

平成23年 5月25日現在

機関番号：20101
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590450
 研究課題名（和文） 低毒性であるピロリ菌リポ多糖の炎症反応惹起機構
 研究課題名（英文） Molecular mechanism of inflammatory reaction induced by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides with weak endotoxic activities

研究代表者

横田 伸一 (SHIN-ICHI YOKOTA)
 札幌医科大学・医学部・准教授
 研究者番号：10325863

研究成果の概要（和文）：

著しく低いエンドトキシン活性しか示さない *Helicobacter pylori* のリポ多糖（LPS）が Toll-like receptor 2（TLR2）からシグナルを入れ、TLR4 発現の低い胃粘膜上皮細胞株の TLR4 発現を上昇させた。*H. pylori* LPS が TLR4 発現誘導により胃の上皮細胞の他の細菌由来 LPS に対する感受性を増強させること、さらに細胞の増殖を亢進させることで、発癌をもたらす病原因子として関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Helicobacter pylori lipopolysaccharide (LPS) shares extremely low endotoxic activity compared with typical gram-negative bacterial LPS. We found that *H. pylori* LPS upregulated TLR4 expression via TLR2 signaling in gastric epithelial cell lines, which express very low levels of TLR4. *H. pylori* LPS sensitized gastric epithelial cells to other bacterial LPS through TLR4 upregulation, and promoted gastric epithelial cell growth. These activities are suggested that *H. pylori* LPS is a pathogenic factor for carcinogenesis.

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
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：細菌学

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，免疫学，感染症，細胞内情報伝達，自然免疫，発癌，炎症

1. 研究開始当初の背景

（1）*Helicobacter pylori*（ピロリ菌）は、胃に定着し、慢性胃炎、胃十二指腸潰瘍、胃癌の原因となることは周知の事実である。最近では、疫学的な検討や除菌による症状の改善などのエビデンスからさまざまな疾患の発症

の関連性が提唱されている。ここで重要な点は、ピロリ菌が胃に定着し、宿主から排除されずに慢性感染となり長期間にわたって比較的弱い炎症を起こし続けていることである。従って胃十二指腸の疾患については、感染初期の胃炎症状を除けば、長い期間にわた

って病状の進行が起こるのである。ピロリ菌の炎症反応惹起能は他の菌に比べてむしろ弱いと位置づけた方がよいと考えられる。近年の自然免疫研究の進展は目覚ましいものがあるが、その中核にあるのが微生物の構成成分をパターンとして認識する Toll-like receptor (TLR) である。TLR4 はリポ多糖 (LPS) を、TLR5 は鞭毛を認識することが知られている。興味深いことにピロリ菌は LPS、鞭毛ともに TLR を経由した情報伝達が他の細菌由来のものに比較して非常に弱いことが示されている。まさに炎症反応惹起の最前線で弱い反応しか起こさないのである。逆に弱い炎症反応であるからこそ宿主から排除を受けないと考えられる。ピロリ菌、クラミジア、*Porphyromonas gingivalis* などの慢性炎症を起こす菌の LPS は共通して低活性である。

(2) 1997 年ころより、私たちはピロリ菌 LPS の特異性に注目してきた。ひとつは宿主の糖鎖抗原であるルイス抗原と同じ構造を LPS の多糖部分に持つことである。以前は宿主の抗原を mimic する抗原を表層にもつことから自己免疫疾患の誘導が想定されていたが、申請者らは少なくとも抗ルイス抗原自己抗体の生成には関与していないことを示唆した。一方で、ルイス抗原構造とは関係ないヒトに対してドミナントに働くエピトープ (高抗原性エピトープ) の存在を明らかにし、ピロリ菌感染者のほぼすべてがこのエピトープに対する抗体を持つことを明らかにした [Yokota et al. *Infect. Immun.* 65, 3509-3512 (1997); *Infect. Immun.* 66, 3006-3011 (1998); *Infect. Immun.* 68, 151-159 (2000)]。さらに、胃癌患者はこの抗体をもっているものの分離される菌はこのエピトープを欠損しており、別なエピトープ (低抗原性エピトープ) が露出していることを明らかにした。約 50% のピロリ菌保有者でこのエピトープに対する抗体を保有しており、活動性ピロリ菌感染のひとつの指標である抗ピロリ IgA 陽性と相関を認めている。LPS の抗原性と宿主とピロリ菌の状態の関連性を示す興味ある知見と考えている。

