

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 11 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293104

研究課題名(和文)ピロリ菌感染症による胃腫瘍発症機構の解明

研究課題名(英文) Search for mechanisms how Helicobacter pylori infection causes gastric cancer

研究代表者

山岡 吉生 (YAMAOKA, YOSHIO)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：00544248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：野生株感染gp130F759マウスは、菌の種類にかかわらず(TN2GF4株およびSS1株を使用)、感染に成功、SS1株に比べて、TN2GF4株感染マウスで高度炎症が引き起こされた。TN2GF4株は、東アジア由来の菌で、SS1は欧米由来の菌であり、東アジア菌が欧米菌に比べて病原性が強いことを支持する結果であった。一方、oipA変異株は全く感染に成功しなかったから、OipAが感染成立、すなわち胃粘膜への菌の接着にも重要な役割を果たしていることが分かった。ピロリ菌の膜タンパク質複合体の解析では、OipAを含む病原性因子群が、ピロリ菌の細胞膜上において複合体を形成していることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Helicobacter pylori (both strains TN2GF4 and SS1) could colonize gp130F759 mice, and mice infected with strain TN2GF4 showed severer inflammation than those with strain SS1. Strain TN2GF4 was East Asian-type and strain SS1 was Western-type, supporting the hypothesis that East Asian-type strains were more virulent than Western-type strains. Somewhat surprisingly, isogenic oipA mutants could not colonize the mice, suggesting that OipA plays important roles on colonization and the attachment of H. pylori to the epithelial cells. We also performed the analyses using outer membrane proteins of H. pylori, and showed that OipA formed virulent complex with other unknown virulence factors on the H. pylori surface.

研究分野：消化管感染症

キーワード：ヘリコバクター・ピロリ 病原因子 胃癌

1. 研究開始当初の背景

ピロリ菌感染は消化性潰瘍や胃癌の原因と考えられているが、感染者すべてが消化性潰瘍や胃癌になるわけではない。この原因として、多様な菌側の病原因子が関与していると考えられる。私は以前、Cytotoxin associated gene product (CagA) 産生菌に感染すると、非産生菌例に比べ、より多くの炎症性サイトカインが胃粘膜より産生されていることを発見し、その後、新しい炎症性サイトカイン誘導因子を発見し、Outer inflammatory protein (OipA) と命名した (Yamaoka et al. PNAS 2000)。私は、OipA および CagA による細胞内シグナル伝達機構に関して、胃上皮細胞を用いた *in vitro* の検討も行い、OipA は signal transducer and activator of transcription (STAT)1/3 → interferon-stimulated responsive element (ISRE) 経路および extracellular signal-regulated kinase (ERK) → activator protein 1 (AP-1) 経路の活性化に関与し、CagA は上皮細胞間バリアが断裂された後に基底膜側から細胞内に注入され SHP-2 への結合を介して ERK → AP-1 経路を活性化することを示した。*in vitro* の系では、ピロリ菌感染により、ERK → AP-1 経路は 2 峰性に活性化し、最初の活性は OipA 依存性 (CagA 非依存性) であるのに対し、2 度目は OipA と CagA の両方に依存する。私はさらにピロリ菌感染スナネズミでも、ERK → AP-1 経路は感染 3 カ月と 9 カ月目に 2 峰性のピークを迎え、胃粘膜炎症の程度も両時期に最も高度になることを証明しており (Gastroenterology 2007)、*in vitro* の現象が *in vivo* の現象を反映する可能性が高い。以上の背景より、実際の胃粘膜傷害において OipA は STAT1/3 → ISRE 経路および ERK → AP-1 経路の活性化に関与し、一方 CagA は慢性期での SHP-2 との結合を介して ERK → AP-1 経路に関与すると仮説した。その証明のためには、適切な動物モデルが必要であった。

2002 年、オーストラリアの Ernst らによって、画期的な胃腫瘍発症マウスモデルが報告された。このマウスは、IL-6 ファミリーのレセプター (gp130) 上の SHP-2 結合部位が欠損したノックインマウスである。gp130 には SHP-2 結合部位の他に、STATs 結合部位 (YXXQ モチーフ) が 4 つ存在し、SHP-2 結合部位欠損マウスでは、SHP-2 → ERK → AP-1 経路が欠落しており、そのため STAT1/3 の過剰活性化が引き起こされる。このマウスモデルでは、ピロリ菌などの感染なしに、自発的に炎症および dysplasia を伴う胃前庭部の高増殖性腫瘍を発症した。前庭部腫瘍は 4 週に明白になり、30 週後に粘膜下侵入もみられた。

