

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月21日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390228

研究課題名（和文） ヘリコバクターピロリ感染胃発癌における菌-宿主間クロストークのメタボローム解析

研究課題名（英文） Metabolome analysis in the gastric carcinogenesis induced by the cross-talk between *Helicobacter pylori* and host.

研究代表者

東 健 (AZUMA TAKESHI)

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：60221040

研究成果の概要（和文）：

ピロリ菌の全ゲノム解析を日本株4株で行った。系統樹解析で、これら日本株は、欧州株と明らかに異なっていることが明らかになり、特に、外膜蛋白遺伝子に大きな違いが認められた。外膜蛋白における違いは、菌-宿主間クロストークにおいて、菌株により反応が異なり、ひいては病態の違いに繋がってくる事が考えられた。

メタボローム解析においては、ピロリ菌感染により、解糖系が亢進するにも関わらず、TCAサイクルが十分に機能せず、乳酸が蓄積することが確認された。ピロリ菌感染が、宿主における代謝物プロファイルを、がん組織に類似したプロファイルへと変換させる可能性を示唆している。

研究成果の概要（英文）：

The complete genome sequences of four *Helicobacter pylori* strains isolated from Japan were determined. A phylogenetic tree of concatenated well-defined core genes supported divergence of the East Asian lineage from the European lineage ancestor, and then from the Amerind lineage ancestor. Phylogenetic profiling revealed a large difference in the repertoire of outer membrane proteins. The results define *H. pylori* East Asian lineages and provide essential information for understanding their pathogenesis.

We investigated metabolome analysis using liquid chromatography-mass spectrometry, gas chromatography-mass spectrometry. Lactic acid was upregulated in *H. pylori* infected AGS (gastric cancer cell line) cells and serum of gastric cancer patients. In contrast, malic acid was downregulated in *H. pylori* infected AGS cells and serum of gastric cancer patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2011年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：*H.pylori*/ プロテオミクス解析 / メタボロミクス解析

1. 研究開始当初の背景：ピロリ菌感染は全世界の約 50%の人が感染している最も感染者の多い慢性感染症の一つであり、胃がんと関連が認められ、ピロリ菌は 1994 年に世界保健機構より 1 群の発がん因子に認定された。しかし、ピロリ菌感染による胃がん発症のオッズ比は、約 2~23 と国や地域により大きく異なる。ピロリ菌における胃がんリスクの違いの要因として、菌-宿主細胞間クロストークの多様性が考えられる。

1997 年にピロリ菌のゲノムの全塩基配列が決定され、全長 1667867 塩基対で 1590 の遺伝子を認めた。ピロリ菌のゲノムは、株により大きさ自体約 160-173 万塩基対と異なり、他の細菌にはない特徴的な現象である。ピロリ菌各株は生理・生化学的に共通する性状を示すが、物理的染色体地図の比較で、遺伝子の多型性が認められ、遺伝子の相互位置も大きく異なっている。これは、高い形質転換率を持ち、外因性 DNA が導入されやすいためと考えられている。また、ピロリ菌のゲノムには、本来ピロリ菌のものではない外来性の遺伝子群が存在している。これは病原性大腸菌等多くのグラム陰性細菌に共通した現象で、これらの細菌では、この外来性遺伝子群を持つことで病原性を発揮することが認められており、この遺伝子群を *pathogenicity island (PAI)*と呼んでいる。ピロリ菌では、病原因子の一つである細胞空胞化毒素関連蛋白(CagA)の遺伝子 *cagA*がこの PAI 内に位置しており、*cagPAI* と呼ばれている。これまでピロリ菌は、*cagPAI* を持つ type I 株と、*cagPAI* を持たない type II 株に分類され、type I 株は胃粘膜の炎症反応が強く、病原性が強いと考えられてきた。ピロリ菌の *cagPAI* 内には 4 型分泌装置の遺伝子が存在している。我々は、ピロリ菌が胃粘膜上皮細胞に接着すると、4 型分泌装置が上皮細胞膜へ針をさすように突き刺さり、その内腔を通して CagA がピロリ菌から上皮細胞内へと注入されることを明らかにした (J Exp Med 191:593-602,2000)。そして、上皮内に注入された CagA は、胃粘膜上皮細胞内でチロシンリン酸化を受け、細胞の分化や増殖に重要な役割を担う細胞質内脱リン酸化酵素 Src homology phosphatase-2 (SHP-2)と特異的に結合し、細胞の異常増殖に作用することを発見した(Science 295:683-686,2002)。CagA との結合により SHP-2 のチロシンフォスファターゼ活性は著しく増強される。我々はこれまでに、CagA によって脱制御された SHP-2 は Ras 非依存的に Erk MAPキナーゼの持続的活性化を引き起こすことを認めた。Erk の持続活性化は細胞の運動性ならびに細胞周期制御に重要な役割を果たすことが知られており、CagA-SHP-2 複合体による Erk の持続的活性化は異常増殖シグナル生成に

