

令和元年6月19日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05191

研究課題名(和文)ピロリ菌病原因子複合体による疾患発症機構

研究課題名(英文)Mechanisms for development of diseases by H. pylori virulence factor complex

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) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：ピロリ菌の重要な病原因子OipAおよびCagAの組換え全長タンパク質の作成に成功し、質量分析にて、OipAがピロリ菌の膜領域で多量体を形成しているか、またはCagAなどの分子と複合体を形成していることを世界で初めて示唆する結果を得た。さらに、血清中のCagA抗体を日本で最も正確に測定できる系を確立した。また胃粘膜組織に近い2次元ガストロイドと呼ばれる小臓器の作成にも成功、今後のピロリ菌と胃粘膜の相互作用の研究を促進できる系を樹立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、我々が作成した血清中のCagA抗体を測定する系では、日本人由来のピロリ菌を材料としており、欧米のピロリ菌を用いている市販キットに比べて、正確性が高く、今後の汎用が期待される。また、今までは、ピロリ菌と胃粘膜との相互関係を調べるのに、胃がん細胞株が用いられていたが、2次元ガストロイドという新しい系を確立したことで、今後の基礎研究の飛躍的な発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：We succeeded to construct recombinant proteins of the whole length of OipA and CagA, the important virulence factors of Helicobacter pylori. Using mass spectrometry analyses, our results first suggested that OipA forms multimeric complex within the membrane region of H. pylori, or forms complex with other factors such as CagA. Furthermore, we established the most reliable system in Japan to measure anti-CagA antibody in serum samples. In addition, we succeeded to construct an ex-vivo model of human stomach, gastric epithelial organoid monolayers (gastric monolayers). Using this novel model, we expect to promote our research field on searching the interaction between H. pylori and gastric mucosa.

研究分野：消化器感染症

キーワード：ピロリ菌 外膜タンパク タンパク質複合体 病原因子 炎症 抗体測定 オルガノイド

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

ヘリコバクター・ピロリ（ピロリ菌）感染者のほとんどに慢性炎症が引き起こされるが、胃癌へ進展するのはわずかである。この原因として、宿主側の要因や環境因子などに加え、多様な菌側の病原因子が関与していると考えられる。病原因子としては、分泌型毒素である CagA や VacA が知られているほか、外膜タンパク質（outer membrane protein: OMP）も接着因子や炎症惹起因子として重要な役割を果たす。我々はピロリ菌起因性胃炎では多量の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、その原因の一つとして、新規ピロリ菌病原因子を同定し、**Outer inflammatory protein A (OipA)**と命名した。しかし、未だ OipA の直接的な機能やその相互作用分子は不明である。そこで、「**OipA などの各病原因子は独立して病原性を引き起こしているのではなく、未知の因子を含めた病原因子複合体を形成したり、時には分泌型として解離したりして、密接に相互作用している**」との仮説を立てるに至った。

2. 研究の目的

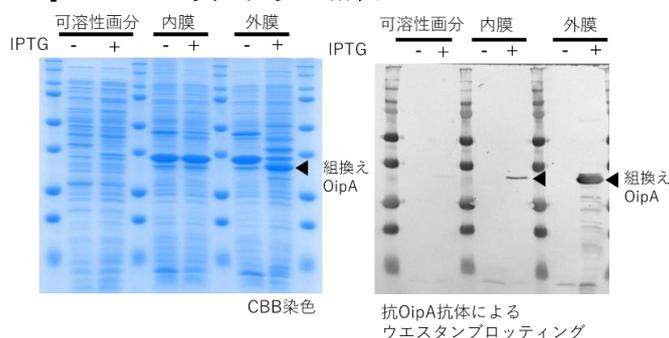
我々が発見・命名した OipA をはじめとする各種病原因子は疫学的に高い相関率で存在しているが、それらの相互作用は未解明である。そこで、本研究では**複数の病原因子から構成される「病原因子複合体」**が相乗的に作用しあつて重篤な疾患を導くと考え、**ピロリ菌の細胞膜上での病原因子間の相互作用と、これにより形成される病原因子複合体がヒトに対して引き起こす病態メカニズムを明らかにする。**

3. 研究の方法

- (1) **OipA タンパク質の発現・精製**: 予備実験において、大腸菌を用いて全長の recombinant OipA (rOipA) の精製に成功、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 は未変性状態であることが推定されたが、多量培養には至っておらず、本研究では、2mg レベルの精製を行う。さらに、CagA についても同様に精製を行う。
- (2) **病原因子複合体の探索**: ピロリ菌の膜タンパク質複合体を構成するサブユニットの同定を質量分析にて解析、さらにアレイを用いて OipA にて発現する宿主側の因子を同定する。
- (3) **疫学的な病原因子の検討**: 我々の持つアジア各国由来のピロリ菌を用いて、病原因子の網羅的な解析を、次世代シーケンサーを用いて行う。

