

ヒト胃内感染ヘリコバクター属、ピロリとハイルマニのゲノム解析と病原性遺伝子の解明

●東 健 ◆吉田 優

神戸大学大学院医学研究科消化器内科学分野

<研究の目的と進め方>

Helicobacter pylori (*H. pylori*)は大きさ1.0～4.0 μmのグラム陰性らせん状菌で、一端に鞭毛が3～6本あり、ヒトの胃内に特異的に生息し、慢性胃炎、胃癌、胃・十二指腸潰瘍、胃 MALT リンパ腫など多様な疾患に関与している。一方、近年、*H. pylori*の類似細菌である *Helicobacter heilmannii* (*H. heilmannii*)が胃 MALT リンパ腫患者から検出され注目されている。この細菌は以前より *Gastrospirillum hominis*として知られており、大きさ4-10 μm、らせん状、波長が約1 μmで3-8回のねじれをもつ運動性の細菌で、最大14本の単極または双極の鞭毛を持ち、ヒト慢性胃炎患者の0.2-4.0%から検出されることが報告されている。このように2つの異なるヘリコバクター属が人畜共通感染症として認められ、また胃粘膜内に異なる疾患を惹起することは興味深い。

これまでに *H. heilmannii*の培養法は今のところ確立されていないため、ゲノム情報も明らかでなく、その研究は立ち遅れている。本研究では、ヒト胃内に生息する2種類の *Helicobacter* 属 (*H. pylori*と *H. heilmannii*)の病原性を明らかにするとともに、*H. pylori*のゲノム解析を基に *H. heilmannii*のゲノムを解析し、病原性遺伝子を明らかにする。

期間内に、以下のことを検討する。

- 1) *H. heilmannii*の全遺伝子解析と病原性遺伝子解析：*H. pylori*との比較検討。エフェクター、分泌装置、さらに PAI の存在の有無を検討する。
- 2) *H. heilmannii*感染及び *H. pylori*感染の病態解析：マウス感染モデル及び *H. pylori*の *cagA*などの病原遺伝子導入マウスなどを用いた菌-宿主細胞間のクロストーク解析。
- 3) *H. pylori*及び *H. heilmannii*の疾患特異性解析：各種疾患からの *H. pylori*と *H. heilmannii*臨牀分離株のゲノム解析。

<2008年度の研究の当初計画>

1) *H. heilmannii*の全遺伝子解析と病原性遺伝子解析：

*H. heilmannii*はマウス胃粘膜に多数定着するが、難培養性細菌であり、いまだ培養法が確立されていない。そこで、マウス感染胃粘膜を、特異的抗体を用いて *H. heilmannii*を回収する。得られた細菌ゲノム DNA をゲノムシーケンサー 20 システムを用いて、*H. heilmannii*の塩基配列解析を行う。ゲノム DNA を 300-500 bp の短い断片に分け、その末端に DNA 増幅及び DNA シーケンシング反応のプライマーに相補的なアダプターをライゲーションする。産物 DNA を変性させ、ランダムな single-strand template DNA (sstDNA)断片を得る。sstDNA ライブラリーをビーズに固定し、増幅試薬を含むエマルジョン中(油水コロイド)でモノクローナルな増幅を行う。その結果、各ビーズは数万コピーものクローナルに増幅された一本鎖 DNA に覆われる。この DNA ビーズを酵素とともにゲノムシーケンサー 20 にセットし、塩基の取り込みによる化学発光を検出することで塩基配列解析を行う。得られた塩基配列を *H. pylori*を含む他の *Helicobacter* 属とのゲノム比較により、*H. heilmannii*の全ゲノムシーケンスを決定

する。また、エフェクター、分泌装置、pathogenicity island などの病原性遺伝子を解析する。

2) *H. heilmannii*感染及び *H. pylori*感染の病態解析：

*H. heilmannii*の強毒株ならびに弱毒株を用いて、病原性遺伝子の違いが、マウス胃に誘導される胃 MALT リンパ腫の病態にどのように関与するかを比較検討する。*H. heilmannii*は体外で培養できないため、感染マウスの胃粘膜のホモジネート液を経口投与することにより感染させる。感染から経時的に1、2、3ヶ月後ならびに6ヶ月後に胃組織と周囲リンパ節を採取し、組織病理学的評価ならびに胃粘膜浸潤細胞の種類、CD4 陽性 T 細胞のサイトカイン産生能、ならびに血清の *H. heilmannii* 特異的 IgG 抗体のサブクラスなど、免疫学的検討を行う。また、胃 MALT リンパ腫の発症には CD4 陽性 T 細胞の産生するサイトカインが重要であると考えられる。そこで、Th1 ならびに Th2 型サイトカインである IFN- γ ならびに IL-4 の欠損マウスに *H. heilmannii*を感染させ、胃 MALT リンパ腫発症における宿主サイトカインの役割を明らかにする。4週令の IFN- γ 欠損マウスならびに、IL-4 欠損マウスにそれぞれ *H. heilmannii*を感染させる。適切なコントロールとして、それぞれのマウスのヘテロマウスを用いる。実際には IL-4 ホモ欠損マウス(雄)と IL-4 ヘテロ欠損マウス(雌)の組み合わせより得られた子マウスを感染実験に用いる。感染より3及び6ヶ月後、胃組織と周囲リンパ節を採取し、組織病理学的ならびに免疫学的検討を上記と同様に行う。一方、*H. pylori*感染の病態においては、エフェクターである CagA が4型分泌装置を介して胃粘膜上皮細胞内に注入されることで、細胞内シグナル伝達系が変化されることが重要であることが明らかにされており、最近、我々は、*cagA* 遺伝子トランスジェニックマウス作製に成功している。そこでこのトランスジェニックマウスを用いて、*cagA* 遺伝子導入により変動する宿主の免疫応答を検討する。