関与することが推察される。また、CagA により活性化された SHP-2 が直接脱リン酸化する細胞内基質分子として focal adhesion kinase (FAK) を同定した (Mol Cell Biol 26:261-276,2006)。FAK は細胞-基質間相互作用の基盤となる細胞接着斑を制御することにより、細胞運動を制御する。SHP-2 は FAK のキナーゼドメイン活性化ループ内に存在するチロシンリン酸化部位を脱リン酸化し、FAK キナーゼ活性を抑制する。FAK の活性低下に伴い細胞接着斑の新生が抑制され、細胞-基質間相互作用の低下による細胞運動能の増大が引き起こされる。

一方、我々は、CagA のチロシンリン酸化部位となるアミノ酸配列(E-P-I-Y-A)モチーフを同定するとともに、リン酸化チロシン残基を含む CagA の SHP-2 結合配列を明らかにした。この SHP-2 結合配列は東アジア株の CagA と欧米株の CagA 間で異なっており、東アジア株の CagA は欧米株の CagA に比べ SHP-2 とより強く結合し、より強い生物活性を発揮することが認められた(Proc Natl Acad Sci USA 99:14428-14433,2002)。従って、東アジア型の CagA を有するピロリ菌の感染は特に強い SHP-2 結合により、細胞内シグナル伝達系をより強く変化させることになり、より強い病原性を有することになると考えられる。実際に、我々はこれまで、東アジア型の CagA を有するピロリ菌の感染と胃がんと間に有意な相関関係を認めた(J Infect Dis 189:820-827,2004)。

以上のように、ピロリ菌感染による菌と宿主細胞間のクロストークの分子メカニズムの解析が進められ、エフェクターである CagA が細胞内に注入されることが起点となり、ピロリ菌感染において、さまざまな細胞内シグナル伝達のカスケードの関与が明らかになってきた。

2. 研究の目的：本研究は、ピロリ菌感染における菌-宿主細胞間クロストークを、メタボロミクスによる網羅的・包括的解析により、ピロリ菌感染胃がん分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法：1) ピロリ菌のゲノム解析：疾患特異的遺伝子を解析するために、次世代シーケンサーを用いて、日本の 4 株(胃がん 2 株、十二指腸潰瘍 1 株、慢性胃炎 1 株)の全ゲノムを解析した。2) メタボローム解析：in vitro 及び in vivo ピロリ菌感染における、アミノ酸、有機酸、脂質代謝物を解析し、ピロリ菌感染による胃がん発症における代謝物プロファイルを明らかにする。胃がん培養細胞株 AGS 細胞を用いた in vitro 感染実験とヒトの慢性胃炎及び胃がん患者血清を用いて、GC-MS を用いた水溶性代謝物を解析し

た。

4. 研究成果: 1) ピロリ菌のゲノム解析: 日本のピロリ菌4株の全ゲノムを解読し、世界の16株のゲノムと比較したところ、日本を含む東アジア株と欧米株では、外膜蛋白質やLewis抗原擬態に関わるリポ多糖合成酵素等、宿主と相互作用する遺伝子群に大きな違いが認められた。したがって、ピロリ菌における胃発がんリスクの違いの要因として、菌-

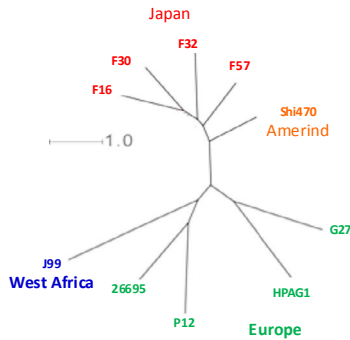


図1 ピロリ菌ゲノムの系統樹解析

宿主間クロストークの多様性が考えられる。

2)メタボローム解析: in vitro ピロリ菌感染による低分子代謝物を解析し、ピロリ菌感染により、解糖系が亢進するにも関わらず、TCAサイクルが十分に機能せず、逆に、乳酸が蓄積することを確認した(図1)。これまでの過去の研究により、胃がん患者のがん組織においても同様な代謝経路の破たんが報告されており(Cancer Res 69:4918-4925,2009)、これらの結果は、ピロリ菌感染が、宿主における代謝物プロファイルを、がん組織に類似し