ところが興味深いことに、大阪大学の平野らは、同様に gp130 上で SHP-2 結合部位が欠損し、STAT1/3 の過剰活性化を認めるノックインマウスを作成したが、このマウスでは 1 年以上の観察でも胃に明らかな肉眼的異常を認めなかった (J Exp Med 2002)。このマウス

は、ヒト gp130 における SHP-2 結合部位 (チロシン 759) をフェニルアラニンに置換させて作成したモデルである (以下 gp130^{F759} マウス)。

私は、gp130^{F759} マウスにピロリ菌を感染させれば、腫瘍形成が起こるのではないかとの仮説をたて、大阪大学より gp130^{F759} マウスを入手し、予備実験を行った。ピロリ菌野生株 CPY2052 を gp130^{F759} マウスに感染させ、6 ヶ月後に観察を行った (n=3) ところ、2 匹は胃全体にわたる高度の炎症細胞浸潤を伴った過形成胃粘膜を認め、1 匹は胃体部に異形成を伴う腫瘍を認めた。なお同じヘリコバクター属である *H. felis* を感染させた gp130^{F759} マウスでは、腫瘍形成はみられず、腫瘍形成がピロリ菌因子によるものであることが確認された。Immunoblot の結果、胃粘膜の ERK のリン酸化は、非感染 gp130^{F759} マウスでは認めず、ピロリ菌感染で著明に上昇した。すなわちピロリ菌感染により、gp130 を介さない ERK → AP-1 経路の活性化が起こっていると考えられた。また STAT3 のリン酸化は、非感染 gp130^{F759} マウスでも著明であったが、ピロリ菌感染ではさらに上昇した。本研究では gp130^{F759} マウスに、*oipA* および *cagA* の各種変異株を感染させる計画で、OipA および CagA の役割が明確になると考える

2. 研究の目的

胃上皮細胞を用いた *in vitro* の系では OipA は STAT1/3 経路および ERK 経路の活性化に関与し、CagA は SHP-2 への結合を介して ERK 経路に関与する。しかし OipA と CagA の *in vivo* での役割は確定されていない。本研究では、IL-6 ファミリーのレセプターである gp130 上の SHP-2 結合部位が欠損したノックインマウス (SHP-2 → ERK 経路は欠落し、STAT1/3 経路は過剰活性化) に *oipA* および *cagA* 遺伝子を変異させたピロリ菌を感染させて、腫瘍形成を観察し、さらに分子生物学的手法を用いて、OipA と CagA の *in vivo* での役割を探求することを目標とする。

3. 研究の方法

1) gp130^{F759} マウス感染実験
gp130^{F759} マウスに、野生株ピロリ菌および *oipA* 遺伝子および *cagA* 遺伝子の変異菌を感染させて、短期間 (1, 3 カ月) から 1 年半の長期間にわたって胃粘膜炎症の有無、さらには腫瘍形成の有無、種類、部位を特定する。さらに ERK → AP-1 経路 および STAT1/3 → ISRE 経路に関与する因子を mRNA レベルおよびタンパクレベルで、分子生物学的手法を駆使して測定し、OipA および CagA が胃粘膜傷害、特に腫瘍形成において果たす役割を解明する。さらに、OipA および CagA の特定部位のアミノ酸変異が腫瘍形成に関与するとの仮説のもと、OipA では DRY motif、CagA では C 末端側の繰り返し配列に注目した相補性変異株を用いた検討を行なう。

2) rOipA タンパク質の発現・精製

26695 株から N 末端に 6×His タグをつけた全長 OipA 遺伝子をクローニングし in vitro 発現系と大腸菌発現系で rOipA タンパク質発現を行う。

4. 研究成果

1) gp130^{F759} マウス感染実験

野生株感染マウスは、菌の種類にかかわらず (TN2GF4 株および SS1 株を使用) 感染に成功、SS1 株に比べて、TN2GF4 株感染マウスで高度炎症が引き起こされた。TN2GF4 株は、東アジア (日本) 由来の菌で、SS1 は欧米 (オーストラリア) 由来の菌であり、東アジア菌が欧米菌に比べて病原性が強いことを支持する結果であった。

