

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390102

研究課題名(和文)ヘリコバクターピロリ胃粘膜長期感染に必要な宿主・菌体因子の時空間的動態解析

研究課題名(英文)Mechanisms of persistent Helicobacter pylori infection

研究代表者

三室 仁美(Mimuro, Hitomi)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：80396887

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,200,000円、(間接経費) 4,560,000円

研究成果の概要(和文)：ヘリコバクターピロリ(Helicobacter pylori, Hp)の胃粘膜長期感染成立メカニズムの包括的理解を目指して、本菌の発現動態解析、パイエル板での動態解析、および宿主反応解析の三つの局面に分けた研究を行った。その結果、パイエル板侵入に関与する可能性のある菌体分子群を同定するとともに、持続感染による宿主microRNAの発現変動が、病態増悪化に重要であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to obtain a comprehensive understanding of the mechanisms underlying Helicobacter pylori (Hp)-induced long-term colonization in stomach. We focused on three aspects of the interplay between Hp and the host: the expression dynamics of Hp, the reaction dynamics at Peyer's patches, and host responses. As a result, we identified candidates of bacterial factors involved in bacterial association with Peyer's patches. We also found that epigenetic silencing of miRNA-X plays a key role in gastric disease progression in response to persistent Hp infection.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学(含真菌学)

キーワード：細菌 感染 微生物 ヘリコバクターピロリ

1. 研究開始当初の背景

ヘリコバクターピロリ (*Helicobacter pylori*, Hp)は、世界人口の約半数が感染している大規模感染症起因菌であり、胃粘膜に持続感染を引き起こして、胃炎、消化性潰瘍、胃 MALT リンパ腫、胃癌の発症と関連している。本菌は胃粘膜表面の粘液層の中や腺窩上皮に付着して増殖し、好中球、形質細胞、マクロファージ、リンパ球の浸潤を特徴とする胃炎を誘発する。

申請者らのグループは、Hp 抗原特異的な CD4 陽性 T 細胞が、胃炎の惹起に必要であること、また、Hp 抗原による感作は、小腸のパイエル板 (PP) 内部の樹状細胞 (DC) に Hp が捕捉されることで誘導されることを報告した (Nagai, S., Mimuro, H. et al., 2007 PNAS)。従来 Hp による胃炎の発症は、胃局所での Hp と宿主細胞との相互作用のみに着目して解釈されていたが、実際は、腸管内の抗原取り込み器官である PP を介して胃炎が惹起されていた。胃に菌体が定着して初めて感作細胞の胃へのリクルートとそれに続く胃炎が起こることから、Hp 感染症においては、長期間胃に定着する Hp の分子戦略と、PP での菌体抗原提示メカニズムの二つの器官を含む全身的な感染動態を鑑みて理解する必要がある。現時点では、PP 上皮層を通過する Hp と宿主の分子メカニズム、PP 内部の抗原提示細胞による貪食と抗原提示の分子機構の詳細は未だ明らかにされていない。さらに、DC から CD4 陽性 T 細胞へのクラス II 主要組織適合抗原を介した抗原提示にオートファジーが関与することが報告されている。Hp は宿主の免疫防御機構に拮抗して、長期的に炎症を惹起し続け得ることから、Hp が抗原提示細胞に対してオートファジーを介した制御をしている可能性が考えられるが未だその詳細は不明である。

Hp は *cag* pathogenicity island (*cag* PAI) と呼ばれる遺伝子群に、IV 型分泌装置 (Type IV secretion system, TFSS) 構成成分と、この装置を介して分泌される菌体タンパク質 CagA がコードされている。*cag* PAI は本菌の病原性に重要であり、特に前癌状態に関連する胃体部優位萎縮性胃炎は CagA に起因することが、基礎及び臨床的な知見から示唆されている。申請者らは以前から、宿主に Hp が感染した際に CagA が引き起こす作用に着目して研究を行っており、CagA が宿主細胞内で結合する多様な分子群と下流シグナルカスケードを明らかにしてきた (Mimuro, H. et al., 2002, Mol Cell; Suzuki, M, Mimuro, H., et al., 2005, JEM; 2009, Cell Host & Microbe)。さらに感染宿主生体内では CagA による転写活性化が、アポトーシス抑制性タンパク質の発現増大を介して、感染胃上皮細胞のターンオーバーによる宿主の病原細菌除去システムの破綻をもたらし、Hp の長期感染を確立させるメカニ