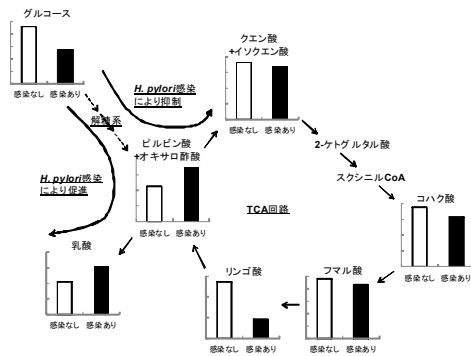


図2 in vitro ピロリ菌感染による代謝物解析

たプロファイルへと変換させる可能性を示唆している。

#### 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 9 件)

① Mimura T, Yoshida M, Nishiumi S,

Tanaka H, Nobutani K, Takenaka M, Suleiman YB, Yamamoto K, Ota H, Takahashi S, Matsui H, Nakamura M, Miki I, Azuma T, IFN- $\gamma$  plays an essential role in the pathogenesis of gastric lymphoid follicles formation caused by *Helicobacter suis* infection, FEMS Immunol Med Microbiol, FEMS Immunol Med Microbiol. 2011、63(1):25-34. 査読有

② Kawai M, Furuta Y, Yahara K, Tsuru T, Oshima K, Handa N, Takahashi N, Yoshida M, Azuma T, Hattori M, Uchiyama I, Kobayashi I, Evolution in an oncogenic bacterial species with extreme genome plasticity: *Helicobacter pylori* East Asian genomes, BMC Microbiol. 2011、16;11:104. 査読有

③ Yamamoto K, Tanaka H, Nishitani Y, Nishiumi S, Miki I, Takenaka M, Nobutani K, Mimura T, Ben Suleiman Y, Mizuno S, Kawai M, Uchiyama I, Yoshida M, Azuma T, *Helicobacter suis* KB1 derived from pig gastric lymphoid follicles induces the formation of gastric lymphoid follicles in mice through the activation of B cells and CD4 positive cells, Microbes Infect. 2011、13(7):697-708. 査読有

④ Furuta Y, Kawai M, Yahara K, Takahashi N, Handa N, Tsuru T, Oshima K, Yoshida M, Azuma T, Hattori M, Uchiyama I, Kobayashi I, Birth and death of genes linked to chromosomal inversion, Proc Natl Acad Sci U S A. 2011、25;108(4):1501-1506. 査読有

⑤ Nobutani K, Yoshida M, Nishiumi S, Nishitani Y, Takagawa T, Tanaka H, Yamamoto K, Mimura T, Bensuleiman Y, Ota H, Takahashi S, Matsui H, Nakamura M, Azuma T, *Helicobacter heilmannii* can induce gastric lymphoid follicles in mice via a Peyer's patch-independent pathway, FEMS Immunol Med Microbiol. 2010、60(2):156-164. 査読有

⑥ Cortes MC, Yamakawa A, Casingal CR, Fajardo LS, Juan ML, De Guzman BB, Bondoc EM; St. Luke's Helicobacter pylori Study Group, Mahachai V, Yamazaki Y, Yoshida M, Kutsumi H, Natividad FF, Azuma T, Diversity of the *cagA* gene of *Helicobacter pylori* strains from patients with gastroduodenal diseases in the

- Philippines、FEMS Immunol Med Microbiol. 2010、60(1):90-97. 査読有
- ⑦ Tanaka H, Yoshida M, Nishiumi S, Ohnishi N, Kobayashi K, Yamamoto K, Fujita T, Hatakeyama M, Azuma T、The CagA protein of *Helicobacter pylori* suppresses the functions of dendritic cell in mice、Arch Biochem Biophys. 2010、1;498(1):35-42. 査読有
- ⑧ Mizuno S, Miki I, Ishida T, Yoshida M, Onoyama M, Azuma T, Habu Y, Inokuchi H, Ozasa K, Miki K, Watanabe Y、Prescreening of a high-risk group for gastric cancer by serologically determined *Helicobacter pylori* infection and atrophic gastritis、Dig Dis Sci. 2010、55(11):3132-3137. 査読有
- ⑨ Hirai I, Sasaki T, Kimoto A, Yamamoto Y, Azuma T, Mahachai V, Hansomburana P, Lertkupinit C, Luangjaru S, Noophan P, Chanatrirattanapan R, Piyairandr V, Sappajit T, Suthivarakom K, Sangsuk L, Wangroongsarb P、Infection of less virulent *Helicobacter pylori* strains in asymptomatic healthy individuals in Thailand as a potential contributing factor to the Asian enigma、Microbes Infect. 2010、12(3):227-230. 査読有

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：メタボローム解析手法を用いた特定疾患の検査方法

発明者：吉田 優、西海 信、東 健

権利者：神戸大学

種類：特許

番号：特願 2010-101643

出願年月日：2010年4月27日

国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

東 健 (AZUMA TAKESHI)

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：60221040

### (2) 研究分担者

吉野 健一 (YOSHINO KEN-ICHI)

神戸大学・バイオシグナル

研究センター・助教

研究者番号：90280792

### (3) 連携研究者

該当なし