

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02730

研究課題名（和文）ピロリ菌のオシレーション発現sRNAによる持続感染機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of persistent infection of Helicobacter pylori by oscillation-expressed sRNA

研究代表者

三室 仁美（Mimuro, Hitomi）

大分大学・グローバル感染症研究センター・教授

研究者番号：80396887

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：ピロリ菌病原因子群の発現抑制性 small RNA HPnc4160 は、相変異により発現が周期的に変動し、標的病原因子群の発現を調節して、ピロリ菌の宿主適応を可能にする。本研究では、ピロリ菌持続感染における当該sRNAの周期的発現変動の意義と、sRNAが発現制御する新規病原因子群の病原性を明らかにすることを目的とした。sRNA上流の繰り返し配列変異株を用いた検討から、相変異が持続感染成立に重要であることを見出した。また、sRNAが発現制御する新規病原因子が、ピロリ菌の胃内上皮付着と食細胞による貪食に重要であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、発癌タンパク質CagAのみならず、複数の病原因子の発現を同時に制御するsRNAの発現レベルは、常に変動し続けることがピロリ菌の持続感染に必須であることを明らかにした。これまでの臨床分離株病原性判別では、病原因子が発現しているかどうかのみ着目していた。本研究成果は、病原性判別法の概念を覆す学術的かつ感染症疫学に大きな影響を与えるものである。また、sRNAが制御する新規病原因子について、胃上皮細胞と食細胞を標的として作動することを明らかにしたことから、宿主との相互作用を標的とした新たな治療薬への展開が期待できる。

研究成果の概要（英文）：HPnc4160, a small RNA that suppresses the expression of H. pylori virulence factors, periodically fluctuates in expression due to phase variation, regulates the expression of target virulence factors, and enables H. pylori to adapt to the host. The purpose of this study was to clarify the significance of periodic changes in the expression of this sRNA in persistent H. pylori infection and the pathogenicity of a group of novel pathogenic factors whose expression is regulated by the sRNA. From studies using mutant strains with repeat sequences upstream of the sRNA, we found that phase variation is important for establishing persistent infection. We also found that novel pathogenic factors whose expression is regulated by the sRNA are important for H. pylori adhesion to the gastric epithelium and phagocytosis by phagocytes.

研究分野：細菌感染生物学

キーワード：ヘリコバクター・ピロリ 持続感染

1. 研究開始当初の背景

Helicobacter pylori (ピロリ菌)は、世界人口の約半数に感染している大規模感染症起原因菌である。幼少期に経口的に生体内に侵入すると、胃内に終生にわたる付着感染を成立させ、胃炎や胃癌の原因となる。実際に胃癌に至るには、本菌感染者のうち年間 0.4%に過ぎない。このことは、本菌が常在菌のように宿主と共生することでも生存できるであろう持続感染病原細菌であることを示している。しかし、疾患を発症するか否かを分かつターニングポイントや、なぜ敢えて病原性を発揮して宿主に疾患を発症させるのかは明らかにされていない。ピロリ菌はゲノムレベルでの変異が容易に入りやすいことが特徴である。感染個体中で引き起こされるゲノムの多様性は、常に飲食に伴いダイナミックに環境が変動する胃のニッチに適応して持続感染を成立させるために、非常に重要である。菌は、慢性感染の過程で、選択的な遺伝子変異により抗原性を変化させて宿主免疫から逃れ、持続感染を可能にしていると予想されている。我々はこれまでに、ピロリ菌が宿主に感染する際に、菌体ゲノムにどのような点変異を導入して宿主環境に適合するか、に興味を持ち、げっ歯類感染動物モデルを用いて、ピロリ菌が胃内感染の際に獲得する菌体遺伝子変異を網羅的に解析した。その結果、感染に伴い、sRNA HPnc4160 の上流域に存在するチミジン反復配列が伸長し、HPnc4160 発現量が低下することを見出した。HPnc4160 欠損変異株と野生株を用いた比較 RNA-Seq および iTRAQ 解析により、sRNA HPnc4160 が欠損すると、発がんに関与する重要な病原因子 *CagA* や機能未知タンパク質群の発現が増大することが明らかになった。HPnc4160 は、標的 mRNA に直接結合して発現を低下させており、ひとたびピロリ菌が胃内で付着感染を成立させると、チミジン反復配列伸長により HPnc4160 発現量が低下し、*CagA* の発現と活性が増大した。また、HPnc4160 が制御する *CagA* 以外の 標的因子が、菌体の初期感染と炎症を増大させていた。すなわち HPnc4160 は、これまで発がんに関わる唯一の菌体因子と見なされていた *cagA* 遺伝子のみならず、他の機能未知病原因子の発現も制御する、新たな病原性制御 sRNA であることが明らかになった。非常に興味深いことに、sRNA HPnc4160 とその標的因子の発現は、上流のチミジン反復配列の長さによって、周期的に変動した。すなわち、感染経時的なチミジン反復配列伸長に伴い、HPnc4160 発現が増減するのであるが、その意義は不明である。そこで、sRNA HPnc4160 による病原性因子の周期的発現制御は、菌体が宿主生体内で長期間生存するために必要な、菌にとっての生存戦略なのではないか、との問いが生じた。