4. 研究成果

(1) OipA タンパク質の発現・精製



OipA 遺伝子のコドンが大腸菌に最適化し、発現プラスミドと宿主の条件検討を行うことで、大腸菌での組換え全長 OipA タンパク質の発現系を確立した。さらに、組換え OipA タンパク質の局在をみたところ、大腸菌の外膜に局在していたことから、OipA が外膜タンパク質であることを生化学的に明らかにした (図 1)。

図 1: 大腸菌を用いた組換え OipA の発現

さらに、グアニジン変性条件下での組換え OipA タンパク質の精製と、ドデシルマルトシド (DDM) を用いたリフォールディング法を確立した。変性 OipA を、His タグを用いたアフィニティー精製により、高純度で精製した (図 2)。そして、変性 OipA に DDM を添加し、透析によりグアニジンを除去した。さらに、超遠心を行うことにより、組換え OipA が可溶性であることを確認した (図 3)。

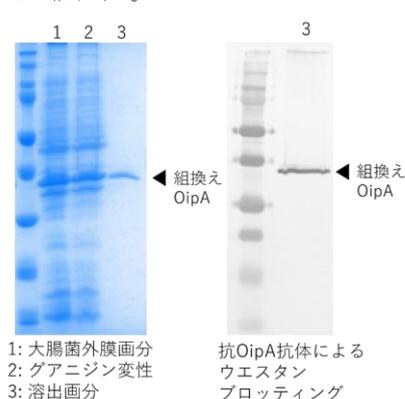


図 2 : 組換え OipA の精製

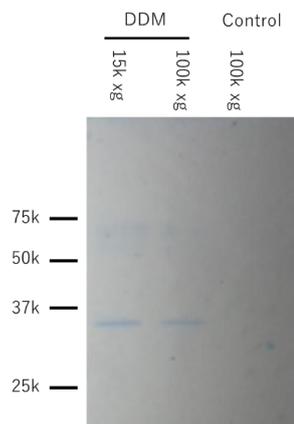


図 3 : 組換え OipA のリフォールディング

最終的に、LB 培地を用いた大腸菌の 1L 培養から約 2mg の組換え OipA タンパク質の精製法を確立した (表 1)。

表 1 : 大腸菌を用いた組換え OipA (rOipA) の精製(1L 培養)

	総タンパク質 (mg)	溶液量 (ml)	タンパク濃度 (mg/ml)	純度 (%)
rOipA 発現大腸菌膜画分	50.2	2.2	22.8	21.8
変性大腸菌膜画分	46.1	17.0	2.71	22.9
精製 rOipA 標品	2.50	0.70	3.57	97.2
リフォールディング rOipA 標品	2.20	10.0	0.22	96.2

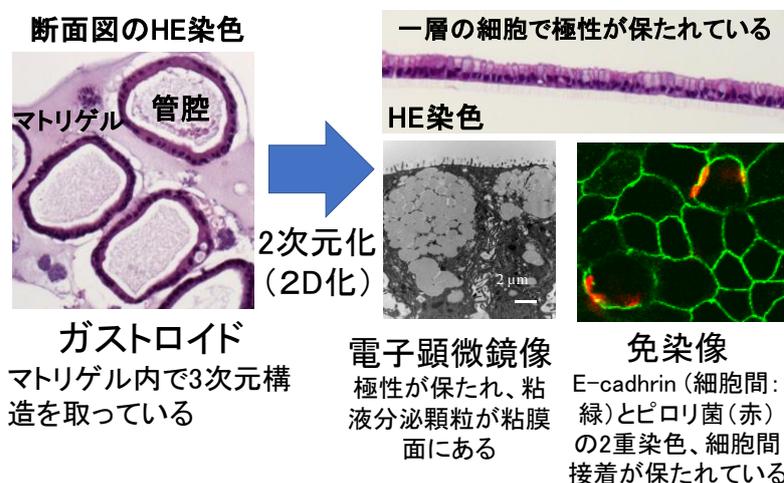
さらに、我々は、病原因子 CagA に関しても同様に、大腸菌での組換え全長 CagA タンパク質の発現系を確立、組換え CagA タンパク質の精製にも成功した。またこの CagA タンパク質を抗原として、血清抗 CagA 抗体の測定系 (ELISA) を作成した。CagA は、大きく東アジア型と欧米型に分かれており、現在市販されている血清抗 CagA 抗体測定系は、欧米型の CagA を抗原としており、日本を含む東アジアでは、測定の感度・特異度が低いことが知られている。そこで、抗原として日本のピロリ菌を用いて、東アジア型 CagA タンパクを精製することで、より感度・特異度が高い測定系が完成した。また、CagA のどの配列が特に抗原性を有するかを調べるため、各種 CagA ペプチドを作成した (特許出願中)。なお、東アジア用血清抗 CagA 抗体測定系に関しては、現在数社の企業と市販に向けての調整を行っており、完成すれば広く使用される可能性を秘めている。

