

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293095

研究課題名(和文)ヘリコバクターピロリ胃粘膜持続炎症の分子基盤と新規ワクチンへの応用

研究課題名(英文)The molecular basis for persistent inflammation in Helicobacter pylori-infected gastric mucosa and their application to a novel vaccine

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Hpの胃粘膜持続炎症メカニズムの包括的理解と、その成果のワクチン開発への応用を目指して、次の研究を実施した。(1)胃での応答制御機構解析：持続感染の過程で、付着因子BabAの付着機能を制御する新しいメカニズムを同定した。(2)腸管パイエル板での応答制御機構解析：腸管内の嫌気環境下での菌体外膜タンパク質変動を解析し、抗原提示細胞への相互作用に影響を及ぼす候補因子群を同定した。(3)ワクチン解析：スナネズミ感染モデルを用いて、嫌気培養菌による予防ワクチン効果を検証した。

研究成果の概要(英文)：In this study we performed the following studies, to develop a more comprehends understanding of mechanisms underlying persistent inflammation in Helicobacter pylori-infected gastric mucosa, and to try to apply the outcome to vaccine development. (1) Control mechanisms of gastric responses: we have discovered a novel mechanism to regulate adherence function of bacterial adhesin BabA during persistent infection. (2) Control mechanisms of intestinal Peyer's patches: we comprehensively analyzed outer membrane protein profiles of H. pylori under anaerobic conditions, and identified candidate factors for the interaction of bacteria with antigen presenting cells. (3) Vaccine: we analyzed prophylactic vaccine effect of anaerobic cultured bacteria for H. pylori infection using a Mongolian gerbil animal model of H. pylori infection.

研究分野：細菌学

キーワード：持続感染 病原体

1. 研究開始当初の背景

ヘリコバクターピロリ (*Helicobacter pylori*, Hp) は、経口的に幼少期に感染すると胃粘膜に持続感染し、胃炎、消化性潰瘍、胃 MALT リンパ腫、胃癌の原因となる。本菌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、抗生物質とプロトンポンプ阻害薬による除菌治療が行われるが、抗生物質治療に対する薬剤耐性菌の出現の危険性は常につきまとうことから、ワクチンの潜在的ニーズは非常に高い。Hp は胃疾患の原因菌であり、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、リンパ球の浸潤を特徴とする胃炎を誘発する。しかしながら 2010 年に突発性血小板減少症紫斑病に対する除菌治療も保険適用となったことから明らかなように、近年、消化管外病原における本菌の重要性も明らかにされている。また、肝実質細胞や扁桃腺窩にも Hp が存在していることが報告されており、持続感染機構の本質的な理解には、胃のみならず全身の臓器での感染動態を関連づけた解釈が重要である。

申請者らのグループは、Hp 抗原特異的な CD4 陽性 T 細胞が、胃炎の惹起に必要であること、またマウスを用いた実験によって、Hp 抗原による感作は、小腸のパイエル板 (PP) 内部の樹状細胞 (DC) に Hp が捕捉されることで誘導されることを報告した (Nagai, S., Mimuro, H. et al., 2007 **PNAS**)。従来 Hp による胃炎の発症は、胃局所での Hp 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、実際は、腸管内の抗原取り込み器官である PP を介して胃炎が惹起されていた。胃に菌体が定着して初めて感作細胞の胃へのリクルートとそれに続く胃炎が起こることから、Hp 感染症においては、長期間胃に定着する Hp の分子戦略と、PP での菌体抗原提示メカニズムの二つの器官を含む全身的な感染動態を鑑みて理解する必要がある。また、PP は生体での抗原提示に重要な器官であることから、嫌気的環境である腸管内での Hp と PP との相互作用を利用することで、宿主に Hp 防御応答を誘導できる可能性も考えられる。しかしながら、PP 上皮層を通過する Hp と宿主の分子メカニズムや、PP 内部の抗原提示細胞による貪食と抗原提示の分子機構の詳細は未だ明らかにされていない。

