

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16244

研究課題名（和文）ピロリ菌の小さなRNAによる胃炎症メカニズムの解明

研究課題名（英文）Analysis of the mechanism of gastric inflammation induced by small RNAs of *H. pylori*.

研究代表者

木下 遼（Kinoshita-Daitoku, Ryo）

名古屋大学・医学系研究科・特任助教

研究者番号：50846566

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ピロリ菌の感染は、胃炎、胃潰瘍、胃がん、MALTリンパ腫などの消化器疾患の発症に関わっている。本研究を進めていくと、ピロリ菌の保有するsmall RNA（sRNA）のsRNA-XおよびsRNA-Zが胃炎発症に関与していることが見出された。さらにピロリ菌臨床分離株を用いた実験結果から、sRNA-Xの発現量と臨床所見が相関することを見つけた。以上の結果から、ピロリ菌による胃炎には、ピロリ菌の保有する病原性sRNAが寄与することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ピロリ菌は世界人口の約半数が感染している大規模感染症であり、胃炎や胃がんなどの消化器疾患を引き起こすことが知られているが、胃炎発症メカニズムは不明な点が多い。しかし本研究を通じて、ピロリ菌が保有するsmall RNAが胃炎発症メカニズムに関与している可能性が示唆された。本研究で得られた新知見は、他の細菌感染症解析の道を拓くほか、創薬・ワクチン開発へとつながることが期待される。

研究成果の概要（英文）：*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection is known to be involved in the development of gastrointestinal diseases such as gastritis, gastric ulcer, gastric cancer, and MALT lymphoma. In this study, we found that sRNA-X and sRNA-Z possessed by *H. pylori* are involved in the development of gastritis. Furthermore, we found that the expression levels of sRNA-X correlated with clinical findings based on the results of experiments using clinical isolates of *H. pylori*. These results indicate that the pathogenic sRNAs possessed by *H. pylori* contribute to gastritis caused by *H. pylori*.

研究分野：細菌学

キーワード：ピロリ菌 small RNA

様式 C-19、F-19-1、Z-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)は世界人口の約半数に感染する細菌で、胃がんや胃十二指腸潰瘍などの消化器疾患を引き起こす大規模感染症である。我が国では、年間12万人以上が胃がんになり、毎年4万人以上が胃がんで死亡している。これまでピロリ菌感染による胃の炎症は、腸管に存在するパイエル板を介したピロリ菌の取り込みや、リポ多糖 (LPS)による胃内のTLR4の活性化によることが報告されてきた。その一方でピロリ菌のLPSは低いエンドトキシン活性しか示さない。さらに、胃粘膜上皮細胞ではLPS受容体のToll like receptor 4 (TLR4)の発現が低く、ピロリ菌による胃炎発症メカニズムは不明な点が多いのが現状である。そこで本研究では、細菌の環境調節因子として近年報告され始めたsmall RNAに着目した。細菌の遺伝子は哺乳類などと比べて非常に少ないが、small RNAが複数の遺伝子をしなやかに制御することで細菌の環境適応を可能にする。また本研究の予備実験から、small RNAの持つ立体構造が炎症を誘発している可能性も示唆された。そのため本研究課題では、ピロリ菌の保有するsmall RNAによる胃炎発症メカニズムの解明を目指した。

2. 研究の目的

上記のように、ピロリ菌は消化器疾患に関与しているが、胃炎発症メカニズムは不明な点が多い。本研究課題では、ピロリ菌由来の胃炎に関与する病原性small RNAを同定し、その構造と機能を明らかにする。そこで、本研究では以下の課題解明を目指す。

課題1) ピロリ菌の全てのsmall RNAを同定する。

課題2) ピロリ菌由来の胃炎に関与する病原性small RNAを同定する。

課題3) ピロリ菌臨床分離株の病原性small RNAと病態の相関を解析する。

3. 研究の方法

1)ピロリ菌のsmall RNAを同定するために、ピロリ菌を対数増殖期まで培養し、菌体を回収した。回収したピロリ菌よりトータルRNAを抽出し、電気泳動を行った。電気泳動後に700nt以下で採取し、Illumina NovaSeq 6000でsmall RNAの解析を行った。解析結果および公共データベースの情報からピロリ菌のsmall RNAを同定した。

2)同定したピロリ菌のsmall RNAの発現量やこれまでの報告からピロリ菌由来の胃炎に関与する可能性のあるsmall RNAを見出した。これらsmall RNAを転写し、胃粘膜上皮細胞に振りかけた。その後、炎症性サイトカインの発現量をELISA法にて解析した。また、small RNAの欠損変異株を作製し、各種small RNAにより制御されているmRNAを探索するために網羅的遺伝子発現量解析(RNA-seq)を行った。mRNAがどのようにsmall RNAに制御されているのかを解析するために、バイオインフォマティクスにより結合予測をした。実際に、予測したように結合するかを

確認するために各種 small RNA と標的 mRNA の結合実験 (EMSA) を行った。また、RNA レベルでの small RNA 制御だけではなく、タンパク質レベルでの制御を行っているのかを解析するためにウェスタンブロットを行った。さらに small RNA による病原性を確認するために、ピロリ菌野生株および各種 small RNA 欠損変異株を用いて胃粘膜上皮細胞への感染実験を行った。感染胃粘膜上皮細胞の上清より炎症性サイトカインの確認を ELISA 法にて行った。また、マウスとピロリ菌野生株および各種 small RNA 欠損変異株を用いてピロリ菌の胃内定着数およびピロリ菌由来の胃炎の解析を行った。

3) ピロリ菌の臨床分離株および病態情報を収集した。収集した臨床分離株を対数増殖期まで培養し、トータル RNA を抽出後に cDNA を合成した。得られた cDNA を用いて、2) で得られた病原性 small RNA および small RNA により制御されている mRNA の発現量を RT-PCR で解析した。

4. 研究成果

課題 1) ピロリ菌の全ての small RNA を同定する。

ピロリ菌の保有する small RNA が胃炎発症メカニズムに関与している可能性が示唆されたため、ピロリ菌の全ての small RNA を同定することにした。ピロリ菌を対数増殖期まで培養し、菌体からピロリ菌のトータル RNA を抽出した。抽出したトータル RNA は電気泳動を行い 700nt 以下で採取し、rRNA を除去後に Illumina NovaSeq 6000 を用いて small RNA の解析を行った。解析結果および公共データベースの情報から新規 small RNA を含む 97 種類のピロリ菌 small RNA を同定した。

課題 2) ピロリ菌由来の胃炎に関与する病原性 small RNA を同定する。

課題 1) で同定したピロリ菌の small RNA の菌体内発現量解析および構造予測を行った。これらの結果およびこれまでの報告からピロリ菌由来の胃炎に関与する可能性のある sRNA-X, sRNA-Y, sRNA-Z を見出した。これらのピロリ菌 small RNA が直接炎症を引き起こす可能性を考え、3 種類の small RNA を転写し、胃粘膜上皮細胞に振りかけ上清中の炎症性サイトカインを ELISA 法で解析した。しかし、直接炎症に関与する small RNA を同定することはできなかった。また、これら 3 種類のピロリ菌 small RNA がピロリ菌体内の遺伝子を制御することで胃炎を発症させる可能性を考え、3 種類の small RNA 欠損変異株を作製した。まず、ピロリ菌野生株および各種 small RNA 欠損変異株を用いて、これら small RNA により制御されている遺伝子を探索するために網羅的遺伝子発現量解析 (RNA-seq) を行った。その結果、sRNA-X では外膜タンパク質 A や発がんに関与するタンパク質 B を含む 17 種類、sRNA-Y では薬剤耐性に関与する遺伝子を含む 2 種類、sRNA-Z では接着に関与する外膜タンパク質 C を含む 10 種類の mRNA を制御している可能性が示唆された。これらの mRNA がどのように各種 small RNA に制御されているのかを解析するために、バイオインフォマティクスにより予測をした。さらに、実際に予測したように結合による制御が行われているかを確認するために small RNA と mRNA の結合実験

(EMSA)を行った。その結果、sRNA-Xでは発がんに関与するタンパク質B、sRNA-Zでは接着に関与する外膜タンパク質Cとの結合を確認した。また、RNAレベルでのsmall RNAによる制御だけではなく、タンパク質レベルでの制御を行っているのかを解析するためにウェスタンブロットを行った。この実験によりsRNA-Xは発がんに関与するタンパク質Bを制御している傾向を確認した。さらにピロリ菌野生株および各種small RNA欠損変異株を用いて胃粘膜上皮細胞への感染実験を行い、上清中の炎症性サイトカインの確認をELISA法にて行った。その結果、sRNA-X欠損変異株で有意に炎症性サイトカインの上昇を確認した。また、マウスとピロリ菌野生株および各種small RNA欠損変異株を用いてピロリ菌の胃内定着数および胃炎の解析を行った。これらの結果、sRNA-X欠損変異株およびsRNA-Z欠損変異株でピロリ菌胃内定着数が有意に変化し、sRNA-X欠損変異株で炎症性サイトカインの有意な上昇を確認した。