ムを明らかにした (Mimuro, H. et al., 2007, Cell Host & Microbe; 2009, Bioessays)。PP で Hp に感作した免疫担当細胞群が胃にホーミングする道標として、胃での持続感染は重要であり、それを可能とする分子戦略として、CagA が重要な役割を果たしていることを明らかにした。しかしながら、胃での持続感染の成立には CagA のような間接的な作用ではなく、外膜タンパク質 (OMP) と、宿主リガンドとの直接的な相互作用による付着成立が必須である。申請者らは胃の定着に作用する付着因子の中でも、感染初期の付着確立に重要である OMP の一種 BabA に関して感染経時的に解析した結果、感染後期では菌体因子と宿主上皮発現がドラスティックに変化して、BabA 機能をマスクする菌体因子の発現上昇の一方、新たな付着因子となる別の宿主因子の発現を Hp 自らが上昇させることで、長期感染を可能としていることが明らかとなった。これらの菌体と宿主の双方のダイナミックな種々因子の変動を統合的に理解するには、菌体と宿主の発現変動を、感染初期から経時的且つ網羅的に解析することが重要である。また、胃の菌体の変化に伴い、腸管内 PP へ流入する菌体と、それに対する PP での宿主応答も質的に変化する。従って、感染個体全体での Hp と宿主細胞の相互作用を包括的に理解するためには、菌体の感染時系列に沿った発現変動解析が非常に重要である。

Hp 病原性の実験動物を用いた研究において、スナネズミがヒトの病原性に重要である TFSS と CagA に依存して、ヒト病態に類似した胃炎、胃癌を呈するのに対して、ごく一部の低病原性株のみが胃内に定着できるマウスでは、胃炎を惹起するものの、TFSS や CagA に依存した強い病態は示さない。従って、スナネズミ感染株 (高病原性株) である ATCC43504 株と、マウス感染株 (低病原性株) である SS1 株の、ゲノム構造、遺伝子組成、ならびに発現パターンを比較解析することで、ヒトに病原性を示す上で重要な菌体因子の同定が可能となる。

2. 研究の目的

以上の構想を踏まえて、本研究では、Hp の胃粘膜長期感染成立メカニズムの包括的理解を目指して、本菌と感染宿主の時間的・空間的相互作用に焦点を絞り、3 年間で次の研究を企図した。Hp 発現動態解析：ヒト類似高病原性スナネズミ感染株と、低病原性マウス感染株のトランスクリプトーム解析を行い、ヒト病原性に重要な菌体因子を同定する。PP 動態解析：予備的検討から、微好気環境での螺旋状菌と、腸内環境での球状菌での PP 上皮層侵入透過親和性が異なるデータを得ている。表面タンパク質の発現プロファイルを網羅的に同定解析することで、PP 侵入に関わる菌体因子及び結合する宿主分子構造を同定する。宿主反応解析：感染経時的に

変動する胃上皮発現動態を解析して、感染経時的に発現変動する Hp の各因子との対応を精査し、長期定着を可能とする分子機構を解明する。これらのデータを統合的に解釈して、ヒトにおける Hp の胃粘膜長期感染成立機構を包括的に解釈する。

3. 研究の方法

(1) 動物実験で用いる Hp 株の全ゲノム塩基配列解析

Hp から調製したゲノム DNA サンプルを、Roche 454 GS FLX Titanium を用いた *de novo* 解析による全ゲノム配列決定に供した。アセンブル、スカフォールド作製、および Sanger 法でのフィニッシング後、クローリングされた配列の、ホモポリマーによる塩基のエラーをゲノムの x50 の Solexa GAIIx による read マッピングにて修正した。

