

学位論文要旨

学 位 申 請 者 氏 名: 佐々木啓晴

Helicobacter pylori 感染に与えるガレクチン-2 の影響

・緒言

Helicobacter pylori (ピロリ菌) はグラム陰性のらせん状桿菌であり、胃炎や消化性潰瘍、胃がんを含む様々な疾患の発症に関与する。ピロリ菌と胃疾患との関連性が示されて以来、疾患の治療法は制酸薬の使用から抗生物質の使用に大きく変わることとなった。日本では、2000 年からピロリ菌除菌療法が保険適用となったが、ピロリ菌の抗生物質への耐性化による除菌成功率の低下が問題となっている。

胃は胃酸や粘液、抗菌ペプチドを分泌することで病原体から身を守っている。胃の副細胞から分泌されるムチンの一種である MUC6 は豊富な糖鎖を有する。MUC6 は糖鎖の末端に $\alpha 1, 4$ 結合した N-アセチルグルコサミン残基を持ち、この糖鎖がピロリ菌細胞壁の合成を阻害することが報告されている。また、自然免疫に関与するサーファクタントプロテイン D はピロリ菌を凝集させることが明らかとなっている。生体内では胃粘液に侵入してきたピロリ菌を凝集させて運動性を低下させ、継続的な胃粘液の分泌によりピロリ菌を胃粘膜細胞から遠ざけるといった複数の感染防御機構が共同して働いていると考えられる。

ガレクチンは β -ガラクトシド構造に親和性を持つ動物レクチンの一種であり、細胞接着や白血球の遊走、分化、アポトーシスを含む様々な生命現象に関与する。現在、哺乳類において 15 種類のサブタイプが発見されている。ガレクチンはその構造からプロトタイプ、キメラタイプ、タンデムリピートタイプに分類され、プロトタイプ及びキメラタイプは 1 分子内に 1 か所の糖認識部位 (CRD) を持ち、タンデムリピートタイプ 1 分子内に 2 か所の CRD を持つ。プロトタイプのガレクチンは 2 量体形成が可能であり、キメラタイプやタンデムリピートタイプは 2 量体や多量体を形成できる。このため、ガレクチンは複合糖質に含まれる β -ガラクトシド構造を認識して複数の複合糖質を架橋することができる。

ピロリ菌は一般的なグラム陰性菌と同様にリポ多糖 (LPS) を持つが、LPS はフコシル化された O 抗原を持つという特徴を有する。そして、ピロリ菌の O 抗原はガレクチンによって架橋される可能性がある。ガレクチン-3 (Gal-3) やガレクチン-4 (Gal-4)、ガレクチン-9 を含む数種類のガレクチンは消化管に発現し、病原体を認識すると共に殺菌作用を示す。とりわけ、Gal-3 はピロリ菌の O 抗原を認識することや β -ガラクトシド構造依存的にピロリ菌に凝集や殺菌作用を示すことが報告されている。

ガレクチン-2 (Gal-2) は胃腸の上皮細胞に局在して発現しており、胃がんの発症やリンパ節転移に関与することが報告されている。Gal-2 は胃の保護作用に関与すると考えられると共に Gal-3 と同様にピロリ菌 LPS 内の O-抗原を認識する可能性やピロリ菌感染に対する生体防御に関与する可能性があるにも関わらず、未だ明確な報告はない。

本研究ではピロリ菌感染に対する生体防御に Gal-2 が関与するのかを調査した。第 I 章では Gal-2 のピロリ菌に対する影響について、第 II 章では弱酸性条件における Gal-2 とピロリ菌の相互作用について、第 III 章ではピロリ菌に対する Gal-2 と Gal-3 の作用の比較を行った。

・方法

第 I 章では、ピロリ菌懸濁液を Gal-2 溶液と混合し、1 時間インキュベート後に Gal-2 のピロリ菌凝集作用を評価した。また、菌懸濁液と Gal-2 の混合液を 3 日間培養して増殖抑制作用を調べるとともに、混合液を Carboxyfluorescein diacetate (CFDA) 及び Propidium iodide (PI) 染色することで Gal-2 の

