

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19092

研究課題名(和文) H. suis感染による胃MALTリンパ腫形成とTLR4シグナル活性化機構の解明

研究課題名(英文) The mechanism of the gastric MALT lymphoma formation after H. suis infection via the activation of TLR4-TRIF pathway.

研究代表者

山本 幸司 (YAMAMOTO, KOJI)

神戸大学・医学研究科・学術研究員

研究者番号：70608322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で我々は、H. suis感染後の胃MALTリンパ腫形成は、TLR4-TRIFシグナル伝達経路の活性化によって引き起こされることを明らかにした。また、TLR4-TRIFシグナル伝達経路の活性化により誘導される1型IFNsは、感染胃粘膜B細胞を刺激する結果、B細胞からのIFN- $\gamma$ の産生を促進することで胃MALTリンパ腫発症に関与していることも明らかとなった。これらの研究成果によりH. suis感染から胃MALTリンパ腫発症に関わる分子メカニズムが明らかとなり、今後、これらの分子メカニズムを標的とした胃MALTリンパ腫形成における新規治療法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Helicobacter suis (H. suis) is zoonotic infection related bacterium, which can induce the gastric mucosa associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma. Recently, we reported that the formation of gastric lymphoid follicles after H. suis infection is induced via the activation of interferon (IFN)- $\gamma$ . However, the detailed mechanism that how the activation of IFN- $\gamma$  is induced after H. suis infection remained unclear. Here, we revealed that the activation of TLR4-TRIF pathway after H. suis infection is related to the production of type1 IFNs from gastric epithelial cells after H. suis infection. In addition, the production of type1 IFNs interacted with type 1 IFN receptors on gastric B cells to secrete IFN- $\gamma$  and then the activation of IFN- $\gamma$  is enhanced by the positive feedback regulation of IFN- $\gamma$  in B cells. These results suggest that TLR4-TRIF-type 1 IFN-IFN- $\gamma$  pathway is crucial for the development of gastric lymphoid follicles after H. suis infection.

研究分野：細菌感染症と消化器疾患

キーワード：H. suis 胃MALTリンパ腫 TLR4-TRIFシグナル伝達 1型IFNs産生 胃粘膜B細胞 IFN- $\gamma$ 産生

## 1. 研究開始当初の背景

近年、*Helicobacter pylori* の類似菌として知られている *H. suis* は、胃病変発症に密接に関与していることが知られている。この細菌は以前より *Gastrospirillum hominis* として知られており、長さ 4-10  $\mu\text{m}$ 、らせん状、波長が約 1  $\mu\text{m}$  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つことが明らかになっている。*H. suis* は、グラム陰性細菌で、イヌ、ネコ、ブタ、ヒトを含む多くの動物種の胃に感染し、動物からヒトへの伝播が想定されていることから、*H. suis* 感染は、人畜共通感染症の原因菌として想定されている。これまでの報告で、*H. suis* をマウスに経口感染させると約 6 か月程度で胃 MALT リンパ腫が 100% の確率で形成されることが知られている。これらのことから、*H. suis* 感染症は、胃 MALT リンパ腫発症に密接に関与していることが示唆される。しかしながら、*H. suis* 感染がどのようにして胃 MALT リンパ腫発症を誘導するのかの詳細なメカニズムは明らかにされていない。

これまでに申請者は、*H. suis* 感染後のマウス胃粘膜では、IFN- $\gamma$  の発現上昇が亢進していること、また、IFN- $\gamma$  遺伝子欠損マウスを用いた *H. suis* の感染実験では、野生型マウスで多数認められていた胃 MALT リンパ腫形成が、100% 抑制されていることが明らかにした。さらに、*H. suis* 感染後に誘導される IFN- $\gamma$  は、感染に胃粘膜に浸潤した B 細胞から産生されることも明らかとなった。これらのことから、*H. suis* 感染後に誘導される胃 MALT リンパ腫形成は、感染胃粘膜に浸潤した B 細胞から産生される IFN- $\gamma$  によって直接的に引き起こされることを明らかとなったが、*H. suis* 感染後、どのようなメカニズムで IFN- $\gamma$  が産生され、胃 MALT リンパ腫形成に関与しているのかの詳細は明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

*Helicobacter suis* (*H. suis*) は、イヌ、ネコ、ブタ、ならびに、ヒトの胃粘に感染しているおり、人畜共通感染症の原因菌であることが知られている。近年の報告で、*H. suis* をマウスに経口感染されると、感染によって胃粘膜に浸潤した B 細胞から産生される IFN- $\gamma$  により 100% の確率で胃 MALT リンパ腫を発症することが知られている。しかしながら、*H. suis* 感染から、どのようなメカニズムで胃粘膜 B 細胞から IFN- $\gamma$  が産生され、また、胃 MALT リンパ腫形成に関連しているのかの詳細は明らかにされていない。

本研究課題では、細菌感染症からインターフェロン誘導に重要な自然免疫系である Toll 様受容体 4 (TLR4) シグナル伝達経路に着目し、*H. suis* 感染から IFN- $\gamma$  を誘導させる新たな分子メカニズムを解明することで、胃 MALT リンパ腫発症を抑制させる新規治療法

のターゲットとなる候補遺伝子の探索を目的とする。宿主の免疫応答によるリンパ腫形成機構が明らかになるだけでなく、免疫制御による胃リンパ腫抑制という新規治療法の開発が期待できる。

## 3. 研究の方法

本申請では、細菌感染症からインターフェロン誘導に重要な自然免疫系である Toll 様受容体 4 (TLR4) シグナル伝達経路に着目し、そのシグナル伝達経路に重要な関連遺伝子を欠損させた MyD88 欠損マウス、TRIF 欠損マウス、ならびに、MyD88/TRIF 二重欠損マウスを用いて、*H. suis* の感染実験を行い、TLR4 シグナル伝達経路の活性化と胃 MALT リンパ腫発症との関連性を明らかにした。*H. suis* 感染後の胃内の各々の細胞における TLR4、インターフェロン受容体の発現については、フローサイトメトリーを用いて詳細に解析し、各々の遺伝子発現細胞の同定を行った。また、*H. suis* 感染症によって胃組織内に存在する各々の細胞上に高発現する TLR4 と 1 型 IFNs 誘導との関連性を *in vitro* で評価した。さらに、胃上皮組織から産生された 1 型 IFNs と胃粘膜 B 細胞から産生される IFN- $\gamma$  との関連性を明らかにするために、B 細胞リンパ腫細胞株を用いて、組換え 1 型 IFNs (IFN- $\gamma$ 、IFN- $\beta$ ) との刺激実験を行い、IFN- $\gamma$  産生を評価した。

## 4. 研究成果

*H. suis* を野生型マウス、MyD88 遺伝子欠損マウス、TRIF 遺伝子欠損マウス、ならびに、MyD88/TRIF 二重欠損マウスに感染させると、野生型マウス、ならびに、MyD88 遺伝子欠損マウスの胃粘膜では多数の胃 MALT リンパ腫形成が認められたが、TRIF 遺伝子欠損マウス、ならびに、MyD88/TRIF 二重欠損マウスの胃粘膜では、胃 MALT リンパ腫形成が有意に抑制されていたほか、IFNs 誘導も胃 MALT リンパ腫が抑制された TRIF 遺伝子欠損マウス、ならびに、MyD88/TRIF 二重欠損マウスの胃粘膜において有意に抑制されていることが明らかとなった。また、フローサイトメトリー、ならびに、免疫染色法の結果、TLR4 は、感染後の胃上皮細胞で高い発現を示すことが明らかとなった。これらのことから、*H. suis* 感染に誘導される胃 MALT リンパ腫は胃上皮細胞上の TLR4-TRIF シグナル伝達経路を介して形成されることが示唆された。

これまでに細菌の持つモノホスホオリピット A (MPLA) の刺激は、TLR4 の下流のシグナル伝達分子である TRIF 依存的に IFNs 誘導に関連していることが知られているため、胃上皮細胞株を用いて MPLA の刺激実験を行った結果、時間依存的に、胃上皮細胞から IFNs の産生が上昇していることが確認された。これらのことから、*H. suis* のもつ MPLA が胃上皮細胞を強く刺激する結果、TLR4-TRIF シグナル伝達経路の活性化を介した IFNs が産生

され、胃 MALT リンパ腫形成に関連していることが示唆された。

一方で、*H. suis* 感染後の胃粘膜に浸潤した各々の細胞上の IFNAR の発現を解析した結果、他の細胞に比べて B 細胞上で IFNAR の高い発現が認められた。さらに、組換え 1 型 IFNs を用いて B 細胞リンパ腫株刺激した結果、B 細胞内の STAT4 の活性化を介して IFN- $\gamma$  が産生されることが明らかとなった。さらに興味深いことに、*H. suis* 感染後に胃粘膜に浸潤した B 細胞上では、IFNGR の高い発現が認められたほか、組換え IFN- $\gamma$  を用いた細胞刺激実験の結果、B 細胞から産生される IFN- $\gamma$  は、フィードバック機構により、B 細胞上の IFNGR と相互作用することで、B 細胞からの IFN- $\gamma$  の産生を持続的に促進していることが明らかとなった。

