

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 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390085

研究課題名（和文）ピロリ菌病原因子 OipA のサイトカイン産生機構の解明

研究課題名（英文）Clarification of mechanisms how *H. pylori* virulence factor OipA produces cytokines

研究代表者

山岡 吉生（YAMAOKA YOSHIO）

大分大学・医学部・教授

研究者番号：00544248

研究成果の概要（和文）：本研究では、ピロリ菌の病原因子 OipA がどのように胃上皮細胞からサイトカインを産生するかの検討をおこなった。まず OipA の中で、サイトカイン産生に関与すると仮説した 3 部位を変異させた菌の作成に成功した（相補性変異株を含む）。しかしこれらは、サイトカイン産生能に強くは関与していなかった。OipA の機能をなくした *oipA* 変異株を用いた実験で、OipA はサイトカイン産生シグナルで、Paxillin や FoxO の活性化に関与していることを発見した。動物実験では、*oipA* 変異株はマウスに感染せず、感染成立に関与していることがわかった。

研究成果の概要（英文）：In this study, we tried to clarify the mechanisms how *H. pylori* virulence factor OipA induce cytokines from gastric epithelial cells. First, we successfully constructed *oipA* mutants with either of 3 regions which I hypothesized to relate to cytokine expression mutated (including complementation mutants). However all of 3 regions were not strongly involved in cytokine induction from gastric epithelial cells. In experiments using *oipA* mutants without the function of OipA, we found that OipA is involved in the activation of Paxillin and FoxO related cytokine-induction signaling. In animal models, *oipA* mutants did not infect mice, suggesting that OipA is involved in the establishment of infection to gastric mucosa.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2011 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2012 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	9,600,000	2,880,000	12,480,000

研究分野：消化管感染症

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：ヘリコバクター・ピロリ、胃癌、シグナル伝達、微生物、感染症

1. 研究開始当初の背景

ピロリ菌感染は胃粘膜炎症を引き起こし、消化性潰瘍や胃癌の原因と考えられている。しかしピロリ菌感染者がすべて消化性潰瘍や胃癌になるのではない。この原因として、宿

主側の要因、環境因子などに加え、多様な菌側の病原因子が関与していると考えられる。私は以前、ピロリ菌起因性胃炎では、多量の炎症性サイトカインが産生されており、特にピロリ菌の病原因子である *cagA* 遺伝子陽性

菌に感染すると、陰性菌例に比べ、より多くの炎症性サイトカイン（特に interleukin [IL]-8）が胃粘膜より産生されていることを発見し、ピロリ菌病原因子によるサイトカイン誘導を研究する先駆けとなった（Yamaoka et al. Gastroenterology 1996, Gut 1997, 1998, 1999）。その後2000年に、新しいIL-8誘導ピロリ菌因子を発見し、Outer inflammatory protein (OipA：外膜炎タンパク)と命名した（Yamaoka et al. PNAS 2000）。欧米人を用いた多変量解析では、CagAではなく、OipAのみが十二指腸潰瘍や胃癌発症の危険因子であり（Yamaoka et al. Gastroenterology 2002a, Gut 2006）、マウスを用いた動物実験でも *oipA* 変異株では、胃に定着する菌数も少なく、また全く炎症を惹起しなかった（Yamaoka et al. Gastroenterology 2002b）。スナネズミを用いた共同研究でも、*oipA* 変異株は、野生株に比べ胃癌の発症率を有意に抑制することが示された（Franco AT et al. Cancer Res 2008）。

OipAによる炎症性サイトカイン誘導メカニズムについても、我々は精力的に研究を行ってきた。我々はIL-8プロモーター上の転写因子結合部位として activator protein 1 (AP-1)結合部位、nuclear factor (NF)- κ B結合部位、および interferon-stimulated responsive element (ISRE)類似構造(ISRE-like element)の3つが、*H. pylori*感染によって活性化されることを証明した（Yamaoka et al. Gastroenterology 2004）。さらに我々は、MAPKのさらに上流の検討も行っており、OipAが上皮成長因子(EGFR)を活性化し、FAKやAktシグナルを活性化することや、OipAが β -カテニンの核内移動に関与していることも証明している（Lu H et al. Mol Biol Cell 2005, Kudo T Infect Immun 2005, Wu JY et al. Cancer Res 2006, Choi IJ et al. Cell Microbiol 2007, Lu H et al. J Biol Chem 2007, Franco AT et al. Cancer Res 2008, Tabassam FH Cell Microbiol 2008, 2009など）。以上、徐々にOipAが胃粘膜上皮に障害を起こす機序が明らかになりつつあるが、これらの活性化には、菌による差もあり、またOipAのどの部位が重要なのかなどの解析は行われておらず、今後のさらなる研究が必要である。