(3) TLR4 を発現している上皮系細胞では従来からいわれているとおり大腸菌 LPS の反応性に比較してピロリ菌 LPS は 1000 倍以下の弱い反応性しか示さない。私たちは、TLR4 の発現量がほとんどない胃癌由来上皮細胞株ではピロリ菌 LPS と大腸菌由来 LPS の反応性がほとんど変わらないことを見出した。この現象は、大腸菌 LPS が TLR4 を経由してシグナルを入れているのに対して、ピロリ菌 LPS が TLR4 ではなく TLR2 を経由してシグナルをいれているためであることを示した [Yokota et al. *FEMS Immunol. Med. Immunol.* 51, 140-148 (2007)]。

2. 研究の目的

本研究では、ピロリ菌 LPS が大腸菌などの典型的な LPS と異なるシグナル伝達様式を示すことから、このシグナルがもたらすピロリ菌の病原因子としての LPS の役割を検討する。特に、胃癌由来株で頻度高く認められる低抗原性エピトープ保有 LPS と慢性胃炎由来株で多く認められる高抗原性エピトープ保有 LPS の生物活性を比較することによって、LPS の発癌に関わる病原因子としてのポテンシャルを明らかにする。また、ピロリ菌 LPS の特異的な生物活性の分子メカニズム検討の一環として、宿主レクチンと LPS との相互作用に着目して検討を行う。

3. 研究の方法

ピロリ菌 LPS による宿主細胞の反応性を検討するのにヒト胃癌由来細胞株 MKN28 と MKN45 を用いた。これらの細胞株は TLR4 の発現量が低く、TLR4 高発現の細胞株 (尿路上皮細胞株 T24 や単球系細胞株 U937, THP-1) に比べて大腸菌 LPS に対する反応性が著しく低い。ピロリ菌 LPS として、高抗原性エピトープ保有 LPS として慢性胃炎由来株 GU2 と十二指腸潰瘍由来株 DU2 から、低抗原性エピトープ保有 LPS として胃癌由来株 CA2, CA6 から精製した LPS を用いた。LPS 標品にリポ蛋白質などの LPS 以外の TLR アゴニストが混入しないように、従来の熱フェノール抽出標品をさらに protein phospholipases, DNase, RNase, proteinase K で処理し、さらに Octyl-Sepharose 疎水クロマトグラフィーを行い、高純度の LPS 標品を得た。

MKN28, MKN45 細胞にピロリ菌 LPS を処理し、TLR4 などの TLRs の発現、interleukin-8 (IL-8) 等のサイトカイン産生性、細胞増殖速度等について検討した。TLR4 の発現に対しては、その分子メカニズムを明らかにするために、ルシフェラーゼレポーター遺伝子解析、各種のシグナル伝達阻害剤の添加効果を検討した。ピロリ菌 LPS のエピトープに関与する糖残基の検討は、単糖もしくは単糖のメチルグリコシドを競合物質とした ELISA 法によった。さらに、各種グリコシダーゼで LPS を処理し、ヒト血清の反応性の変化を検討した。ピロリ菌 LPS と宿主のレクチンとの相互作用は、リコンビナントヒト surfactant protein D (SP-D) および A (SP-A) について ELISA 法によって検討した。

4. 研究成果

(1) MKN28 と MKN45 細胞をピロリ菌 LPS で前処理すると、大腸菌 LPS による IL-8 の産生誘導の増強が認められた。この活性は低抗原性エピトープ保有 LPS の方が、高抗原性エピトープ保有 LPS に比較して有意に強かった。ピロリ菌 LPS により、大腸菌 LPS のリ

セプターである TLR4 の発現誘導が認められた。MEK1/2 阻害剤 (PD98059) もしくは ERK1/2 阻害剤 (FR180204) の添加により、この TLR4 の発現誘導は有意に抑制された (図 1)。一方、p38 阻害剤 (SB202190) 添加では有意な変化を認めなかった。TLR4 プロモーターのレポーター遺伝子解析では、転写因子 PU.1 の結合配列のうちの一つ (PU.1_1) および AP1 の結合配列 (A/E) に変異を入れると転写活性は著しく抑制されたが、ピロリ菌 LPS 処理による転写誘導は認められた。NF-Y の結合配列に変異を入れた時のみ、ピロリ菌によるプロモーター活性の上昇が認められなくなった (図 2)。ピロリ菌 LPS 処理によって NF-Y の活性化が認められた。NF-Y の活性化も MEK1/2 阻害剤および ERK1/2 阻害剤により有意に抑制された。TLR2 の発現を siRNA で抑制させておくとピロリ菌 LPS による TLR4 の発現誘導が抑制された。

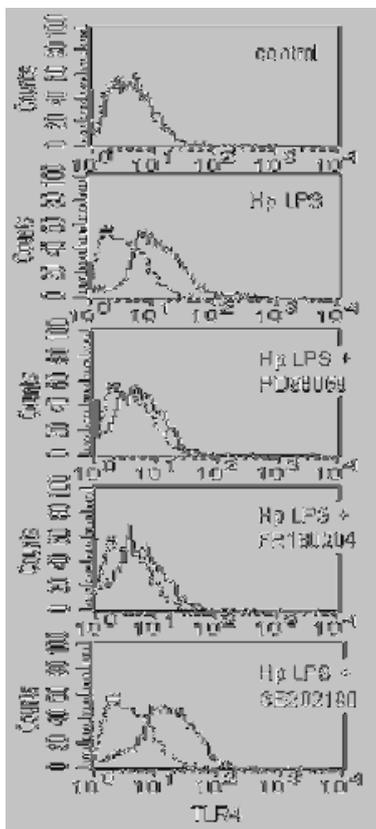


図 1. *H. pylori* CA2 株 LPS による MKN28 細胞上の TLR4 発現誘導とそれに対する MAP キナーゼ阻害剤の効果。PD98059: MEK1/2 inhibitor, FR180204: ERK1/2 inhibitor, SB202190: p38 inhibitor.

(2) ピロリ菌 LPS 処理により胃癌由来細胞株の増殖速度が有意に亢進した。この増殖亢

進は MEK 阻害剤, ERK 阻害剤により有意に抑制され、p38 阻害剤では変化を認めなかった。低抗原性エпитープ保有 LPS で、より強い MEK1/2-ERK1/2 MAP キナーゼ系の活性化と胃上皮細胞株の細胞増殖速度の高い亢進が認められた。

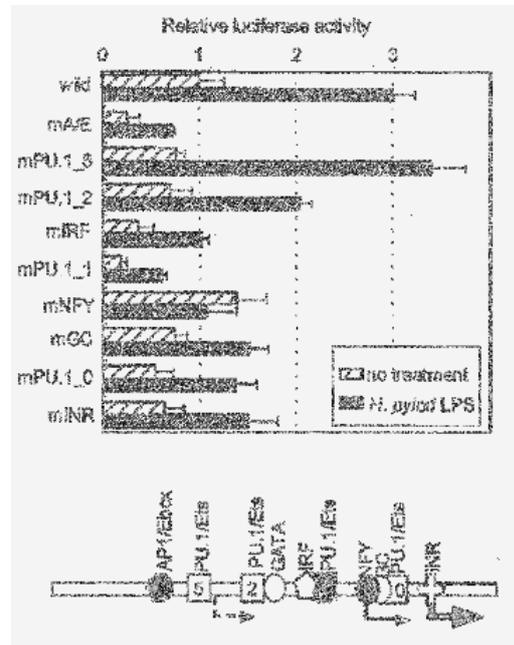


図 2. MKN28 細胞における TLR4 のルシフェラーゼレポーター遺伝子によるプロモーター解析. *H. pylori* LPS 処理による TLR4 発現上昇にかかわる転写因子の同定

(3) 以上の結果から、胃癌由来株に頻度高く認められる低抗原性エピトープ保有 LPS が、MEK1/2-ERK1/2 の MAP キナーゼ系をより強く活性化することで、上皮細胞の増殖を促進する。さらに TLR4 の発現増強により他の細菌由来の LPS に対する感受性を上昇させ、強い炎症反応を起こす素地を胃内で形成することが推察され (図 3)、LPS が胃癌発症のひとつの因子になると考えられた。

