

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390123

研究課題名(和文) ヘリコバクターピロリの胃粘膜感染機構と炎症惹起メカニズムの研究

研究課題名(英文) Mechanisms of *Helicobacter pylori* infection and inflammation in gastric mucosa

研究代表者

三室 仁美 (MIMURO HITOMI)

東京大学・医科学研究所・講師

研究者番号：80396887

研究成果の概要(和文)：ピロリ菌による胃炎惹起メカニズムの包括的理解を目指して、本菌と感染宿主との相互作用に関して、マクロ的解析、胃内のマクロファージ・樹状細胞の解析、腸管パイエル板での解析、の三つの局面に分けた研究を行った。その結果、感染の経時的進行に伴い、ピロリ菌は菌体自身と宿主の双方の菌体付着に関与する因子群の機能的発現をダイナミックに変動させることで、各感染ステージそれぞれに適した感染の場を自ら構築することを見出した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to obtain a comprehensive understanding of the mechanisms underlying *Helicobacter pylori*-induced inflammation. We focused on three aspects of the interplay between *H. pylori* and the host: macroscopic, macrophages and dendritic cells, and peyer's patch analyses. As a result, we found that *H. pylori* modulates both bacteria and host adherence factors during the course of infection *in vivo*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2009年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学(含真菌学)

キーワード：細菌、感染、微生物、ヘリコバクターピロリ

1. 研究開始当初の背景

ピロリ菌 (*Helicobacter pylori*) は、世界人口の約半数が感染している大規模感染症起因菌であり、胃粘膜に持続感染を引き起こして、胃炎、消化性潰瘍、胃 MALT リンパ腫、胃ガンの発症と関連している。本菌は胃粘膜表面の粘液層の中や腺窩上皮に付着して増殖し、好中球、形質細胞、マクロファージ(Mφ)、リンパ球の浸潤を特徴とする胃炎を誘

発する。一方、胃の深部に形成される胃 MALT リンパ腫では、病巣部位近傍に菌体が見られないことから、ピロリ菌が誘導する病態には、菌体と感染部位である胃粘膜での、直接接触により惹起される機構と、菌体成分が遊走性細胞を介して、感染部位から遠方の病巣に影響を及ぼす機構の、少なくとも二つのルートの介在が想定された。

申請者らのグループは、胃炎の惹起に必要

なピロリ菌抗原による感作は、小腸のパイエル板内部の樹状細胞 (DC) にピロリ菌が捕捉されることによって誘導されることを報告した。従来、ピロリ菌による胃炎の発症は、胃局所でのピロリ菌と宿主細胞との相互作用のみに着目して解釈されていたが、胃炎惹起の理解には、胃のみではなく、全身的な感作細胞の動態を鑑みて解明する必要があることを初めて提示した。しかしながら、パイエル板内の菌体侵入と、その後引き続き抗原提示細胞による食食、抗原提示、ケモカイン産生、免疫担当細胞の胃へのリクルートなどの詳細は不明なままである。

一方で、ピロリ菌は *cag* pathogenicity island (*cag* PAI) とよばれる遺伝子群に、IV型分泌装置構成成分と、この装置を介して分泌される菌体タンパク質 CagA がコードされている。*cag* PAI は本菌の病原性に重要であり、特に、前ガン状態に関連する胃体部優位萎縮性胃炎は CagA に起因することが、基礎及び臨床的な知見から示唆されている。申請者らは CagA が GRB2 や CRK と結合して MEK/ERK カスケードの活性化と、細胞の運動性亢進を引き起こすこと、さらに、BCL2 ファミリータンパク質の一つである MCL1 の発現亢進により、感染上皮細胞のアポトーシスが抑制され、これにより、感染の足場となる上皮細胞が剥離せずに長期間保持され、結果として、上皮細胞のターンオーバーによる宿主の病原細菌除去システムが破綻して、菌の定着が増大するメカニズムを解明した。ピロリ菌による胃炎惹起には、胃に菌が定着していることが必要であることを考え合わせると、パイエル板でピロリ菌に感作した免疫担当細胞群が胃にホーミングする道標として、胃での持続感染は重要であり、それを可能とする分子戦略として、菌体の CagA が重要な役割を果たしていることを明らかにした。しかしながら、胃での持続感染の成立は CagA のみならず、外膜タンパク質 OMP ファミリーのひとつでリス b 糖鎖 (Le^b) をリガンドとする BabA など複数の菌体付着因子アドヘジンと宿主上皮細胞の相互作用も必須である。これら菌体付着に関わる菌体および宿主分子群の発現は感染の進行に伴い変動することが予想されているが、その菌体と宿主の時間的相互作用変化の全貌は未だ不明なままである。