一方、*oipA* 変異株は全く感染に成功しなかった。以前の砂ネズミ感染実験では、*oipA* 変異株が感染成立しなかったという報告があるが、我々のマウス (野生株マウス) を用いた感染実験では、感染成立しており (ただし菌量は野生株感染に比べて有意に減少) (Yamaoka Y. et al. Gastroenterology 2002) やや予想外の結果であったが、OipA が感染成立、すなわち胃粘膜への菌の接着にも重要な役割を果たしていることが分かった。

そこで、OipA の役割をさらに詳しく調べるため、OipA の精製に取り組んだ。一般的に膜タンパク質の精製は困難を極めるが、様々な条件を駆使して、大腸菌を用いて **全長の recombinant OipA (rOipA) の精製に成功**した (図 1)。精製標品の円二色性スペクトルの測定結果から、得られた精製 rOipA は未変性状態であり、二次構造も明らかとした (図 2)。この精製標品を胃上皮細胞 (AGS 細胞株) の培養液中に添加したところ、IL-8 の産生誘導は確認できなかったが、マイクロアレイの結果からアクチン細胞骨格の再構成を誘導することを示した (投稿準備中)。

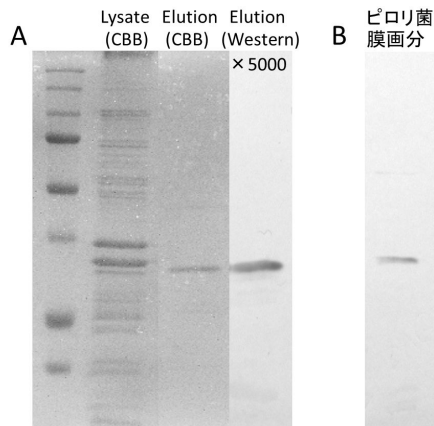


図1: A) E.coli lysateから6×Hisタグを用いたアフィニティー精製で、rOipAを精製し、抗OipA抗体に認識された。B)ピロリ菌の膜画分に對しても抗OipA抗体は高力価でOipAを特異的に認識した。

さらに、円二色性スペクトルによる二次構造

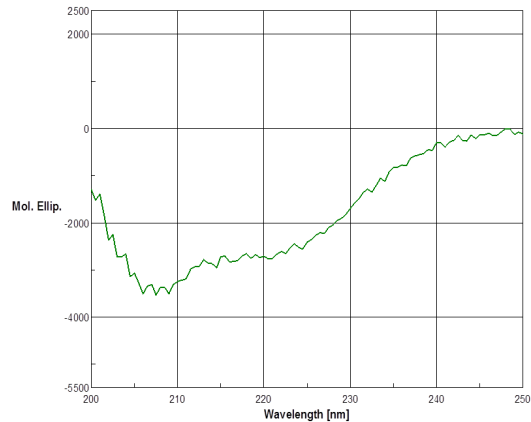


図2: 円二色性スペクトルでの二次構造解析 rOipAは43%のランダム構造を含んでいた

の解析から OipA はランダム構造に富んでいることが分かった (図 2)。ランダム構造は他の分子と結合することで、安定的な二次構造をとることが知られている。そこで、ピロリ菌の膜タンパク質複合体の解析を行った。手法は、タンパク質間の弱い相互作用、つまり四次構造および高次構造を保持したまま、タンパク質複合体を分離できる High Resolution Clear Native PAGE (hr-CN-PAGE)を用いた。そして、1次元目に hr-CN-PAGE で複合体を分離した後、2次元目に SDS-PAGE を行うことで、各々の複合体を構成する分子を分離することに成功した (図 3)。抗 OipA 抗体をはじめとした、各種病原因子に対する抗体を用いたウエスタンブロットにより一部のスポットをすでに同定できており、**OipA を含む病原因子群が、ピロリ菌の細胞膜上において複合体を形成している**ことを見出している (図 3)。

