Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

# Effects of Helicobacter pylori on the glutathione-related pathway in gastric epithelial cells

Matsuoka, Koki

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2021-03-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲第8022号
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1008022

※ 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

Effects of *Helicobacter pylori* on the glutathione-related pathway in gastric epithelial cells

## 胃上皮細胞におけるヘリコバクター・ピロリが グルタチオン関連経路に及ぼす影響

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）

松岡　晃生

## 1. はじめに

*Helicobacter pylori*（*H. pylori*）の胃粘膜への持続感染は、萎縮性胃炎や胃・十二指腸潰瘍を引き起こし、胃癌や胃粘膜関連リンパ組織リンパ腫（胃 MALT リンパ腫）の発症リスクを高めることが疫学的に指摘されている。*H. pylori* 除菌後であっても胃癌発症リスクは存在し、*H. pylori* 感染した宿主ではどのような変化が起きているかを調べることは重要である。

*H. pylori* の病原性に関する研究はこれまで、CagA や VacA といった *H. pylori* が保有する病原因子に基づく研究が多くを占めていたが、*H. pylori* の病原因子は多様であり、*H. pylori* 感染が実際に宿主に与える影響も多様であると考えられる。そこで我々は、*H. pylori* 感染が宿主に与える影響を、これまでとは異なる新しい視点から評価することを目的として、メタボロミクス解析を実施した。メタボロミクス解析は生体内の代謝物を網羅的に調べることができ、遺伝子発現とともに、その他の環境要因の影響も含めて評価することが可能であり、代謝物変動は最も表現型に近いとされている。本研究では、*H. pylori* 感染が胃上皮細胞にもたらす代謝変動を評価し、由来疾患の異なる *H. pylori* が宿主に与える影響の違いについても検討した。

## 2. 方法

ヒト胃上皮培養細胞株 AGS 細胞を培養し、*H. pylori* 標準株 26695 を感染させた。*H. pylori* を感染させた AGS 細胞中の代謝物を Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC/MS)により分析し、代謝物分析結果に基づいて代謝マップを作成した。

還元型グルタチオン（GSH）が低下している状況下において、*H. pylori* 感染が宿主に与える影響を評価するため、グルタチオン合成酵素（GSS）を siRNA でノックダウンし、*H. pylori* 感染が宿主に与える影響を評価した。

*H. pylori* 臨床由来株を使用した実験では、萎縮性胃炎（AG：F13 株、F36 株）、十二指腸潰瘍（DU:F21 株、F52 株）、胃癌（GC：F32 株、MKM1 株）由来の菌株を使用した。これらの臨床由来菌株を AGS 細胞に感染させ、LC/MS を用いて AGS 細胞内の GSH と還元型グルタチオン（GSSG）を分析し、酸化ストレスの指標である酸化型グルタチオンと還元型グルタチオンの比（GSSG/GSH）について評価した。また、臨床由来菌株の由来疾患間の違いを検討するため、グルタチオン合成・分解に関連する酵素群の mRNA 発現を real-time PCR で評価した。また、GSS のタンパク質発現量を western blotting により評価した。

統計解析は JMP version10 を使用し、p 値が 0.05 未満である場合を統計学的に有意

な差があると判断した。

3. 結果

AGS 細胞に *H. pylori* 標準株 26695 を 6 時間、もしくは、24 時間感染させ、LC/MS により代謝物分析を実施するとともに、そのデータに基づき、代謝経路に与える影響を検討した。グルタチオン回路に関しては、感染後 6 時間と 24 時間ともに、低下傾向を認めた。アミノ酸代謝に関しては、6 時間感染では低下傾向を、24 時間感染では増加傾向を認めた。その他の代謝経路に関しては特徴的な代謝物変化を認めなかった。

*H. pylori* 感染によるグルタチオン回路低下が確認されたことから、続いて、グルタチオン回路を通じて合成される GSH が低下している状況下において、*H. pylori* 感染が宿主に与える影響を評価した。まず、siRNA を用いて GSS をノックダウンさせ、続けて、IL-8 mRNA 発現を検討した。その結果、GSS をノックダウンさせることで、コントロール群と比較して感染群における IL-8 発現が亢進した。

