

## 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 4月 11日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590631

研究課題名（和文）ヘリコバクター・ピロリ菌の細胞死（プログラム死）と持続感染・宿主免疫応答

研究課題名（英文）Analyzing the relationship between programmed cell death of *Helicobacter pylori* (apoptosis), persistence and host immunity

研究代表者 竹内 啓晃 (TAKEUCHI HIROAKI)

高知大学・教育研究部医療学系・講師

研究者番号：90346560

研究成果の概要（和文）：ピロリ菌固有遺伝子 *cdrA* は細胞分裂抑制作用を有し、胃内感染中に欠損する。そこで、本遺伝子の宿主免疫応答を *in vitro* 及び *in vivo* (胃生検組織) で IL-8 を測定し解析した。*cdrA* 機能不全株は *in vitro*、*in vivo* 共に機能保持株の約半分の IL-8 産生量であった。このことは、*cdrA* 機能不全株は宿主免疫応答を減弱し攻撃（排除）を回避することで慢性持続感染維持に貢献している可能性が示唆された。*cdrA* による IL-8 誘導は NF- $\kappa$ B 経路であることも明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The *H. pylori cdrA* has a repressive role on cell division. Loss of *cdrA* was found during persistent infection in animal model and patients. Thus we investigated whether the *cdrA* affects on the host immune response *in vitro* and *in vivo*. The IL-8 level was compared in AGS cells co-cultured with wild-type or *cdrA*-disruptant strains and in biopsy specimens from patients infected by *cdrA*-positive or *cdrA*-negative strains. IL-8 level induced in AGS by a *cdrA*-disruptant strain was significantly lower ( $P<0.01$ ) compared to wild-type: corresponding to 50%-60% of those of wild-type, which coincided with *in vivo* data using biopsy specimens from *cdrA*-positive and *cdrA*-negative groups. Therefore, colonization by a *cdrA*-negative or *cdrA*-dysfunctional strain resulted in decreased IL-8 production and repression of NF- $\kappa$ B, and hence, attenuate the host immunity leading to persistent infection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：ヘリコバクター・ピロリ、細胞分裂、宿主免疫応答、IL-8、細胞死、形態、*cdrA*、FtsZ

1. 研究開始当初の背景  
約1/3のピロリ菌ゲノムは固有遺伝子でその機能は不明である。ピロリ菌の病原性に関しては解明されつつある。しかし、強酸性胃内

に定着するピロリ菌の生命動態（細胞分裂や変態）については殆ど解明されていない。申請者らは *cdrA* という本菌固有の細胞分裂関連遺伝子を見出し、菌体の分裂抑制作用を有

することを報告した。その後、*cdrA* 欠損株は野生株と形態を事にする事、ペニシリン系薬剤に tolerance (殺菌性に耐性化) になること、PBP (ペニシリン結合蛋白、特に PBP1~4) の profile が異なること、coccoid に変態しづらいこと、そして細胞増殖が亢進し長期間生存 (死ににくい) を可能とすることを明らかにした。また、本遺伝子は動物感染モデルやヒトで持続感染中に欠損する傾向にあることが報告された。

## 2. 研究の目的

- (1) 本 *cdrA* の感染宿主における免疫応答を解明する。
- (2) 形態・変態や viability (細胞死) への影響を細胞分裂蛋白 (FtsZ) や分裂制御蛋白 (MinCDE) との相互作用解析から進め本菌固有の細胞分裂機序および細胞死の機序解明に迫る。

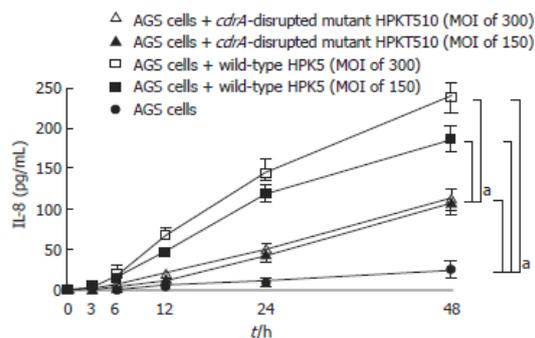
## 3. 研究の方法

- (1) 遺伝子破壊株の作成: 目的遺伝子を破壊した変異株の作成は薬剤耐性遺伝子 Km を使用し相同組み換えにて作成した。
- (2) 遺伝子多型性の解析: 臨床分離株 (癌、非癌患者由来) からゲノムを精製し特異的なプライマーで PCR 解析した。必要に応じてシーケンスを実施した。
- (3) 宿主免疫応答の解析: 主として IL8 の測定 (AGS 細胞とピロリ菌の共培養液や感染患者のヒト組織 (生検バイオプシー) を使用) を蛋白量 (ELISA) あるいは mRNA 転写量にて解析した。
- (4) 抗体作成: 目的遺伝子をクローニング後、その His 融合蛋白を作製し、ウサギ免疫にて種々のポリクロナール抗体を作成した。
- (5) 蛍光染色による細胞内局在の解析: 作成した抗体にて蛍光染色を実施し細胞内局在を解析した。
- (6) 蛋白発現量の解析: 作製した抗体あるいは His 抗体にてウェスタンブロット法を行なった。必要に応じて免疫沈降後ウェスタンブロットを実施し蛋白間の結合を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 宿主免疫応答

① *in vitro* 解析 (AGS 細胞とピロリ菌 (野生株 HPK5 とその *cdrA* 破壊株 HPKT510) の共培養): 両株間で IL8 産生誘導を比較した。下図に示すように HPKT510 株は HPK5 株の約 50% 程度の IL8 産生量だった。また、HPK5 株は菌数依存性に IL8 産生量を上昇させた (MOI:150 と 300 で実施)。



② *in vivo* 解析 (*cdrA* 多型解析を踏まえて米国患者にて *cdrA* 機能保持株感染者と機能不全株感染者の胃生検バイオプシーを使用し IL8 を測定): 測定した IL8 平均値は機能不全感染者群で 111pg/ml、機能保持株感染者群で 156pg/ml であり、*in vitro* 同様に機能不全株感染者の胃内においても IL8 の誘導は機能保持株感染者群よりも低値 (約 60%) であった。

### (2) *cdrA* 多型解析

種々のプライマーを設計し PCR 解析 (シーケンス) した結果、日本株は *cdrA* 陽性株が殆どであったが、米国は *cdrA* 陰性株が優勢を示し、多型に富むことが判明した。また、*cdrA* 遺伝子は 4 つの型に分類でき type I, II が *cdrA* 陽性 (機能保持株)、type III, IV が *cdrA* 陰性 (機能不全・欠損株) であった。

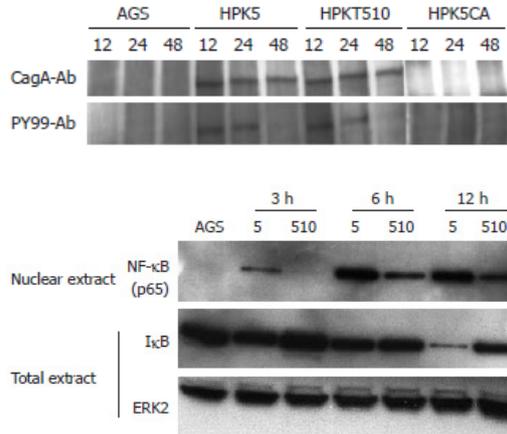
<i>H. pylori cdrA</i>			
Status	Genotype	United States (48 patients) <sup>1</sup>	Japan (51 patients)
Positive	Type I	0 (0)	4 (7.8)
	Type II	13 (16.9)	46 (90.2)
Negative	Type III	29 (37.7)	1 (2.0)
	Type IV	35 (45.4)	0 (0)
Total		77 <sup>2</sup>	51

さらに、同一患者の異なる胃内感染部位から採取したピロリ菌で *cdrA* 遺伝子型を解析した。結果、同じ患者の胃であっても感染部位間 (幽門部と胃体部) で *cdrA* 遺伝子型が異なっている事が明らかとなり、その多くは胃体部定着菌で *cdrA* 遺伝子が欠損する傾向を認めた。

<i>cdrA</i> status <sup>1</sup>		<i>cdrA</i> genotype (allele type)	
<i>cdrA</i> positive (6 cases)	Same <sup>2</sup> : 1	Antrum (+) <sup>3</sup>	Antrum Corpus
	Difference: 5	Corpus (+)	Identical <sup>4</sup> : 1 Type II Type II
		Corpus (-)	Difference: 5 4 Type II Type III
<i>cdrA</i> negative (23 cases)	Same: 22	Antrum (-)	1 Type II Type IV
		Corpus (-)	5 Type III Type III
	Difference: 1	Antrum (-)	11 Type IV Type IV
		Corpus (-)	Difference: 7 4 Type III Type IV
		Corpus (+)	2 Type IV Type III
Total (%)	Same: 23 (79)	Same: 17 (59)	1 Type IV Type II
	Difference: 6 (21)	Difference: 12 (41)	

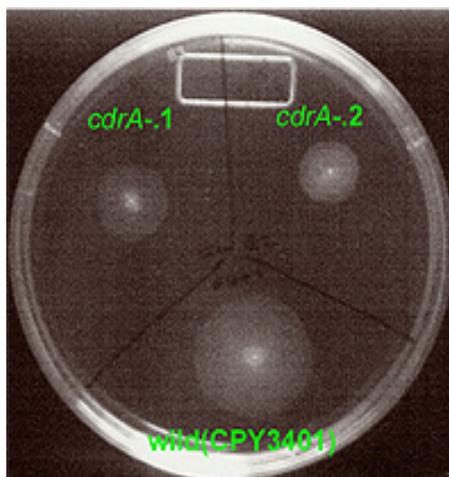
### (3) *cdrA*による IL8 誘導経路

下図に示すように、*cdrA*による IL8 誘導産生経路に病原因子 CagA が関与しているか否かを解析した結果、*cdrA*は CagA 発現および細胞内移行性とそのリン酸化に干渉していないことを明らかにした。また、*cdrA*の IL8 誘導には NF- $\kappa$ B の活性化 (I $\kappa$ B の減少) が関与していることを証明した。



### (4) *cdrA*の運動性に及ぼす影響

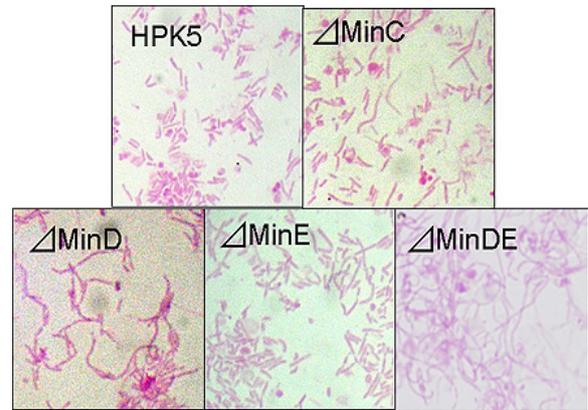
*cdrA*破壊 HPKT510 株は HPK5 株よりも形態がやや膨化しより短桿菌状に変化する。そのため、運動性に及ぼす影響を解析した。運動性の解析には野生株 CPY3401 (運動性が良い) とその *cdrA* 破壊株を作成し使用した。その結果、*cdrA* 破壊株は運動性が低下することが分かった。(下図は軟寒天培地でのピロリ菌の運動性 swarming: もやとしたサークルの大きさがピロリ菌の運動性を示している。大きなサークルほど運動性が高い。破壊株は 2 株とも野生株よりも小さなサークルを形成している。)



### (5) 細胞分裂関連蛋白 (FtsZ および MinC, D,

### E) の菌体形成への影響

大腸菌では MinC, D, E は分裂部位の決定制御に関与する蛋白である。そこで、HPK5 株の各 *min* 遺伝子破壊株を作成しその形態を観察した。全ての破壊株(*min C, D, E* と *DE* の 2 遺伝子破壊株)は著しくフィラメント化したが増殖・CFUは HPK5 株と大差を認めなかった。また、大腸菌で観察される無各細胞やミニ細胞は認めなかった。以上より大腸菌内での働きとは異なる、ピロリ菌固有の *min* 遺伝子作用があることが強く示唆された。(下図はグラム染色: 程度には株間で差があるものの、全ての破壊株で菌体の著しいフィラメント化を認める。)



