

# 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内科学講座消化器内科学分野

## <研究の目的と進め方>

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) は大きさ 1.0～4.0  $\mu$ m 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。

1997 年に *H. pylori* のゲノムの全塩基配列が決定され、全長 1667867 塩基対で 1590 の遺伝子を認めた。*H. pylori* のゲノムは、株により大きさ自体約 160-173 万塩基対と異なり、他の細菌にはない特徴的な現象である。*H. pylori* 各株は生理・生化学的に共通する性状を示すが、物理的染色体地図の比較で、遺伝子の多型性が認められ、遺伝子の相互位置も大きく異なっている。これは、高い形質転換率を持ち、外因性 DNA が導入されやすいためと考えられている。また、*H. pylori* のゲノムには、本来 *H. pylori* のものではない外来性の遺伝子群が存在している。これは病原性大腸菌など多くのグラム陰性細菌に共通した現象で、これらの細菌では、この外来性遺伝子群を持つことで病原性を発揮することが認められており、この遺伝子群を pathogenicity island (PAI) と呼んでいる。*H. pylori* では、病原因子の一つである細胞空胞化毒素関連蛋白 (CagA) の遺伝子 *cagA* がこの PAI 内に位置しており、*cagPAI* と呼ばれている。*H. pylori* の *cagPAI* 内には IV 型分泌装置の遺伝子が存在している。我々は、*H. pylori* が胃粘膜上皮細胞に接着すると、IV 型分泌装置が上皮細胞膜へ針をさすように突き刺さり、その内腔を通して CagA が *H. pylori* から上皮細胞内へと注入されることを明らかにした (J Exp Med 191:593-602,2000)。また、上皮内に注入された CagA は、胃粘膜上皮細胞内でチロシンリン酸化を受け、細胞の分化や増殖に重要な役割を担う細胞質内脱リン酸化酵素 Src homology phosphatase-2 (SHP-2) と特異的に結合し、細胞の異常増殖に作用することを発見した (Science 295:683-686,2002)。これまで *H. pylori* を *cagPAI* を持つ type I 株と、*cagPAI* を持たない type II 株に分類し、type I 株は胃粘膜の炎症反応が強く、病原性が強いと考えられてきた。

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  $\mu$ m、らせん状、波長が約 1  $\mu$ m 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。

本研究は、*H. pylori* の *cagPAI* 遺伝子群の機能を解析し、*H. pylori* 感染の病態を解明すること、さらに、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. pylori* 感染における宿主応答の解析

- 2) *H. pylori* の疾患特異的病原遺伝子の解解析
- 3) *H. heilmannii* の全遺伝子解析と病原性遺伝子解析
- 4) *H. heilmannii* 感染及び *H. pylori* 感染の病態解析
- 5) *H. pylori* 及び *H. heilmannii* の疾患特異性解析

## <研究開始時の研究計画>

### 1) *H. pylori* 感染における宿主応答の解析

我々は世界で初めて、*H. pylori* が胃粘膜上皮細胞に接着すると、IV 型分泌装置が上皮細胞膜へ針をさすように突き刺さり、その内腔を通して CagA が *H. pylori* から上皮細胞内へと注入され、上皮内に注入された CagA は、胃粘膜上皮細胞内でチロシンリン酸化を受け、細胞の分化や増殖に重要な役割を担う細胞質内脱リン酸化酵素 SHP-2 と特異的に結合し、細胞の異常増殖に作用することを発見した。本研究でスナネズミ感染実験を行い、IV 型分泌装置の構成遺伝子の 1 つである *cagE* 遺伝子をノックアウトした *H. pylori* 変異株の感染では、胃粘膜の炎症はほとんど消失したが、エフェクターの 1 つである *cagA* 遺伝子をノックアウトした *H. pylori* 変異株の感染では胃粘膜の炎症は軽度軽減されるに留まることを認め、CagA 以外に IV 型分泌装置を介して宿主細胞内に注入されるエフェクターの存在が考えられた。したがって、本研究では *H. pylori* 感染における *cagPAI* 遺伝子発現の解析、*H. pylori* 感染でチロシンリン酸化される胃粘膜上皮細胞内蛋白質の網羅的解析、さらに、IV 型分泌装置の動態と *H. pylori* の新規エフェクターの解析を計画している。本研究に必要な、*in vitro* 感染実験、哺乳類発現ベクター pSP65SR  $\alpha$  への *cagA* 遺伝子のクローニング、及び各種病原因子変異 *H. pylori* 株は既に準備出来ている。

