

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 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：2012～2014

課題番号：24590530

研究課題名(和文)ピロリ菌の発癌に関わる病原因子としてのリポ多糖の多様性

研究課題名(英文) Role on pathogenesis of antigenic diversity of lipopolysaccharides in Helicobacter pylori infection

研究代表者

横田 伸一 (Yokota, Shin-ichi)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：10325863

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヘリコバクター・ピロリのリポ多糖(LPS)は、高抗原性エピトープ保有型と低抗原性エピトープ保有型の2つに分類できる。低抗原性型LPSは、胃由来上皮細胞株での大腸菌LPSによるIL-8誘導を宿主のサーファクタント蛋白質Dと協調して、Toll-like receptor 4の発現を上昇させることにより、産生増強させることを示した。LPSの抗原性は胃癌との関連を認めているが、ピロリ菌感染関連鉄欠乏性貧血発症との関連は見いだせなかった。

研究成果の概要(英文)：Helicobacter pylori lipopolysaccharide (LPS) can divide highly-antigenic epitope-carrying one and weakly-antigenic epitope-carrying one. We found that weakly-antigenic epitope-carrying LPS enhanced Escherichia coli LPS-induced IL-8 production by upregulation of Toll-like receptor 4 expression in cooperation with host surfactant protein D, which specifically interacted with the weakly-antigenic LPS. The weakly-antigenic LPS-carrying H. pylori is more frequently found in gastric tumor than other gastroduodenal diseases. In this study, we did not observe relationship between the antigenicity of LPS and pathogenesis of H. pylori-related iron deficiency anemia.

研究分野：微生物学，免疫学，生化学

キーワード：ヘリコバクター・ピロリ 感染免疫 リポ多糖 炎症 エピトープ 発癌

## 1. 研究開始当初の背景

*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。重要な点は、ピロリ菌が胃に定着し、急性の強い炎症反応を起こすことなく、宿主からは排除されずに長期間にわたって炎症を起こし続けていることである。従って、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。宿主から排除されないことからみてもピロリ菌の炎症反応惹起能は他の病原細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。ピロリ菌のリポ多糖(LPS)は、腸内細菌などの典型的なリポ多糖に比較して、著しく低い生物活性しか示さないことが知られている。だからこそ菌が排除されず長期にわたる病変形成が起こると考えた。通常のエンドトキシン活性が低いことで、病原因子として重要ではないかのごとく考えられているが、申請者らはピロリ菌LPSの病態形成への寄与について明らかにしたいと考えている。私たちは日本のピロリ菌分離株が、LPSのヒトに対する抗原性に基づき高抗原性と低抗原性の2つに分類できることを見出した。さらに低抗原性LPS保有株は胃癌から高頻度に分離された。その他の知見も鑑み、ピロリ菌の初感染では高抗原性型であり、抗原変異が菌交代かはまだ明らかではないが、長期間の感染の間にLPSの病原性のより高い低抗原性型になると考えている。これらLPSのエピトープはO-抗原多糖のメインの繰り返し構造ではなく、多糖の付け根に近い部分に存在し、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、低抗原性エピトープにはβ-ガラクトース残基が重要であると示唆されている。さらに、炎症反応惹起能が高抗原性エピトープ保有LPSに比較して強い低抗原性エピトープ保有LPSが宿主のレクチンであるサーファクタントタンパク質D (SP-D)に結合することを私たちは見出している。

## 2. 研究の目的

本研究では、低抗原性エピトープ保有LPSが高抗原性のものに比較して高い生物活性を示すメカニズムについて明らかにする。糖鎖構造の差が重要であると考えられることから、宿主側のレクチンとLPSの相互作用が重要であると考え、LPSと結合するレクチンのスクリーニングを実施し、LPSの生物活性との関連について明らかにする。高抗原性および低抗原性エピトープの構造研究、これらのエピトープの生成機序についてさらに検討を進める。私たちの作業仮説である「ピロリ菌非感染状態では、TLR4の発現が低いため他の菌のLPSが進入してきても大きな炎症反応は起こらないが、ピロリ菌感染によってそのLPSがTLR4の発現を誘導することで炎症反応を誘導させやすい状態にする。」を検証するために、

TLR4の発現に着目してLPSの役割を明らかにしていく。さらに、ひとつの菌株におけるエピトープ発現の変化を検討するため、同一菌株が家族内で感染している事例、同一患者で長期間経過後に菌が再分離できた事例における分離菌株の遺伝的同一性とエピトープ発現について検討する。さらに、胃十二指腸疾患以外のピロリ菌感染関連疾患、例えば鉄欠乏性貧血などについて、LPSの抗原性の関連性について患者由来菌株のエピトープ発現を検討する。

