

6. *Helicobacter pylori* LPS は TLR2/TLR10 に認識される

永島 裕之

札幌医科大学医学部微生物学講座

はじめに

われわれの体は病原体を認識し、排除する免疫機構を備えている。病原体の固有の分子構造 microbial-associated molecular patterns (MAMPs) を認識し、免疫反応を惹起し生体防御に必要な遺伝子群を発現する。Toll-like receptor (TLR) は、pattern recognition receptors (PRRs) のなかで最初に同定された受容体で、さまざまな MAMPs を認識することが明らかになっている¹⁾。ヒトでは 10 種類 (TLR1-10)、マウスでは 12 種類 (TLR1-9, 11-13) の TLR が存在しており、それぞれ異なる ligand を認識する。そのなかで TLR10 の ligand はいまだに報告されていない。

多くの TLR は homodimer を形成するものの、TLR1, TLR2, TLR6, TLR10 は TLR1 family ともよばれ、heterodimer を形成し、lipopeptide が主な ligand である。TLR の細胞外領域に ligand が結合すると TLR2 は acyl 基の数の違いにより TLR1 もしくは TLR6 と heterodimer を形成し、それぞれを tri-acyl lipopeptide, di-acyl lipopeptide を識別する^{2,3)}。

Helicobacter pylori (*H. pylori*) の LPS は著しく低い内毒素活性を示すことから、*H. pylori* 感染において TLR4 の関与が少なくと考えられてきた。*H. pylori* に関しては TLR が免疫に関与していないという考えもあったように、いまだ十分な理解がされていない。一方で TLR2 に認識されるとの報告も散見され、現在も議論がなされている。

技術的な進歩から、糖尿病、脂質異常、関節リウマチなどのありふれた疾患も含め、多くの疾患で Genome-Wide Association Study (GWAS) が行われるようになった。1~10 万人規模を対象にして行われるもので、これまでの *in vitro* の研究では判明し得なかった真の意味での疾患感受性遺伝子が発見されるようになってきた。2013 年にヨーロッパで行われた研究で、*H. pylori* 感染者に優位な single nucleotide polymorphism (SNP) を GWAS を用いて検討された。その結果 TLR10 が疾患感受性遺伝子として報告された⁴⁾。これまで *H. pylori* 感染症において報告が多くなされていた TLR4 や TLR2 ではなく、TLR10 が結果として得られたことは大きな驚きとともに知れ渡ることとなった。

さらにわれわれは *H. pylori* の LPS が TLR2/TLR10

に認識されることを明らかにした⁵⁾。*H. pylori* の LPS は tetra-acyl lipid A という特徴的な構造をしており、これまで不明であった TLR10 の ligand 構造を示唆するデータであり、さらに今後の LPS 研究に一石を投じる結果と思われたので、最新のデータとともに概説する。

1. *H. pylori* と地域差

H. pylori 感染症はヨーロッパおよび東アジアなどの地域によって *H. pylori* 感染率、胃癌発症率に大きな差異がある疾患である。地域差を説明する因子がわかれば胃癌の発症を防げるとの理由で、これまでは CagA, VacA, OipA などの *H. pylori* の菌側の因子に関する研究が多くなされていた⁶⁾。しかし、とくに胃癌発症の多い日本や韓国などの東アジアでは、ほぼすべての *H. pylori* が CagA を有しており、菌側の因子のみでは説明がつかない。一方で宿主因子はあまり研究のなされていない領域であった。

2. *H. pylori* と宿主との関係

胃内に生息する *H. pylori* は、人類が 58,000 年前にアフリカ大陸に誕生して以来、人類とともに進化してきた⁷⁾。遺伝子シーケンス解析からヨーロッパ、アメリカ大陸、東南アジアなど地域によって違いが有り、人が世界に拡散するとともに *H. pylori* も多様化してきた。最近の研究では起源の違う *H. pylori* 株を有する場合に胃癌発症が増えることが報告されている⁷⁾。アフリカ系祖先の系統が強い人に対してはほぼ無害であるのに対して、アメリカ先住民系統が強い人に対しては胃癌発症を促しやすいとの結果が得られている⁸⁾。