(2) 外膜タンパク質の調製と網羅的ショットガン解析

菌液を洗浄後、プロテアーゼ阻害剤と DNase を含む溶液中で超音波破碎した。遠心分離により未破碎の細胞を除去後、超遠心分離により、細胞質画分と細胞膜画分を得た。細胞膜画分を sodium N-lauroyl sarcosinate を含む緩衝液に懸濁し、室温にて震盪してサルコシン化した。その後超遠心分離により、上清の内膜画分と、沈殿の外膜画分を得た。外膜画分は懸濁可溶化後、LC/MS/MS による網羅的タンパク質ショットガン解析に供した。

(3) スナネズミ感染モデルにおける *in vivo* での BabA 作用解析

BabA 欠損変異株および野生型 Hp をスナネズミに経口的に感染させた。8 週間後に感染動物から胃を摘出して、免疫組織化学的解析に供した。さらに、感染動物の胃から total RNA を抽出して、各種 mRNA 発現量を定量した。

(4) マウス腸管ループアッセイによるパイエル板侵入効率の解析

マウスの腸管を結紮して、内部にらせん状もしくは球状 Hp を注入後、一定時間の後に腸管パイエル板を摘出し、免疫組織化学的解析を行った。

(5) Hp 感染で発現変動する microRNA の同定 Hp を経口投与後 9 週のスナネズミから胃を摘出し、microRNA の発現変動を Taqman microRNA array を用いて網羅的に解析した。一方、メチル化により発現変動する microRNA の同定のためには、DNA メチルトランスフェラーゼ阻害剤である 5-aza-dC で処理をした胃上皮培養細胞と未処理の細胞からそれぞれ microRNA を抽出し、Taqman microRNA array に供して解析した。

(6) Outer membrane vesicles (OMVs) の調製と活性測定

Hp を培養後、遠心分離により菌体を除外した標品を超遠心分離により OMV 画分を得た。レポータープラスミドなどをトランスフェク

とした各種培養細胞に OMV を 24 時間添加後、上清は ELISA、細胞溶解液は qRT-PCR による mRNA 定量に用いた。

4. 研究成果

Hp 発現動態などの基礎データとするために、動物感染モデルで使用するスナネズミ定着株、マウス定着弱病原性惹起株、およびマウス定着強病原性惹起株計 3 株のゲノム配列を決定した。次に、螺旋状菌と球状菌をマウス腸管ループアッセイに供し、菌体の性状によるパイエル板侵入効率を免疫組織染色法により精査した結果、螺旋菌に比べて球状菌が、パイエル板内部に効率良く取り込まれることが明らかになった。そこで、感染動態に伴い変動する Hp 発現を調べるために、腸管内の微好気状態での螺旋状菌と、腸管内の嫌気状態での球状菌からそれぞれ mRNA を調製し、網羅的トランスクリプトーム解析に供した。その結果、球状体に特異的に発現する mRNA と smallRNA を複数同定した。現在それらの菌体内における役割を解析するために、当該因子の欠損もしくは過剰発現変異 Hp を作製している。一方、菌体の表面分子が、パイエル板への侵入を制御しうる可能性があることから、ゲノム解析を行った 3 株について、螺旋状菌および球状菌のそれぞれから外膜タンパク質を精製し、LC/MS/MS による網羅的ショットガン解析に供した。その結果、球状体外膜に特異的に存在する因子を複数同定した。これらのうち、まず、スナネズミおよびマウス定着株のどちらにも共通する因子を選定し、それらの欠損変異株を作製して、当該分子のパイエル板侵入における作用を精査している。