## 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には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は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。生物活性検討にはLPS標品にリポ蛋白質や核酸などのLPS以外のTLRアゴニストが混入しないように、従来法による標品をさらにprotein phospholipases, DNase, RNase, proteinase Kで処理後、Octyl-Sepharose疎水クロマトグラフィーによって精製した高純度LPS標品を用いた。MKN28, MKN45細胞に高純度ピロリ菌LPSを処理し、TLR4など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。さらに、低抗原性エピトープ保有LPSとの相互作用が明らかとなっているリコンビナントヒトSP-Dの添加効果を検討した。

高抗原性エピトープ、低抗原性エピトープの存在は、私たちが開発した方法[Yokota et al. Infect. Immun. (2000)]に従い、各々のエピトープに対する抗体を特異的にもつヒト血清の反応性をELISA法、イムノブロット法によって検討した。α1-6-グルカン鎖の存在は、Altmanらによって樹立されたモノクローナル抗体[Harrison et al. Helicobacter (2011)]の供与を受けて、ELISA法により検討した。

ピロリ菌が分離された小児患者およびその家族(父母兄弟)由来の菌株、同一患者からの複数の分離菌株、鉄欠乏性貧血患者および貧血症状の認められない患者由来の菌株は、胃内視鏡によるバイオプシー、もしくは胃液から分離した[Toita et al. Gastroenterol. Res. Pract. (2013), Yokota et al. Clin. Infect. Dis (2008)]。菌株の遺伝的同一性は、random amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCRによるfingerprinting、およびmultilocus sequence typing (MLST)法によった。

## 4. 研究成果

(1) 低抗原性エピトープ保有LPS刺激に対する宿主細胞の反応に対するサーファクタン

ト蛋白質の影響 .

私たちは低抗原性保有 LPS に SP-D が結合すること、結合部位にエピトープである  $\beta$ -ガラクトース残基が重要であることを示している。本研究では、LPS による胃の上皮細胞株 MKN28, MKN45 からの IL-8 産生誘導に対する SP-D 添加効果を調べた。低抗原性エピトープ保有 LPS 刺激による IL-8 の産生誘導は SP-D タンパク質共存下で有意に増強された。さらに低抗原性エピトープ保有 LPS 前処理後に大腸菌 LPS を作用させると、大腸菌 LPS 単独刺激に比較して IL-8 産生の増強を認めるが、その作用は SP-D の共存により著明に上昇した (図-A)。一方で高抗原性エピトープ保有 LPS は、それ単独あるいは大腸菌 LPS の共刺激による IL-8 誘導能は低かった。高抗原性エピトープ保有 LPS の低い IL-8 誘導は SP-D 添加によっても有意な上昇を認めなかった。さらに、低抗原性エピトープ保有 LPS には、MKN28, MKN45 細胞の増殖を亢進させる作用があるが、SP-D の共存により、細胞増殖亢進も増強された。

ピロリ菌 LPS 刺激による TLRs の発現を検討した (図-B)。低抗原性エピトープ保有 LPS により有意な TLR4 の発現上昇が認められた。さらに SP-D との共刺激により TLR4 の発現上昇が著明に増強した。

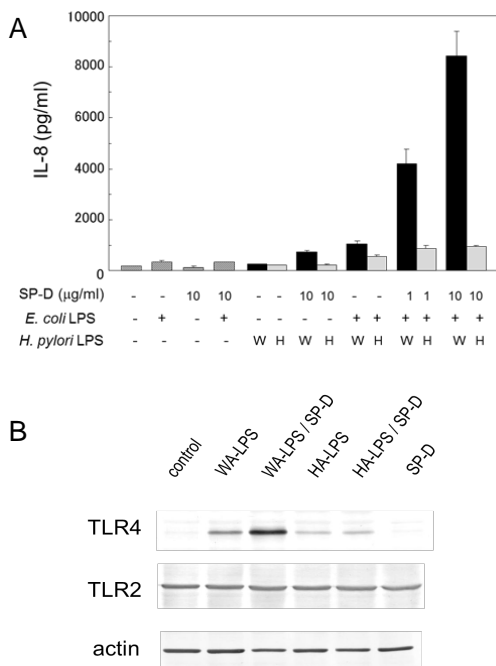


図 . 胃由来上皮細胞株 MKN28 のピロリ菌 LPS による前処理、およびそれに SP-D を共存させた時の細胞の変化 . A: 大腸菌 LPS 刺激による IL-8 産生誘導 . B: TLR4, TLR2 タンパク質の発現 W, WA-LPS: 低抗原性エピトープ保有 LPS . H, HA-LPS: 高抗原性エピトープ保有 LPS .