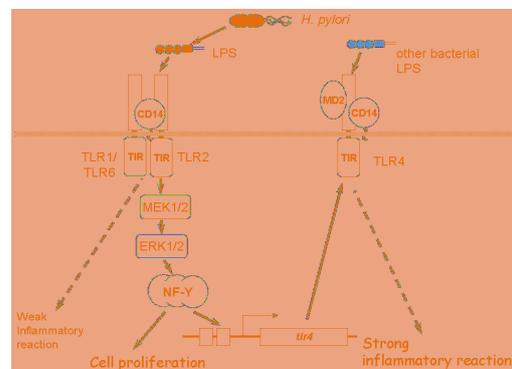


図 3. *H. pylori* LPS の胃上皮細胞に対する作用

(4) ピロリ菌 LPS 上のヒトに対してドミナントに働く 2 種のエピトープに關する糖残基を検討した。ヒト血清中抗体の LPS への ELISA での結合に対する単糖および単糖のメチルグルコシド添加による阻害活性を検討した。高抗原性エピトープ保有 LPS への結合はメチル-N-アセチル-グルコサミニドによって強く抑制され、 β 結合の方がより強く阻害した (図 4)。さらに肺炎球菌由来 β -N-アセチル-グルコサミニダーゼ処理により、高抗原性エピトープを認識する抗体の反応性が低下し、逆に低抗原性エピトープを認識する抗体の反応性の有意な上昇を認めた。一方、低抗原性エピトープ保有 LPS に対する抗体の結合は、ガラクトースおよび N-アセチル-ガラクトサミンで有意に強い阻害が認められた。また、*Aspergillus* 由来の β -ガラクトシダーゼ処理により、低抗原性エピトープ保有 LPS に対する抗体の反応性が低下した。以上の結果から、高抗原性エピトープには、 β -N-アセチル-グルコサミン残基が關与しており、この糖残基が欠失することで露出する β -ガラクトース残基が低抗原性エピトープに關与していることが示唆された。



図 4. 単糖および単糖のメチルグルコシドによるヒト血清中抗体の *H. pylori* LPS に対する結合の阻害活性 (競合的 ELISA 法)。GU2 (左) は高抗原性エピトープ保有 LPS、CA2 (右) は低抗原性エピトープ保有 LPS である。競合物質の濃度は、特に明記していない限りは 100 mM で添加した。

(5) LPS に対して結合する宿主のレクチンをスクリーニングし、SP-D が低抗原性エピトープ保有 LPS に対して高抗原性エピトープ保有 LPS に比較して有意に強く結合することを見出した。この結合は、メチル- β -D-ガラクトピラノシド添加によって最も強く阻害された。低抗原性エピトープ保有 LPS 処理に

よる胃癌上皮細胞における大腸菌 LPS 誘導性 IL-8 産生増強は、SP-D 添加によってさらに増強された。低抗原性エピトープに対して SP-D が結合し、ピロリ菌 LPS の生物活性を増強することが示唆された。

(6) 今回の研究により、ピロリ菌 LPS が胃の上皮細胞に対して、強い炎症反応を惹起する素地をつくり、細胞増殖を亢進するという胃癌発症に關わる病原因子となることが示唆された。胃癌由来株に多く見られる低抗原性エピトープ保有 LPS の方が、これらの活性の高いことは非常に興味深い。さらに、非還元末端に位置する β 結合の N-アセチル-グルコサミン残基を含む構造がピロリ菌 LPS でヒトに対してドミナントに働くエピトープであり、低抗原性の LPS はこの残基が欠損していることが示唆された。これはピロリ菌側の宿主抗体応答からの逃避機構のひとつと位置づけることができるが、一方で病原性を上げていることになる。今後は、この β -N-アセチルグルコサミン残基欠失のメカニズムを酵素活性レベルや遺伝レベルで明らかにしていきたい。

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 6 件)

- ① 横田伸一, 今野武津子, 藤井暢弘. *Helicobacter pylori* と鉄欠乏性貧血. 臨床と微生物, 査読無, Vol.38, 2011, pp.21-25
- ② Yokota, S., Okabayashi, T., Rehli, N., Fujii, N., Amano, K. *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides upregulate Toll-like receptor 4 expression and proliferation of gastric epithelial cells via the MEK1/2-ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway. *Infection and Immunity*, 査読有, Vol.78, 2010, pp.468-476
- ③ 横田伸一, 天野憲一, 藤井暢弘. *Helicobacter pylori* リポ多糖の構造および生物活性の特異性に関する研究—発症に關わる病原因子としての役割—. 日本ヘリコバクター学会誌, 査読無, Vol.11, No.2, 2010, pp.53-58
- ④ 今野武津子, 横田伸一, 藤井暢弘. *Helicobacter pylori* の主要な感染経路は母子感染である—random amplified polymorphic DNA fingerprinting 法による検討—. 日本ヘリコバクター学会誌, 査読無, Vol.11, No.2, 2010, pp.59-65

- ⑤ Konno, K., Yokota, S., Suga, T., Takahashi, M., Sato, K., Fujii, N. Predominance of mother-to-child transmission of *Helicobacter pylori* infection detected by random amplified polymorphic DNA fingerprinting analysis in Japanese families, *Pediatric Infectious Disease Journal*, 査読有, Vol.27, 2008, pp.999-1003
- ⑥ Yokota, S., Konno, M., Mino, E., Sato, K., Takahashi, M., Fujii, N. Enhanced Fe ion-uptake activity in *Helicobacter pylori* strains isolated from patients with iron-deficiency anemia. *Clinical Infectious Diseases*, 査読有, Vol.46, 2008, pp.e31-e33

