

令和 6 年 5 月 16 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07287

研究課題名(和文)慢性胃粘膜感染したピロリ菌が分泌する外膜小胞による神経炎症の制御機構

研究課題名(英文)Regulatory mechanisms of neuroinflammation by outer membrane vesicles secreted by chronically gastric mucosa-infected *H. pylori*.

研究代表者

朴 雅美 (Park, Ah-Mee)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：70469245

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Helicobacter pylori (HP)は胃に持続感染し消化性潰瘍・胃癌を引き起こす病原菌であるが、胃外疾患との関連も多く、アルツハイマー型認知症(AD)ではHPの感染率が高いことが報告されている。本研究では動物モデルを用いてAD病態へのHP感染の影響とメカニズムの解明を目指した。HPを長期感染させた老齢ADマウスでは、脳でオートファジーや炎症に関連する遺伝子発現が増加すること、老人斑が減少することが分かった。HPが分泌する外膜小胞(OMV)は老齢マウスでのみ脳内に移行するが、OMVには好中球活性化proteinなどが含まれており、これらが脳の炎症などに影響している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HPの胃外疾患との関連には不明な点が多い。本研究では古くから存在の知られていたOMVが病原菌の飛び道具としてホストに全身性の影響を与えるという新たな側面を見出した非常に意義深い研究成果である。本研究ではOMVが炎症を惹起する病原因子の1つであることが分かったが、脳へも移行可能なことからDrug delivery systemのキャリアーとしてOMVを用いるなどの方面でも応用が可能であると考えられる。認知症は超高齢化を迎えている日本においては大きな社会問題となっており、本研究の成果は「ADの早期予防のためのHP除菌療法」の開発や提案につながる可能性があり、臨床的にも意義深いものであると考えている。

研究成果の概要(英文)：Helicobacter pylori (HP) is a pathogenic bacterium that chronically infects the stomach and causes peptic ulcers and gastric cancer. HP is also associated with extragastric diseases, and a high rate of HP infection has been reported in Alzheimer's disease (AD). In this study, we aimed to elucidate the effects and mechanisms of HP infection on AD pathology using an animal model. We found that mRNA expression related to autophagy and inflammation increased and amyloid plaques decreased in the brain of aged AD mice infected with HP for 10-months. OMVs contain neutrophil-activated protein, which may affect brain inflammation.

研究分野：微生物学

キーワード：Helicobacter pylori outer membrane vesicles neuronal inflammation Alzheimer's disease

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

*Helicobacter pylori* (HP) は胃に持続感染するグラム陰性らせん菌で、消化性潰瘍・胃癌を引き起こす病原菌である。HP 感染は上部消化管疾患だけでなく、全身性疾患の発症にも関与することが分かってきた。中枢神経系 (central nervous system, CNS) 疾患の発症に及ぼす HP 感染の影響については興味深い疫学調査の報告が増加している。特に2つの代表的な慢性炎症性疾患である多発性硬化症 (multiple sclerosis, MS) とアルツハイマー型認知症 (Alzheimer's disease, AD) では HP の感染率が MS では一般人口と比べて低く AD では高いことが明らかになった。CNS の炎症における MS と AD の共通点として、脳内の自然免疫系の細胞であるミクログリアやアストロサイトが活性化されている点がある。一方で相違点としては MS では血液由来の向炎症性ヘルパーT細胞 (Th1・Th17) の CNS への浸潤が炎症の中心となるが、AD では血液由来の免疫細胞の CNS への浸潤が乏しいという点、向炎症性の Th1 サイトカインは MS を増悪するが、AD ではむしろ神経保護的に働き得るという点などがある。このような CNS 慢性疾患にどのように HP が関係しているのかは、明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

本研究では動物モデルを用いて MS、AD 各病態への HP 感染の影響を明らかにし、さらにその影響がどういったメカニズムによるのかを解明することを目指す。これまでの申請者らの研究結果から、マウスの HP 慢性感染は全身性の免疫バランスに影響を与えないこと、HP が分泌する外膜小胞 (OMV) が神経炎症を亢進させることが明らかとなっている。これらの結果を踏まえ、「HP 由来の OMV が MS、AD 各々の神経炎症を対照的にコントロールする」という仮説を立てた。これは、HP が分泌した OMV は血行性に体内を移動し向炎症性の Th1, Th17 細胞の働きを抑えることで MS を軽減する一方で、OMV は BBB を通過し、脳内でミクログリアやアストロサイトを活性化し AD 増悪に働くという仮説である。本研究ではこの仮説を実証することを目的としている。本研究の成果は「HP 由来 OMV による MS の新規治療法」や「AD の早期予防のための HP 除菌療法」の開発や提案につながる可能性があり、臨床的にも意義深いものであると考えられる。

## 3. 研究の方法

野生型 (WT)、及び AD モデルマウス [ヒト型変異 APP と変異型プレセニリン1のダブルトランスジェニック (Tg) マウス] それぞれ老齢 (約40週齢) に HP を感染させた後、10ヶ月飼育した。コントロールには同週齢の非感染マウスを用いた。飼育終了前に記憶力、行動量を Y-迷路試験にて調べた。その後、血液と脳を回収し、左脳から RNA を抽出しシトランスクリプトーム解析に用いた。右脳はバラホルムアルデヒドで固定し組織染色用にスライスを作成した。OMV は HP と大腸菌 (EC, コントロール) をそれぞれブルセラ培地にて培養し、培地から濾過/超遠心法にて回収し以下の実験に用いた。1. 神経芽腫細胞 (Neuro2A)、ミクログリア (MG6)、アストロサイトに曝露し、オートファジーマーカー LC3II 関連の因子を調べた。2. 蛍光ラベルし、若齢・老齢マウスに投与し *in vivo* イメージャーにより体内動態と脳内の局在部位同定を行った。3. タンパク質を抽出し、LC-MS による病原因子 (タンパク質) の同定を行った。3。

## 4. 研究成果

HP 感染実験の結果： Y 迷路試験では AD マウスでは WT に比べ運動量が亢進していた。これは認知症に見られる徘徊行動に類似する状態であるといえる。トランスクリプトーム解析の結果 (図 1)、WT+HP 群ではストレスタンパク質である HSP などが増加する事がわかった。AD+HP 群ではオートファジーに関連する遺伝子が多数増加していた。

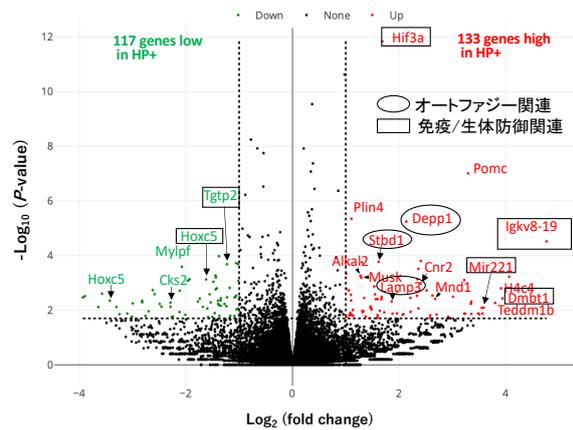
次に脳のアミロイドβの蓄積を組織免疫染色法によって AD±HP で比較した結果、意外なことに HP 感染群で低下していた。この結果は脳のトランスクリプトーム解析で AD+HP 群でオートファジーが増加したことは相関があるが、人での疫学調査結果とは相違するものであった。今回のマウス HP 感染実験で用いたシドニー株が何らかのオートファジーインデューサーとなる分子を分泌しているならば、むしろ治療への応用に使える可能性がある。そこで、HP が産生する OMV がオートファジーに与える影響を種々の 3 種の培養細胞で LC3II を調べた結果、Neuro2A と MG6 は EC-OMV では LC3II は低下したが、HP-OMV では増加した。アストロサイトの LC3II は正常状態でも非常に多かったが OMV 添加による変化はなかった。このことから、HP-OMV は神経細胞やミクログリアにオートファジーを誘導する作用があることが分かった。

蛍光ラベルした OMV の体内動態を調べた結果、若齢マウスでは脳内移行は見られなかったが、老齢マウスでは移行しており、脳スライスの蛍光検出からも移行していることが明らかとなった (図 2)。このことは、老齢マウスでは血液脳関門の透過性が亢進しており、OMV の影響を受け易い状態にあることが分かった。