Hp の胃粘膜感染成立に重要な体内動態と病原性を理解するために、胃上皮細胞への菌体付着に重要な菌体膜タンパク質アドヘジン BabA の病原性発動における作用を解析した。菌体表面タンパク質 BabA は、宿主細胞表面の Le^b 糖鎖をリガンドとして結合することが報告されている。BabA-Le^b 結合の *in vivo* での感染における意義を検証するために、スナネズミ感染モデル系を採用した。齧歯類の胃粘膜表面の Le^b 発現は種により異なることが想定されたため、スナネズミ胃組織を免疫組織化学的解析に供した結果、スナネズミ胃粘膜には Le^b が発現していることが確認できた。スナネズミ感染 8 週間後の胃を摘出して解析した結果、野生型 Hp に比べ BabA 欠損変異株は、胃粘膜における CXCL1 発現が有意に低いことが明らかになった。*In vitro* の解析結果と総合して、BabA-Le^b 結合は、IV 型分泌装置による炎症惹起を増大させる作用があることを明らかにした (Ishijima, N., et al., JBC, 2011)。

Hp は、感染ステージに応じて宿主応答を微調整することで長期感染を確立させると予想されるが、そのメカニズムの詳細は未だ明

らかにされていない。一方、宿主応答の微調整を司る分子としての non-coding RNA (ncRNA) の重要性と、種々遺伝子発現のエピジェネティック修飾による制御が明らかにされている。ピロリ菌は感染宿主の胃粘膜上皮細胞に異常なメチル化を誘導することから、感染が発端となるエピジェネティック制御による宿主 ncRNA の発現調節が、宿主応答制御に重要である可能性が考えられる。microRNA は長さ 20-25 塩基の 1 本鎖 RNA であり、ncRNA の一種である。Hp 持続感染に应答して発現量が低下し、且つ DNA のメチル化により発現が抑制される microRNA-X (miR-X) を、スナネズミ感染モデルの胃由来サンプルと、胃上皮細胞を用いた microRNA マイクロアレイにより同定した。ヒト胃臨床検体での miR-X 発現量は、ピロリ菌陰性に比べ、ピロリ菌陽性検体において有意に低下しており、さらに、疾患悪性度が高いほど miR-X 発現量が低下していた。miR-X 発現を抑制すると、胃上皮細胞の細胞増殖が増大することを見出した。細胞増殖能に関与する miR-X の標的遺伝子を同定するために、miR-X 過剰発現胃上皮細胞で発現が低下する mRNA を、マイクロアレイ解析により選定し、標的候補遺伝子の細胞増殖能への関与を精査した結果、二つの遺伝子を候補遺伝子として同定した。実際にヒト胃粘膜組織中およびスナネズミ動物感染モデルにおいて、ピロリ菌感染により miR-X 発現量が低下し、その標的遺伝子の発現量は増大していることが明らかになった。これらの結果から、Hp 感染による炎症が誘導する miR-X のエピジェネティックサイレンシングは、異常な細胞増殖を誘導し、胃がんを含む慢性胃疾患の原因となる重要なメカニズムであることを明らかにした。

細胞内の自然免疫受容体である NOD1 は、グラム陰性細菌のペプチドグリカンを認識して、宿主にオートファジーと炎症応答を誘導する。今まで、細胞内のどのオルガネラでペプチドグリカンが NOD1 に認識されるのか、そして、ペプチドグリカンが NOD1 に直接結合するかは不明なままであった。そこで、Hp の outer membrane vesicles (OMVs) を、生理的にペプチドグリカンが宿主細胞質内に運搬する機構として用い、OMV はオートファゴソーム形成と炎症性 IL-8 応答を、NOD1 と RIP2 依存的経路で上皮細胞に誘導することを見出した。OMV 内部に含まれるペプチドグリカンは、EEA1-陽性の初期エンドソームにおいて、NOD1 および RIP2 と共局在した。さらに、共焦点レーザー顕微鏡による観察で、NOD1 とペプチドグリカンの直接結合の証拠を得た。以上の結果から、細菌感染において、NOD1 は初期エンドソーム内でペプチドグリカンを検出して、それによって RIP2 依存的オートファゴソームと炎症シグナルが誘導されることを示した (Irving, A., Mimuro, H., et al., Cell Host Microbe, 2014)。