2. 研究の目的

そこで本研究では、ピロリ菌持続感染における sRNA HPnc4160 の周期的発現変動の意義を明らかにし、HPnc4160 による発現変動制御を受ける新規病原因子群の、持続感染における作用機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)ピロリ菌変異株作製と解析

ピロリ菌の遺伝子変異株は、薬剤カセット挿入法、もしくは自殺遺伝子を含む DNA 相補断片をエレクトロポレーションにより菌体に導入することで構築した。

マウス感染実験は、対数増殖期のピロリ菌を胃内に接種し、一定時間後に胃を採取し、ホモジナイズしたのちにプレートに播種し培養して、生育したコロニー数から算出した。胃内定着ピロリ菌の配列は、コロニーを複数単離し、ゲノム DNA を調製後、目的配列部分の PCR 産物をサンガーシーケンスにより解析した。

マクロファージによる食食反応は、PMA 刺激によりマクロファージ様に分化させたヒト単球 THP-1 細胞と菌体を共培養したのちに、パラホルムアルデヒドで固定し、蛍光免疫染色を施し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、細胞内外の菌体を数えることで評価した。

(2) 新規病原因子結合宿主因子解析

ピロリ菌病原因子の組換えタンパク質は、大腸菌発現プラスミドを用いて作製した。

結合タンパク質同定は、胃上皮細胞株 AGS の細胞溶解液と組換えタンパク質を混合反応後、組換えタンパク質が結合するビーズを用いたプルダウン法によりサンプルを回収し、SDS-PAGE 解析後に、特異的に結合したバンドに含まれるタンパク質を LC-MS/MS 解析により同定した。

4. 研究成果

ピロリ菌の病原因子群の発現抑制性 small RNA (sRNA) HPnc4160 の発現は、sRNA コード領域上流のチミジン連続配列長が相変異により変化することで、周期的な発現量変化を示した。長

期感染における HPnc4160 の周期的発現変動の意義を明らかにするために、まず、HPnc4160 欠損組換えピロリ菌を作出し、マウスに胃内接種してから 8 週後の長期感染時の胃内定着菌数を確認した結果、欠損株は野生株に比べて有意に胃内定着菌数が少なかった (図 1)。このことから、HPnc4160 は、菌体の持続感染成立に重要であることが示唆された。

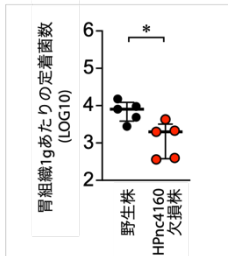


図1. Hpnc4160は持続感染成立に重要である。ピロリ菌野生株とHPnc4160欠損株をマウスに胃内接種した。8週後に胃を摘出し、定着菌数を測定した。

ピロリ菌がマウス胃内定着後、HPnc4160 コード領域上流のチミジン連続配列長が伸長する傾向が見られる (図 2)。また、チミジン連続配列長が長くなると、HPnc4160 発現量は連続配列長の伸長に対して周期的に増減する (図 3)。この連続配列長が短くても HPnc4160 発現量が高い場合と低い場合があり、また、配列長が長くとも、HPnc4160 発現が高い場合と低い場合があった (図 3)。連続配列長の長短と持続感染との関係を探るために、連続配列が短く HPnc4160 発現が高い T4 と発現が低い T1、および、連続配列が長く HPnc4160 発現が高い T18 と発現の低い T16 の変異株を作製した。