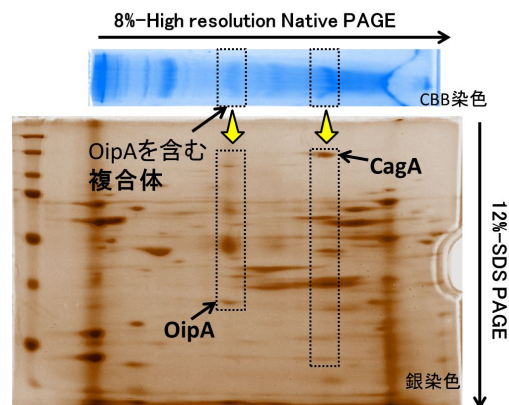


図3: ピロリ菌膜タンパク質複合体の二次元展開 OipAとCagAは他の分子と複合体を形成していた

なお、この膜領域に存在する複合体の中で、分泌型毒素である CagA の同定にも成功しており、病原因子が密接に相互作用しているという仮説を示唆するものである。

以上より、**未知の因子を含めて、OipA などのピロリ菌病原因子が高次構造を保持して構成する複合体を「ピロリ菌病原因子複合体」とみなすことが可能であると結論付けることができた**。現在、この複合体の機能解析を、新たに得られた基盤 (B) 研究にて遂行

中である。

さらに、私の研究室では、アジア各国や中米のピロリ菌のストックが存在しており、これらの臨床株における病原因子のタイピング、さらには胃粘膜からのサイトカイン産生についても検討することができ、東アジア菌が欧米菌に比べて病原性が強いことは、基本的には事実であるが、モンゴルの菌は、欧米型を示し、確かに胃粘膜炎症は少ないが、胃癌が多いなどの様々な問題点も見出すことができ、これらの成果は基盤(A)海外、採択につながり、研究を遂行中である。

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 87 件; うち英文 57 件)

Matsunari O, Miftahussurur M, Shiota S, Suzuki R, Vilaichone RK, Uchida T, Ratanachu-Ek T, Tshering L, Mahachai V, Yamaoka Y. Rare *Helicobacter pylori* virulence genotypes in Bhutan. *Sci Rep*. 2016; 6:22584. doi: 10.1038/srep22584. 査読あり

Tegtmeyer N, Moodley Y, Yamaoka Y, Pernitzsch SR, Schmidt V, Traverso FR, Schmidt TP, Rad R, Yeoh KG, Bow H, Torres J, Gerhard M, Schneider G, Wessler S, Backert S. Characterisation of worldwide *Helicobacter pylori* strains reveals genetic conservation and essentiality of serine protease HtrA. *Mol Microbiol*. 2016; 99:925-44. doi: 10.1111/mmi.13276. 査読あり

Sgouras DN, Trang TT, Yamaoka Y. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter*. 2015; 20 Suppl 1:8-16. doi: 10.1111/hel.12251. 査読あり

Uotani T, Miftahussurur M, Yamaoka Y. Effect of bacterial and host factors on *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 2015; 19:1637-50. doi: 10.1517/14728222.2015.1073261. 査読あり

Binh TT, Suzuki R, Trang TT, Kwon DH, Yamaoka Y. Search for novel candidate mutations for metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* using next-generation sequencing. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015; 59:2343-8. doi: 10.1128/AAC.04852-14. 査読あり

Nagashima H, Iwatani S, Cruz M, Jiménez Abreu JA, Tronilo L, Rodríguez E, Disla M,

Terao H, Uchida T, Mahachai V, Vilaichone RK, Tshering L, Mitsui T, Shiota S, Graham DY, Yamaoka Y. Differences in interleukin 8 expression in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa tissues from patients in Bhutan and the Dominican Republic. *Hum Pathol*. 2015; 46:129-36. doi: 10.1016/j.humpath.2014.10.006. 査読あり

Hanada K, Yamaoka Y. Genetic battle between *Helicobacter pylori* and humans. The mechanism underlying homologous recombination in bacteria, which can infect human cells. *Microbes Infect*. 2014; 16:833-9. doi: 10.1016/j.micinf.2014.08.001. 査読あり

Iwatani S, Nagashima H, Reddy R, Shiota S, Graham DY, Yamaoka Y. Identification of the genes that contribute to lactate utilization in *Helicobacter pylori*. *PLoS One*. 2014; 9:e103506. doi: 10.1371/journal.pone.0103506. 査読あり

Hanada K, Uchida T, Tsukamoto Y, Watada M, Yamaguchi N, Yamamoto K, Shiota S, Moriyama M, Graham DY, Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* infection introduces DNA double-strand breaks in host cells. *Infect Immun*. 2014; 82:4182-9. doi: 10.1128/IAI.02368-14. 査読あり

Yamaoka Y, Graham DY. *Helicobacter pylori* virulence and cancer pathogenesis. *Future Oncol*. 2014; 10:1487-500. doi: 10.2217/fon.14.29. doi: 10.2217/fon.14.29. 査読あり