(2) 病原因子複合体の探索

これまでの分子疫学研究から、OipA 遺伝子は 4 型分泌機構をコードしている *cag* pathogenicity island の存在や、CagA, VacA と強く関連していることが明らかとなっている。そこで、ピロリ菌の病原因子は病原因子間で相互作用しているのではないかと考え、理化学研究所ライフサイエンス技術基盤研究センターと共同でピロリ菌の膜タンパク質複合体の解析を行った。

ピロリ菌の膜画分における膜タンパク質複合体を明らかにするために、High resolution Clear Native PAGE で複合体を分離した後に、ゲルを CBB で染色し、短冊状にタンパク質バンドごとに分割した。さらに、このゲルからペプチドを抽出し、質量分析器で解析することで、ピロリ菌の膜タンパク質複合体を構成するサブユニットの同定を行った。その結果、OipA を特定の分子量のゲル (分子量が 102-222 kDa 間のゲル) から検出した。さらに、CagA などの他の分子についても OipA と同じゲルからみられた。単量体 OipA の推定分子量は 32kDa であることから、OipA がピロリ菌の膜領域で多量体を形成しているか、または他分子と複合体を形成していることが示唆された。

なお、精製 OipA 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 (FAK など) を誘導することが示唆された。AGS 細胞は胃癌細胞株であり、正常の胃粘膜上皮を再現していない可能性が高いため、正常胃粘膜上皮の作成にも取り組んだ。最近、生体内の組織・器官に近いモデルとして、**オルガノイド**が注目されている。オルガノイドは組織細胞をマトリゲル内で 3 次元的に培養した細胞集合体 (小臓器) で、2009 年にオランダの Hans Clevers のグループが



マウス小腸オルガノイドを報告して以来、ヒト腸管・胃・肺・膵臓などの正常組織および腫瘍・遺伝性疾患などの病変部からのオルガノイドが報告されている。我々は、米国ペイラー医科大学 Mary K. Estes らとの国際共同研究として取り組み、胃粘膜上皮由来のオルガノイド (ガストロイド)、さらにガストロイドを 2 次元化した上皮の作成に成功した。この成功は、新たな科研費 (基盤研究 (B)) へとつながることができた。

図 4 : ガストロイドとその 2 次元化

(3) 疫学的な病原因子の検討

我々の研究室には、アジア各国からのピロリ菌が保存されており、これらから DNA を抽出して、PCR-sequencing にて *oipA* (遺伝子のオン、オフ)、*cagA* (東アジア型、欧米型、繰り返し配列の数)、*vacA* (s, m 領域のゲノタイプ) を検討、さらに *cag* pathogenicity island についても次世代シーケンサーを用いて検討を行った。その結果、当初の予想通り、*oipA* オン、*cagA* 陽性、*vacA* s1 タイプが強く相関していることを見出した。さらに、次世代シーケンサーを用いた検討では、*oipA* オンは、*babA* の有無や *hopQ* のゲノタイプなど、多くの OMP の存在と関連していることがわかり、現在さらなる検討を行っているところである。これらの検討から、さらなる未知のピロリ菌病原因子の発見につながる可能性を秘めている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 73 件) (すべて査読有)