Hp は *cag* pathogenicity island (*cag* PAI) と呼ばれる遺伝子群に、IV 型分泌装置 (Type IV secretion system, TFSS) 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 をコードしている。*cag* PAI は本菌の病原性に重要であり、特に前癌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。申請者らは以前から、宿主に Hp が感染した際に CagA が引き起こす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、アポトーシス抑制性タンパク質 MCL1 の発現増大を介して、感染胃上皮細胞のターンオーバーによる宿主の病原菌除去システムの破綻をもたらし、Hp の長期感染を確立させるメカニズムを明らかにした (Mimuro, H. et al., 2007, *Cell Host & Microbe*; 2009, *Bioessays*)。また、菌体と胃上皮の定着に関与する外膜タンパク質 (OMP) の中でも、宿主上皮細胞表面に発現する Lewis b (Le^b) 血液型抗原に特異的に結合する菌体外膜タンパク質 BabA を介した菌体の胃上皮細胞への付着が、TFSS の分泌作用の増大に重要であることを明らかにした (Ishijima, N. et al., 2011, **JBC**)。即ち、PP で Hp 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、CagA、TFSS、および BabA 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、感染後期では菌体因子と宿主上皮発現がドラスティックに変化して、菌体付着に必要な菌体-宿主因子が変動する。これらの菌体と宿主の双方のダイナミックな種々因子の変動を統合的に理解するには、菌体と宿主の発現変動を、感染初期から経時的かつ網羅的に解析することが重要である。また、Hp は胃内の微好気的環境では螺旋状の形態であるが、腸管内の嫌気的条件下では球状の形態に変化することが知られている。酸素分圧による菌体形状の変化は、形のみではなく表面タンパク質などの質的な変化も伴うことは容易に推測できる。したがって、感

染個体全体での Hp と宿主細胞の相互作用を包括的に理解するためには、微好気環境である胃内の菌体と、嫌気環境である腸管内での菌体との質的相違を理解した上で解析する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、Hp の胃粘膜持続炎症メカニズムの包括的理解と、その成果のワクチン開発への応用を目指して、次の研究を実施した。

(1) 胃での応答制御機構解析：スナネズミ感染動物モデルを用いて、感染動物の胃内より Hp を単離調製し、胃での付着に重要な分子を同定する。また、Hp の感染経時的な発現変動に対応した胃上皮発現動態解析により、長期感染機構を解明する。

(2) 腸管パイエル板での応答制御機構解析：嫌気培養 Hp の表面タンパク質の発現プロファイルを、微好気培養 Hp と比較して網羅的に同定解析することで、胃炎惹起に重要な、PP への侵入や PP 内部の DC への貪食に関わる菌体因子の同定を目指す。

(3) ワクチン解析：腸管内での Hp と PP の嫌気培養菌を利用した感染予防ワクチン効果を評価し、予防効果の分子メカニズムを解析する。

3. 研究の方法

(1) スナネズミ持続感染 Hp 株の単離と性状解析

経口的に ATCC43504 株を接種したスナネズミの胃から、定着した Hp を単離培養した。単離した菌体の BabA 付着因子による Le^b 糖鎖との結合能は、Le^b 合成糖鎖固相化プレートに結合する Hp を抗 Hp 抗体で検出する ELISA 系により測定した。菌体表面の Le^b 糖鎖発現強度は、抗 Le^b 抗体を用いたフローサイトメトリーにより解析した。菌体表面の Le^b 糖鎖の除去は、Fucosidase 処理もしくは過ヨウ素酸化反応により実施した。Hp 感染スナネズミの胃内 mRNA 発現は、感染動物の胃から調製した total RNA を用いて定量的 RT-PCR 法により解析した。

(2) Hp 表面タンパク質発現プロファイル解析

螺旋状 Hp は微好気培養によって、また、球状 Hp は、螺旋状 Hp を嫌気環境下で継続培養して調製した。菌体をサルコシン含有緩衝液で処理して、超遠心分離により、サルコシ

ン不溶性画分である膜画分を得た。得られた画分を LC/MS/MS による網羅的ショットガン解析に供し、含まれる Hp 膜タンパク質を同定した。

(3) 遺伝子欠損 Hp 株の確立

同定した因子 X の欠損変異株は、カナマイシン耐性遺伝子を目的 ORF に挿入するようにデザインした DNA 断片をエレクトロポレーション法により Hp に導入し、相同組換えにより目的遺伝子欠損変異株を得た。

