

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659220

研究課題名（和文） 宿主応答攪乱を誘導するヘリコバクターピロリ由来 ncRNA の同定

研究課題名（英文） Identification of *Helicobacter pylori*-derived ncRNAs that induce host response disruption

研究代表者

三室 仁美 (MIMURO HITOMI)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：80396887

研究成果の概要（和文）：感染時に宿主応答を攪乱させる作用を有する、未知のヘリコバクターピロリ (*H. pylori*) エフェクター分子の探索を実施した。その結果、DNA 立体構造を加味した *in silico* 解析からは、エフェクター RNA としての可能性の高い *H. pylori* RNA の同定には至らなかったものの、*H. pylori* 感染によって細胞内の存在量が増大する microRNA を同定した。特に増大が顕著にみられた microRNA は、感染宿主細胞の細胞増殖に影響を与える可能性が示唆された。*H. pylori* 感染時に細胞内で発現量が増大する microRNA は、菌体から RNA が移行するのではなく、主に宿主細胞の発現変動に由来することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to explore effector RNAs in *Helicobacter pylori*, which disrupt host responses. *In silico* analysis revealed that there is no effector RNAs possessing human microRNA-like conformation in *H. pylori* genome sequence. We found that the levels of several microRNAs were increased independent of the bacterial RNA transfer in *H. pylori*-infected epithelial cells. The effect of the identified microRNA increased in *H. pylori*-infected cells was estimated as the cell proliferation of host cells.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 2,900,000 | 870,000 | 3,770,000 |

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、感染症、ヘリコバクターピロリ

1. 研究開始当初の背景

ヘリコバクターピロリ (*Helicobacter pylori*, *H. pylori*) は、ヒトの胃粘膜に持続感染を引き起こす病原細菌であり、胃炎、消化性潰瘍、胃 MALT リンパ腫、胃ガンの発病と関連する。本菌の *cag* pathogenicity island (*cag* PAI) 遺伝子群にコードされている IV 型分泌装置 (Type IV secretion system, TFSS) 構成成分と、この装置を介して感染宿主細胞内に直接分泌される唯一の菌体エフェクタータンパク質 CagA は本菌の病原性に重要であることが基礎および臨床的知見から示唆されている。申請者らは以前から、

感染時の CagA の作用に着目して研究を行っており、CagA が宿主細胞内で結合する多様な分子群と下流シグナルカスケードを明らかにしてきた (Mimuro, H. et al., 2002, *Mol Cell*; Suzuki, M, Mimuro, H., et al., 2005, *JEM*; 2009, *Cell Host & Microbe*)。さらに感染宿主生体内では CagA による転写活性化が、感染胃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の破綻をもたらし、*H. pylori* の長期感染を確立させるメカニズムを解明し (Mimuro, H. et al., 2007, *Cell Host & Microbe*; 2009, *Bioessays*)、宿主転写活性の攪乱が、本菌

の病原性を制御していることを明らかにしてきた。

しかしながら、感染による NF- κ B などの転写活性変動に関する報告は多数あるが、CagA やその他の既知病原因子だけでは活性の全てを説明できないことから、未知のエフェクターの存在が想定されている。申請者らを含め多くの研究者がこれまでに宿主に移行する菌体タンパク質や DNA の網羅的解析を試みているものの、本菌の病巣形成の一端を担うに価する活性を持つ新規エフェクターの報告は未だない。

近年のゲノム科学進歩により、高等生物から *H. pylori* (Sharma et al., **Nature**, 2010) などの細菌に至るあらゆる生物のゲノムから転写された RNA には、mRNA のみではなく、膨大な種類のタンパク質をコードしない non-coding RNA (ncRNA) が存在することが明らかになった。特にヒト ncRNA のうち 20-25nt の一本鎖 RNA である microRNA (miRNA) は、全ゲノムの 6 割程度の発現を制御していると考えられている。

ヒト miRNA の活性責任領域は 7nt 程度と極小さいために、相同配列を含む菌体 ncRNA が存在する可能性が十分予想されること、また、今まで菌体の RNA が宿主に移行するか否かの報告はないことから、*H. pylori* の新規 RNA エフェクターの同定を発意した。