### 2) *H. pylori* の疾患特異的病原遺伝子の解析

慢性胃炎、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、胃癌由来 *H. pylori* 臨床分離株 11 株の約 37kb の *cagPAI* の全塩基配列を決定し、これまで報告されていた欧米の 3 株と比較した結果、系統樹解析により日本の萎縮性胃炎、胃潰瘍及び胃癌株は欧米株と起源が異なることが認められた。また、日本の十二指腸株は欧米株に近い起源であることが示された。したがって、胃粘膜萎縮を伴う、萎縮性胃炎、胃潰瘍、胃癌に日本特有の *H. pylori* 群が存在することが考えられた。さらに、*cagPAI* 遺伝子群の中で、CagA と IV 型分泌装置を形成する CagY (*Agrobacterium tumefaciens* の Vir 系の virB10 に類似遺伝子) に株間の遺伝子変異が大きいことが認められた (J Clin Microbiol 42:2508-2517,2004)。本研究では継続的に、*H. pylori* の疾患特異的病原遺伝子の解析を、*cagA* 遺伝子トランスジェニックマウスと *cagPAI* 遺伝子変異 *H. pylori* 菌を用いたスナネズミ感染実験で検討する。*cagA* 遺伝子トランスジェニックマウスは、一度作製を試み、遺伝子は導入されたが発現がされなかった。これは、CagA は細菌由来であり、核酸塩基 A 及び T が多く、哺乳類では発現が困難なためと考え、昨年度、CagA をコンピューター解析より蛋白構造を変化することなく哺乳類型に塩基を置換させ、胚細胞に導入に成功している。また、スナネズミ *H. pylori* 感染モデルは、これまで、感染後 4 週後から胃の炎症がはっきり認められ、6 ヶ月後には萎縮性胃炎、腸上皮化生、胃潰瘍が認められることを確認している。本研究におけるスナネズミ感染実験に用いる *cagPAI* 遺伝子 28 個をそれぞれノックアウトした変異株

は既に作製されている。また、*cagPAI* 遺伝子の国際的地域差と病態との関連を検討するが、これまでにアメリカ、オーストラリア、中国、タイ、ベトナム、イギリス等から既に臨床分離株を収集している。さらに、科学技術振興調整費、我が国の国際的リーダーシップの確保、「アジアのヘリコバクターピロリ感染対策」において構築された *H. pylori* 感染対策のネットワークを用いることにより、世界各地からの菌株の採取が可能である。

### 3) *H. heilmannii* の全遺伝子解析と病原性遺伝子解析：

*H. heilmannii* はマウス胃底腺に多数定着するが、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 シークエンス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。

### 4) *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- $\gamma$  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- $\gamma$  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。

### 5) *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* 臨床分離株のゲノム解析。*H. pylori* 感染は、慢性胃炎、胃・十二指腸潰瘍、胃癌、胃 MALT リンパ腫などの多くの病態の異なる消化器疾患に関与している。また、*H. heilmannii* 感染においても慢性胃炎にとどまるものが多く、まれに胃 MALT リンパ腫を発生することになる。こ

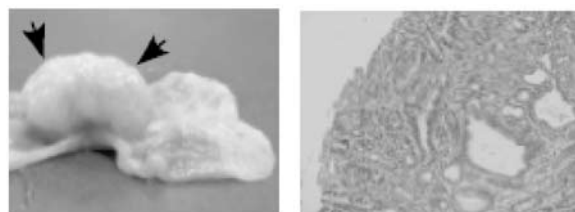
れらの病態の違いにそれぞれの菌の疾患特異的因子が存在することが考えられる。そこで、各種疾患から得られた臨床分離株のゲノム解析を行い、本解析で同定された病原性遺伝子の違いを検討する。*H. pylori* は内視鏡下生検組織からの培養で臨床分離株が得られ、十分な DNA を得ることができ、*cagPAI* を中心にゲノム解析を行い疾患による *H. pylori* のゲノムの違いを検討する。一方、*H. heilmannii* は培養ができないため、生検組織をギムザ染色し、鏡検下に菌を同定し、感染を確認した上で、感染胃粘膜をホモゲナイズし、一旦マウスに感染させ、マウス感染胃粘膜を、特異的抗体を用いて *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、それぞれの臨床株の *H. heilmannii* の塩基配列解析を行う。