次に、6 つの臨床由来菌株を AGS 細胞に感染させ、GSH と GSSG レベルを分析することで、由来疾患の違いがグルタチオンに与える影響について検討した。その結果、どの臨床由来株感染においても GSH の低下を認めたが、AG 由来株や DU 由来株と比較して、

GC 由来株では GSH 減少の程度が大きかった。さらに、酸化ストレスの指標とされている GSSG と GSH の比（GSSG/GSH）が、特に GC 由来株において高いことが確認できた。

*H. pylori* 感染による GSH 低下の機序を検討するため、GSH 合成・分解に関連する酵素群の mRNA 発現量を検討した。臨床由来株別、あるいは、疾患別に分けて Cation transport regulator 1 （CHAC1）、Glutamate-cysteine ligase （GCLC）、GSS 、Heme oxygenase-1 (HO-1)、Nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (Nrf2)、Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)の mRNA 発現を評価したが、疾患別での有意差は認めなかった。

AG 群や DU 群と比較して、GC 群で GSH の低下の程度が大きく、酸化ストレスの指標である GSSG/GSH 比が高かった要因を検討するため、GSS タンパク質発現量を評価した。その結果、AG 群や DU 群では GSS タンパク質発現に変動は見られなかったが、GC 群では GSS タンパク質発現が低下した。

## 4. 考察

今回の研究では、AGS 細胞への *H. pylori* 感染における代謝物変動のみならず、代謝経路の評価を行い、さらに、由来疾患の異なる臨床分離株を用いた検証も実施した。その

結果、*H. pylori* 感染により宿主のグルタチオン回路が抑制され、GC 由来株感染宿主では、特に、グルタチオン変動に基づく高酸化ストレス状態であることが明らかとなった。通常であれば、感染した宿主においてホメオスターシスが機能し、酸化ストレスに対する防御機構が働くと考えられるが、GC 由来株感染では酸化ストレスの防御的制御も抑制されている可能性も確認できた。

*H. pylori* の持続感染が成立している背景には、*H. pylori* 感染が宿主の GSH を低下させることで、宿主の防御的作用を弱めていることが考えられる。これまでの報告で、*H. pylori* が胃内で持続感染するため、VacA によるオートファジーの誘導を介し CagA が抑制的に制御されていることが明らかとなった。その研究では、m1VacA は LRP1 との結合を介して宿主細胞内の GSH を低下させ、活性酸素種の蓄積に依存して、CagA 分解性オートファジーを誘導させることも明らかにしている。このことより、*H. pylori* 感染により宿主細胞内の GSH 低下を介して CagA 分解性オートファジーが誘発され、宿主細胞が *H. pylori* を取り除く反応から逃れ、その結果として感染が持続していると推察される。

本研究において、*H. pylori* 感染により、宿主細胞内の活性酸素種が増え、GSH が低下することが明らかになった。これに加え GC 由来株では、他の疾患由来臨床株よりも酸化ストレスが強く、かつ、GSS 発現も低下させることから、GSH 合成も抑制している可能性が明

らかとなった。*H. pylori* 感染でユビキチン化とプロテアソームを介した p53 タンパク質分解が亢進されることが報告されており、*H. pylori* 感染による様々なタンパク質レベルの制御が誘導されている可能性がある。また、アルコール性肝障害モデルのラットに、プロテアソーム阻害薬である PS-341 を投与することで、GCLC や GSS 発現が上昇したという報告もあり、GSS タンパク質制御に対するプロテアソーム系の関与も示唆される。本研究では、GC 株感染において、他の臨床由来株と比較して GSS mRNA 発現量では有意な変動は見られず、タンパク質発現が低下したことから、GC 株感染では他の臨床由来株ではみられないような GSH 合成に関与する蛋白レベルでの制御が行われている可能性が示唆された。

5. 結論

*H. pylori* 感染は宿主に対して酸化ストレスを与え、グルタチオン関連経路を抑制することが示された。特に GC 株では他の疾患由来臨床株と比較して、酸化ストレス指標が高いことが明らかとなった。さらに、GC 株では他の疾患由来臨床株とは異なり、GSH 合成に関連するタンパク質への影響もみられ、その結果、宿主への影響を亢進している可能性が示唆された。