ピロリ菌殺菌作用を調査した。更に、マウス胃粘液と粘膜細胞を同時固定した組織切片の PAS 染色及び Gal-2 の免疫組織染色により、胃粘液中における Gal-2 の存在を検討した。

第 II 章では、弱酸性条件における Gal-2 の構造の変化を CD スペクトル測定した。ピロリ菌から抽出した LPS を Gal-2 固定化カラムに添加し、アフィニティークロマトグラフィーを行うことで Gal-2 のピロリ菌リガンドを探索した。

第 III 章では、弱酸性条件における Gal-3 の構造の変化を CD スペクトル測定した。また、Gal-3 のピロリ菌増殖抑制作用の評価やピロリ菌リガンドの探索を行い、Gal-2 と比較した。

・結果

Gal-2 はピロリ菌凝集作用を示し、その作用は濃度依存的に増強した。また、GFP 標識した Gal-2 の添加により生じたピロリ菌の凝集体表面からは蛍光が検出され、その作用はラクトースの添加によって阻害された。Gal-2 とピロリ菌の混合液を培養した結果、Gal-2 は増殖抑制作用を示した。Gal-2 とピロリ菌の混合液を CFDA-PI 染色液で染色すると凝集体からは PI によって死菌を示す蛍光が検出された。免疫組織染色の結果、Gal-2 は胃粘液細胞のみならず、胃粘液中にも存在することが明らかとなった。

弱酸性条件における Gal-2 の β -シート構造を CD スペクトル測定すると、pH5.0 条件では構造が変化し、ピロリ菌凝集作用も大きく低下したが、pH6.0 までは構造及び凝集作用が維持された。Gal-2 固定化カラムによるピロリ菌 LPS のアフィニティークロマトグラフィーにより、Gal-2 は H type I を含む LPS を認識することを初めて見出した。

弱酸性条件における Gal-3 の CD スペクトル測定の結果、構造は pH5.0 までは維持され、Gal-2 よりも低い pH まで構造が維持された。また、Gal-3 はピロリ菌増殖抑制作用を示し、その作用は Gal-2 よりも強かった。Gal-3 固定化カラムによるピロリ菌 LPS のアフィニティークロマトグラフィーにより、Gal-3 は H type I 及び Lewis X を含む LPS を認識した。

・考察

Gal-2 はピロリ菌表面の β -ガラクトシド構造依存的にピロリ菌を凝集させることが明らかとなった。また、Gal-2 はピロリ菌の H type I を含む LPS を認識したことから、Gal-2 はピロリ菌表面に存在する H type I を含む LPS を認識することで凝集を引き起こすと考えられる。

Gal-2 はピロリ菌に殺菌作用を示し、胃粘液中に存在したことから、胃粘液深部に侵入して粘膜細胞に接着しようとするピロリ菌を殺菌して生体防御に関与すると予測される。Gal-2 のピロリ菌殺菌機序は不明であるが、Gal-3 はピロリ菌の代謝機能を障害することや Gal-4 は血液型 B 抗原を持つ大腸菌の細胞壁を傷害することから、Gal-2 も同様の殺菌機構を示す可能性がある。

Gal-3 の構造は Gal-2 よりも低い pH まで維持され、ピロリ菌の H type I 及び Lewis X を含む LPS を認識した。胃粘液は管腔側に近づくにつれて pH が下がることから、Gal-3 は胃粘液の管腔側でピロリ菌に対して殺菌作用を示すと考えられる。また、本来ガレクチンファミリーは Lewis X や Lewis Y を認識しないはずである。しかし、Gal-3 は Gal-2 とは異なり、糖鎖の末端のみならず内部をも認識できることから LPS 内部のラクトサミン構造を認識したと考えられる。

以上のことから、Gal-2 は胃粘膜細胞付近でピロリ菌の LPS 中の H type I を認識して凝集を引き起こすことに加えて、増殖抑制・殺菌作用を示すことにより、生体防御に関与する可能性が示された。また、Gal-3 と Gal-2 はそれぞれ胃粘液の管腔側と胃粘膜細胞付近の異なる場所でピロリ菌を殺菌することで生体防御に関与する可能性が示唆された。