### <研究期間の成果>

#### 1) *H. pylori* 感染における宿主応答の解析

*H. pylori* 株のゲノム解析を無作為に選んだ 8 個の構造遺伝子について塩基配列を検討したところ、世界の地域による差及び病態による差は認められなかった。一方、病原因子である CagA や細胞空胞化毒素遺伝子 *vacA* は、世界の地域により大きく異なり、特に、慢性萎縮性胃炎と胃癌の発症が高い、日本、韓国、中国と欧米との違いが認められ、塩基配列による樹系図では、欧米と東アジアとは異なった branch に位置し、*H. pylori* の起源が異なると考えられた。したがって、病原遺伝子に変異が多いと考えられた。*H. pylori* が胃粘膜上皮細胞に接着すると、4 型分泌装置が *H. pylori* の細胞膜から上皮細胞膜へ針をさすように突き刺さり、その内腔を通して CagA が *H. pylori* から胃粘膜上皮細胞内へと注入される。上皮細胞内に注入された CagA は上皮内でチロシンリン酸化を受け、チロシンリン酸化された CagA が、細胞の増殖や分化に重要な役割を担う細胞質内脱リン酸化酵素である Src homology phosphatase-2 (SHP-2) と結合することが認められた。また、CagA によって脱制御された SHP-2 は Ras 非依存的に Erk MAP キナーゼの持続的活性化を引き起こすことが認められ、CagA-SHP-2 複合体による Erk の持続的活性化は異常増殖シグナル生成に関与することが推察された。一方、CagA はチロシンリン酸化非依存的に PAR1/MARK キナーゼと結合し、PAR1 キナーゼ活性は低下し、結果として PAR1 は細胞膜から遊離し、極性や細胞間結合が損なわれることも示された。さらに、CagA は E-cadherin の結合蛋白である  $\beta$ -catenin を脱制御することも示唆されており、細胞間接着装置の不活化を介して正常胃粘膜構造を破壊し、*H. pylori* 感染に伴う胃粘膜炎症を促進させることが示唆された。

2) *H. pylori* の疾患特異的病原遺伝子の解析 *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、同マウスが生後 3 ヶ月から過形成胃炎を生じ、72 週において胃癌が生じたことを認めた(下図：生後 72 週に認めた胃癌)。



#### 3) *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  $\mu$ g 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、*H. pylori* と *Helicobacter ceterum* の virB10 とアミノ酸配列で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。

#### 4) *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- $\gamma$ 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腫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。

#### 5) *H. pylori* 及び *H. heilmannii* の疾患特異性解析

*H. pylori* 及び *H. heilmannii* を、それぞれ野生型C57BL6マウスに感染させると、*H. pylori* では、胃炎ならびに長期間船により胃がんを、一方、*H. heilmannii* は、胃リンパ腫を誘導することを明らかにしている。そこでこれらの胃内に生息する細菌がどのようにして異なる疾患を誘導するのかを検討する。具体的には、感染上皮から経時的に胃粘膜上皮細胞を採取し、各種遺伝子の発現を検討している。

#### <国内外での成果の位置づけ>

*H. pylori* と宿主細胞間の相互作用を解析し、*H. pylori* が胃粘膜上皮細胞に接着すると、4型分泌装置を介して病原因子CagAがエフェクターとして、*H. pylori* から上皮細胞内へと注入され、上皮内に注入されたCagAはチロシンリン酸化を受け、ヒト上皮細胞のシグナル伝達系を攪乱することを世界に先駆けて明らかにした(J Exp Med 191:593-602,2000)。また、胃粘膜上皮細胞内でチロシンリン酸化されたCagAが、細胞の分化や増殖に重要な役割を担う細胞質内脱リン酸化酵素SHP-2と特異的に結合し、細胞の異常増殖に作用することを発見した(Science 295:683-686,2002)。さらに、CagAのチロシンリン酸化部位となるアミノ酸配列モチーフE-P-I-Y-A(下線のチロシン残基がリン酸化部位)を同定するとともに、CagAのSHP-2結合部位が、チロシンリン酸化部位下流のアミノ酸配列pY-A-T-I-D-Fであることを認めた。このSHP-2結合配列は東アジア株のCagAと欧米株のCagA間で異なっており、東アジア型のCagAはSHP-2結合特異的アミノ酸配列に100%一致しているが、欧米型のCagAではリン酸化チロシン残基から5番目のアミノ酸が1つ異なっていた(FからD)。このわずかな1つのアミノ酸の違いにより、東アジア型のCagAは欧米型のCagAに比べSHP-2とより強く結合し、より強い生物活性を発揮することが認められた(Proc Natl Acad Sci USA 99:14428-14433,2002)。また、東アジア型CagAを有する *H. pylori* による感染は強い胃粘膜の炎症をきたし、胃粘膜萎縮に関与することを明らかにした(J Infect Dis 189:820-827,2004)。エフェクターCagAにより活性化されたSHP-2が直接脱リン酸化する細胞内基質分子としてfocal adhesion kinase (FAK)を同定した(Mol Cell Biol 26:261-276,2006)。FAKは細胞-基質間相互作用の基盤となる細胞接着斑を制御することにより、細胞運動を制御する。SHP-2はFAKのキナーゼドメイン活性化ループ内に存在するチロシンリン酸化部位を脱リン酸化し、FAKキナーゼ活性を抑制する。FAKの活性低下に伴い細胞接着斑の新生が抑制され、細胞-基質間相互作用の低下による細胞運動能の増大が引き起こされる。また、*H. pylori* 感染により上皮細胞間のタイトジャンクションが崩壊されることを明らかにした(Nature 447:330-333, 2007)。以上、我々は、これまで *H. pylori* 感染による菌と宿主細胞間のクロストークの分子メカニズムの解析において、*cagPAI* 内の4型分泌装置やエフェクターであるCagAが病原性に重要な役割を担っていることを明らかにしてきた。

*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を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遺伝子の解析が進め

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、北里大学薬学部の中村らにより、胃 MALT リンパ腫患者やカニ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* は純粋培養法が確立されていない。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、展望>

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

#### <研究期間の全成果公表リスト>

- 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
- 0912011028 Murata-Kamiya N, Kurashima Y, Teishikata Y, Yamahashi Y, Saito Y, Higashi H, Aburatani H, Akiyama T, Peek RM Jr, Azuma T, Hatakeyama M. Helicobacter pylori CagA interacts with E-cadherin and deregulates the beta-catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in

- gastric epithelial cells. Oncogene. 2007 Jul 12;26(32):4617-26.
- 0912011038 Ren S, Higashi H, Lu H, Azuma T, Hatakeyama M. Structural basis and functional consequence of Helicobacter pylori CagA multimerization in cells. J Biol Chem. 2006 Oct 27;281(43):32344-52.
  - 0912011046 Naito M, Yamazaki T, Tsutsumi R, Higashi H, Onoe K, Yamazaki S, Azuma T, Hatakeyama M. Influence of EPIYA-repeat polymorphism on the phosphorylation-dependent biological activity of Helicobacter pylori CagA. Gastroenterology. 2006 Apr;130(4):1181-90.
  - 0912011054 Tsutsumi R, Takahashi A, Azuma T, Higashi H, Hatakeyama M. Focal adhesion kinase is a substrate and downstream effector of SHP-2 complexed with Helicobacter pylori CagA. Mol Cell Biol. 2006 Jan;26(1):261-76.
  - 0912011059 Yamazaki S, Yamakawa A, Okuda T, Ohtani M, Suto H, Ito Y, Yamazaki Y, Keida Y, Higashi H, Hatakeyama M, Azuma T. Distinct diversity of vacA, cagA, and cagE genes of Helicobacter pylori associated with peptic ulcer in Japan. J Clin Microbiol. 2005 Aug;43(8):3906-16.
  - 0912011103 Yokoyama K, Higashi H, Ishikawa S, Fujii Y, Kondo S, Kato H, Azuma T, Wada A, Hirayama T, Aburatani H, Hatakeyama M. Functional antagonism between Helicobacter pylori CagA and vacuolating toxin VacA in control of the NFAT signaling pathway in gastric epithelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Jul 5;102(27):9661-6.
  - 0912011112 Yamazaki S, Kato S, Matsukura N, Ohtani M, Ito Y, Suto H, Yamazaki Y, Yamakawa A, Tokudome S, Higashi H, Hatakeyama M, Azuma T. Identification of Helicobacter pylori and the cagA genotype in gastric biopsies using highly sensitive real-time PCR as a new diagnostic tool. FEMS Immunol Med Microbiol. 2005 Jun 1;44(3):261-8.
  - 0912011118 Higashi H, Yokoyama K, Fujii Y, Ren S, Yuasa H, Saadat I, Murata-Kamiya N, Azuma T, Hatakeyama M. EPIYA motif is a membrane-targeting signal of Helicobacter pylori virulence factor CagA in mammalian cells. J Biol Chem. 2005 Jun 17;280(24):23130-7.