さらに、菌に応答して胃で産生される何らかの宿主因子が、免疫担当細胞をパイエル板から胃へリクルートする使命を果たすと予想されるが、その実態は未だ不明なままである。サイトカイン産生の主要な担い手は食細胞 (Mφ や DC) であることから、実際に遊走細胞の浸潤に必須なケモカインの産生は、胃において、食細胞とピロリ菌が接触することに端を発して産生されると考えられる。そこ

で、胃の食細胞とピロリ菌の接触、それに引き続くサイトカイン産生・免疫担当細胞のリクルートなどの一連の免疫応答と、ピロリ菌がこれらの宿主反応を調節する機構の解明は、病巣形成機構の理解に重要な意義を持つと考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、本菌と感染宿主との相互作用に焦点を絞り、マクロ的解析、胃内の食細胞の解析、および腸管パイエル板での解析の三つの局面に分けた研究を企図した。

(1) マクロ的動態: ピロリ菌の *in vivo* での感染動態を経時的に検討して、宿主内での時空間的なピロリ菌の動態を明らかにする。さらに、胃での付着に重要な菌体付着タンパク質を中心に、胃動態の変移を解析する。

(2) 胃の反応: 感染初期にピロリ菌が胃で接触する DC や Mφ における炎症性サイトカインの挙動に着目して、網羅的解析および各種ノックアウトマウスを用いた解析を行い、感染による炎症惹起に重要な炎症性サイトカイン産生の分子機構を解明する。

(3) パイエル板の反応: ピロリ菌は、腸管内において、胃内での螺旋菌とは異なる形態である球状体になると考えられている。螺旋菌と球状菌のパイエル板侵入を比較検討して、ピロリ菌のパイエル板相互作用特異性を検討する。さらに、各種遺伝子改変マウス由来細胞を用いて、パイエル板や腸内環境への相互作用に変化を及ぼす宿主因子を同定する。

これらのデータを統合的に解釈して、感作細胞の体内動態と胃への集積、さらに感作細胞の胃集積の基盤となる胃における感染初期反応の本質的な意義を包括的に理解することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 蛍光タンパク質発現ピロリ菌の作製

蛍光タンパク質 (GFP など) をコードする遺伝子を恒常的に発現する菌体因子プロモーターの下流に挿入することで、蛍光を発するピロリ菌を作製した。作製したピロリ菌の *in vitro* における活性は、胃癌上皮細胞 AGS に感染後、細胞運動能の亢進、CagA 分泌能およびリシフェラーゼプロモーターアッセイによる NF-κB 活性化能を測定することで判定した。良好な活性を示すクローンは、次に、マウスおよびスナネズミに経口的に感染させた。4 および 8 週間後に感染動物から胃を摘出して、生菌数の測定と免疫組織学的解析に供した。さらに、感染動物の胃から total RNA を抽出して、各種 mRNA 発現量を定量した。

(2) Le^b 発現細胞株の確立

ヒト β -1,3-galactosyltransferase、 α -1,2-Fucosyltransferase、および α -1,4-Fucosyltransferase を発現する組換えレトロウイルスを、各種ルイス b 糖鎖 (Le^b) 非発現細胞 (MDCK, CHO および NIH3T3 細胞) に感染させた。薬剤耐性により発現細胞を選択して、 Le^b 発現細胞株を樹立した。細胞表面の Le^b 発現は、免疫染色法およびフローサイトメーターにより測定した。