(4) Hp 感染予防ワクチン

微好気培養菌もしくは嫌気培養菌菌体をパラフォルムアルデヒドで固定し、アジュバントのコレラトキシンとともにスナネズミに経口投与した。4 回免疫後、微好気培養菌をチャレンジし、8 週間後にスナネズミの胃を摘出し、付着菌数定量および組織標本の炎症評価を行った。

4. 研究成果

(1) 胃での応答制御機構解析

ヒトでの病態に近い慢性胃炎を惹起できるスナネズミを用いた Hp 動物感染を行い、感染 8 週後の胃内定着 Hp を単離培養した。菌体表面付着因子 BabA のリガンドとなる Le^b 糖鎖への、これらの菌の付着効率を測定したところ、菌体の Le^b 結合能が消失した株が多数みられた。Western blot の結果、これらの菌株は BabA タンパク質を発現しているにも関わらず、BabA 依存的 Le^b 結合能を消失していることが明らかとなった。これらの菌体表面の Le^b 糖鎖発現量をフローサイトメトリーにより解析したところ、野生株に比べ著しく Le^b 発現が増大していた。さらに菌体表面の Le^b 糖鎖を Fucosidase 処理もしくは過ヨウ素酸化により除去した菌体では、菌体の Le^b 結合能が復活したことから、Hp は持続感染により、菌体表面糖鎖発現を変動させることで付着因子 BabA の作用を減弱させる新たな付着機構変動メカニズムが明らかになった。一方、Hp 持続感染によりスナネズミ胃上皮において細胞接着分子の発現が増大した。Hp は IV 型分泌装置に依存して当該接着分子と結合することから、Hp は持続感染の過程で、BabA と宿主 Le^b 糖鎖との結合による菌体付着から、IV 型分泌装置と宿主の結合による菌体付着へと経時的に付着機構を変動させることが明らかになった。

(2) 腸管パイエル板での応答制御機構解析

Hp の形態は、微好気環境下の胃内では螺旋状であるが、腸管内の嫌気条件下では球状体に変化する。マウスでは腸管内のパイエル板に嫌気培養体 Hp が効率よく侵入することから (Nagai, S., Mimuro, H. et al., 2007 PNAS)、微好気培養菌および嫌気培養菌の表面タンパク質が腸管での菌体-宿主相互作用を制御する可能性が考えられたため、嫌気および微好気培養菌の膜タンパク質プロファイルの網羅的解析を試みた。表面タンパク質は多くが膜タンパク質であり疎水性に富むため、通常の二次元電気泳動解析には適さないことから、菌体表面にビオチン化学修飾を施し、菌体可溶化後にアビジンビーズを用いて回収した膜タンパク質のトリプシン消化ペプチドを調製し iTRAQ リポータータグによる質量分析計 (LC/MS/MS) での網羅的解析を検討した。しかし、微好気培養および嫌気培養菌体によって球体表面の生化学的性状が異なるため、ビオチン化学修飾効率が不均一となることから、この方法は適さないことが判明した。そこで、サルコシン界面活性剤の可溶化効率の差異を利用した外膜タンパク質調製法を確立した。調製した外膜タンパク質画分を、LC/MS/MS による網羅的ショットガン解析に供して、得られたペプチド由来タンパク質を同定した。さらに、emPAI 値によるサンプル間の存在比を算出して、各表面タンパク質の微好気培養菌と嫌気培養菌の網羅的暫定的定量比較を行い、腸内の嫌気培養菌で特異的に発現する因子群を同定した。

同定した因子群のなかで、嫌気培養菌での発現率が多かった因子 X に特に着目し、Hp マウス感染株での欠損変異株を作製した。当該マウス感染株には着目因子 X の homologue 遺伝子が 3 つ (X1-X3) 存在することが明らかとなったため、それぞれの欠損変異株を作製した。これらの作製した菌株の微好気環境下での生育速度、菌体の形態、胃上皮細胞への付着および炎症惹起能は野性型と同等であったことから、因子 X は、微好気培養菌の上皮細胞への付着および IV 型分泌装置活性には影響を及ぼさないことが示唆された。マウス腸管結紮ループアッセイに供して、これら X 欠損変異株のパイエル板侵入効率を解析した結果、嫌気培養菌での発現増大が確認でき

ていた X1 因子の欠損変異株では、嫌気培養菌のパイエル板内部取り込み能の低下がみられたことから、X1 因子は菌体のパイエル板侵入能を制御する因子である可能性が考えられた。