<2008年度の成果>

1) *H. heilmannii*の全遺伝子解析と病原性遺伝子解析：

*H. heilmannii*の DNA の精製については、感染マウスから現時点で既に1 μg の DNA が精製され、DNA をゲノムシーケンサー 20 で得られたシーケンスをメタゲノム解析で解析したところ、宿主由来(マウス)の DNA の混入はほとんど無かった。BLAST 解析の結果における GC% の分布から *Helicobacter* 属の遺伝子は 35-45% の範囲であると考えられた。高い GC% は *Bifidobacterium* 属由来のものと考えられ、腸内細菌の混入が考えられた。*Helicobacter* 属の遺伝子との相同性を検討したところ、*Helicobacter pylori*と *Helicobacter cetrurum* の virB10 と 80% の相同性を持った遺伝子が同定され、3.4kbp まで塩基配列を決定した。したがって、*H. heilmannii*のゲノム内に pathogenicity island 及び4型分泌装置の存在が想定された。さらに我々はより精製された *H. heilmannii* DNA を得るために、効率的な *H. heilmannii* の分離に成功し、高純度の *H. heilmannii* DNA が精製されている。現在メタゲノム解析を行っており、より正確なゲノム情報の解読が期待され

る。

2) *H. heilmannii*感染及び*H. pylori*感染の病態解析:

*H. pylori*の病態解析においては、*cagA* トランスジェニックマウスを作製し、生後12週に胃・小腸粘膜に過形成が生じ、生後72週には8.3%に胃・小腸に過形成ポリープ、1.8%に胃・小腸癌が発症することを明らかにした。しかも、このトランスジェニックマウスでは粘膜に炎症が認められないことから、*CagA*の過剰発現のみで発癌が誘導できることを明らかにした。さらに、興味深いことに、*CagA*を全身に過剰発現させたマウスでは、72週令でリンパ腫や白血病が発症した。これまでに、SHP-2は骨髄系およびリンパ系細胞の発育に必要で、小児の白血病でSHP-2遺伝子の変異が報告されており、*CagA*が骨髄およびリンパ系細胞に発現しSHP-2と結合することにより、SHP-2の本来の機能が損なわれリンパ腫や白血病が発症してきたと考えられる。

*H. heilmannii*の病態解析においては、6週令のC57B6マウスを用いて感染実験を行った。感染4週後から胃にリンパ濾胞が形成され、徐々にサイズの増大、数の増加が認められた。胃粘膜切片の病理学的解析では、リンパ濾胞を形成する細胞の多くは小型リンパ球であり、濾胞は胚中心、辺縁帯、マントル層などの通常のリンパ濾胞と同様の構造を有していた。また粘膜内および粘膜下層の炎症細胞浸潤がみられたが、粘膜の萎縮はほとんどみられなかった。濾胞を形成する細胞の種類を同定するため、凍結した胃組織をリンパ球表面マーカーに対するモノクローナル抗体を用いて免疫染色を行ったところ、濾胞を形成する細胞の多くはB220陽性であり、B細胞であることを明らかにした。またCD4で染色される細胞も濾胞内外に認められ、実効細胞としてCD4陽性ヘルパーT細胞が濾胞内に存在することが類推された。このような免疫細胞構成は、感染期間によって大きな変化は認められず、形態学的にも小リンパ濾胞が同様の機序により増大するものと考えられた。*H. heilmannii*感染胃粘膜内のサイトカインを定量的RT-PCRで検討したところ*H. heilmannii*感染によりTh1型サイトカインであるIFN- γ およびTh2型サイトカインであるIL4が、有意に増加しており、感染後時間経過とともにその程度は増強していた。また、マウス血清中の*H. heilmannii*特異的IgGサブクラスをELISAで測定ところ、感染2か月以降IgG2bが上昇しており、感染3か月以降IgG1も優位に上昇していた。以上より*H. heilmannii*感染によるMALTリンパ腫発症にTh1とTh2の両者の免疫反応の活性が関与していることが示された。このリンパ濾胞形成において、*H. heilmannii*感染胃粘膜内CXCL13およびVCAM1を定量的RT-PCRで検討したところ、非感染マウスにくらべ優位に上昇していた。これらリンパ球ホーミングに関するケモカインが、リンパ腫発症に関与している可能性が示唆された。これらの成果から*H. heilmannii*感染におけるMALTリンパ腫形成メカニズムは、*H. pylori*ですでに報告されているリンパ種形成と近似のメカニズムであることが示唆された。しかしながら、*H. pylori*感染では、胃粘膜上皮障害が主体であるが、*H. heilmannii*感染では、リンパ濾胞の形成が主体であるという分子メカニズムについては、今後、検討していく必要がある。