## 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 17 件)

- ① Takeuchi H, 他 7 名 1 番目 Effect of *Helicobacter pylori cdrA* on IL-8 secretions and NF- $\kappa$ B activation. World J. Gastroenterology 査読有、18:425-34. 2012
- ② Morishita K, Takeuchi H, 他 8 名 2 番目 Superoxide dismutase (SOD) activity of *Helicobacter pylori per se* from 158 clinical isolates and the characteristics. Microbiol. Immunol. 査読有、in press 2012
- ③ Shibayama K, Takeuchi H, 他 3 名 2 番目 Biochemical and pathophysiological characterization of *Helicobacter pylori* asparaginase. Microbiol. Immunol. 査読有、56:408-17. 2011
- ④ Kudo H, Takeuchi H, 他 3 名 2 番目 In vivo anti-*Helicobacter pylori* activity of Chinese chive (*Allium tuberosum*). Food Science and technology research 17:505-13. 2011
- ⑤ Con SA, Takeuchi H, 他 4 名 2 番目

Clinical relevance of *babA2*, and a recombinant gene between *babA2* and *babB* of *Helicobacter pylori*: Studies in Costa Rican and Japanese isolates. World J. Gastroenterology 査読有、16: 474-8. 2010

- ⑥ Nishioka M, Takeuchi H, 他 6 名 2 番目 The mechanical binding strengths of *Helicobacter pylori* BabA and SabA adhesins using an adhesion binding assay-ELISA and its clinical relevance in Japan. Microbiol. Immunol. 査読有、54: 442-51. 2010
- ⑦ Trang VT, Takeuchi H, 他 6 名 2 番目 Antimicrobial activity of aminoreductone against *Helicobacter pylori*. Journal of Agricultural and Food Chemistry/ Biochemistry 査読有、57: 11343-8. 2009

[学会発表] (計 44 件)

- ① Takeuchi H, Evaluation of Natural product, Refined Deep Seawater, for *Helicobacter pylori* colonization and intestinal flora condition, and its application. World Congress of Microbes-2011. 2011.7.31. Beijing International Convention Center China
- ② Kadota Y, Functional analysis of *minC*, D and E genes of *Helicobacter pylori*. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress 2011.9.6-10. Sapporo convention center, Japan
- ③ 門田陽集、他 *Helicobacter pylori* の細胞分裂制御に関する Min システムの解析第 58 回日本臨床検査医学会学術集会岡山 2011.11.17-19. 岡山コンベンションセンター
- ④ Kawada M, *In vivo* effects of refined deep seawater (RDSW) against *Helicobacter pylori*. 110<sup>th</sup> ASM General Meeting 2010.5.23-28. Convention center San Diego, CA. USA
- ⑤ Morimoto N, Identification of *Helicobacter pylori* outer membrane protein related to *H. pylori*-associated chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. 110<sup>th</sup> ASM General Meeting 2010.5.23-28. Convention center San Diego, CA. USA
- ⑥ 濱田真也子、他 *Helicobacter pylori* 細胞分裂関連遺伝子 *cdrA* の機能と *ftsZ* との関連性に関する解析 第 41 回日本臨床検査自動化学会総会 2009.10.8-10. パシフィコ横浜

[図書] (計 2 件)

- ① 編者：竹内啓晃、杉浦哲朗  
執筆者：竹内啓晃、上原良雄、他 Pocket

Handbook Atlas 二版 pp1-33. 2011

- ② Nishimori I. Takeuchi H, Supuran CT Chapter 17: Inhibitors of *Helicobacter pylori*  $\alpha$ - and  $\beta$ -carbonic anhydrases as novel drugs for gastroduodenal diseases. Drug Design of Zinc-Enzyme Inhibitors: Functional, Structural and Disease Applications pp359-74. Wiley Hoboken press 2009

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：抗ピロリ菌組成物

発明者：島村智子、竹内啓晃、井澤登、勝野真也

権利者：高知大学、日本ミルクコミュニティ(株)

種類：特許

番号：特願 2009-133754

出願年月日：2009.06.03

国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹内 啓晃 (TAKEUCHI HIROAKIO)

高知大学・教育研究部医療学系・講師

研究者番号：90346560

### (2) 研究分担者

杉浦 哲朗 (SUGIURA TETUROU)

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号：50171145

公文 義雄 (KUMON YOSHITAKA)

高知大学・教育研究部医療学系・准教授

研究者番号：40215033

森本 徳仁 (MORIMOTO NORIHITO)

高知大学・医学部附属病院・主任臨床検査技師

研究者番号：60398055

### (3) 連携研究者

中澤 晶子 (NAKAZAWA TERUKO)

山口大学・歯学系・名誉教授

研究者番号：40053053