2. 研究の目的

OipAによる炎症性サイトカイン誘導メカニズムは未だ完全には明らかではない。本研究では、

- (1) OipAのアミノ酸構造に注目して、OipAが炎症性サイトカイン産生を引き起こすシグナル伝達機構について解明する。
- (2) 動物実験を用いて、OipAが胃粘膜炎症を引き起こす機序について検討する。
- (3) OipAのタンパク構造解析を行う。

3. 研究の方法

(1) *oipA* 変異株にて胃上皮細胞株からのIL-8産生が減少しない菌では、190番目のアミノ酸がスレオニン (Thr: T) からプロリン (Pro: P) に、276番目がバリン (Val: V) からアラニン (Ala: A) に変異していたという予備実験から、この部位がIL-8産生に関与すると仮定した。さらにOipAのC末端側(250-252番目)にはいわゆるDRY motif (Asp-Arg-Tyr) が存在しており、G protein coupling receptor (GPCR)に存在するDRY motifは、EGFRの活性化で重要な役割を果たしている。そのため、OipAの190番目および276番目のアミノ酸、さらにはDRY motifに焦点をあてた各種*oipA*相補性変異株を作成し、変異株および野生株感染胃上皮細胞からのサイトカイン誘導能を測定する。細胞内シグナル伝達については、特にNF- κ B pathway、GPCR-EGFR pathwayに注目して、OipAのアミノ酸変異がもたらす影響を調べる。

(2) さらに各種*oipA*相補性変異株および野生株感染動物モデルを用いて、*in vivo*でのサイトカイン産生、シグナル伝達機構を調べる。

(3) ピロリ菌の大量培養法を行い、組み換えタンパク質を作製し、機能を調べる。

4. 研究成果

(1) *oipA* 遺伝子相補性変異株は、*oipA* 変異株に*oipA* 遺伝子を再導入した株である。ピロリ菌の遺伝子相補性変異株作成には、ピロリ菌/大腸菌シャトルベクター (pHel vector) を用いる方法が一般的であるが、外膜タンパク (OMP) の発現は大腸菌にとって致命的であり、この方法は用いることができないとされていた。実際我々は、以前別のOMPであるAlpABの変異株作成には、hp0796という遺伝子内にプラスミドを導入するchromosome-basedシステムを用いての作成に成功している（Lu H et al. J Biol Chem 2007）。そのため、今回もまずはchromosome-basedシステムを用いた。まずは*oipA* 遺伝子全長およびそのプロモーター領域をpBluescript II vectorでクローニングし、カナマイシン耐性カセット (*aphA3*)を加えたプラスミドpB(*oipA-aphA3*)を作成した。さらに*oipA* 遺伝子の190番目のアミノ酸をProからThrに、276番目をAlaからValに変えたプラスミド、さらにはDRY motifを変異させたプラスミドも作成した。別にhp0796の全長をクローニングしておき (pBhp0796)、pB(*oipA-aphA3*)の*oipA-aphA3* 部位を、pBhp0796に入れることで、pBhp0796::*oipAaphA3* が作成された。

一方、同時にpHel vectorを用いた方法も、特認助教の岩谷を中心にチャレンジした。OMPでは不可能と考えられていたが、OipAの発現は大腸菌にとって致命的ではなく、作成に成功した。chromosome-basedシステムで

は、hp0796 の発現も欠落しているため、以後の実験では、pHel vector を用いて作成した菌株を用いることとした。ピロリ菌の相補性変異株を用いた検討をしているグループは国内ではほとんど見られず、新奇性、重要性は高い。

ただし、これらの変異では、変異株と野生株を胃上皮細胞と共培養させた場合に、IL-8 の産生に大きな差はみられなかった (DRY の変異で IL-8 産生量が約 15% 低下し、相補株にて野生株と同様の IL-8 量に戻るため、少しの影響はあるのかもしれない)。そこで、方針を少し変えて、通常の *oipA* 変異株を用いて、IL-8 産生の上流シグナルについての検討を行なった。その結果、Paxillin のリン酸化に OipA が関与していることがわかり、EGFR, FAK, Akt の発現を siRNA で押さえたところ、ピロリ菌によって誘導された Paxillin のリン酸化が抑制された (Tabassam FH et al. Am J Gastrointest Liver Physiol 2011)。またピロリ菌による細胞形態の変化 (Hummingbird 形成) も抑制された。さらに、FoxO のリン酸化にも OipA が関与していることも判明し、FoxO の発現を siRNA で押さえると IL-8 の産生も抑制されることがわかった (Tabassam FH et al. Helicobacter 2012)。

(2)

マウスを用いた系では、以前、我々は野生株として CPY2052 株を用い、その *oipA* 変異株を C57BL/6 マウスに投与し、3 ヶ月目に検討したところ、変異株感染群では、野生株感染群に比べ、菌量が有意に減少しており、定着に関与する因子であることが証明された。また *oipA* 変異株では、全く炎症を惹起しなかった。これらの以前の研究はベイラー医科大学で行われたものであるが、今回、大分大学ではマウスでのピロリ菌感染実験に成功しているため、当初の予定であったスナネズミの系ではなく、マウスの系で研究を進めることとした。まずは、野生株での実験を行った。野生株として、TN2 株と SS1 株を用いたところ、共にマウスに感染するが、感染量は SS1 株が約 1000cfu/mg に対し、TN2 株では 10cfu/mg と差を認めた。変異株を用いる実験では SS1 株を使用することにしたが、SS1*oipA* 変異株は感染成立しなかった。以前の CPY2052 株の場合は、菌量が減量しており、本研究から、OipA が菌の胃粘膜への定着に関与する因子であることが確認された。ただ、通常のマウスでは、炎症の程度が低いため、新たに IL-6 ファミリーのレセプター (gp130) 上の SHP-2 結合部位が欠損したノックインマウス (gp130 マウス) を用いた検討も始めた。このマウスは、STAT1/3 の過剰活性化が起こっており、オーストラリアのグループの検討では、自然発症でピロリ菌感染なしに胃腫瘍

が発症したと報告している。しかし我々の検討では 1 年の経過観察で腫瘍は認めなかった。しかしこのマウスにピロリ菌を感染させると約 1 年で胃腫瘍ができることもわかった。今後はこのマウスに *oipA* 相補性変異株を感染させる実験を検討しており、新たに平成 25 年度から基盤研究 B を獲得することができた。

スナネズミを用いた以前の研究では、野性株として TN2 株を用いた場合、*oipA* 変異株は感染が成立しなかったとの報告があったが、野性株として 7.13 株を用いた我々の検討では、*oipA* 変異株も感染したが、野生株感染では 27% が胃癌が発生したのに対して、*oipA* 変異株では 1 例も胃癌にはならなかった (Franco AT et al. Cancer Res 2008)。スナネズミを用いた研究は、米国ベイラー医科大学との共同研究として行い、本研究期間にも、特にスナネズミと OMP の関連性を調べた。野性株として 7.13 株を用いた場合、*oipA* 変異株感染例では野生株感染例に比べ IL-6, IL-11 の mRNA 発現量が有意に低下していることが分かった (Sugimoto M et al. J Gastroenterol Hepatol 2011)。

(3)

本研究では、当初は予定していなかったが、OipA についての生化学的解析が重要と考え、まずはピロリ菌の大量培養を試みた。本プロジェクトは、挑戦的萌芽研究として採用され、来年度も続けていく計画である。ピロリ菌は液体培地での継代培養では増殖しないことがわかったため、多くの寒天培地上で培養した後、5 L フラスコをピロリ菌培養用気体で充填して液体培養を行うことで、一度に 10L 培養可能なピロリ菌大量培養方法を確立した。OipA の組み換えタンパク質の作製を試みたが、当初は大腸菌では発現が確認できなかった。様々な組み換えタンパク質発現法を試み、コムギ胚芽を用いた無細胞合成系で組み換え OipA の発現に成功した。この組み換え OipA の可溶化を行い、精製法を確立することができた。一方、ピロリ菌からの native OipA の分取には成功していないため、現在検討を行っている。組み換え OipA 単量体が得られたことで、今後はこの分子をプローブとして、相互作用分子の探索を行えるようになった。機能不明分子の機能解析を行うためには、相互作用分子の探索は非常に有効な手法であるが、これまで得られていなかった OipA 単量体が得られたことは、今後の OipA 解析に向けた重要な一歩となった。

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 70 件)

英文雑誌 (すべて査読あり)

- ① Shiota S, Suzuki R, Yamaoka Y. The significance of virulence factors in *Helicobacter pylori*. *J Dig Dis*. 2013. doi: 10.1111/1751-2980.12054.
- ② Yamaoka Y. Pathogenesis of *Helicobacter pylori*-Related Gastroduodenal Diseases from Molecular Epidemiological Studies. *Gastroenterol Res Pract*. 2012;2012:371503. doi: 10.1155/2012/371503.
- ③ Tabassam FH, Graham DY, Yamaoka Y. *Helicobacter pylori*-associated regulation of forkhead transcription factors FoxO1/3a in human gastric cells. *Helicobacter*. 2012;17: 193-202. doi: 10.1111/j.1523-5378.2012.00939.
- ④ Tabassam FH, Graham DY, Yamaoka Y. Paxillin is a novel cellular target for converging *Helicobacter pylori*-induced cellular signaling. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011 ;301: G601-11. doi:10.1152/ajpgi.00375.2010.
- ⑤ Sugimoto M, Ohno T, Yamaoka Y. Expression of angiotensin II type 1 and type 2 receptor mRNAs in the gastric mucosa of *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils. *J Gastroenterol*. 2011 ;46:1177-86. doi: 10.1007/s00535-011-0433-7.
- ⑥ Sugimoto M, Ohno T, Graham DY, Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* outer membrane proteins on gastric mucosal interleukin 6 and 11 expression in Mongolian gerbils. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011;26:1677-84. doi:10.1111/j.1440-1746.2011.06817.x.
- ⑦ Ohno T, Vallström A, Rugge M, Ota H, Graham DY, Arnqvist A, Yamaoka Y. Effects of blood group antigen-binding adhesin expression during *Helicobacter pylori* infection of Mongolian gerbils. *J Infect Dis*. 2011;203:726-35. doi: 10.1093/infdis/jiq090.
- ⑧ Yamaoka Y. Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nat*