- ① Uotani T, Murakami K, Uchida T, Tanaka S, Nagashima H, Zeng XL, Akada J, Estes MK, Graham DY, Yamaoka Y. Changes of tight junction and interleukin-8 expression using a human gastroid monolayer model of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 2019;24(3):e12583. doi: 10.1111/hel.12583.
- ② Tserentogtokh T, Gantuya B, Subsomwong P, Oyuntsetseg K, Bolor D, Erdene-Ochir Y, Azzaya D, Davaadorj D, Uchida T, Matsuhisa T, Yamaoka Y. Western-Type *Helicobacter pylori* CagA are the Most Frequent Type in Mongolian Patients. *Cancers (Basel)*. 2019;11(5). pii: E725. doi: 10.3390/cancers11050725.
- ③ Miftahussurur M, (他 25 名), Yamaoka Y. Analysis of risks of gastric cancer by gastric mucosa among Indonesian ethnic groups. *PLoS One*. 2019;14(5):e0216670. doi: 10.1371/journal.pone.0216670.
- ④ Ansari S, Akada J, Matsuo Y, Shiota S, Kudo Y, Okimoto T, Murakami K, Yamaoka Y. Epitope peptides of *Helicobacter pylori* CagA antibodies from sera by whole-peptide mapping. *J Gastroenterol*. 2019 (Epub ahead of print). doi: 10.1007/s00535-019-01584-8.
- ⑤ Nagashima H, Yamaoka Y. Importance of Toll-like Receptors in Pro-inflammatory and Anti-inflammatory Responses by *Helicobacter pylori* Infection. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2019;421:139-158. doi: 10.1007/978-3-030-15138-6_6.
- ⑥ Gantuya B, Oyuntsetseg K, Bolor D, Erdene-Ochir Y, Sanduijav R, Davaadorj D, Tserentogtokh T, Uchida T, Yamaoka Y. Evaluation of serum markers for gastric cancer and its precursor diseases among high incidence and mortality rate of gastric cancer area. *Gastric Cancer*. 2019;22(1):104-112. doi:10.1007/s10120-018-0844-8.
- ⑦ Yamaoka Y. How to eliminate gastric cancer-related death worldwide? *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(7):407-408. doi: 10.1038/s41571-018-0029-8.
- ⑧ Kabamba ET, Tuan VP, Yamaoka Y. Genetic populations and virulence factors of *Helicobacter pylori*. *Infect Genet Evol*. 2018;60:109-116. doi: 10.1016/j.meegid.2018.02.022.
- ⑨ Park JY, Forman D, Waskito LA, Yamaoka Y, Crabtree JE. Epidemiology of *Helicobacter pylori* and CagA-Positive Infections and Global Variations in Gastric Cancer. *Toxins (Basel)*. 2018;10(4). pii: E163. doi: 10.3390/toxins10040163.
- ⑩ Waskito LA, Miftahussurur M, Lusida MI, Syam AF, Suzuki R, Subsomwong P, Uchida T, Hamdan M, Nasronudin, Yamaoka Y. Distribution and clinical associations of integrating conjugative elements and *cag* pathogenicity islands of *Helicobacter pylori* in Indonesia. *Sci Rep*. 2018;8(1):6073. doi: 10.1038/s41598-018-24406-y.
- ⑪ Binh TT, (他 12 名), Yamaoka Y. Molecular Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection in a Minor Ethnic Group of Vietnam: A Multiethnic, Population-Based Study. *Int J Mol Sci*. 2018;19(3). pii: E708. doi:10.3390/ijms19030708.
- ⑫ Myint T, Miftahussurur M, Vilaichone RK, Ni N, Aye TT, Subsomwong P, Uchida T, Mahachai V, Yamaoka Y. Characterizing *Helicobacter pylori cagA* in Myanmar. *Gut Liver*. 2018;12(1):51-57. doi: 10.5009/gnl17053.
- ⑬ Ansari S, (他 15 名), Yamaoka Y. *Helicobacter pylori bab* characterization in clinical isolates from Bhutan, Myanmar, Nepal and Bangladesh. *PLoS One*. 2017;12(11):e0187225. doi: 10.1371/journal.pone.0187225.
- ⑭ Subsomwong P, Miftahussurur M, Uchida T, Vilaichone RK, Ratanachu-Ek T, Mahachai V, Yamaoka Y. Prevalence, risk factors, and virulence genes of *Helicobacter pylori* among dyspeptic patients in two different gastric cancer risk regions of Thailand. *PLoS One*. 2017;12(10):e0187113. doi: 10.1371/journal.pone.0187113.