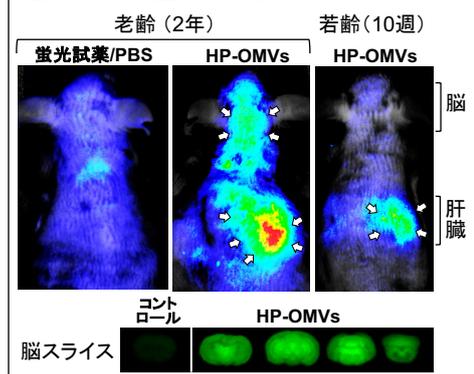
HP-OMV が脳内に移行し神経炎症を惹起することが明らかとなった。OMV は菌に由来するタンパク質、脂質や核酸で構成される。こういった因子が炎症に関連しているのかを調べるため、HP-OMV からタンパク質を抽出しプロテオーム解析し、584 のタンパク質が同定できた (表)。その中でヒトへの毒性が報告されているものとしては、表中に赤で示した好中球活性化 protein や TNF-α inducing protein があつた。OMV は核酸や脂質も含むため、それらの影響についても今後検討していく必要があると考えている。

これまでの申請者の研究と合わせて HP 感染による脳内の経時的変化をまとめると、ミクログリア活性化のピークは感染 3 ヶ月後で、10 ヶ月にかけて徐々に低下する。また、アミロイドβのプラーク量は 3 ヶ月では差がなかったが 10 ヶ月では同週齢非感染マウスに比べ減少していた。今後はこのような経時変化に HP がどのようなメカニズムで影響を及ぼすのかを明らかにすることが重要であると考えている。

[図1] ADマウスのHP長期感染によるmRNA発現変化



[図2] OMVの生体内動態



[表] HP-OMV構成 タンパク質

Catalase	Flagellar protein FlaG
Neutrophil-activating protein Napa / DNA protection during starvation protein Dps	Lipid/polyisoprenoid-binding Yce1-like domain-containing protein
Tumor necrosis factor alpha-inducing protein	Flagellin
Urease subunit alpha	Iron-regulated outer membrane protein
Urease subunit beta	Lipopolysaccharide 1,2-glucosyltransferase Rfa 1
ABC transporter substrate-binding protein	Lipoprotein
Adherence-associated lipoprotein A	LPP20 lipofamily protein
Basal-body rod modification protein FlgD	LPP20 lipoprotein
Chaperonin GroEL	Membrane protein
Co-chaperonin GroES	Neuraminyllactose-binding hemagglutinin
Corrinoid ABC transporter substrate-binding protein	Outer membrane protein assembly factor Bama
Diaminopimelate epimerase	Outer membrane protein HopQ / Omp27
Disulfide isomerase	Outer membrane protein Omp14
Elongation factor Tu	Outer membrane adhesin protein AlpB
Enolase	Peptidase M16 inactive domain protein
Fe(2+) dicitrate transport protein FecA	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
Ferritin	Peroxidase
Flagellar basal body protein	Putative outer membrane protein
Flagellar hook protein FlgE	requirement A protein HtrA
Flagellar hook-associated protein 2	Thioredoxin reductase
Flagellar hook-associated protein 3	Vacuolating cytotoxin autotransporter
Flagellar hook-length control protein FlkK	