Rev Gastroenterol Hepatol. 2010 ;7: 629-641. doi: 10.1038/nrgastro.2010.154.

日本語雑誌

- ① 山岡吉生. 我々の厄介な相棒: ピロリ菌. *日本病態生理学会雑誌*. 査読無、21:1-11, 2013.
- ② 山岡吉生. ピロリ菌感染と健康長寿. *学術の動向*. 査読無、7: 32-38, 2012.
- ③ 山岡吉生. *H. pylori* ゲノム解析と臨床. *日本ヘリコバクター学会誌*. 査読無、13: 23-24, 2012.
- ④ 山岡吉生. *H. pylori* 菌体因子と宿主免疫応答. *日本ヘリコバクター学会誌*. 査読無、12: 14-15, 2011.
- ⑤ 塩田星児, 山岡吉生. 障害機序に関する新知見をみる. *Helicobacter Research*. 査読無、15: 319-324, 2011.
- ⑥ Hong Lu, 山岡吉生. *Helicobacter pylori* の病原因子 OipA/DupA に関する最新の知見. *Helicobacter Research*. 査読無、14: 31-37, 2010.
- ⑦ 山岡吉生. *Helicobacter pylori* の病原性 - どこまで解明されたか? *日本消化器病学会誌*. 査読無、107: 1262-1272, 2010.
- ⑧ 山岡吉生. *Helicobacter pylori* 感染とサイトカイン. *検査と技術*. 査読無、38: 883, 2010.

[学会発表] (計 54 件)

- ① Yamaoka Y. Molecular epidemiology of *Helicobacter pylori*: Association between *Helicobacter pylori* and disease outcomes. Special Lecture. 43th Annual Meeting of Gastroenterological Society of Taiwan. (2013年3月16日) 招待講演、高雄、台湾
- ② Yamaoka Y. Geographic differences of *Helicobacter pylori* genotypes and gastric cancer. Special lecture. VIII Congreso Internacional Interdisciplinario de Investigacion Cientifica. (2012年6月14日) 招待講演 (オープニングセミナー)、サントドミンゴ、ドミニカ共和国
- ③ 山岡吉生. *Helicobacter pylori* の分子疫学研究: 次世代シーケンスも含めて、85

回日本細菌学会総会(2012年3月28日)
招待講演、長崎、日本

- ④ Yamaoka Y. Bacterial virulence factors, The 2nd Asian Pacific Topic Conference (2012年1月15日) 招待講演、クアラルンプール、マレーシア
- ⑤ Yamaoka Y. Roles of virulence factors of *Helicobacter pylori*: OipA and DupA, XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology (2011年9月8日) 招待講演、札幌、日本
- ⑥ Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* pathogenesis and gastric cancer, International gastric cancer congress (2011年4月21日) 招待講演、ソウル、韓国
- ⑦ Yamaoka Y. Geographic differences of *Helicobacter pylori* genotypes and gastric cancer (2010年10月15日) 招待講演、ハノイ、ベトナム
- ⑧ Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* virulence factors and gastric cancer, Gachon International Gastric Cancer Symposium 2010 (2010年10月9日) 招待講演、インチョン、韓国

[図書] (計3件)

- ① 山岡吉生、藤岡利生. ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*). 病原菌の今日的意味. 松本慶蔵 編. 医薬ジャーナル社、大阪: pp493-504, 2011.
- ② 藤岡利生、山岡吉生、Lam Ting Nguyen. Preface. *Helicobacter pylori* infection in Asia. 藤岡利生、山岡吉生、Lam Ting Nguyen 編. 先端医学社、東京: pp100, 2011.
- ③ 山岡吉生. *Helicobacter pylori*. 新しい診断と治療のABC. 胃癌. 飯田 三雄 編. 最新医学社. 大阪: pp36-43, 2010.

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ

<http://www.med.oita-u.ac.jp/phealth2/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山岡 吉生 (YAMAOKA YOSHIO)
大分大学・医学部・教授
研究者番号: 00544248

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

David Y. Graham

ベイラー医科大学・消化器内科・教授