本研究は、Hp 胃粘膜長期感染成立に必要な

宿主および菌体因子とその相互作用を多角的に明らかにした独創性の高い研究であるといえる。今後は、本研究で得られた成果を総合的に解釈することで、ヒトに病原性を示す上で重要な菌体因子の同定が可能となり、Hp のみならず他の病原細菌も含めた感染症の理解と克服への道筋が大きく開かれるものと考えられる。

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 14 件)

- ① Irving AT, Mimuro H, Kufer TA, Lo C, Wheeler R, Turner LJ, Thomas BJ, Malosse C, Gantier MP, Casillas LN, Votta BJ, Bertin J, Boneca IG, Sasakawa C, Philpott DJ, Ferrero RL, Kaparakis-Liaskos M. The Immune Receptor NOD1 and Kinase RIP2 Interact with Bacterial Peptidoglycan on Early Endosomes to Promote Autophagy and Inflammatory Signaling. **Cell Host Microbe**. 2014, 15, 623-635. 査読有, doi: 10.1016/j.chom.2014.04.001.
- ② Suzuki S, Franchi L, He Y, Muñoz-Planillo R, Mimuro H, Suzuki T, Sasakawa C, Núñez G. *Shigella* type III secretion protein MxiI is recognized by Naip2 to induce Nlr4 inflammasome activation independently of Pkc δ . **PLoS Pathog**. 2014, 10, e1003926. 査読有, doi: 10.1371/journal.ppat.1003926.
- ③ Kobayashi T, Ogawa M, Sanada T, Mimuro H, Kim M, Ashida H, Akakura R, Yoshida M, Kawalec M, Reichhart JM, Mizushima T, Sasakawa C. The *Shigella* OspC3 effector inhibits caspase-4, antagonizes inflammatory cell death, and promotes epithelial infection. **Cell Host Microbe**. 2013, 13, 570-583. 査読有, doi: 10.1016/j.chom.2013.04.012.
- ④ Sanada T, Kim M, Mimuro H, Ashida H, Ogawa M, Mizushima T, Sasakawa C. A bacterial effector targets the TRAF6-NF κ B pathway to modulate the acute inflammatory response to bacterial invasion of epithelial cells. **Virulence**. 2012, 3, 518-521. 査読有, doi: 10.4161/viru.21451.
- ⑤ Fukumatsu M, Ogawa M, Kim M, Mimuro H, Sasakawa C. Uptake of *Shigella*-containing pseudopodia by neighboring epithelial cells at tricellular junctions via non-canonical clathrin-dependent