(3) ピロリ菌感染による分泌装置依存的な上皮細胞活性化における付着因子 BabA の作用解析

宿主の Le^b 糖鎖をリガンドとする菌体付着因子 BabA の欠損変異株を作製した。作製したピロリ菌の *in vitro* における活性は、樹立した Le^b 陽性および陰性細胞株にピロリ菌を感染後、CagA 分泌能測定、mRNA 定量および ELISA による分泌 IL-8 タンパク質定量により判定した。

(4) スナネズミ感染モデルにおける *in vivo* での BabA 作用解析

BabA 欠損変異株および野生型ピロリ菌をスナネズミに経口的に感染させた。8 週間後に感染動物から胃を摘出して、免疫組織化学的解析に供した。さらに、感染動物の胃から total RNA を抽出して、各種 mRNA 発現量を定量した。

(5) ピロリ菌感染 M ϕ の網羅的発現変動解析とシグナル伝達分子の解析

マウス骨髄由来 M ϕ に各種ピロリ菌を感染させた後に、total RNA を抽出して、マイクロアレイ解析に供した。感染経時的に発現が増大するサイトカインに関して、シグナル伝達に関与することが考えられる因子のノックアウトマウスから調製した骨髄由来 M ϕ を用いて、サイトカイン発現を精査した。

(6) マウス腸管ルーブアッセイによるパイエル板侵入効率の解析

マウスの腸管を結紮して内部に螺旋状もしくは球状ピロリ菌を注入後、一定時間の後に腸管のパイエル板を摘出し、免疫組織化学的解析を行った。

4. 研究成果

宿主に感染したピロリ菌の動態を経時的、空間的に調べるために、蛍光タンパク質 (GFP など) を発現するピロリ菌を作製した。作製したピロリ菌は、*in vitro* では野生株と同等の細胞付着能、運動能、および IV 型分泌装置依存的な活性惹起能を示したものの、スナネズミを用いた *in vivo* 動物感染実験においては、主要な病原因子である IV 型分泌装置に依存した病原性を示さなかった。おそらく変異株の作製過程において、*in vitro* で馴化したために *in vivo* での病原性が減弱した

可能性が考えられた。

そこで次に、ピロリ菌の胃粘膜感染成立に重要な体内動態と病原性を理解するために、胃上皮細胞への菌体付着に重要な菌体膜タンパク質アドヘジン BabA の病原性発動における作用を解析した。菌体表面タンパク質 BabA は、宿主細胞表面の Le^b 糖鎖をリガンドとして結合することが報告されている。BabA- Le^b 結合の感染における意義を検証するために、まず *in vitro* での BabA 機能解析に使用可能な Le^b 発現細胞株を樹立した。レトロウイルスにより三種の糖転移酵素 (β -1,3-galactosyltransferase、 α -1,2-Fucosyltransferase、および α -1,4-Fucosyltransferase) を組み合わせる細胞に導入して、 Le^b 発現 MDCK, NIH3T3 および CHO 細胞株を作製した。樹立したこれらの細胞株を用いた *in vitro* での感染細胞の解析により、ピロリ菌は Le^b 及び BabA に依存して、細胞への付着を成立させること、また、病原性に重要な IV 型分泌装置に依存した CagA 注入活性、炎症性サイトカイン (IL-8 および CCL5) や前癌状態関連遺伝子 (CDX2 および MUC2) の発現、および IL-8 タンパク質産生が増大することが明らかとなった。

次に *in vivo* における BabA- Le^b 結合の作用を調べるために、スナネズミ感染モデル系を採用した。齧歯類の胃粘膜表面の Le^b 発現は種により異なることが想定されたため、スナネズミ胃組織を免疫組織化学的解析に供した結果、スナネズミ胃粘膜には Le^b が発現していることが確認できた。スナネズミ感染 8 週後の胃を摘出して解析した結果、野生型ピロリ菌に比べ、BabA 欠損変異株は胃粘膜における炎症性サイトカイン CXCL1 の発現が有意に低いことが明らかになった。これらの結果から、BabA と Le^b の結合は *in vitro* および *in vivo* において、IV 型分泌装置による炎症惹起作用を増大させる作用があることが明らかとなった。