以上の結果から、SP-D が低抗原性エピトープ保有 LPS に結合することによって胃上皮細胞の TLR4 発現が上昇するために、大腸菌 LPS に対する反応性などの活性が増強されることが示唆された。

(2) ピロリ菌 LPS における  $\alpha$ 1-6-グルカン鎖の分布 .

これまでに抗原性を解析してきた LPS について、 $\alpha$ 1-6-グルカン鎖の存在をモノクローナル抗体で検討したところ、36 株中 1 株のみで  $\alpha$ -グルカン鎖の存在を確認した。 $\alpha$ -グルカン鎖は海外の菌株では比較的頻度高く認められる。今回の結果から、 $\alpha$ -グルカン鎖は、日本の臨床分離株では発現頻度が低く、高抗原性および低抗原性エピトープとの関係はないと考えられた。

(3) 同一患者から得られた複数の分離株、および家族内感染の菌株における LPS エピトープの検討 .

同一患者の複数検体 (胃体部, 幽門部, 胃液) から得られた菌株、および最初の分離から長期間 (5~9 年) 経過後に分離された 3 例の菌株の LPS の抗原性について検討した。菌株の遺伝的な同一性は RAPD-PCR 法によって確認した。また、ピロリ菌が分離された小児患者 35 例について、その父母と兄弟についても菌株の分離を行い、遺伝子的同一性を RAPD-PCR 法と MLST 法によって検討した。同一患者から得られた菌株間、遺伝子的同一性が示された家族内感染株間において、LPS の抗原性、すなわち保有するエピトープには変化がなく、LPS の高抗原性エピトープと低抗原性エピトープはピロリ菌において安定した表現型であることが示唆された。

(4) 鉄欠乏性貧血患者由来菌株の解析 .

鉄欠乏性貧血患者由来菌株 (IDA 株) 24 株と貧血症状のない胃十二指腸疾患患者由来の菌株 (non-IDA 株) 25 株を用いた。鉄取り込みに関与している遺伝子のうち、菌内膜の鉄取り込み装置構成蛋白質のひとつである FeoB、菌体外で鉄の運搬に関与している neutrophil activating protein A (NapA)、および鉄取り込みに関わる多くの遺伝子の発現のリプレッサーである ferric upregulator (Fur) について、mRNA の発現量を検討したが、IDA 株と non-IDA 株の 2 群間で有意差が認められなかった。そこで塩基配列の比較を行った。NapA では 144 アミノ酸残基中、4 箇所の polymorphism が認められた。そのうち 70 番目のアミノ酸は、IDA 株 24 株中 18 株で Thr であった。一方、non-IDA 株 25 株では 6 株のみが Thr 型であり、両群間で出現頻度に有意な差が認められた。Fur は 150 アミノ酸残基中 7 箇所に、FeoB は 642 アミノ酸残基中に 70 箇所以上に polymorphism を認めたが、IDA 株群と non-IDA 株群間で出現頻度に有意な差のあるものは認めなかった。

LPSの抗原性については、高抗原性エピトープ保有株、低抗原性エピトープ保有株の出現頻度はIDA株とnon-IDA株との間で有意な偏りを認めず、LPSの抗原性と鉄欠乏性貧血発症リスクには関連性は見出せなかった。

#### 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 8件)

Yokota S, Amano K, Nishitani C, Arika S, Kuroki Y, Fujii N. Implication of antigenic conversion of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides that involve interaction with surfactant protein D. 査読有、Infection and Immunity, Vol. 80, No. 8, 2012, p. 2956-2962.  
DOI: 10.1128/IAI.00345-12

Amano K, Yokota S, Monteiro MA. Comparison of the serological reactivity of lipopolysaccharides from Japanese and Western strains of *Helicobacter pylori* to sera from *H. pylori*-positive humans. 査読有、ISRN Microbiology, Vol. 2012, 2012, Article ID 162816.  
DOI: 10.5402/2012/162816.

Yokota S, Toita N, Yamamoto S, Fujii N, Konno M. Positive relationship between a polymorphism in *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein A gene and iron-deficiency anemia. 査読有、Helicobacter, Vol. 18, No. 2, 2013, p. 112-116.  
DOI: 10.1111/hel.12011.