- trafficking pathway. **Virulence**. 2012, 3, 515-518. 査読有, doi: 10.4161/viru.21740.
- ⑥ Fukumatsu M, Ogawa M, Arakawa S, Suzuki M, Nakayama K, Shimizu S, Kim M, **Mimuro H**, Sasakawa C. *Shigella* targets epithelial tricellular junctions and uses a noncanonical clathrin-dependent endocytic pathway to spread between cells. **Cell Host Microbe**. 2012, 11, 325-336. 査読有, doi: 10.1016/j.chom.
- ⑦ Sanada T, Kim M, **Mimuro H**, Suzuki M, Ogawa M, Oyama A, Ashida H, Kobayashi T, Koyama T, Nagai S, Shibata Y, Gohda J, Inoue J, Mizushima T, Sasakawa C. The *Shigella flexneri* effector OspI deamidates UBC13 to dampen the inflammatory response. **Nature**. 2012, 483, 623-626. 査読有, doi: 10.1038/nature10894.
- ⑧ Ashida H, Ogawa M, Kim M, **Mimuro H**, Sasakawa C. Bacteria and host interactions in the gut epithelial barrier. **Nat Chem Biol**. 2011, 8, 36-45. 査読有, doi: 10.1038/nchembio.741.
- ⑨ Ashida H, **Mimuro H**, Ogawa M, Kobayashi T, Sanada T, Kim M, Sasakawa C. Cell death and infection: a double-edged sword for host and pathogen survival. **J Cell Biol**. 2011, 195, 931-942. 査読有, doi: 10.1083/jcb.201108081.
- ⑩ Ashida H, Ogawa M, **Mimuro H**, Kobayashi T, Sanada T, Sasakawa C. *Shigella* are versatile mucosal pathogens that circumvent the host innate immune system. **Curr Opin Immunol**. 2011, 23, 448-455. 査読有, doi: 10.1016/j.coi.2011.06.001.
- ⑪ Suzuki M, Kiga K, Kersulyte D, Cok J, Hooper CC, **Mimuro H**, Sanada T, Suzuki S, Oyama M, Kozuka-Hata H, Kamiya S, Zou QM, Gilman RH, Berg DE, Sasakawa C. Attenuated CagA oncoprotein in *Helicobacter pylori* from Amerindians in Peruvian Amazon. **J Biol Chem**. 2011, 286, 29964-29972. 査読有, doi: 10.1074/jbc.M111.263715.
- ⑫ Ogawa M, **Mimuro H**, Yoshikawa Y, Ashida H, Sasakawa C. Manipulation of autophagy by bacteria for their own benefit. **Microbiol Immunol**. 2011, 55, 459-471. 査読有, doi: 10.1111/j.1348-0421.2011.00343.x.
- ⑬ Ishijima N, Suzuki M, Ashida H, Ichikawa Y, Kanegae Y, Saito I, Borén T, Haas R, Sasakawa C, **Mimuro H**. BabA-mediated adherence is a potentiator of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system activity. **J Biol Chem**. 2011, 286, 25256-25264. 査読有, doi: 10.1074/jbc.M111.233601.
- ⑭ Ogawa M, Yoshikawa Y, Kobayashi T, **Mimuro H**, Fukumatsu M, Kiga K, Piao Z, Ashida H, Yoshida M, Kakuta S, Koyama T, Goto Y, Nagatake T, Nagai S, Kiyono H, Kawalec M, Reichhart JM, Sasakawa C. A Tecpr1-dependent selective autophagy pathway targets bacterial pathogens. **Cell Host Microbe**. 2011, 9, 376-389. 査読有, doi: 10.1016/j.chom.2011.04.010.

[学会発表] (計 7 件)

- ① 三室 仁美 「*Helicobacter pylori* の感染戦略」第 87 回日本細菌学会総会、2014 年 3 月 28 日、東京
- ② 三室 仁美 「ヘリコバクターピロリ感染による宿主応答制御」平成 25 年度遺伝子病制御研究所国際研究集会「Infection, Immunity, Inflammation, Cancer」、2013 年 10 月 25 日、札幌
- ③ 三室 仁美 「ヘリコバクターピロリ感染による宿主応答制御」第 19 回日本ヘリコバクター学会学術集会、2013 年 06 月 29 日、長崎
- ④ Hitomi Mimuro 「Crosstalk between *Helicobacter pylori* and Host Cells」9th International Conference of Flow Dynamics, ICFD、2012 年 09 月 21 日、仙台
- ⑤ 三室 仁美 「ヘリコバクターピロリの感染機構」第 65 回日本細菌学会九州支部総会、2012 年 08 月 25 日、沖縄
- ⑥ Hitomi Mimuro, Kotaro Kiga, and Chihiro Sasakawa 「Control of host cell responses by *Helicobacter pylori* infection」International Union of Microbiological Societies (IUMS) 2011 Congress、2011 年 9 月 8 日、札幌
- ⑦ Hitomi Mimuro, Kotaro Kiga, and Chihiro Sasakawa 「Control of host cell responses by *Helicobacter pylori* infection」第 85 回日本細菌学会総会、2012 年 3 月 28 日、長崎

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/Mimuro_Lab/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三室 仁美 (Mimuro, Hitomi)
東京大学・医科学研究所・准教授
研究者番号：80396887

(2) 研究分担者

小川 道永 (Ogawa, Michinaga) 国立感染症研究所・細菌第一部・室長
研究者番号：80361624

丸山 史人 (Maruyama, Fumito) 東京医科歯科大学・医歯（薬）学総合研究科・准教授
研究者番号：30423122

(3) 連携研究者

無