3. *H. pylori* LPS は TLR2/TLR10 に認識される

われわれは、これまでも *H. pylori* 感染症の地域差に注目し、病態に影響する宿主因子の研究を行ってきた。同じような衛生環境であるものの比較的胃癌が多いとされているブータンと、比較的胃癌発症が少ないとされているドミニカ共和国に赴き、フィールド調査を行った。健常者における *H. pylori* 感染率、病理学的所見、胃癌発症率などを比較した⁹⁾。胃粘膜組織を内視鏡的にサンプリングし、遺伝子発現量を比較検討した。16 例を対象にマイクロアレイを用いた解析を行い、*H. pylo-*

ri 感染者と非感染者の比較を行った。その結果、感染者で *tlr10* mRNA が有意に高く発現していることを発見した。これまで *H. pylori* 感染症において関連性があるとされている *tlr2*, *tlr4* ではそれぞれ fold change は 3.1, 2.5 であったのに対して, *tlr10* は 15.4 と非常に大きな差が認められた。感染に伴う TLR の遺伝子発現量の上昇は一般的には ligand 刺激が関与していると理解されている。そこで *H. pylori* LPS が TLR10 の ligand であるという仮説をたて、全 275 症例を対象に *tlr10* の発現量を比較した。統計学的に有意に *H. pylori* 感染者で *tlr10* の発現が高いことを認めた。さらに *H. pylori* 感染者において *tlr10* と *tlr2* の間では発現量に有意な正の相関を認めた。免疫染色からその発現部位は、主に胃粘膜上皮であった。胃癌由来で、極性を有し monolayer を形成する比較的 normal 粘膜に近い cell line である NCI-N87 を用いた感染実験を行った。その結果、時間依存的、濃度依存的に *tlr10* の発現量が増加することが判明した。これらのことから *H. pylori* の菌体成分中の分子が TLR10 の ligand であるという仮説をたてた。HEK 細胞を用い ligand の同定を行った。HEK に TLR を transfection し、heat-killed *H. pylori* で刺激すると、TLR2/TLR10 を transfection したもので最も高い NF- κ B の活性化が得られた。さらにどの成分が ligand であるかを検討するために、菌体最外層にある LPS で同様の実験を行った。同様に TLR2/TLR10 を transfection したもので最も高い NF- κ B の活性化がみられた。以上のことから *H. pylori* LPS が TLR2/TLR10 の ligand であることが判明した⁵⁾ (図 1)。

4. TLR と *H. pylori* LPS

一般的な LPS が TLR4 に認識されることは明らかになっており、2009 年に Jie-Oh Lee らが構造解析を行い LPS と TLR4 の結合様式を結晶構造解析にて報告した¹⁰⁾。*E. coli* に代表される hexa-acyl lipid A が TLR4 に認識されることが明らかになった¹⁰⁾。一方 acyl 基の数が少ない penta-acyl もしくは tetra-acyl lipid A では TLR4 が dimer を形成できず、炎症を惹起する生理活性が下がる。penta-acyl や tetra-acyl lipid A を有するグラム陰性菌は腸内に生息するものに多く認められており、*H. pylori* は tetra-acyl lipid A の構造を有している。Tetra-acyl lipid A は生合成過程において、当初 hexa-acyl 体 (de novo form) として合成されたものが processing を受けて tetra-acyl 体となる (図 1)。この変化はグラム陰性菌が宿主の免疫機構から逃れるための戦略の一つと考えられている^{11,12)}。Trent らは *H. pylori* の lipid A の processing に関与する酵素を knock out し、hexa-acyl lipid A を発現した変異株を作製して mice に感染させた。すると TLR4 に認識されることで