2. 研究の目的

本研究では、感染時に宿主応答を攪乱させる作用を有する、未知の *H. pylori* エフェクター分子を探索することを目的として、次の研究を企図した。(1) *H. pylori* 感染により存在量が増大する宿主 miRNA 配列を同定する。(2) *in silico* 検索により、*H. pylori* がコードする候補 RNA を選定する。(3) 1 と 2 で得られたデータからエフェクターとして作動する可能性のある RNA を選定する。(4) 候補 RNA の宿主作用を検証する。

3. 研究の方法

(1) miRNA microarray 解析

H. pylori と 24 時間共培養した感染胃上皮細胞 AGS 細胞と非感染細胞から、small RNA 画分を含む total RNA を調製した。Total RNA の逆転写反応により cDNA pool を作製した。miRNA 発現プロファイルは、TaqMan Array MicroRNA Cards A (Applied Biosystems) を用いて解析した。

(2) miRNA 発現プロファイル確認

それぞれの miRNA の発現プロファイルは、 $\Delta\Delta$ Ct 法により解析し、U6 発現を内部標準として発現レベルを算出した。

(3) *in silico* 解析

H. pylori 全ゲノム配列中の mature miRNA および stem-loop sequence 配列の有無は、

miRBase

(<http://www.mirbase.org/search.shtml>)

により解析した。

(4) miRNA の宿主細胞における効果

miRNA は宿主細胞内で、相補配列を有する特定の mRNA 配列に結合して発現を抑制する作用を有することが知られている。そこで、miRNA の発現増大によって発現量が変化する mRNA を網羅的に同定解析することで、miRNA による宿主作用を類推することが可能となる。AGS 細胞に 50nM の pre-miRNA Negative control もしくは着目した pre-miRNA を Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) を用いて導入し、*H. pylori* を共培養させた。Total RNA は RNeasy Kit (Qiagen) により精製し、遺伝子発現 profiling は Affymetrix Human Genome U133A Plus 2.0 Array (Santa Cruz) を用いて、47,000 transcripts を解析した。データは GeneSpring GX7.3 (Agilent) で解析した。miRNA seed 配列は、Human TargetScan 5.1 (<http://www.targetscan.org/>) を用いて解析した。

4. 研究成果

H. pylori が胃上皮細胞に付着感染した際に、エフェクター RNA が宿主細胞に注入されて作用を発揮する場合には、宿主内で当該 RNA 量が増大することが考えられる。そこで、*H. pylori* 感染上皮細胞から調製した試料を miRNA microarray 解析に供し、感染により存在量が増大する miRNA を精査した。その結果、複数の miRNA の存在量が増大することが確認できた。

H. pylori のゲノム構造は株間での差異が比較的大きく、可塑性に富んでいるため、ヒトにおいて高病原性を有する *H. pylori* のゲノム配列を基盤として、エフェクター RNA 候補配列を選定する必要がある。従ってヒトの感染症状と類似した胃炎、胃潰瘍、胃癌を呈するスナネズミ感染株 ATCC43504 株のゲノム配列を基本として領域選定を行うのが望ましい。そこでまず、*de novo* 解析により ATCC43504 株の全ゲノム配列情報を得た。さらに、サンガー法による補足データ確認を行い、遺伝子領域予測およびアノテーション解析を遂行した。本ゲノム解析に関しては、新学術領域研究「ゲノム支援」の支援を受けて解析を行った。

次に、解析した全ゲノム配列情報を元に、*in silico* 解析を行った。決定した一次配列情報を元に、まず、mature miRNA と相溶性の高い配列を有する配列を検索した。100% 相同配列を有するものは同定できなかったものの、Score 60 以上の値を有する配列を約 5300 カ所同定した。次に、熱力学的安定性に基づく高次構造予測を行い、ヘアピン構造をとる

ループ/ステム領域を網羅的に選定した結果、約 4900 カ所の配列を同定した。tRNA や rRNA 領域を含む領域候補を除外した後に、ステム部分に相当する位置の塩基に、ヒトの成熟型 miRNA のシード配列と同じものを含む候補を選定した結果、該当する部位は同定できなかった。そこで次に、*H. pylori* 感染により宿主上皮細胞中で存在量が增大することを同定した miRNA の上位 10 種について、相同する配列が *H. pylori* ゲノム配列中に存在するかを検討したが、100%相同の配列は存在しないことが明らかとなった。これらの結果から、*H. pylori* 感染により胃上皮細胞で存在量が增大する miRNA は、*H. pylori* からのエフェクターRNA の注入に起因するのではなく、主に宿主側の発現増大などの理由により増大することが示唆された。

In silico 配列解析に先立ち、*H. pylori* 感染により胃上皮細胞で発現が増大する miRNA について、胃上皮細胞内での宿主作用を検討するために、当該 miRNA 過剰発現細胞によって発現が変動する mRNA を、microarray 解析により精査した。その結果、細胞増殖に関わる因子群の発現が変動することが明らかとなった。

本研究によって、DNA 立体構造を加味した *in silico* 解析からは、エフェクターRNA としての可能性の高い *H. pylori* RNA の同定には至らなかったものの、*H. pylori* 感染によって細胞内の存在量が增大する miRNA を同定した。特に増大が顕著にみられた miRNA は、感染宿主細胞の細胞増殖に影響を与える可能性が示唆された。また、*H. pylori* 感染時に細胞内で発現量が增大する miRNA は、菌体から RNA が移行するのではなく、主に宿主細胞の発現変動に由来することが明らかとなった。

miRNA の seed 配列のごく限局した部分だけを有する RNA であっても、ヒト miRNA 様活性を有する可能性があることから、今後は、*in silico* 解析における cut off 値などの条件をさらに検討する必要がある。また、実際に *in vivo* での感染時に *H. pylori* 菌体内に発現する RNA を解析することで、宿主内で miRNA 様の活性を示す菌体由来 RNA が同定できる可能性が考えられることから、さらに RNA-seq 解析により、新たな病原性に関与する RNA 同定を検討すべきであろう。本研究で同定した、感染細胞内で存在量が增大する miRNA は、これをターゲットとした治療薬やワクチンへの応用転換が期待できる。

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 3 件)

- (1) A bacterial effector targets the TRAF6-NFκB pathway to modulate the acute inflammatory response to bacterial invasion of epithelial cells. Sanada T, Kim M, Mimuro H, Ashida H, Ogawa M, Mizushima T, Sasakawa C. *Virulence*. 2012; 3(6):518-521. doi: 10.4161/viru.21451. 査読有
- (2) Uptake of *Shigella*-containing pseudopodia by neighboring epithelial cells at tricellular junctions via non-canonical clathrin-dependent trafficking pathway. Fukumatsu M, Ogawa M, Kim M, Mimuro H, Sasakawa C. *Virulence*. 2012; 3(6):515-518. doi: 10.4161/viru.21740. 査読有
- (3) Cell death and infection: a double-edged sword for host and pathogen survival. Ashida H, Mimuro H, Ogawa M, Kobayashi T, Sanada T, Kim M, Sasakawa C. *J Cell Biol*. 2011; 195(6):931-42. doi: 10.1083/jcb.201108081. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① Mimuro H, Kiga K, Sasakawa C. “Control of host cell responses by Helicobacter pylori infection” International Union of Microbiological Societies (IUMS) 2011 Congress, 2011 年 9 月 8 日, 札幌コンベンションセンター, 北海道
- ② Mimuro H, Kiga K, Sasakawa C. “Control of host cell responses by Helicobacter pylori infection” 第 85 回日本細菌学会総会, 2012 年 3 月 28 日, 長崎新聞文化ホール, 長崎県

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/Mimuro_Lab/index.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・准教授
研究者番号：80396887

(2) 研究分担者

丸山 史人 (MARUYAMA FUMITO)
東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究
科・准教授
研究者番号：30423122

(3) 連携研究者

無