたこともあり、今回の実験結果から、*H.pylori* 感染による asparagine レベルの低下は、*H.pylori* 感染により宿主細胞に引き起こされる生体反応、すなわち、細胞増殖、腫瘍増大、炎症反応などに関係している可能性がある。

*H.pylori* 感染後 6 時間、あるいは、12 時間の AGS 細胞において、citric acid と isocitric acid の上昇が著明であった。今回の実験では、*H.pylori* 感染により IDH 酵素活性は低下したことから、脂肪酸合成が増加した可能性があり、*H.pylori* 感染により誘導される胃上皮細胞での生体反応は、citric acid を介した脂肪酸制御も関与しているのかもしれない。

本研究はメタボロミクスを用いて *H.pylori* に起因する生体内代謝変動を解析した研究であるが、従来ほとんど行われなかった *H.pylori* 株をヒト胃がん細胞株に感染させることにより、*H.pylori* 感染により誘導される生体内的低分子代謝物を包括的に解析した。解糖系、TCA 回路、そして、これらの代謝経路に付随するアミノ酸代謝において特徴的な変動を示す重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。