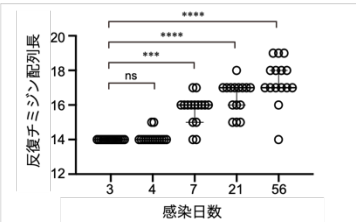


図2. 胃内定着株はsRNA HPnc4160上流のチミジン反復配列が伸長する。

マウス感染実験の結果、長期 (8 週間) 感染後の胃内定着菌数は、ももとの HPnc4160 発現量に関わらず、チミジン連続配列長の長い菌株 (T16 および T18) は、チミジン連続長の短い菌株 (T1 および T4) の場合に比べ、胃内定着菌数が有意に高かった (図 4)。胃内定着菌を単離し、ゲノムの連続 T 配列長を確認したところ、チミジン連続長の短い T1 および T4 ではチミジン連続長に大きな変化はみられなかったが、チミジン連続長の長い T16 および T18 では、経時的にチミジン連続配列長の異なる菌が出現していた (図 5)。すなわち、ピロリ菌が生体に適応して持続感染を成立させる過程では、多様なチミジン連続配列長を示す菌株のバリエーションが増え、HPnc4160 発現および HPnc4160 が発現制御する病原因子の発現量が異なる多様なバリエーションの菌が増大し、宿主に適応していくことが示唆された (図 6)。

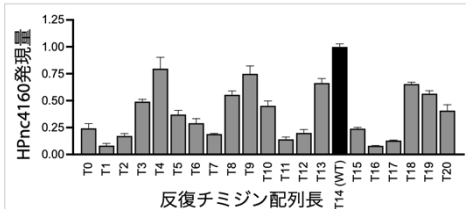


図3. HPnc4160上流反復チミジン配列長の伸長に伴い、sRNA発現量は周期的に変動する。

HPnc4160 によって mRNA 発現制御を受ける多くの新規病原因子群は、配列ホモロジー検索から、菌体が宿主と接する際の最前線の分子である外膜タンパク質であることが判明した。そこで、HPnc4160 の制御因子である PomY、PomZ および、HPnc4160 に依存しない相変異により発現制御を受ける PomX に着目し、相変異と病原性の関連を解明することを旨とした研究を展開した。まずこれらの遺伝子欠損変異株を作製し、基本的性状解析を行ったところ、これらの遺伝子は、菌体の生育、鞭毛による運動能、および IV 型分泌装置活性には影響がないことが明らかになった。マウス感染実験の結果、これらの因子はマウスの胃内定着に関与することが判明した。

マクロファージによる菌体取り込み能を精査したところ、PomX または PomY 欠損変異株では、野生株よりも、細胞による菌体取り込み数が減少することを見出した。菌体が貪食細胞に取り込まれることで、ピロリ菌抗原特異的 T 細胞応答が惹起され胃炎が発症することから、PomX および PomY は、胃炎発症制御因子であることが予想された。

宿主結合因子をプルダウンアッセイにより同定するために、大腸菌リコンビナントタンパク質作製を試みた。膜貫通領域を保持したままの全長組換えタンパク質作製は、技術的に困難であったことから、菌体外領域のみを発現する組換えタンパク質作製を試みた。AlphaFold によるタンパク質立体構造予測の結果、PomX および PomY については、一本のポリペプチド鎖で菌体外領域が形成されていたことから、菌体外領域のみの組換えタンパク質を作製した。全長タンパク質のリコンビナント

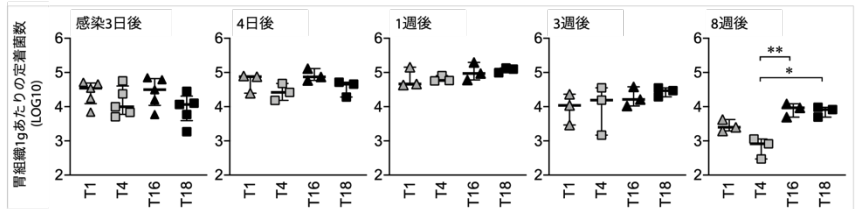


図4. HPnc4160上流反復チミジン配列長の長いピロリ菌は、感染が持続する。

タンパク質精製ができなかった PomZ は、膜貫通領域を除く菌体外領域が複数のポリペプチド鎖に分かれていることが予想されたため、主要な

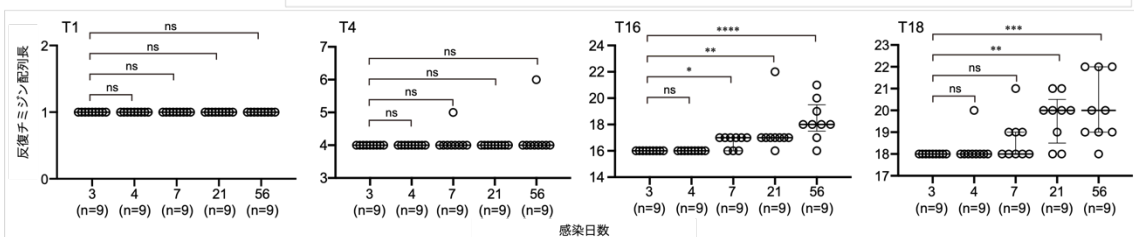
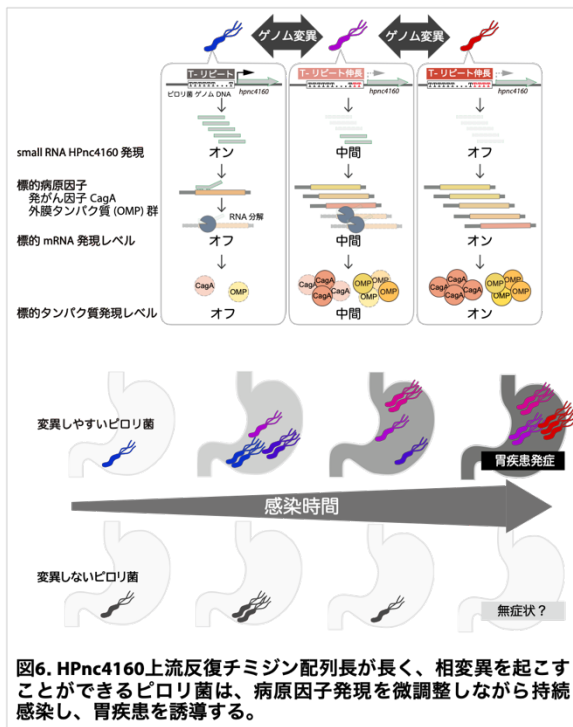


図5. HPnc4160上流反復チミジン配列長の長いピロリ菌は、反復チミジン配列長のバリエーションが多様である。

ポリペプチド鎖のみの部分タンパク質を作製した。胃上皮細胞溶解液とのプルダウンアッセイの結果、PomY および PomX については結合候補タンパク質を複数得たものの、PomZ については明確な結合因子が得られなかった。PomY の結合宿主因子は、胃上皮細胞内でピロリ菌感染部位に集積がみられたことから、当該因子は、PomY を介した細胞付着に関与する可能性が考えられた。一方、グリカンアレイ解析の結果、PomX 特異的に結合する糖鎖構造を同定した。現在、PomX が宿主の糖タンパク質と結合する可能性について解析している。リコンビナントタンパク質の作製が困難であった PomZ については、ビオチンリガーゼ融合 PomZ 発現組換えピロリ菌を用い、結合宿主因子同定系構築を進めている。

これまで考えられている一般的な相変異は、タンパク質コード領域内の単純反復配列や多重遺伝子による変異機構により、遺伝子発現が 0% もしくは 100% のどちらかの状態となる ON/OFF 制御発現である。我々が感染制御機能を見出した sRNA HPnc4160 は、上流域での反復配列長の周期的変動により、無段階的の微調節が可能となっていた。さらに HPnc4160 は多数の病原因子分子群の mRNA に結合して発現を抑制する。

本研究において独自性・創造性が高い点は、多数の病原因子の同時発現制御が ON/OFF ではなく無段階的制御であることが、持続感染に重要である点を明らかにした点である。ピロリ菌は、宿主免疫機構によって操作されるダイナミックな複製と死の均衡のなかで、持続感染・伝播が可能となる好ましいバランスを維持して、胃のニッチで生存している。周期的発現変動を示す因子は、病原細菌が持続感染を成立させるうえで、単なる発現欠如や高発現状態では解決できない微妙な宿主と細菌の均衡状態を保つための、重要なメカニズムであるはずである。これまでの、すでに何十年もの感染の末に疾患が発症したヒト由来ピロリ菌臨床分離株のゲノムや発現解析から、菌体因子発現の有無で病原性が判断されていた。しかし本研究によって、病原因子の有無のみならず、発現の動的変化をも鑑みた病原性判別法が重要であることが示唆された。また、相変異制御に着目した病原性発現機構制御は、抗生物質耐性菌出現に対峙する新たな創薬ターゲットとしての展開が期待できる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kubota Aizawa Sanae, Matsubara Yasuo, Kanemoto Hideyuki, Mimuro Hitomi, Uchida Kazuyuki, Chambers James, Tsuboi Masaya, Ohno Koichi, Fukushima Kenjiro, Kato Naoya, Yotsuyanagi Hiroshi, Tsujimoto Hajime	4. 巻 26
2. 論文標題 Transmission of Helicobacter pylori between a human and two dogs: A case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Helicobacter	6. 最初と最後の頁 e12798
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/hel.12798	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, et al, and Mimuro Hitomi	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 該当する

1. 著者名 Nagata Ryoko, Sato Hiroki, Takenaka Shoji, Yokoyama Junji, Terai Shuji, Mimuro Hitomi, Noiri Yuichiro	4. 巻 24
2. 論文標題 Analysis of Genetic Relatedness between Gastric and Oral Helicobacter pylori in Patients with Early Gastric Cancer Using Multilocus Sequence Typing	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2211 ~ 2211
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms24032211	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 三室 仁美	4. 巻 95
2. 論文標題 ピロリ菌の持続感染メカニズム	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 100 ~ 103
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14952/SEIKAGAKU.2023.950100	査読の有無 無
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 Khan Farzana, Khan Sakirul, Nabeka Hiroaki, Mimuro Hitomi, Nishizono Akira, Hamada Fumihiko, Matsuda Seiji	4. 巻 395
2. 論文標題 Neurotoxic stimulation alters prosaposin levels in the salivary systems of rats	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 159 ~ 169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00441-023-03847-6	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 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 三室仁美
2. 発表標題 ヘリコバクター・ピロリ感染症実験動物モデルを用いた病原性解析
3. 学会等名 第68回日本実験動物学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hitomi Mimuro
2. 発表標題 Helicobacter pylori manipulates a small RNA to regulate the adaptation to the host environment
3. 学会等名 The 27th Annual Meeting of the Japanese Society for Helicobacter Research
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hitomi Mimuro
2. 発表標題 Why H. pylori can be persistently infected Infection mechanism leading to drug discovery ideas
3. 学会等名 106th Airlangga Webinar Conference Series (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三室仁美
2. 発表標題 ヘリコバクター・ピロリの病原性とその制御機構の基礎研究
3. 学会等名 第29回日本ヘリコバクター学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Naomi Aini, Weichen Gong, Kana Nishida, Tomohiro Miyoshi, Hitomi Mimuro
2. 発表標題 Identification of novel Helicobacter pylori virulence factors that regulates macrophage phagocytosis.
3. 学会等名 九州微生物研究フォーラム2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hitomi Mimuro
2. 発表標題 Host adaptation strategies of Helicobacter pylori
3. 学会等名 HGSC 2023（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔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			
ベトナム	Cho Ray Hospital	108 Central Hospital		