一方、スナネズミ感染モデルにおいて、ピロリ菌感染後経時的に胃から定着菌体および胃組織を採取すると、回収した菌体の付着因子 BabA のタンパク質発現が経時的に低下することが明らかとなった。一方で、感染動物の胃組織中の mRNA 発現量の比較および免疫組織化学的解析から、宿主因子のうち、BabA とは別の菌体因子の宿主リガンド因子の発現が、感染と共に経時的に増大することが明らかになった。従って、ピロリ菌は、感染の経時的進行に伴い、菌体自身と宿主の双方の菌体付着に関与する因子群の機能的発現をダイナミックに変動させることで、各感染ステージそれぞれに適した感染の場を自ら構築することを見出した。

M ϕ による炎症性サイトカイン産生に影響を及ぼす菌体および宿主因子を同定するた

めに、ピロリ菌を感染させた野生型マウス骨髄由来 Mφ から抽出した mRNA をマイクロアレイ解析に供した。さらに各種遺伝子欠損マウス骨髄由来 Mφ を用いた *in vitro* での感染実験を行い、サイトカイン mRNA 発現量の動態を解析した結果、ピロリ菌が感染した Mφ では、宿主の MyD88 に依存して、IL-1 や MIP-2 をはじめとする種々サイトカインの mRNA 発現が亢進することが明らかになった。菌体側因子の各種遺伝子改変ピロリ菌を用いた解析から、ピロリ菌が Mφ に感染した際に活性化する MyD88 依存的シグナル伝達に関わる菌体の責任分子を一部同定した。さらに、本活性化に関連する IL-1 に関して精査した結果、感染により発現増大する IL-1α が感染増悪化に関与することが明らかになった。

螺旋菌と球状菌をマウス腸管ループアクセスに供し、菌体性状によるパイエル板侵入効率を免疫組織染色法により精査した結果、螺旋菌に比べて球状菌は、パイエル板内部に効率的に取り込まれることが明らかとなった。螺旋菌投与群のパイエル板内部に見られる菌は球状体であったことから、胃内で螺旋菌として付着していたピロリ菌が剝離して腸管内部侵入すると、腸内環境因子により螺旋菌となり、パイエル板に効率良く取り込まれることが示唆された。さらに各種遺伝子改変マウスから調製した樹状細胞と、種々遺伝子改変ピロリ菌を用いた *in vitro* での感染実験によって、樹状細胞活性化に関わる宿主因子と菌体因子を一部同定した。現在詳細な分子メカニズムを解析中である。

本研究は、ピロリ菌感染による胃粘膜炎症惹起の基盤となる菌体と宿主の相互作用を多角的に明らかにした独創性の高い研究であるといえる。さらに本研究課題は、平成 22 年度新学術領域「ゲノム科学の総合的推進に向けた大規模ゲノム情報生産・高度情報解析支援」に採択され、モデル動物感染株の全ゲノム塩基配列解析も進めることができた。今後は、これらのゲノム解析データと、本研究で得られた結果を総合的に解釈することで、ヒトに病原性を示す上で重要な菌体因子の確定が可能となり、ピロリ菌のみならず他の病原細菌も含めた感染症の理解と克服への道筋が大きく開かれるものと考えられる。

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 10 件)

① Autophagy targeting of *Listeria monocytogenes* and the bacterial countermeasure. Ogawa M, Yoshikawa Y, Mimuro H, Hain T, Chakraborty T, and

Sasakawa C. Autophagy. 2011;7(3):310-314. 査読有

② Reinforcement of epithelial cell adhesion to basement membrane by a bacterial pathogen as a new infectious stratagem. Kim M, Ogawa M, Mimuro H, and Sasakawa C. Virulence. 2010;1(1):52-55. 査読有

③ *Shigella* deploy multiple countermeasures against host innate immune responses. Ashida H, Ogawa M, Kim M, Suzuki S, Sanada T, Punginelli C, Mimuro H, and Sasakawa C. Curr Opin Microbiol. 2011;14(1):16-23. 査読有

④ Bacterial interactions with the host epithelium. Kim M, Ashida H, Ogawa M, Yoshikawa Y, Mimuro H, and Sasakawa C. Cell Host Microbe. 2010;8(1):20-35. 査読有