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Ahmad Ijaz, Omura Seiichi, Sato Fumitaka, Park Ah-Mee, Khadka Sundar, Gavins Felicity N. E., Tanaka Hiroki, Kimura Motoko Y., Tsunoda Ikuo	4. 巻 25
2. 論文標題 Exploring the Role of Platelets in Virus-Induced Inflammatory Demyelinating Disease and Myocarditis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3460 ~ 3460
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms25063460	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 Moriguchi Kota, Nakamura Yumina, Park Ah-Mee, Sato Fumitaka, Kuwahara Motoi, Khadka Sundar, Omura Seiichi, Ahmad Ijaz, Kusunoki Susumu, Tsunoda Ikuo	4. 巻 24
2. 論文標題 Anti-Glycolipid Antibody Examination in Five EAE Models and Theiler's Virus Model of Multiple Sclerosis: Detection of Anti-GM1, GM3, GM4, and Sulfatide Antibodies in Relapsing-Remitting EAE	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12937 ~ 12937
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms241612937	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 Park AM, Tsunoda I.	4. 巻 42
2. 論文標題 Helicobacter pylori infection in the stomach induces neuroinflammation: the potential roles of bacterial outer membrane vesicles in an animal model of Alzheimer's disease.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Inflamm Regen.	6. 最初と最後の頁 39
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41232-022-00224-8	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 Park AM, Khadka S, Sato F, Omura S, Fujita M, Hashiwaki K, Tsunoda I.	4. 巻 12
2. 論文標題 Bacterial and fungal isolation from face masks under the COVID-19 pandemic.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 11361
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-15409-x	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 Hagiwara S, Nishida N, Ida H, Ueshima K, Minami Y, Takita M, Aoki T, Morita M, Chishina H, Komeda Y, Yoshida A, Park AM, Sato M, Kawada A, Nakano H, Nakagawa H, Kudo M.	4. 巻 12
2. 論文標題 Role of phlebotomy in the treatment of liver damage related to erythropoietic porphyria.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 6100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-10089-z	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 Hagiwara S., Watanabe T., Kudo M., Minaga K., Komeda Y., Kamata K., Kimura M., Hayashi H., Nakagawa K., Ueshima K., Minami Y., Aoki T., Takita M., Morita M., Chishina H., Ida H., Park A.-M., Nishida N.	4. 巻 11
2. 論文標題 Clinicopathological analysis of hepatic immune-related adverse events in comparison with autoimmune hepatitis and graft-versus host disease.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 9242
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-88824-1	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 Hagiwara S, Nishida N, Ida H, Ueshima K, Minami Y, Takita M, Aoki T, Morita M, Chishina H, Komeda Y, Yoshida A, Park AM, Sato M, Kawada A, Nakano H, Nakagawa H, Kudo M.	4. 巻 12
2. 論文標題 Role of phlebotomy in the treatment of liver damage related to erythropoietic porphyria.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 6100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-10089-z	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10件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 佐藤文孝、城玲央奈、森口幸太、コン・タン・グエン、イジャーズ・エフマド、尾村誠一、朴雅美、安達貴弘、角田郁生
2. 発表標題 IgA抗体欠損は実験的自己免疫性脳脊髄炎を軽減させる
3. 学会等名 第35回 神経免疫学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 角田郁生、中村優美和、森口幸太、城玲央奈、朴雅美、Ijaz Ahmad、Sundar Khadka、Cong Thanh Nguyen、尾村誠一、佐藤文孝
2. 発表標題 免疫の立場からMSの病態にせまる
3. 学会等名 第35回 神経免疫学会（招待講演）（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 朴雅美、スングル・カドカ、佐藤文孝、尾村誠一、角田郁生
2. 発表標題 コロナ禍でのマスク使用実態と使用後の付着菌類の同定
3. 学会等名 日本化学会秋季事業 第13回 CSJ化学フェスタ（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 朴雅美、尾村誠一、佐藤文孝、角田郁生
2. 発表標題 ピロリ菌感染はアルツハイマー型認知症モデルマウス脳の免疫遺伝子発現を増加：ピロリ菌OMV誘導性サイトカイン産生の関与
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 朴雅美、尾村誠一、佐藤文孝、角田郁生
2. 発表標題 ピロリ菌感染はアルツハイマー型認知症モデルマウスの脳の遺伝子発現を変化させた
3. 学会等名 第41回日本認知症学会学術集会 第37回日本老年精神医学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 朴雅美、佐藤文孝、角田郁生
2. 発表標題 ヘリコクター・ピロリ菌の外膜小胞は神経炎症を誘導する：アルツハイマー型認知症との関連
3. 学会等名 文部科学省 学術研究助成基金 挑戦的研究(開拓) R4年度採択「新規被膜型蛋白質ナノ粒子を用いた細胞性免疫・粘膜免疫誘導型ワクチンの開発」班会議
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 朴雅美, 岩室優, 角田郁生
2. 発表標題 胃粘膜ピロリ菌感染マウスの脳内免疫細胞活性化：アルツハイマー型認知症との関連
3. 学会等名 第42回 日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ピロリ菌の外膜小胞は神経炎症を誘導する：アルツハイマー型認知症との関連
2. 発表標題 朴雅美, 角田郁生
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sato F., Omura S., Park A.-M., Khadka S., Nakamura Y., Katsuki A., Nishio K., Gavins F.N.E., Tsunoda I.
2. 発表標題 Distinct bacteria in the gut associate with IgA levels in the central nervous system in picornavirus-induced acute and chronic myelitis models.
3. 学会等名 第68回 日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sato F., Omura S., Park A.-M., Khadka S., Nakamura Y., Katsuki A., Nishio K., Gavins F.N.E., Tsunoda I
2. 発表標題 Potential roles of IgA in the central nervous system in a viral model of multiple sclerosis.
3. 学会等名 第50回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021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