Lind J, Backert S, Pfeleiderer K, Berg DE, Yamaoka Y, Sticht H, Tegtmeyer N. Systematic analysis of phosphotyrosine antibodies recognizing single phosphorylated EPIYA-motifs in CagA of Western-type *Helicobacter pylori* strains. *PLoS One*. 2014; 9:e96488. doi: 10.1371/journal.pone.0096488. 査読あり

[学会発表](計 46 件 うち招待講演 25 件)

Yamaoka Y. Molecular epidemiology of *Helicobacter pylori* in ASEAN countries: Focused in Indonesia. KONKERPAS PPHI-PGI-PEGI2015. (2015年8月16日). 招待講演、マラン、インドネシア

Yamaoka Y, Jimenez A Joze, Modesto Cruz. Molecular epidemiology of *Helicobacter pylori*: association between *H. pylori* and disease outcomes. XII Congreso Centroamericano y del Caribe de parasitología y Medicina Tropical. (2015年6

月13日) 招待講演、プンタカナ、ドミニカ共和国

Yamaoka Y. Self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: the organoids. XI Congreso Internacional de Investigacion cientifica. (2015年6月10日)招待講演、サントドミンゴ、ドミニカ共和国

Yamaoka Y. The diversity of *Helicobacter pylori*: correlation to laboratory diagnosis. 9th National Symposium & Workshop of Indonesia Antimicrobiol Resistance Watch and Annual Scientific Meeting of Indonesian Society for Clinical Microbiologist (2014年11月29日)招待講演、ジャカルタ、インドネシア

Yamaoka Y. Genomic diversity of *Helicobacter pylori* in Asia. Asian Pacific Digestive Week (2014年11月22日)招待講演、バリ島、インドネシア

Yamaoka Y. Self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: the organoid. 4th Mongolian Digestive Disease Week (2014年6月18日)招待講演、ウランバートル、モンゴル

Yamaoka Y. Does the difference of CagA phenotype explain the geographic differences in gastric cancer incidence?. 4th Mongolian Digestive Disease Week (2014年6月18日)招待講演、ウランバートル、モンゴル

Yamaoka Y. The relations of bacterial and host factors in *Helicobacter pylori* infected gastric mucosa. X Congreso Internacional e Investigacion Cientifica. (2014年6月12日)招待講演、サントドミンゴ、ドミニカ共和国

Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* genomes: from pathogenesis to tool for human migration. The 87th Annual meeting of Japanese Society for Bacteriology (2014年3月28日)招待講演、東京(タワーホール船堀)

Yamaoka Y. Carcinogenesis of *Helicobacter pylori* infection. The 3rd Dong-A International Medical Symposium (2014年2月8日)招待講演、釜山、韓国

Yamaoka Y. Genotypes of *Helicobacter pylori* in Asian countries. Mongolia-Japan joint symposium for *Helicobacter pylori* (2013年11月22日)招待講演、ウランバートル、モンゴル

山岡吉生、ピロリ菌感染症の臨床と研究。第303回日本内科学会地方会 生涯教育講演会(2013年11月17日)招待講演、那覇、沖縄県(ロワジュールホテル&スパタワー那覇)

Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* genotypes in Asian countries. XXVIth International Workshop on *Helicobacter pylori* and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer (2013年9月14日)招待講演、マドリード、スペイン

Yamaoka Y. The Mongolian gerbil model. XXVIth International Workshop on *Helicobacter pylori* and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer (2013年9月12日)招待講演、マドリード、スペイン

松尾 祐一、城戸 康年、山岡 吉生。ピロリ菌外膜たんぱく質の Outer inflammatory protein A の精製、第86回日本生化学大会(2013年9月13日)、横浜、神奈川県(パシフィコ横浜)

Yamaoka Y. Genetic characteristics of *Helicobacter pylori* and its relation to gastric cancer. XXII Congreso Nacional de Gastroenterologia (2013年9月7日)招待講演、プンタカナ、ドミニカ共和国

Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* Current status in Dominican Republic 1st phase. (2013年9月7日)招待講演、プンタカナ、ドミニカ共和国

山岡吉生、*Helicobacter pylori* と生体防御。第24回日本生体防除学会(2013年7月11日)招待講演、熊本、熊本県(くまもと森都心プラザ)

〔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

<http://www.med.oita-u.ac.jp/phealth2/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山岡 吉生 (YAMAOKA YOSHIO)

大分大学・医学部・教授

研究者番号: 00544248

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし