

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

研究幽門螺旋桿菌熱緊迫蛋白 60 的功能：誘發宿主 Treg  
細胞增加藉以抑制 T 細胞之活性  
研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型  
計畫編號：NSC 99-2320-B-009-002-  
執行期間：99 年 08 月 01 日至 100 年 07 月 31 日  
執行單位：國立交通大學生物科技學系(所)

計畫主持人：廖光文

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：林宗翰  
碩士班研究生-兼任助理人員：何妹怡  
碩士班研究生-兼任助理人員：簡廷諺  
碩士班研究生-兼任助理人員：陳美惠  
博士班研究生-兼任助理人員：陳家弘

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2 年後可公開查詢

中華民國 100 年 08 月 11 日

## 國科會計畫(99-2320-B-009-002-) 結案報告

### 研究幽門螺旋桿菌熱緊迫蛋白60的功能:誘發宿主Treg細胞增加藉以抑制T細胞之活性

#### 一、 前言

幽門螺旋桿菌的長期慢性感染是嚴重消化性潰瘍病症的主因，研究顯示幽門螺旋桿菌可由於其基因產物而造成宿主免疫抑制，進而可長期存在人體中造成慢性感染，承蒙國科會九十四及九十八年補助之研究計劃 (NSC94-2320-B-009-002以及NSC95-2320-B-009-002)，本研究室發現幽門螺旋桿菌以尚未被發現之基因產物有效誘發宿主組織產生TGF- $\beta$ [1]，幽門螺旋桿菌可能藉此得以全面性抑制宿主的免疫作用。若能釐清幽門螺旋桿菌抑制宿主免疫力的機制，將有助於發展以免疫力清除幽門螺旋桿菌的醫療方法。更進一步，於民國九十八年國科會補助之研究計劃(NSC98-2320-B-009-002)中，我們發現HpHSP60可使人類單核球產生較多的TGF- $\beta$ [2]，此外幽門螺旋桿菌HSP60可結合至TGF- $\beta$ R II，並使SMAD2/3磷酸化造成轉錄因子SMAD3/4活性的上升，而目前文獻中對此功能及影響上皆尚未有探討。因此，本研究室綜合上述研究成果進一步提出一計畫案，用以探討幽門螺旋桿菌之HSP60可能造成免疫抑制現象及機制。在此計畫中，主要針對HpHSP60促使免疫系統中的調控性T細胞 (regulatory T cells, Treg cells) 增生之現象及其機制作為研究探討的主題。

#### 二、 目的

- (1) 研究幽門螺旋桿菌HSP60分子對調控性T細胞 (Treg cells) 增生之影響。
- (2) 探討幽門螺旋桿菌HSP60分子對Treg細胞增生的作用位置及其作用機制。

#### 三、 文獻探討

幽門螺旋桿菌之熱休克蛋白60(HpHSP60) 雖然在很早之前就已被發現，然而其早期的功能僅被定位在細菌用以黏附宿主細胞的黏著分子[3]；或是一種刺激宿主發炎性免疫反應發生的強力免疫原(immunogen)[4]。近期的研究結果則顯示，

HpHSP60 具有引發細胞激素產生以及刺激血管內皮細胞表現ICAM-1、VCAM、以及E-selectin 等分子的相關功能[5]。Oguma等人以胃上皮細胞KATO III為研究標的，發現HpHSP60會和此上皮細胞表面的TLR2和TLR4相結合，繼而造成下游NF- $\kappa$ B 的活化，因而使得胃上皮細胞分泌IL-8 [6]。稍後，同樣的研究團隊針對HpHSP60於免疫系統中單核球細胞可能造成之影響加以研究，結果發現HpHsp60同樣會引起人類U937巨噬細胞株以及NOMO-1單核細胞株產生IL-8。Ferrero等人則發現HpHSP60可刺激巨噬細胞產生IL-6。然而其引發IL-6產生的訊息傳遞路徑並非經由TLR2或是TLR4，而是一尚未被辨識出的新途徑 [7]。Henderson等人比較幽門螺旋桿菌、念珠菌 (*Chlamydia pneumoniae*) 以及人類的HSP60，結果顯示HpHSP60最能刺激人類的周邊血液單核球 (peripheral blood mononuclear cells) 產生IL-1 $\beta$ 、IL-6、以及IL-8 [8]。相較HpHSP60在炎症反應中所扮演的明確角色，其在免疫抑制方面的定位則尚未被瞭解。然而，在人類或是其他物種HSP60的研究中發現，其具有調節免疫功能之活性。人類在遭受外傷時其創傷區域的HSP60會降低單核球細胞產生TNF- $\alpha$ 的能力 [9]；而*Chlamydial* HSP60則會將免疫反應偏移至Th2以利於病原之持續性感染 [10]。進一步的研究更顯示人類或是病原的HSP60具有活化Treg細胞以抑制免疫反應的能力 [11, 12]。Wang等人之研究亦指出，日本血吸蟲之HSP60特定片段(胺基酸序列437-460)能夠透過調控TLR2而造成Treg細胞之增生及其活性。[13]在我們實驗室的先驅研究中，已發現HpHSP60能與TGF- $\beta$  receptor II做結合，並會引發TGF- $\beta$ 的訊息傳遞路徑SMAD2/3的活化，進而開啟下游基因的轉錄活性。綜合上述研究結果，HSP60s對於免疫反應似乎具有雙效的調節效應，然而HpHSP60在免疫抑制上所扮演的角色則尚待釐清。綜合以上資料似乎透露出HpHSP60可與多種不同之細胞表面受體作用進行不同的免疫反應，但是目前仍無這方面的研究。

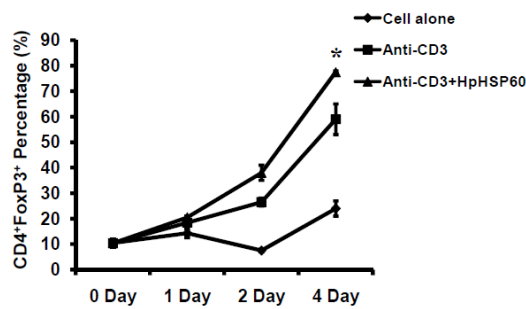
#### 四、 研究方法、結果

##### 1. 幽門螺旋桿菌HSP60 刺激PBMC細胞，誘發Treg增生。

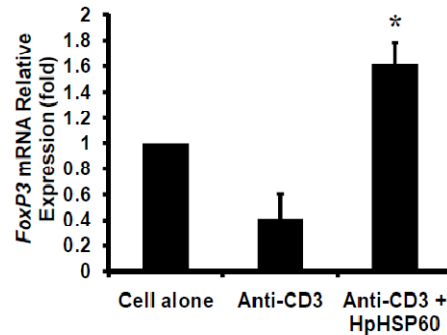
The ability of HpHSP60 on the induction of Treg cell was determined and the results revealed that HpHSP60 treatments could induce significantly increases in the Treg cells at 2 days after treatments compared with the untreated group or the anti-CD3 antibody group. *FoxP3* mRNA relative expression was also increased when PBMCs

treated with HpHSP60.

A.



B.



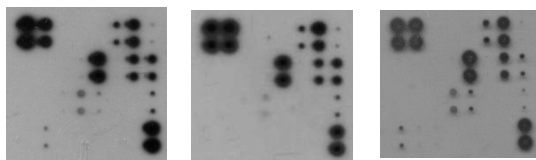
**Figure1. Treatment with HpHsp60 increases the percentage of regulatory T cell.**

(A) Percentage of regulatory T cell in CD4<sup>+</sup> cells were assay by the FoxP3 intracellular staining. (C) *FoxP3* gene expression was verified at mRNA level by real-time PCR. Relative expression was normalized with  $\beta$ -actin.

## 2. HpHSP60 影響調細胞激素釋放。

Cytokine array was used to verify the cytokine expression profile. Activation by anti-CD3 antibody triggered the expression of cytokines, growth factors, and some chemokines in T cell. Treatment with HpHSP60 significantly decreased the expressions of most cytokines and chemokines, thus altered the cytokine expression profiles. Interestingly, TGF- $\beta$ , which is a well-known inhibitory cytokine, increased apparently by treating with HpHSP60.

(A) Cell alone (B) Anti-CD3 (C)Anti-CD3 + HpHSP60



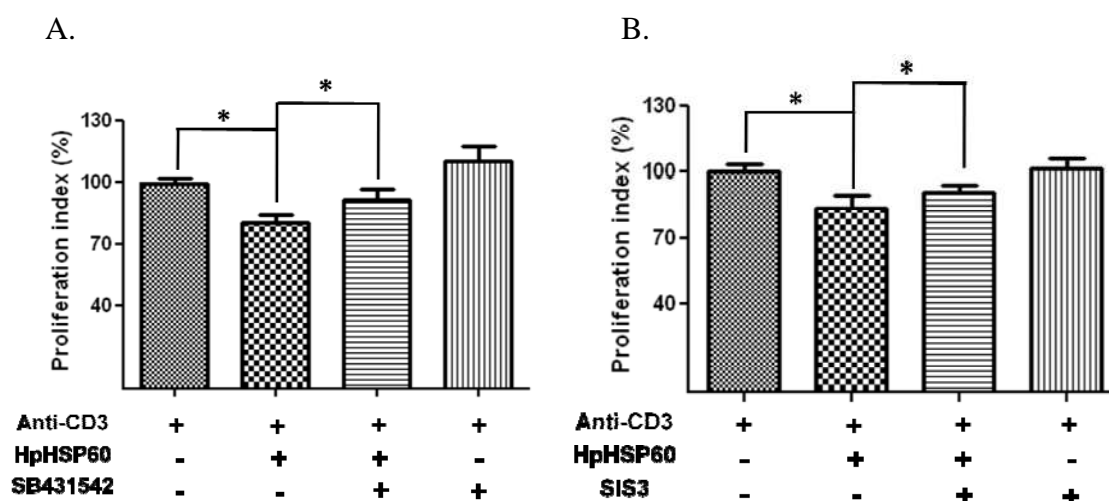
	a	b	c	d	e	f	g	h
1	Pos	Pos	Neg	Neg	GCSF	GM-CSF	GRO	GRO- $\alpha$
2	Pos	Pos	Neg	Neg	GCSF	GM-CSF	GRO	GRO- $\alpha$
3	IL-1 $\alpha$	IL-2	IL-3	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10
4	IL-1 $\alpha$	IL-2	IL-3	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10
5	IL-13	IL-15	IFN- $\gamma$	MCP-1	MCP-2	MCP-3	MIG	RANTES
6	IL-13	IL-15	IFN- $\gamma$	MCP-1	MCP-2	MCP-3	MIG	RANTES
7	TGF- $\beta$ 1	TNF- $\alpha$	TNF- $\beta$	Blank	Blank	Blank	Blank	Pos
8	TGF- $\beta$ 1	TNF- $\alpha$	TNF- $\beta$	Blank	Blank	Blank	Blank	Pos

<b>Cytokine Intensity</b>		
<b>(normalize with cell no.)</b>	<b>Anti-CD3</b>	<b>HpHSP60</b>
<b>Growth Factors &amp; Chemokines</b>		
<b>GMCSF</b>	<b>232</b>	<b>146</b>
<b>GRO</b>	<b>293</b>	<b>157</b>
<b>RANTES</b>	<b>192</b>	<b>113</b>
<b>IL-5</b>	<b>79</b>	<b>UD</b>
<b>MCP-1</b>	<b>128</b>	<b>87</b>
<b>TNF-β</b>	<b>UD</b>	<b>22</b>
<b>GRO-α</b>	<b>49</b>	<b>51</b>
<b>MCP-2</b>	<b>64</b>	<b>103</b>
<b>Proinflammatory Cytokines</b>		
<b>IL-8</b>	<b>275</b>	<b>UD</b>
<b>IL-6</b>	<b>296</b>	<b>157</b>
<b>TNF-α</b>	<b>101</b>	<b>30</b>
<b>IFN-γ</b>	<b>40</b>	<b>UD</b>
<b>Anti-proinflammatory Cytokines</b>		
<b>IL-10</b>	<b>281</b>	<b>121</b>
<b>TGF-β</b>	<b>UD</b>	<b>87</b>

**Figure2. The treatment of HpHSP60 altered the cytokine expression profile of activated PBMCs.** Cytokine array map was adapted from the user manual of RayBio® Human Cytokine Antibody Array. Scanning photographs of cytokine arrays attached were describing as following: (A) PBMCs without any treatment. (B) PBMCs treated with anti-CD3 mAbs. (C) PBMCs treated with anti-CD3 and HpHSP60. The relative intensity of different cytokines was normalized with the positive spots. The values of relative cytokine expression were shown on the table (UD: undetectable).

3. HpHSP60誘發所產生的TGF-β參與抑制PBMCs增生。

Sequentially, TGF- $\beta$  inhibitor SB 431542 and SIS3 were used to examine its effect on growth inhibition of PBMCs, which is caused through the generation of Tregs when treated with HpHSP60. SB431542 is an inhibitor specific to the ALK-4, 5, 7 (activin-like kinase, i.e. TGF- $\beta$  receptor I) whereas SIS3 is an inhibitor selectively blocked the phosphorylation and functions of Smad3. Treatments of TGF- $\beta$  inhibitors significantly rescue the inhibition, which indicated TGF- $\beta$  signaling pathway was involved.



**Figure3. TGF- $\beta$  signaling pathway involved in the proliferative inhibition.** PBMCs treated with anti-CD3 and HpHSP60 were co-administrated with TGF- $\beta$  inhibitor (A) SB431542 or (B) SIS3. Proliferation was monitored by MTT assay.

## 五、 結論

本研究發現幽門螺旋桿菌熱休克蛋白60具有誘發人類Th0細胞分化成調控型T細胞的能力。此現象可能是透過TGF- $\beta$ 訊息傳遞路徑而引發。籌備此計畫之目的在於探討幽門螺旋桿菌毒力因子HSP60對於免疫抑制關Treg細胞的影響。透過此計畫能夠進一步瞭解幽門螺旋桿菌之慢性致病機制，以其降低其對於人類健康之影響。基於胃潰瘍與胃癌對於國人所造成之危害，此計畫之興提希冀能為國人健康盡一份棉薄之力。在學術研究方面，我們將此一計畫之部份成果整理撰寫，已發表至SCI期刊*Cytokine* (論文發表: Antibodies against *Helicobacter pylori* heat shock protein 60 aggravate HSP60-mediated proinflammatory responses. *Cytokine*. 2011 Aug;55(2):174-80.)。而由此計畫所得之資料，將可幫助我們對於HpHSP60

所造成之影響有更進一步的瞭解，以為日後開發疫苗或藥物奠定成功基礎。

## 六、 參考文獻

- [1] Wu MS, Lin JT, Hsu PN, Lin CY, Hsieh YT, Chiu YH, Hsueh PR, Liao KW. Preferential induction of transforming growth factor-beta production in gastric epithelial cells and monocytes by *Helicobacter pylori* soluble proteins. *J Infect Dis.* 2007 196:1386-93.
- [2] Lin CY, Huang YS, Li CH, Hsieh YT, Tsai NM, He PJ, Hsu WT, Yeh YC, Chiang FH, Wu MS, Chang CC, Liao KW. Characterizing the polymeric status of *Helicobacter pylori* heat shock protein 60. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 388:283-9.
- [3] MARIO HUESCA, SERGIO BORGIA, PAUL HOFFMAN, AND CLIFFORD A. LINGWOOD. Acidic pH Changes Receptor Binding Specificity of *Helicobacter pylori*: a Binary Adhesion Model in which Surface Heat Shock (Stress) Proteins Mediate Sulfatide Recognition in Gastric Colonization. *Infect Immun.* 1996 Jul;64(7):2643-8.
- [4] Lin SN, Ayada K, Zhao Y, Yokota K, Takenaka R, Okada H, Kan R, Hayashi S, Mizuno M, Hirai Y, Fujinami Y, Oguma K. *Helicobacter pylori* heat-shock protein 60 induces production of the pro-inflammatory cytokine IL8 in monocytic cells. *J Med Microbiol.* 2005 Mar;54(Pt 3):225-33.
- [5] Amberger A, Maczek C, Jürgens G, Michaelis D, Schett G, Trieb K, Eberl T, Jindal S, Xu Q, Wick G. Co-expression of ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1 and Hsp60 in human arterial and venous endothelial cells in response to cytokines and oxidized low-density lipoproteins. *Cell Stress Chaperones.* 1997 Jun;2(2):94-103.
- [6] Takenaka R, Yokota K, Ayada K, Mizuno M, Zhao Y, Fujinami Y, et al. *Helicobacter pylori* heat-shock protein 60 induces inflammatory responses through the Toll-like receptor-triggered pathway in cultured human gastric epithelial cells. *Microbiology* (Reading, England) 2004 Dec;150(Pt 12):3913-22.
- [7] Gobert AP, Bambou JC, Werts C, Balloy V, Chignard M, Moran AP, et al. *Helicobacter pylori* heat shock protein 60 mediates interleukin-6 production by macrophages via a toll-like receptor (TLR)-2-, TLR-4-, and myeloid differentiation factor 88-independent mechanism. *J Biol Chem.* 2004 Jan 2;279(1):245-50.
- [8] Maguire M, Poole S, Coates AR, Tormay P, Wheeler-Jones C, Henderson B. Comparative cell signalling activity of ultrapure recombinant chaperonin 60 proteins from prokaryotes and eukaryotes. *Immunology.* 2005 Jun;115(2):231-8.

- [9] Flohe SB, Bangen JM, Flohe S, Agrawal H, Bergmann K, Schade FU. Origin of immunomodulation after soft tissue trauma: potential involvement of extracellular heat-shock proteins. *Shock*. 2007 May;27(5):494-502.
- [10] Kinnunen A, Paavonen J, Surcel HM. Heat shock protein 60 specific T-cell response in chlamydial infections. *Scand J Immunol*. 2001 Jul-Aug;54(1-2):76-81.
- [11] Zanin-Zhorov A, Bruck R, Tal G, Oren S, Aeed H, Hershkovich R, et al. Heat shock protein 60 inhibits Th1-mediated hepatitis model via innate regulation of Th1/Th2 transcription factors and cytokines. *J Immunol*. 2005 Mar 15;174(6):3227-36.
- [12] Zanin-Zhorov A, Cahalon L, Tal G, Margalit R, Lider O, Cohen IR. Heat shock protein 60 enhances CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cell function via innate TLR2 signaling. *J Clin Invest*. 2006 Jul;116(7):2022-32.
- [13] Wang X, Zhou S, Chi Y, Wen X, Hoellwarth J, He L, Liu F, Wu C, Dhesi S, Zhao J, Hu W, Su C. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg induction by an HSP60-derived peptide SJMHE1 from *Schistosoma japonicum* is TLR2 dependent. *Eur J Immunol*. 2009 Nov;39(11):3052-65.



# 國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2011/08/05

國科會補助計畫	計畫名稱: 研究幽門螺旋桿菌熱緊迫蛋白60的功能: 誘發宿主Treg細胞增加藉以抑制T細胞之活性
	計畫主持人: 廖光文
	計畫編號: 99-2320-B-009-002- 學門領域: 醫學之生化及分子生物
無研發成果推廣資料	

99 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：廖光文		計畫編號：99-2320-B-009-002-				計畫名稱：研究幽門螺旋桿菌熱緊迫蛋白 60 的功能：誘發宿主 Treg 細胞增加藉以抑制 T 細胞之活性	
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	1	1	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	2	4	100%	人次	
		博士生	1	1	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
國外	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%		章/本
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		

<p>其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)</p>	無。
--	----

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	



# 國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表  未發表之文稿  撰寫中  無

專利： 已獲得  申請中  無

技轉： 已技轉  洽談中  無

其他：（以 100 字為限）

論文發表: Antibodies against Helicobacter pylori heat shock protein 60 aggravate HSP60-mediated proinflammatory responses. Cytokine. 2011 Aug; 55(2):174-80.

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

籌備此計畫之目的在於探討幽門螺旋桿菌毒力因子 Hsp60 對於免疫抑制關 Treg 細胞的影響。透過此計畫能夠進一步瞭解幽門螺旋桿菌之慢性致病機制，以其降低其對於人類健康之影響。基於胃潰瘍與胃癌對於國人所造成之危害，此計畫之興提希冀能為國人健康盡一份棉薄之力。在學術研究方面，我們將此一計畫之部份成果整理撰寫，已發表至 SCI 期刊 Cytokine。而由此計畫所得之資料，將可幫助我們對於 HpHsp60 所造成之影響有更進一步的瞭解，以為日後開發疫苗或藥物奠定成功基礎。