次に、よりヒトに近い病態モデル動物であるスナネズミ感染系で検討するために、Hp スナネズミ感染株での因子 X 欠損変異株を作製した。作製した菌株の微好気培養菌は、胃上皮細胞株 AGS 細胞への菌体付着能が若干低下した。一方、スナネズミを用いて、スナネズミ感染株を腸管結紮ループアッセイに供したところ、マウスとは異なり、微好気培養菌体と嫌気培養菌体のパイエル板内部への侵入効率に差異は認められなかった。パイエル板内部でまず菌体が遭遇することが考えられる樹状細胞と菌体との反応性を検討したところ、ヒト末梢血由来樹状細胞に対してスナネズミ感染株 Hp の嫌気培養体は、微好気培養体よりも有意に取り込まれることが判明した。今後、同定した嫌気培養体特異的因子群が、ヒト樹状細胞への菌体取り込み効率を制御する分子である可能性を検討する。

(3) ワクチン解析

スナネズミ感染モデルを用いて、微好気培養菌と嫌気培養菌の防御ワクチン効果を検討した結果、嫌気培養菌の投与によって、Hp 感染による胃炎と定着菌数の低下がみられた (図参照)。

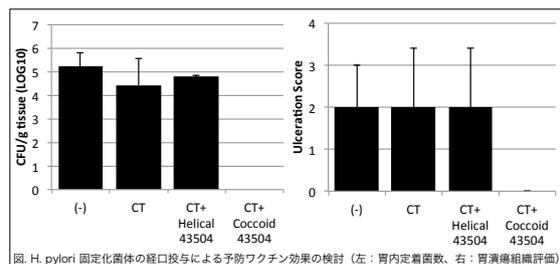


図. H. pylori 固定化菌体の経口投与による予防ワクチン効果の検討 (左: 胃内定着菌数、右: 胃潰瘍組織評価)

(2) の解析から、嫌気培養体では樹状細胞応答が増大する可能性が考えられることから、それらの活性の、予防ワクチン効果における作用を現在検討している。

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 7 件)

① Kubota-Aizawa S, Ohno K, Kanemoto

- H, Nakashima K, Fukushima K, Uchida K, Chambers JK, Goto-Koshino Y, Mimuro H, Watanabe T, Sekizaki T, Tsujimoto H. Epidemiological study on feline gastric *Helicobacter* spp. in Japan. *J Vet Med Sci.*、査読有、2017 May 18;79(5):876-880. doi: 10.1292/jvms.16-0567. Epub 2017 Mar 26.
- ② Ashida H, Mimuro H, Sasakawa C. *Shigella* manipulates host immune responses by delivering effector proteins with specific roles. *Front Immunol.* 査読有、2015 May 7;6:219. doi: 10.3389/fimmu.2015.00219.
- ③ Ogawa H, Fujikura D, Ohnuma M, Ohnishi N, Hang'ombe BM, Mimuro H, Ezaki T, Mweene AS, Higashi H A novel multiplex PCR discriminates *Bacillus anthracis* and its genetically related strains from other *Bacillus cereus* group species. *PLoS One.* 査読有、2015 Mar 16;10(3):e0122004. doi: 10.1371/journal.pone.0122004.
- ④ Kiga K, Mimuro H*, Suzuki M, Shinozaki-Ushiku A, Kobayashi T, Sanada T, Kim M, Ogawa M, Iwasaki YW, Kayo H, Fukuda-Yuzawa Y, Yashiro M, Fukayama M, Fukao T, Sasakawa C. Epigenetic silencing of miR-210 increases the proliferation of gastric epithelium during chronic *Helicobacter pylori* infection. *Nat Commun.* 査読有、2014 Sep 4;5:4497. doi: 10.1038/ncomms5497.
- ⑤ Irving AT, Mimuro H, Kufer TA, Lo C, Wheeler R, Turner LJ, Thomas BJ, Malosse C, Gantier MP, Casillas LN, Votta BJ, Bertin J, Boneca IG, Sasakawa C, Philpott DJ, Ferrero RL, Kaparakis-Liaskos M. The immune receptor NOD1 and kinase RIP2 interact with bacterial peptidoglycan on early endosomes to promote autophagy and inflammatory signaling. *Cell Host Microbe.* 査読有、2014 May 14;15(5):623-35. doi: 10.1016/j.chom.2014.04.001.
- ⑥ Suzuki S, Mimuro H, Kim M, Ogawa M, Ashida H, Toyotome T, Franchi L, Suzuki M, Sanada T, Suzuki T, Tsutsui H, Núñez G, Sasakawa C. *Shigella* IpaH7.8 E3 ubiquitin ligase targets glomulin and activates inflammasomes to demolish macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 査読有、2014 Oct 7;111(40):E4254-63. doi: 10.1073/pnas.1324021111.
- ⑦ Suzuki S, Franchi L, He Y, Muñoz-Planillo R, Mimuro H, Suzuki T, Sasakawa C, Núñez G. *Shigella* type III secretion protein MxiI is recognized by Naip2 to induce Nlr4 inflammasome activation independently of Pkc δ . *PLoS Pathog.* 査読有、2014 Feb 6;10(2):e1003926. doi: 10.1371/journal.ppat.1003926.