⑤ *Shigella* infection of intestinal epithelium and circumvention of the host innate defense system. Ashida H, Ogawa M, Mimuro H, Sasakawa C. Curr Top Microbiol Immunol. 2009;337:231-255. 査読有

⑥ *Bordetella* evades the host immune system by inducing IL-10 through a type III effector, BopN. Nagamatsu K, Kuwae A, Konaka T, Nagai S, Yoshida S, Eguchi M, Watanabe M, Mimuro H, Koyasu S, and Abe A. J Exp Med. 2009;206(13):3073-3088. 査読有

⑦ *Listeria monocytogenes* ActA-mediated escape from autophagic recognition. Yoshikawa Y, Ogawa M, Hain T, Yoshida M, Fukumatsu M, Kim M, Mimuro H, Nakagawa I, Yanagawa T, Ishii T, Kakizuka A, Sztul E, Chakraborty T, and Sasakawa C. Nat Cell Biol. 2009;11(10):1233-1240. 査読有

⑧ Strategy of *Helicobacter pylori* to enhance colonization of the stomach. Mimuro H. Nippon Saikingaku Zasshi. 2009;64(2-4):311-317. 査読無

⑨ *Helicobacter pylori* CagA phosphorylation-independent function in epithelial proliferation and inflammation. Suzuki M, Mimuro H, Kiga K, Fukumatsu M, Ishijima N, Morikawa H, Nagai S, Koyasu S, Gilman RH, Kersulyte D, Berg DE, and Sasakawa C. Cell Host Microbe. 2009;5(1):23-34. 査読有

⑩ *Helicobacter pylori* cytotoxin-associated gene A activates the signal transducer and activator of transcription 3 pathway *in vitro* and *in vivo*. Bronte-Tinkew DM, Terebiznik M, Franco A, Ang M, Ahn D,

Mimuro H, Sasakawa C, Ropeleski MJ, Peek RM Jr, and Jones NL. Cancer Res. 2009;69(2):632-639. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

- ① Mimuro, H. et al. “Regulation of bacterial colonization on gastric epithelium by *Helicobacter pylori* virulence factors” 第 10 回あわじしま感染症・免疫フォーラム (The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity), 2010 年 9 月 8 日, 淡路夢舞台国際会議場, 兵庫県
- ② Mimuro, H. et al. “Effect of *Helicobacter pylori*'s BabA adhesion on the pathogenicity in gastric epithelial cells” 第 10 回日韓国際微生物学シンポジウム (The 10th Japan-Korea international symposium on microbiology, JKISM10), 2010 年 3 月 26 日, パシフィコ横浜, 神奈川県
- ③ 三室仁美 “*Helicobacter pylori* の宿主感染戦略” 第 92 回 日本細菌学会関東支部総会, 2009 年 11 月 6 日, 東京医科歯科大学, 東京都
- ④ Mimuro, H. et al. “Control of epithelial cell by *Helicobacter pylori* infection” 15th International Workshop on Campylobacter, Helicobacter, and related organisms (CHRO2009), 2009 年 9 月 2 日-5 日, 朱鷺メッセ (新潟コンベンションセンター), 新潟市
- ⑤ Mimuro, H. et al. “Control of Gastric Epithelial Cell by *Helicobacter pylori* infection” American Society for Microbiology 109th General Meeting, 2009 年 5 月 18 日-21 日, ペンシルヴァニアコンベンションセンター, U.S., ペンシルヴァニア州
- ⑥ 三室仁美, 笹川千尋 “ヘリコバクターピロリ菌の宿主感染機構” 第 56 回日本実験動物学会総会, 2009 年 5 月 16 日, 大宮ソニックスシティ, 埼玉県
- ⑦ 三室仁美 “Control of gastric epithelial cell by *Helicobacter pylori* infection” 第 82 回 日本細菌学会総会, 2009 年 3 月 12 日-14 日, 名古屋国際会議場, 愛知県

[その他]

ホームページ等

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/bac/hp/mainpage.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

三室 仁美 (MIMURO HITOMI)

東京大学・医科学研究所・講師
研究者番号：80396887

(2)研究分担者

小川 道永 (OGAWA MICHINAGA)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：80361624

(3)連携研究者

無