H. pylori は宿主からすべて排除され、慢性胃炎を発症しないことを示した。

一方さまざまな議論はあるものの、*H. pylori* LPS は TLR2 に認識されるという報告が複数の研究者から発表されている^{13,14)}。多くの報告は TLR2 のみに注目しており TLR1, TLR6 に関して述べられた報告は少ない。横田らは、TLR2/TLR1 が TLR2/TLR6 より *H. pylori* LPS を強く認識することを報告している¹⁵⁾が、TLR10 に関する報告はこれまで存在していなかった。

5. *H. pylori* と宿主因子としての TLR10

筆者が行った研究は *H. pylori* LPS が TLR2/TLR10 に認識されるというものであるが、TLR10 は *H. pylori* 感染症において、宿主の疾患感受性遺伝子としても報告されている⁴⁾。Mayerle らは、GWAS を用いて *H. pylori* の seroprevalence の解析を行い、論文中では TLR1 を疾患感受性遺伝子として報告した。しかし実際のデータでは、最も p 値の低かった rs10004195 は TLR10 に関与している SNP であり、その他にも多数の TLR10 に関係している SNP が結果として得られている。われわれの結果と Mayerle らの報告から、TLR10 が重要な宿主因子であることが強く示唆された。

6. PRR としての TLR10 と *H. pylori* LPS との関係

H. pylori LPS が TLR2/TLR10 に認識されていることを改めて PRR として考察したい。これまでわかっていることとして TLR10 は TLR1, TLR6 と同じ 4p14 染色体上に code されており、それぞれ非常に遺伝子配列が似ている。また gene sequence の解析からこれらの TLR は遺伝子重複によって生成したものと報告されている¹⁶⁾。そのため TLR10 も TLR2 と heterodimer を形成し、なんらかの lipopeptide を認識するものと考えられていた。Govindaraj¹⁷⁾ らは、コンピュータを用いた計算上の ligand として Pam₃CSK₁ などの tri-acyl peptide を認識する可能性があることを報告しているが、実際の証明はされていなかった。Tetra-acyl lipid A という特徴的な構造を有している *H. pylori* LPS が、われわれのデータから TLR2/TLR10 に認識されることが示唆された。TLR2 の ligand として報告されている分子は共通の acyl 基 2 本の部分構造を有しており³⁾、*H. pylori* LPS にも類似の構造が存在する。TLR2 は TLR1, TLR6 もしくは TLR10 と heterodimer を形成する。TLR2 が共通構造の 2 本の acyl 基を認識しているとすれば、TLR10, TLR1, TLR6 が残りの acyl 基の数の違いを見分けていることが考えられる。*H. pylori* LPS の tetra-acyl lipid A では、共通構造の 2 本の acyl 基が TLR2 によって、残り 2 本の acyl 基が TLR10 によって認識されているのかもしれない (図 1)。

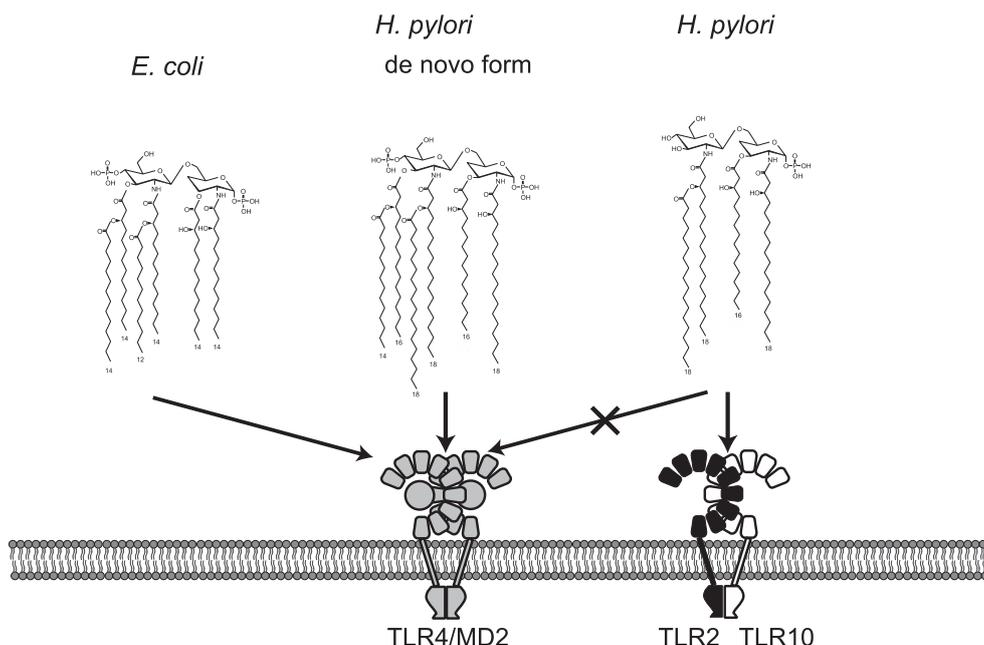


図1 *H. pylori* と *E. coli* LPS の lipid A の構造と TLR による認識

Hexa-acyl lipid A を有する *E. coli* LPS は TLR4/MD2 に認識される。Tetra-acyl lipid A を有する *H. pylori* LPS は TLR4 に認識されず、TLR2/TLR10 に認識されることがわれわれの研究によって明らかとなった。一方、lipid A 生合成の processing 過程を欠損させた *H. pylori* 変異株では hexa-acyl lipid A を有する LPS (de novo form) を発現しており、TLR4 に認識されるようになる。

TLR2, TLR4 はともに細菌表面にある構造物 (LTA, LPS) を認識しているが、TLR2 はこれまで予想されていたよりも多種多様な ligand を認識していることがわかってきた。これは MAMPs の多様性に対応するべく幅広い ligand を認識するように TLR2 システムが進化してきたものと考えられている¹⁸⁾。TLR4 と比較して TLR2 は ligand としてのスペクトラムが非常に広い。グラム陰性菌はグラム陽性菌へと進化し、やがてマイコバクテリウム、真菌などへ進化を遂げている。TLR2 システムの多様性は bacteria の envelope evolution への対応によるものであるとの仮説に非常に合致する所見であると考えられる。いずれも細胞最外層にある lipid を含んだ膜の一部を認識していることは大変興味深い。

7. GWAS など遺伝子免疫研究からわかってきたこと

gene duplication は非常に重要な遺伝子の進化過程である。ウニは T cell, B cell などのリンパ球は有していないものの、253 もの TLR を有している。遺伝子重複によって TLR の数を増やし、さまざまな病原体を認識するという免疫機構を有していると報告されている¹⁹⁾。これらの事実からも gene duplication は宿主免疫の多様性を生み出す重要な進化機構のひとつであると位置づけることができる。またこれまでの研究であまり注目されていなかった TLR10-TLR1-TLR6 の locus には

positive selection がかかっていると複数の研究者から報告されている。Netea のグループは疫学調査で得られた 500 名の健康人を対象とし、bacteria, fungi, virus, TLR ligands など血液サンプルを刺激し、サイトカインの誘導の違いの検討を行った。そこで TLR10-TLR1-TLR6 の locus がサイトカイン産生の能力に大きな影響を与えていることを報告した²⁰⁾。Quintana-Murci らも TLR10-TLR1-TLR6 の locus に positive selection が認められることを報告しており、この領域がヨーロッパとアフリカで大きく違うことを報告している。Netea ら、Quintana-Murci らが総じて述べていることはヒトを対象にした大規模な網羅的解析では、TLR10-TLR1-TLR6 の locus の解析は生物進化、ヒトのさまざまな疾患の個人差を説明できる可能性があるとして述べている。TLR10-TLR1-TLR6 に対してさらなる解析が必要であるが、*H. pylori* 感染症がこれらの研究のモデルケースとなると考えられる。

おわりに

TLR10 が *H. pylori* 感染症において重要な働きをしていることはわれわれの結果と GWAS を用いた結果から確実なものとなった。これまで行われていた *in vitro*, マウスを用いた *in vivo* の実験系では明らかにできなかった結果である。TLR10 の解析は今現在 *H. pylori* でのデータ以外は乏しいものの、lipid A の構造の変化

は腸内細菌として有名な Bacteroides 属などを含む commensal bacteria に多く共通して認められる。*H. pylori* LPS の解析は今後腸内細菌叢研究への応用に結びつく示唆に富む結果と考えられた。

文 献

- 1) Kawai T, Akira S : The role of pattern-recognition receptors in innate immunity : update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11 : 373-384, 2010
- 2) Jin MS, Kim SE, Heo JY, et al. : Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a triacylated lipopeptide. *Cell* 130 : 1071-1082, 2007
- 3) Jin MS, Lee JO : Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes. *Immunity* 29 : 182-191, 2008
- 4) Mayerle J, den Hoed CM, Schurmann C, et al. : Identification of genetic loci associated with *Helicobacter pylori* serologic status. *JAMA* 309 : 1912-1920, 2013
- 5) Nagashima H, Iwatani S, Cruz M, et al. : Toll-like receptor 10 in *Helicobacter pylori* infection. *J Infect Dis* 212 : 1666-1676, 2015
- 6) Yamaoka Y : Mechanisms of disease : *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 7 : 629-641, 2010
- 7) Linz B, Balloux F, Moodley Y, et al. : An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature* 445 : 915-918, 2007
- 8) Kodaman N, Pazos A, Schneider BG, et al. : Human and *Helicobacter pylori* coevolution shapes the risk of gastric disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 111 : 1455-1460, 2014
- 9) Nagashima H, Iwatani S, Cruz M, et al. : Differences in interleukin 8 expression in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa tissues from patients in Bhutan and the Dominican Republic. *Hum Pathol* 46 : 129-136, 2015
- 10) Park BS, Song DH, Kim HM, et al. : The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* 458 : 1191-1195, 2009
- 11) Cullen TW, Giles DK, Wolf LN, et al. : *Helicobacter pylori* versus the host : remodeling of the bacterial outer membrane is required for survival in the gastric mucosa. *PLoS Pathog* 7 : e1002454, 2011
- 12) Needham BD, Trent MS : Fortifying the barrier : the impact of lipid A remodelling on bacterial pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 11 : 467-481, 2013
- 13) Smith SM, Moran AP, Duggan SP, et al. : Tribbles 3 : a novel regulator of TLR2-mediated signaling in response to *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *J Immunol* 186 : 2462-2471, 2011
- 14) Smith MF Jr, Mitchell A, Li G, et al. : Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for *Helicobacter pylori*-induced NF- κ B activation and chemokine expression by epithelial cells. *J Biol Chem* 278 : 32552-32560, 2003
- 15) Yokota S, Ohnishi T, Muroi M, et al. : Highly-purified *Helicobacter pylori* LPS preparations induce weak inflammatory reactions and utilize Toll-like receptor 2 complex but not Toll-like receptor 4 complex. *FEMS Immunol Med Microbiol* 51 : 140-148, 2007
- 16) Huang Y, Temperley ND, Ren L, et al. : Molecular evolution of the vertebrate TLR1 gene family—a complex history of gene duplication, gene conversion, positive selection and co-evolution. *BMC Evol Biol* 11 : 149, 2011
- 17) Govindaraj RG, Manavalan B, Lee G, et al. : Molecular modeling-based evaluation of hTLR10 and identification of potential ligands in Toll-like receptor signaling. *PLoS One* 5 : e12713, 2010
- 18) Li J, Lee DS, Madrenas J : Evolving Bacterial Envelopes and Plasticity of TLR2-Dependent Responses : Basic Research and Translational Opportunities. *Front Immunol* 4 : 347, 2013
- 19) Rast JP, Smith LC, Loza-Coll M, et al. : Genomic insights into the immune system of the sea urchin. *Science* 314 : 952-956, 2006
- 20) Li Y, Oosting M, Smeekens SP, et al. : A Functional Genomics Approach to Understand Variation in Cytokine Production in Humans. *Cell* 167 : 1099-1110 e14, 2016