<国内外での成果の位置づけ>

*H. heilmannii*は培養が出来ず、全くゲノム解析がなされていないため、*H. pylori*のゲノム解析を基に*H. heilmannii*のゲノムを解析し、病原性遺伝子を明らかにすること、また、マウス感染モデルや*H. pylori*の*cagA*などの病原遺伝子導入マウスなどを用いて病態解析することが挙げられる。本研究により、全く解析がなされていなかった、*H. heilmannii*の全遺伝子と病原性遺伝子が明らかになり、*H. pylori*感染及び*H. heilmannii*感染の病態が把握さ

れ、それぞれの感染の疾患特異性が明らかにされる。これらの結果により、これら細菌感染による各種疾患発症リスク診断法が確立され、効率的な除菌治療が可能になる。*H. pylori*の遺伝子配列との相同性を基に、PCRによる16S rRNAの解析が進められている(J Clin Microbiol, 39:1510-1516,2001)。これまで*H. pylori*によるリンパ腫発症には適切な動物モデルがなく、解明が進んでいなかった。最近同じ*Helicobacter*属である*H. heilmannii*がヒト胃MALTリンパ腫の病原菌である可能性が報告され、興味深いことに、近年、研究協力者である信州大学医学部臨床検査部の太田ら、北里大学薬学部の中村らにより、胃MALTリンパ腫患者やカンクイザルから分離された*H. heilmannii*をマウスに感染させることにより短期間で胃MALTリンパ腫を誘導できるマウスモデルが開発された(Infect Immun, 75:1214-22,2007)。このマウスモデルを用いて、*Helicobacter*属細菌感染による胃リンパ腫発症における分子メカニズムや宿主免疫応答を明らかにすることで、リンパ腫に対する有効な治療法につながる可能性がある。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

*H. heilmannii*は純粋培養法が確率されていない。感染マウスの胃粘膜からヘリコバクター属に対する特異的ポリクローナル抗体を用いて、目的菌を精製しているが、マウス胃粘膜に常在する細菌や糞食による腸内細菌、また、マウス胃粘膜組織の混入により、メタゲノム解析が困難となっている。これまでの解析では、BLAST解析の結果から、腸内細菌の混入が多く認められ、さまざまな条件検討を行っている。今後、磁気ビーズ法に加え、フローサイトメトリーによるソーティング法、また無菌マウスを用いて、さらに*H. heilmannii*の精製純度を高め、メタゲノム解析を行う予定である。

<今後の課題>

現在、マウス感染胃粘膜から特異的抗体を用いて*H. heilmannii*を回収する際に、他の菌ならびにマウス由来のDNAの混入を少なくするための工夫を進めている。また、病態解析においては*H. heilmannii*をサイトカイン欠損マウスに感染させ、胃リンパ腫発症における宿主免疫応答において、CD4陽性T細胞が果たす役割の解明を進めていく予定である。

<成果公表リスト>

- 0801291750 Ohnishi N, Yuasa H, Tanaka S, Sawa H, Miura M, Matsui A, Higashi H, Musashi M, Iwabuchi K, Suzuki M, Yamada G, Azuma T, Hatakeyama M. Helicobacter pylori CagA protein induces gastrointestinal carcinoma and leukemias in mice. Proc Natl Acad Sci USA 105:1003-1008, 2008.
- 0901151522 Nakayama M, Hisatsune J, Yamasaki E, Isomoto H, Kurazono H, Hatakeyama M, Azuma T, Yamaoka Y, Yahiro K, Moss J, Hirayama T. Helicobacter pylori VacA-induced Inhibition of GSK3 through the PI3K/Akt Signaling Pathway. J Biol Chem. 284(3):1612-9, 2009
- 0901151555 Kurashima Y, Murata-Kamiya N, Kikuchi K, Higashi H, Azuma T, Kondo S, Hatakeyama M. Deregulation of beta-catenin signal by Helicobacter pylori CagA requires the CagA-multimerization sequence. Int J Cancer. 122(4):823-31. 2008
- 0901151607 Saadat I, Higashi H, Obuse C, Umeda M, Murata-Kamiya N, Saito Y, Lu H, Ohnishi N, Azuma T, Suzuki A, Ohno S, Hatakeyama M. Helicobacter pylori CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. Nature 447(7142):330-3,2007