〔学会発表〕(計 12 件)

- ① 横田伸一. ヘリコバクター・ピロリリポ多糖の高抗原性エピトープと低抗原性エピトープの性状解析. 第78回日本細菌学会北海道支部会・第28回日本クラミジア研究会合同学術集会 2010年9月4日. 北海道江別市
- ② 今野武津子. *Helicobacter pylori*関連鉄欠乏性貧血の発症機序に関する菌側要因の検討第71回日本血液学会 2009年10月23日. 京都
- ③ 横田伸一. 低エンドトキシン活性の *Helicobacter pylori* リポ多糖の発癌因子としての可能性—TLR4 発現増強と細胞増殖亢進—第15回ヘリコバクター学会 2009年 9月24-25日. 東京
- ④ 横田伸一. *Helicobacter pylori* リポ多糖の構造および生物活性の特異性に関する研究—発癌に関わる病原因子としての役割—. 15回ヘリコバクター学会 2009年 9月24-25日. 東京
- ⑤ 今野武津子. *H. pylori*感染は母から児への伝播が優位である—Random amplified polymorphic DNA fingerprinting法による検討—第15回ヘリコバクター学会 2009年 9月24-25日. 東京
- ⑥ Yokota, S. Weakly endotoxic *Helicobacter pylori* LPS upregulates Toll-like receptor 4 and host cell proliferation via MEK1/2-ERK1/2 MAP kinase pathway. 15th International Workshop on *Campylobacter*,

Helicobacter and Related Organisms (CHRO2009) 2009年9月4日. Niigata

- ⑦ Yokota, S. *Helicobacter pylori* LPS upregulates TLR4 and host cell proliferation via MEK-ERK pathway. 第82回日本細菌学会 2009年3月12—14日. 名古屋
- ⑧ Yokota, S. Modulation of Toll-like receptor signal transduction by bacteria, virus and self. Regulation in Innate Immunity from Recognition Molecules to Antimicrobial Peptides. 2008年10月28—29日. Sapporo
- ⑨ 横田伸一. 低毒性である *Helicobacter pylori* リポ多糖による Toll-like receptor 4 の発現増強作用の分子機構とその意義. 第14回日本エンドトキシン研究会 2008年10月24—25日. 仙台
- ⑩ 横田伸一. 鉄欠乏性貧血患者由来の *Helicobacter pylori* における鉄取り込み能と増殖速度の亢進第76回日本細菌学会北海道支部学術集会 2008年9月6日. 札幌
- ⑪ 横田伸一. 低毒性である *Helicobacter pylori* リポ多糖による Toll-like receptor 4 の発現増強の分子機構とその意義. 第73回日本インターフェロン・サイトカイン学会 (JCS2008. 自然免疫の最前線) 2008年7月10—12日. 札幌
- ⑫ 今野武津子. 鉄欠乏性貧血患者由来の *Helicobacter pylori* 菌株の鉄取り込み能と増殖速度は増加している—鉄欠乏のない患者由来の菌株との比較—第14回日本ヘリコバクター学会 2008年6月26—27日. 神戸

〔図書〕(計 2 件)

- ① Yokota, S., Amano, K., Fujii, N. *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides as a possible pathogenic factor for gastric carcinogenesis. *Gastritis, InTech-Open Access Publisher, Rijeka, 2011, in press.*
- ② 横田伸一, 藤井暢弘, 天野憲一. ヘリコバクター・ピロリのリポ多糖の発癌に関わる病原因子としての可能性. *エンドトキシン研究 12*, 医学図書出版, 東京, 2009, pp.133-137,

6. 研究組織

(1)研究代表者

横田 伸一 (SHIN-ICHI YOKOTA)
札幌医科大学・医学部・准教授
研究者番号：10325863

(2)研究分担者

藤井 暢弘 (NOBUHIRO FUJII)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号：90133719

岡林 環樹 (TAMAKI OKABAYASHI)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号：10359995

(3)連携研究者

天野 憲一 (KEN-ICHI AMANO)
秋田大学・バイオサイエンス教育・研究
センター・准教授
研究者番号：40113766

(4)研究協力者

今野 武津子 (MUTSUKO KONNO)
札幌厚生病院・小児科・部長