Thesis summery

Name: Takaharu Sasaki

Effects of galectin-2 against *Helicobacter pylori* infection

• **Introduction** *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is a helix-shaped Gram-negative bacterium, various diseases including gastritis, peptic ulcer and gastric cancer are caused by the bacterium infection. A major drug therapy for gastritis and peptic ulcer has turned to antibiotics against *H. pylori* from the use of antacid. In Japan, a drug therapy to eradicate *H. pylori* in positive patients is covered by National Health Insurance. However, decreasing success rate of the eradication is regarded as a problem.

Stomach protects itself against pathogens by secreting gastric acid, mucus and antimicrobial peptides. The biosynthesis of *H. pylori*'s cell wall is inhibited by gastric mucin having glycoconjugates with terminal $\alpha 1, 4$ -GlucNAc. The aggregation of *H. pylori* is caused by surfactant protein D. It is assumed that a number of infection prevention mechanisms against *H. pylori* work together.

Galectins are a family of animal lectins with affinity to β -galactosides of glycoconjugates and are involved in various biological phenomena such as cell adhesion, migration of leukocytes, differentiation, and apoptosis. Fifteen members of the galectin family proteins have been found in mammalian species. Galectins are classified into three types based on their molecular architectures, i.e., proto-type, chimera-type, and tandem repeat-type; proto- and chimera-types have one carbohydrate recognition domain (CRD) for β -galactosides in a molecule and the tandem repeat-type has two CRDs. Proto-type galectins can form noncovalent symmetric dimers and other galectins are also capable of forming dimers or oligomers. Thus, galectins can crosslink glycoconjugates possessing β -galactoside structures.

H. pylori, similar to other typical Gram-negative bacteria, possess an outer membrane consisting of phospholipids and lipopolysaccharide (LPS), with fucosylated O-antigen of LPS. These LPS can be crosslinked by galectins. Notably, some galectin family proteins such as galectin-3 (Gal-3), -4, and -9 are expressed in the gastrointestinal tract, recognize pathogens, and kill them. Gal-3 is involved in innate immunity by inducing the aggregation of *H. pylori* and then killing the bacteria in a β -galactosides-dependent manner.

Galectin-2 (Gal-2) is localized in gastrointestinal epithelium cells and reducing expression of the protein is associated with progression and lymph node metastasis in gastric cancer. Thus, Gal-2 can be defensive factor for stomach. Like Gal-3, Gal-2 may play several crucial roles for biophylaxis against *H. pylori* infection, but no data is available.

In this study, Gal-2 was assessed whether the protein was involved in host immunity against *H. pylori*. Effects of Gal-2 against *H. pylori*, interaction between Gal-2 and bacterium under weak acid conditions, and comparison of effects against the bacterium between Gal-2 and Gal-3 were investigated in chapter I, II and III, respectively.

• **Methods** Chapter I, the aggregation assay was performed by microscopic observation of the Gal-2-*H. pylori* mixture. The growth inhibition and bactericidal effect of Gal-2 were evaluated by comparing bacterial OD₆₀₀ of mixture before and after incubation and staining mixture with carboxyfluorescein-propidium iodide (CFDA-PI). The distribution of Gal-2 in gastric mucus and mucosa was assessed by immunohistochemical staining after tissue-fixing with Carnoy's solution.

Chapter II, Change in Gal-2 structure under weak acid conditions was assessed by CD spectroscopy. Affinity chromatography using Gal-2 immobilized column and extracted LPS of *H. pylori* was performed to find the ligands.

Chapter III, Change in Gal-3 structure under weak acid conditions, inhibition of *H. pylori* growth by Gal-3 and LPS ligands of the bacterium recognized by Gal-3 were investigated. The results were compared with Gal-2.

• **Results** The clumps of *H. pylori* were formed by addition of Gal-2 and the effect was increased by high concentration of the protein. The fluorescence was detected on surface of the clumps, which was induced by adding GFP tagged Gal-2 to *H. pylori*. The aggregation effect was inhibited by excess lactose. The bacterial growth was inhibited by Gal-2. The red fluorescence of PI, which means dead cells, was observed only in the clumps. Gal-2 was observed in gastric mucus.