- ⑮ Aftab H, Miftahussurur M, Subsomwong P, Ahmed F, Khan AKA, Matsumoto T, Suzuki R, Yamaoka Y. Two populations of less-virulent *Helicobacter pylori* genotypes in Bangladesh. *PLoS One*. 2017;12(8):e0182947. doi: 10.1371/journal.pone.0182947.
- ⑯ Tanaka S, Nagashima H, Uotani T, Graham DY, Yamaoka Y. Autophagy-related genes in *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 2017;22(3). doi:10.1111/hel.12376.
- ⑰ Miftahussurur M, Yamaoka Y, Graham DY. *Helicobacter pylori* as an oncogenic pathogen, revisited. *Expert Rev Mol Med*. 2017;19:e4. doi:10.1017/erm.2017.4.
- ⑱ Matsuo Y, Kido Y, Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* Outer Membrane Protein-Related Pathogenesis. *Toxins (Basel)*. 2017 Mar 11;9(3). pii: E101. doi:10.3390/toxins9030101.
- ⑲ Matsuo Y, Kido Y, Akada J, Shiota S, Binh TT, Trang TT, Dung HD, Tung PH, Tri TD, Thuan NP, Tam LQ, Nam BC, Khien VV, Yamaoka Y. Novel CagA ELISA exhibits enhanced sensitivity of *Helicobacter pylori* CagA antibody. *World J Gastroenterol*. 2017;23(1):48-59. doi: 10.3748/wjg.v23.i1.48.
- ⑳ Thi Huyen Trang T, Thanh Binh T, Yamaoka Y. Relationship between *vacA* Types and Development of Gastrointestinal Diseases. *Toxins (Basel)*. 2016;8(6). pii: E182. doi: 10.3390/toxins8060182.

[学会発表] (計 50 件)

- ① Yoshio Yamaoka, *Helicobacter pylori* virulence and gastric cancer pathogenesis: current knowledge, The 27th Annual Meeting of the Korean College of Helicobacter and Upper Gastrointestinal Research and the 16th Japan-Korea Joint Symposium on Helicobacter Research (Korea) 2019
- ② Yoshio Yamaoka, *H. pylori*-related pathogenesis of diffuse-type gastric cancer, The 2nd Seoul international Symposium on Helicobacter (South Korea) 2018
- ③ Yoshio Yamaoka, Updated information about the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection, The 8th Shanghai International Conference of Gastroenterology (China) 2018
- ④ Yoshio Yamaoka, Non-*Helicobacter pylori* microbiome in gastric carcinogenesis, Asian Pacific Digestive Week (APDW 2018) (Korea) 2018
- ⑤ Yoshio Yamaoka, *Helicobacter pylori*: Challenging the present and future, Makassar Gastroenterology Hepatology Update 2018 (MAGEHAP2018) & Gastroenterology-Hepatology Update; Surabaya-Denpasar-Malang-Makassar 14 Joint conference (Indonesia) 2018
- ⑥ Yoshio Yamaoka, Virulence factors of *Helicobacter pylori*, Renji-Nanfeng Symposium on Helicobacter pylori and microbiota in health and disease (China) 2017
- ⑦ Yoshio Yamaoka, *Helicobacter pylori* and inflammation driven gastric cancer, Asian Pacific Digestive Week (APDW2017) (Hong Kong 2017)
- ⑧ Yoshio Yamaoka, Stomach microbiome, results from 7 Asian countries, XXXth International Workshop on Helicobacter & Microbiota in Inflammation and Cancer (France) 2017
- ⑨ Yoshio Yamaoka, Current status of *Helicobacter pylori* study and its future prospect, 7th Mongolian Digestive Disease Week (Mongolia) 2017
- ⑩ Yoshio Yamaoka, GI complication of *H. pylori* infection, 33rd World Congress of Internal Medicine (Indonesia) 2016
- ⑪ Yoshio Yamaoka, *Helicobacter pylori* virulence and gastric cancer pathogenesis, Singapore Gastric Cancer Consortium; 9th Annual Scientific Program (Singapore) 2016
- ⑫ Yoshio Yamaoka, *Helicobacter pylori* virulence and gastric cancer pathogenesis, population-based strategies for *H. pylori*-associated disease management: a Japanese perspective. National *H. pylori* Conference and Northeast Digestive Disease Forum (China) 2016

[図書] (計 4 件)

- ① Vo Phuoc Tuan, Boldbaatar Gantuya, Takashi Matsumoto and Yoshio Yamaoka, Caister Academic Press, Microbiota: Current Research and Emerging Trends, 2019, 99-121 (**Edited by Takashi Matsumoto and Yoshio Yamaoka**)
- ② Evarister Tshibangu Kabamba Yoshio Yamaoka, Springer Japan, Gastric Cancer, 2019, 31-50.
- ③ Muhammad Miftahussurur, Yoshio Yamaoka, Springer Japan, Helicobacter pylori, 2016, 19-32.
- ④ Muhammad Miftahussurur, Yoshio Yamaoka, Springer Japan, *Helicobacter pylori* Research: from Bench to Bedside, 2016, 519-542 (**Edited by Steffen Backert and Yoshio Yamaoka**)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：ペプチド及びその利用

発明者：赤田純子、山岡吉生、村上和成、塩田星児

権利者：同上

種類：特許

番号：2018-123612

出願年：2018

国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究分担者：なし