Toita N, Yokota S, Fujii N, Konno M. Clonality analysis of *Helicobacter pylori* in patients isolated from several biopsy specimens and gastric juice in a Japanese urban population by random amplified polymorphic DNA fingerprinting. 査読有、Gastroenterology Research and Practice Vol. 2013, 2013, Article ID 721306.  
DOI: 10.1155/2013/721306.

今野 武津子、戸板 成昭、横田 伸一、*H. pylori* 感染症関連疾患と除菌治療の意義・鉄欠乏性貧血、査読無、日本臨床、Vol. 71, No. 8, 2013, p. 1462-1466.

今野 武津子、横田 伸一、高橋 美智子、藤原 伸一、大崎 敬子、神谷 茂、日本人小児の最近のピロリ菌感染率と感染経路について意義、査読無、日本ヘリコバクター学会誌、Vol. 15, No. 2, 2014, p. 68-74.

横田 伸一、今野 武津子、ヘリコバクター・ピロリ感染症と鉄欠乏性貧血、査読無、臨床と微生物、Vol. 42, No. 2, 2015, p. 165-170.

Yokota S, Konno M, Fujiwara S, Toita N, Takahashi M, Yamamoto S, Ogasawara N, Shiraishi T. Intrafamilial, preferentially mother-to-child and intrasporousal, *Helicobacter pylori* infection in Japan determined by multilocus sequence typing and random amplified polymorphic DNA fingerprinting. 査読有、Helicobacter. 2015, 印刷中。  
DOI: 10.1111/hel.12217.

[学会発表](計 8件)

横田 伸一、*Helicobacter pylori* リポ多糖のエピトープと生物活性の関連、北海道腸内細菌叢研究会平成 24 年度研究報告会、2012 年 9 月 27 日、ガーデンパレスホテル(北海道・札幌市)

横田 伸一、ピロリ菌リポ多糖とサーファクタント蛋白 D の相互作用と生物活性の関連、第 79 回日本細菌学会北海道支部会、2012 年 9 月 28-29 日、とかちプラザ(北海道・帯広市)

今野 武津子、北海道 K 町における感染実態ならびに感染経路に関するこれまでの当科での成績、第 19 回日本ヘリコバクター学会、2013 年 6 月 28-29 日、長崎大学医学部(長崎県・長崎市)

横田 伸一、小児鉄欠乏性貧血患者由来ピロリ菌に高頻度に認められる NapA の polymorphism、第 19 回日本ヘリコバクター学会、2013 年 6 月 28-29 日、長崎大学医学部(長崎県・長崎市)

横田 伸一、小児鉄欠乏性貧血患者由来のピロリ菌に高頻度に認められた neutrophil activating protein A (NapA) の polymorphism、第 80 回日本細菌学会北海道支部会、2013 年 8 月 30-31 日、東京農業大学オホーツクキャンパス(北海道・網走市)

横田 伸一、感染と鉄欠乏性貧血の関連について、北海道腸内細菌叢研究会平成 25 年度研究報告会、2013 年 10 月 17 日、ガーデンパレスホテル(北海道・札幌市)

戸板 成昭、単一宿主における胃内の *Helicobacter pylori* の clonality の検討、第 20 回日本ヘリコバクター学会、2014 年 6 月 28-29 日、東京ステーションコンファレンス(東京都・千代田区)

藤原 伸一、都市と農村における小児の  
*Helicobacter pylori* 感染率と感染経路に関  
する研究、第 63 回日本農村医学会、2014  
年 11 月 13-14 日、つくば国際会議場（茨  
城県・つくば市）

〔図書〕（計 1 件）

横田 伸一、天野 憲一、西谷 千明、  
有木 茂、黒木 由夫、藤井 暢弘、医  
学図書出版、エンドトキシン・自然免疫  
研究 15—飛躍する自然免疫研究—、2012、  
pp. 1-6.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

6. 研究組織

(1)研究代表者

横田 伸一 (YOKOTA, Shin-ichi)  
札幌医科大学・医学部・教授  
研究者番号：10325863

(2)研究分担者

山本 聡 (YAMAMOTO, Soh)  
札幌医科大学・医学部・助教  
研究者番号：10588479

藤井 暢弘 (FUJII, Nobuhiro)  
札幌医科大学・医学部・教授  
研究者番号：90133719  
(平成 25 年 4 月 17 日辞退)

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

今野 武津子 (KONNO, Mutsuko)  
札幌厚生病院・小児科

藤原 伸一 (FUJIWARA, Shin-ichi)  
札幌厚生病院・小児科

戸板 成昭 (TOITA, Nariaki)  
札幌厚生病院・小児科