The aggregation effect remained at pH 6.0 but not at pH 5.0. The β -sheet structure in Gal-2 hardly change at pH 6.0 to 7.0, and denaturation was observed at pH 5.0. LPS containing H type I structure in *H. pylori* was recognized by Gal-2.

The β -sheet structure in Gal-3 remained at pH 5.0 to 7.0. The growth of *H. pylori* was inhibited by Gal-3, and the effect was stronger than Gal-2. LPS containing H type I and Lewis X structures in *H. pylori* were recognized by Gal-3.

• **Discussion** Gal-2 induced aggregation of *H. pylori* in a β -galactoside structure dependent fashion and recognized LPS containing H type I in the bacteria. It suggests that Gal-2 induced aggregation of *H. pylori* by crosslinking LPS containing H type I structure in the bacteria.

Gal-2 killed *H. pylori* and existed in gastric mucus, so that it may play a role in phylaxis immediately before adhesion to gastric mucosa. Gal-3 injures metabolism of *H. pylori* and Gal-4 disrupts cell wall of blood type antigen B positive *Escherichia coli*. Although a detailed mechanism of bactericidal effect of Gal-2 is unclear, Gal-2 may similarly affect *H. pylori*.

The structure of Gal-3 was maintained in lower pH than Gal-2. Gal-3 recognized LPS containing H type I and Lewis X. It suggests that Gal-3 indicates bactericidal effect to *H. pylori* in luminal side of gastric mucus. Even though galectin family cannot bind Lewis X and Lewis Y, Gal-3 recognized Lewis X. Gal-3 may bind to LacNAc structure of LPS because the protein can bind inside of carbohydrate chain.

In conclusion, Gal-2 induces aggregation of *H. pylori* via crosslinking LPS containing H type I structure, and kills the bacterium above gastric mucosa. Gal-3 affects *H. pylori* in luminal side. These results suggested that Gal-2 and Gal-3 work together in the immune response for the *H. pylori* infection.

論文審査の結果の要旨

Helicobacter pylori(ピロリ菌)は、グラム陰性のらせん状桿菌であり、胃炎や消化性潰瘍、胃がんを含む様々な疾患の発症に関与する。ピロリ菌除菌療法の普及に伴ってピロリ菌感染に起因する胃炎や胃がんの罹患率は大きく減少したが、近年、ピロリ菌の薬剤耐性化による除菌成功率の低下が問題となっており、新たな除菌療法の確立が必要となっている。ガレクチンは、 β -ガラクトシド構造に親和性を持つ動物レクチンの一種であり、細胞接着や白血球の遊走、分化、アポトーシスを含む様々な生命現象に関与することが知られている。ガレクチンは、そのタイプによって分子内に1または2か所の糖認識部位を持ち、2量体や多量体を形成するとともに、複合糖質に含まれる β -ガラクトシド構造を認識して複数の複合糖質を架橋することができる。ピロリ菌は、一般的なグラム陰性菌と同様に細胞壁外膜にリポ多糖(LPS)を有するが、そのLPSはLewis抗原と呼ばれるフコシル化されたO抗原を持ち、このO抗原はガレクチンによって架橋される可能性がある。実際、ガレクチン-3(Gal-3)はピロリ菌のO抗原を認識することや β -ガラクトシド構造依存的にピロリ菌に凝集および殺菌作用を示すことが報告されている。一方、ガレクチン-2(Gal-2)は胃腸の上皮細胞に局在して発現しており、胃がんの発症やリンパ節転移に関与することが報告されているものの、Gal-2がピロリ菌LPS内のO抗原を認識する可能性やピロリ菌感染に対する生体防御に関与する可能性については、未だ明確な報告はない。