これらの研究成果により、*H. suis* 感染後の胃 MALT リンパ腫発症は、胃上皮細胞に発現する TLR4-TRIF シグナル伝達経路の活性化を介して 1 型 IFNs が産生されること、また、産生された 1 型 IFNs は、感染胃粘膜内に浸潤した B 細胞上の IFNAR と相互作用する結果、IFN- $\gamma$  を産生させることが明らかとなった。これらの研究成果により、*H. suis* 感染後の胃 MALT リンパ腫形成に関わる分子メカニズムの詳細が明らかとなり、今後、これらの分子メカニズムを標的とした胃 MALT リンパ腫形成における新規治療法の開発が期待される。

#### 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 3 件)

1. Ogawa H, Iwamoto A, Tanahashi T, Okada R, Yamamoto K, Nishiumi S, Yoshida M, Azuma T. Genetic variants of *Helicobacter pylori* type IV secretion system components CagL and CagI and their association with clinical outcomes. Gut pathogens (In press)

#### 2. 山本幸司、東健

ヘリコバクター属感染症と胃病変発症メカニズム

日本ヘリコバクター学会誌 Vol.18, No.2 2017年1月

#### 3. 山本幸司、吉田優、東健

抗 CXCL13 抗体は、*Helicobacter suis* 感染によって誘発された胃リンパ濾胞形成を抑制する。日本ヘリコバクター学会誌 Vol.16, No.2 2015年1月

[学会発表](計 10 件)

#### 1. 山本幸司、東健

サイトカイン・ケモカイン産生を介した *H. suis* 感染後に誘導される胃 MALT リンパ腫形成メカニズム 第 4 回 神緑会 Young Investigator Award (YIA) 発表会 神戸 2016年10月29日 一般発表

#### 2. 山本幸司、東健

サイトカイン・ケモカイン産生を介した *H. suis* 感染後に誘導される胃 MALT リンパ腫形成メカニズム

第 89 回日本生化学会大会 仙台 2016年9月25日-27日

#### 3. 山本幸司

ヘリコバクター属感染症と胃病変発症メカニズム (ランチョンセミナー)

第 22 回日本ヘリコバクター学会 別府 2016年6月24日-26日.

#### 4. 山本幸司、東健

IFN- $\gamma$  producing B cells induce the formation of gastric lymphoid follicles after *H. suis* infection.

第 63 回日本生化学会近畿支部例会 神戸 2016年5月21日.

#### 5. 山本幸司、東健

IFN- $\gamma$  producing B cells induce the formation of gastric lymphoid follicles after *H. suis* infection.

第 81 回 日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 長崎 2016年5月13日-14日.

#### 6. 山本幸司、東健

抗 CXCL13 抗体は、ヘリコバクター感染後の胃リンパ濾胞形成を抑制する。

第 38 回日本分子生物学会、第 88 回日本生化学会合同大会 神戸 2015年12月1日-4日.

#### 7. Koji Yamamoto、Takeshi Azuma

Interferon- $\gamma$ -producing B cells induce the formation of gastric lymphoid follicles after *Helicobacter suis* infection.

第 68 回日本細菌学会関西支部総会 京都 28. Nov. 2015.

#### 8. 山本幸司、東健

Interferon- $\gamma$ -producing B cells induce the formation of gastric lymphoid follicles after *Helicobacter suis* infection.

第 80 回日本インターフェロン・サイトカイン学会 東京 2015年7月17日-18日.

#### 9. 岩本彰、棚橋俊仁、小川浩史、楊林、山本幸司、東健

次世代シーケンサーを用いたヘリコバクターピロリ菌癌性蛋白 CagA に特徴的な変異

の検出

第 21 回日本ヘリコバクター学会学術集会 神戸  
2015 年 6 月 26 日-27 日.

10. 山本幸司、東健

インターフェロン産生 B 細胞は、*H. suis* 感染後の胃リンパ濾胞形成を誘導する。

第 21 回日本ヘリコバクター学会学術集会 神戸  
2015 年 6 月 26 日-27 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

神戸大学消化器内科 ホームページ

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/gi/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本幸司 (Koji Yamamoto)

神戸大学・大学院医学研究科・学術研究員

研究者番号：70608322

(2)研究分担者

なし。

研究者番号：

(3)連携研究者

なし。

研究者番号：

(4)研究協力者

なし。