課題3) ピロリ菌臨床分離株の病原性small RNAと病態の相関を解析する。

これまでの結果、ピロリ菌のsRNA-Xが胃炎に関与していることが示唆された。そこでピロリ菌の臨床分離株および病態情報を収集し、病態と病原性small RNAの相関を解析することにした。収集した臨床分離株を対数増殖期まで培養し、トータルRNAを抽出後にcDNAを合成した。得られたcDNAを用いて、sRNA-XおよびsRNA-Xにより制御されているmRNAの発現量をRT-PCRで解析した。その結果、sRNA-Xおよび発がんに関与するタンパク質Bを含む6種類のmRNAの発現が病態と関与していることが明らかになった。

本研究課題からピロリ菌による胃炎発症メカニズムに関与するsmall RNAが同定できた。しかし、ピロリ菌のsmall RNAは機能未知なものが多いため病原性との関連については、今後の大きな研究課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kinoshita-Daitoku Ryo, et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 A bacterial small RNA regulates the adaptation of Helicobacter pylori to the host environment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2085
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-22317-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Abass Adiza, Okano Tokuju, Boonyaleka Kotchakorn, Kinoshita-Daitoku Ryo, Yamaoka Shoji, Ashida Hiroshi, Suzuki Toshihiko	4. 巻 560
2. 論文標題 Effect of low oxygen concentration on activation of inflammation by Helicobacter pylori	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 179 ~ 185
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.04.123	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kinoshita-Daitoku Ryo, Kiga Kotaro, Sanada Takahito, Ogura Yoshitoshi, Bo Zhu, Iida Tamako, Yokomori Rui, Kuroda Eisuke, Tanaka Mototsugu, Sood Arpana, Suzuki Toshihiko, Nakai Kenta, Hayashi Tetsuya, Mimuro Hitomi	4. 巻 525
2. 論文標題 Mutational diversity in mutY deficient Helicobacter pylori and its effect on adaptation to the gastric environment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 806 ~ 811
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.02.087	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tanaka Mototsugu, Kinoshita-Daitoku Ryo, Kiga Kotaro, Sanada Takahito, Zhu Bo, Okano Tokuju, Aikawa Chihiro, Iida Tamako, Ogura Yoshitoshi, Hayashi Tetsuya, Okubo Kosu, Kurosawa Miho, Hirahashi Junichi, Suzuki Toshihiko, Nakagawa Ichiro, Nangaku Masaomi, Mimuro Hitomi	4. 巻 10
2. 論文標題 Group A Streptococcus establishes pharynx infection by degrading the deoxyribonucleic acid of neutrophil extracellular traps	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3251-3251
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-60306-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Satoh-Takayama Naoko, Kato Tamotsu, Motomura Yasutaka, Kageyama Tomoko, Taguchi-Atarashi Naoko, Kinoshita-Daitoku Ryo, Kuroda Eisuke, Di Santo James P., Mimuro Hitomi, Moro Kazuyo, Ohno Hiroshi	4. 巻 52
2. 論文標題 Bacteria-Induced Group 2 Innate Lymphoid Cells in the Stomach Provide Immune Protection through Induction of IgA	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Immunity	6. 最初と最後の頁 635 ~ 649 .e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.immuni.2020.03.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kinoshita-Daitoku Ryo, Ogura Yoshitoshi, Kiga Kotaro, Maruyama Fumito, Kondo Tomoyo, Nakagawa Ichiro, Hayashi Tetsuya, Mimuro Hitomi	4. 巻 9
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of Helicobacter pylori Strain ATCC 43504, a Type Strain That Can Infect Gerbils	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 105~105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.00105-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 木下遼 三室仁美
2. 発表標題 Mutational diversity in mutY deficient Helicobacter pylori and its effect on adaptation to the gastric environment
3. 学会等名 第73回日本細菌学会関西支部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西田叶 木下遼 鯉坂裕美 氣駕恒太朗 柴山恵吾
2. 発表標題 Helicobacter pylori の sRNA を介した外膜タンパク質の発現制御
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 木下遼 三室仁美	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 4
3. 書名 実験医学	

1. 著者名 西田叶 木下遼 柴山恵吾	4. 発行年 2022年
2. 出版社 ニューサイエンス社	5. 総ページ数 4
3. 書名 細胞	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------