本研究において佐々木啓晴氏は、Gal-2がピロリ菌感染に対する生体防御に関与する可能性について検証し、その結果を3章構成で論じている。まず、第I章において、Gal-2のピロリ菌に対する凝集・殺菌作用を明らかにした上で、第II章では、より生理条件に近い弱酸性条件下におけるGal-2のピロリ菌凝集作用について評価するとともに、Gal-2のピロリ菌LPSリガンドの探索を行っている。また、第III章ではピロリ菌に対するGal-2とGal-3の作用の比較を行っている。以下、本論文の研究成果の概要をまとめた。

第I章では、Gal-2のピロリ菌に対する凝集・殺菌作用について検討している。まず、ピロリ菌懸濁液をGal-2溶液と混合し、Gal-2のピロリ菌凝集作用を評価した。Gal-2は濃度依存的なピロリ菌凝集作用を有し、この作用はラクトースの添加によって阻害された。この結果から、Gal-2はピロリ菌表面の β -ガラクトシド構造を架橋することにより凝集を引き起こすことが示された。また、ピロリ菌懸濁液をGal-2と共に培養して培養前後の濁度から増殖比を算出したところ、Gal-2はピロリ菌に対して濃度依存的な増殖抑制作用を示すことが明らかになった。ピロリ菌の凝集体は、死細胞の検出に用いられるpropidium iodide染色に対して陽性であったことから、Gal-2はピロリ菌を凝集・殺菌し、増殖抑制効果を示すことが明らかとなった。さらにマウス胃粘膜組織を用いた免疫組織染色の結果、Gal-2は胃粘

膜細胞のみならず、胃粘液中にも存在することが明らかになった。本章の結果から、Gal-2 は胃粘液中でピロリ菌に対して凝集および殺菌作用を現す可能性を示した。

Gal-2 がピロリ菌と相互作用する胃粘液中は弱酸性であることから、第II章では、弱酸性条件における Gal-2 のピロリ菌凝集作用および構造変化を評価するとともに、Gal-2 のピロリ菌 LPS リガンドの探索を行っている。Gal-2 のピロリ菌凝集作用は pH の低下とともに減弱するが、pH6.0 までは維持された。また、弱酸性条件における CD スペクトル測定により、pH5.0 では Gal-2 の β -シート構造が変化する一方、pH6.0 までは構造が維持されることを示した。さらに、ピロリ菌由来の LPS を Gal-2 固定化カラムに添加し、アフィニティークロマトグラフィーを行うことにより、Gal-2 が認識するピロリ菌 LPS 中の Lewis 抗原を探索した結果、Gal-2 は H type I を含む LPS を認識することを初めて見出した。本章および第I章の結果を併せると、Gal-2 は胃粘膜細胞直上もしくは細胞付近の胃粘液中でピロリ菌の H type I を含む LPS を架橋することで凝集や殺菌作用を示すと考えられた。

第III章では、Gal-3 のピロリ菌増殖抑制作用の評価やピロリ菌リガンドの探索を行い、Gal-2 と比較している。まず、弱酸性条件において CD スペクトル測定した結果、Gal-2 では構造の変化が生じた pH5.0 まで Gal-3 の構造が維持されることが明らかになった。また、Gal-3 はピロリ菌増殖抑制作用を示し、その作用は Gal-2 よりも強かった。Gal-3 固定化カラムによるピロリ菌 LPS のアフィニティークロマトグラフィーにより、Gal-3 は H type I および Lewis X を含む LPS を認識することが明らかになった。本章の結果から、Gal-3 は胃粘液層の管腔側で、Gal-2 は胃粘膜細胞直上付近でピロリ菌の感染を防ぎ、両者は共同して生体防御機能を維持している可能性を示した。

以上、Gal-2 が胃粘膜細胞直上もしくは胃粘膜細胞付近でピロリ菌表面の H type I に結合して凝集・殺菌作用を示し得ることを実証し、ピロリ菌感染に対する生体防御に Gal-2 が関与する可能性を初めて明らかにした点は高く評価できる。本研究成果は、新たな抗菌薬の開発やピロリ菌感染患者の治療戦略の開発のための有用な基礎的知見を提供している。よって、その独創性および研究意義の観点から、本論文は本研究科課程による博士（薬学）論文に十分値すると判断した。