[学会発表] (計 12 件)

- ① 蛭川沙也加、三室仁美: “嫌気培養ピロリ菌による免疫応答と予防ワクチン効果”, 第90回日本細菌学会総会, 2017年3月19-21日, 仙台国際センター展示棟 (宮城県仙台市)
- ② 黒田英介、三室仁美: “*Helicobacter pylori* 持続感染における BabA 機能変動メカニズムの解析”, 第90回日本細菌学会総会, 2017年3月19-21日, 仙台国際センター (宮城県仙台市)
- ③ 木下遼、氣賀恒太朗、Sood Arpana, 小椋義俊、林哲也、三室仁美: “ハイパーミューテーターを用いたピロリ菌持続感染メカニズムの解析”, 第90回日本細菌学会総会, 2017年3月19-21日, 仙台国際センター (宮城県仙台市)
- ④ 氣賀恒太朗、朱勃、木下遼、真田貴人、三室仁美: “小さな RNA によるピロリ菌生存戦略”, 第90回日本細菌学会総会, 2017年3月19-21日, 仙台国際センター (宮城県仙台市)
- ⑤ Ryu Jinhyeob, 大坪亮太、飯田真珠子、芦田浩、笹川千尋、三室仁美: “宿主ユビキチン E3 リガーゼによる腸管病原性大腸菌の病原性抑制作用”, 第90回日本細菌学会総会, 2017年3月19-21日, 仙台国際センター (宮城県仙台市)

- ⑥ 真田貴人、芦田浩、氣駕恒太朗、笹川千尋、三室仁美：“赤痢菌感染動物モデルを用いた炎症抑制エフェクターOspIの解析”，第90回日本細菌学会総会，2017年3月19-21日，仙台国際センター（宮城県仙台市）
- ⑦ 氣駕恒太朗、朱勃、三室仁美：“Identification of sRNAs controlling respiratory chain in *Helicobacter pylori*” 第89回日本細菌学会総会. 2016年3月23-25日. 大阪国際交流センター（大阪府大阪市）
- ⑧ 三室仁美：“*Helicobacter pylori*の感染戦略”，BMB2015（第38回日本分子生物学会年会，第88回日本生化学会大会合同大会）（招待講演），2015年11月4日，神戸ポートピアホテル（兵庫県神戸市）
- ⑨ Hitomi Mimuro：“*Helicobacter pylori* infection and microRNA”，The 14th Awaji International Forum on Infection and Immunology（招待講演、国際学会），2015年9月10日，淡路夢舞台国際会議場（兵庫県淡路市）
- ⑩ Hitomi Mimuro：“Crosstalk between *Helicobacter pylori* and host cells”，第21回東アジアシンポジウム（招待講演），2014年7月17-18日，Seoul（Korea）
- ⑪ 三室仁美，氣駕恒太朗：“*Helicobacter pylori* 感染と宿主応答”，日本生化学会大会（招待講演），2014年10月15-18日，国立京都国際会館（京都府京都市）
- ⑫ Hitomi Mimuro：“Epigenetic silencing of miR-210 increases the proliferation of gastric epithelium during chronic *Helicobacter pylori* infection”，11th International Workshop on Pathogenesis and Host Response in *Helicobacter* Infections, 2014年7月2-5日，Helsingor（Denmark）

〔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

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

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし