

機関番号: 34519

研究種目: 基盤研究(B)

研究期間: 2008-2010

課題番号: 20390129

研究課題名(和文)

ヘリコバクター・ピロリの慢性感染に与る宿主・病原体関係の解析

研究課題名(英文)

Importance of host response for the development of chronic gastritis induced by infection with *Helicobacter pylori*.

研究代表者

筒井 ひろ子 (TSUTSUI HIROKO)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号: 40236914

研究成果の概要(和文):

ヘリコバクター・ピロリ(ピロリ菌)はヒトの胃に慢性感染して、慢性胃炎、胃がん、あるいは MALT リンパ腫を引き起こす。病原体の病原因子については、詳細に解明されてきたが、宿主要因がどのように病害形成に関与するのかは不明であった。当該研究課題では、慢性胃炎の主要な浸潤細胞である好酸球に照準を合わせ、どのようなメカニズムで炎症が惹起され、その炎症が病原体排除に寄与するかを検討した。その結果、胃粘膜上皮細胞が恒常的に産生するタンパク質である IL-33 が好酸球性炎症に深く関わり、且つ、ピロリ菌の排除そのものにも関与することが判明した。ピロリ菌感染に対しては、抗菌剤やプロトンポンプ阻害剤を用いた除菌が標準治療として浸透している。しかし、薬剤耐性菌や再感染が臨床上大きな問題となっている。これらの問題を克服するために、IL-33 を標的とした治療が有望かもしれない。

研究成果の概要(英文):

Helicobacter pylori is a Gram-negative, extracellular bacterium and is involved in the development of chronic gastritis and gastric cancer. We now know that the standard therapy against *H. pylori* using antibiotics and proton pump inhibitor are beneficial for prevention of the gastric diseases. However, we have faced upon many cases that are resistant to the therapy and suffer from the re-infection. Here, we investigated whether and how host responses against *H. pylori* are involved in the development of those diseases. And we found that many eosinophils are infiltrated in the inflammatory sites of chronic gastritis in *H. pylori*-infected mice. Furthermore, IL-33, a potent cytokine triggering activation and recruitment of eosinophils via induction of IL-13/IL-5 and chemokines for eosinophils, is essentially required for the development of chronic gastritis. Indeed, *Il33*^{-/-} mice are resistant to chronic gastritis induced by infection with *H. pylori* and are impaired in the clearance of the bacterium. These results indicated IL-33 as a potent target for protection against the chronic gastritis and plausibly gastric cancer.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2009年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野: 医歯薬学

科研費の分科・細目: 基礎医学・細菌学(含真菌学)

キーワード: 感染免疫、ヘリコバクター・ピロリ、好酸球、インターロイキン33(IL-33)、IL-33受容体、胃粘膜上皮細胞、好中球

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまで、以下のことを明らかにしてきた。

- (1) 生体防御応答が病的な炎症性疾患やアレルギー性炎症の直接原因になることを証明した。特に、生体防御応答で産生される IL-18 は、IFN- γ と IL-13 を同時に産生する Super Th1 細胞への分化誘導を促し、好酸球性炎症を惹起する。以上のことから、感染で惹起される胃病変のみならず、*H. pylori* 慢性感染そのものも宿主応答に準拠する可能性を着想するに至った。
- (2) 組織破壊（炎症）と組織修復（線維化）の制御機構について気管支喘息モデルを用いて解明した。気道周囲の IFN- γ に起因する好中球性炎症は、組織破壊を促進して線維化を抑制する。逆に、IL-13 に起因する好酸球浸潤は、気道周囲の炎症を抑制して線維化を促進する。このことから、*H. pylori* が、感染局所における IL-13 産生を誘導して、好酸球を介した炎症応答抑制を促すことで、慢性感染すると考えるに至った。
- (3) 内因性 IL-18 が、IFN- γ と IL-13 産生誘導を介して、多様な病原体の排除に貢献することを明らかにした。IL-18 が IFN- γ 産生を誘導して、細胞内寄生菌であるリステリア菌や、細胞内寄生原虫であるリーシュマニアやマラリア原虫感染実験で証明した。逆に、内因性 IL-18 は IL-13 産生を誘導することでマスト細胞を活性化し、その結果、消化管寄生線虫の感染防御に貢献することも証明した。
- (4) 病原体の感染を契機に産生される IL-18 が、細胞内酵素である caspase-1 (casp1) の活性化に依存することを証明した。
- (5) 自然免疫応答による casp1 の活性化分子メカニズムを解明した。特に、細胞外の病原体成分センサーである Toll 様受容体 (TLR) とそのシグナル分子がどのように casp1 の活性化に寄与するかを証明した。(3)、(4)、(5)から、*H. pylori* 感染により活性化される casp1 が、IL-18 と後述する IL-33 の分泌を誘導して、マスト細胞や好酸球を活性化することで、炎症応答を抑制する可能性を着想するに至った。

最近、新規サイトカインである IL-33 がクローニングされた。IL-33 は、IL-18 同様、casp1 の活性化によりプロセッシングを受けて活性型になった後に、細胞外に遊離すると報告された。遊離した IL-33 はマスト細胞、好酸球や Th2 細胞を活性化して IL-13 や IL-5 の産生を誘導し、その結果、好酸球性炎症に寄与する可能性が示唆されている。例えば、組換え IL-33 を連日経鼻的に投与すると、マウスは好酸球性炎症を伴う喘息様応答を示す。このことから、当該研究では IL-18 のみならず IL-33 の動静も視野に入れる。

2. 研究の目的

ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*) はヒトの胃粘膜表層に慢性感染し、胃・十二指腸潰瘍や胃癌の発症に深く関わる。スナネズミの胃に *H. pylori* を接種すると、感染は遷延し、やがて前癌病変が観察される。炎症誘導とその結果誘導される組織改築には、IV 型分泌装置と、それを介して宿主細胞に注入されるエフェクターを代表とする病原因子が重要であることがスナネズミを用いた研究で明らかにされた。しかし、慢性感染のメカニズムは未だに不明である。一般に、病原体感染の遷延化は、病原体固有の病原因子だけではなく、宿主応答によっても強く規定される。マウス感染予備実験で、申請者らは、*H. pylori* に対して宿主は排除に有用な炎症応答ではなく、むしろ、好酸球集積を代表とする炎症制御応答を活性化する事実に遭遇した。当該研究では、感染胃に観察される高度な好酸球浸潤が、どのような分子・細胞メカニズムで誘導され、どのような機序で生体防御応答を制御して慢性感染を許すのかについて、炎症性サイトカイン・ケモカインの動態に照準を合わせて解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス

野生型 C57BL/6 マウス並びに IL-33 受容体 (R)欠損 C57BL/6 マウスを用いた。

(2) *H. pylori* の接種

マウスの胃に経口チューブをもちいて、*H. pylori* (ss1 株)を連日 3 日間投与した。

(3) 組織学的検索

感染後、経時的に胃を切除する。胃切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色する。好酸球の細胞質は赤に、好中球のそれは薄青に染まる。感染後の胃における好酸球集積動態を調べるために、胃切片全域の好酸球を数えた。

また、好酸球を特定するために、好酸球特有の歳病表面マーカーである Siglec F 並びに Gr-1 発現を蛍光ラベルした各抗体を用いて、胃切片を培養し、共焦点レーザー顕微鏡でその発現を調べた。両マーカーとも陽性が好酸球で、Siglec F 陰性 Gr-1 陽性が好中球である。

(4) *H. pylori* 感染菌数の測定

感染後、経時的に胃を採取し、洗浄後、胃のホモジェネートを作成する。ホモジェネートを適宜希釈し、*H. pylori* 選択培地にプレーティングする。7 日間培養後、コロニー数を数え (Colony Forming Unit:)、胃 1 個当たりの菌数を CFU で表記した。

(5) 慢性胃炎のメカニズムの解析

感染慢性胃炎形成、並びに *H. pylori* の排除における IL-33 の重要性を、以下の方法で検討した。胃癌細胞株である AGS 細胞に *in vitro* で *H. pylori* を感染し、IL33 発現が増強するかを、定量性 RT-PCR で測定した。なお、IL-33 は当初の報告とは異なり、全長サイズのタンパク質が活性化を示し、IL-18 の

場合とは異なり、*casp1* で切断されると不活性化されることが証明されたことから、*casp1* の関与についての研究は割愛した。ついで、IL-33 の受容体である IL-33R 遺伝子を欠損するマウスに *H. pylori* を経口接種し、慢性胃炎の程度を組織学的に検討すると共に菌数 (CFU) を計測した。

(6)胃における IL-33 産生細胞の特定

家兎に組換えマウス IL-33 とアジュバントを接種し、定期的にブースターを掛けた。抗血清を採取し、同組換え IL-33 を用いて抗マウス IL-33 抗体を生成した。健常マウスの胃を採取し、凍結胃切片を作成して、抗マウス IL-33 抗体と蛍光ラベル2次抗体を用いて染色した。IL-33 の発現は共焦点レーザー顕微鏡を用いて検討した。

(7)IL-33 の産生に係わる *H. pylori* 病原因子を明らかにするために、type IV 分泌装置を欠損する *ssl1* 株を用いて、*in vitro* でヒト胃がん細胞株である AGS 細胞を感染させ、定量 RT-PCR で IL-33 mRNA 発現を測定した。

4. 研究成果

(1)好酸球性慢性胃炎

野生型 C57BL/6 マウスに *H. pylori* (*ssl1* 株) を経口接種した。感染1ヶ月目の切片でも、好酸球や好中球などの顆粒球浸潤が粘膜下に見られるようになった。接種後2ヶ月目以降になると、顕著な好酸球集積が粘膜下層のみならず粘膜固有層にも観察された。その浸潤程度は、感染後の経過時間に対応した。好酸球を特定するために、好酸球特有の歳病表面マーカーである Siglec F 並びに Gr-1 発現を蛍光ラベルした各抗体を用いて、共焦点レーザー顕微鏡で調べた。その結果、感染1ヶ月後以降、両マーカー陽性の細胞が胃に集積し、その程度は時間と共に増加することが明らかとなった。以上のことから、従来 *H. pylori* 感染では好中球が主たる浸潤細胞であると信じられてきたが、好酸球も好中球と遜色なく浸潤することが明らかになった。*H. pylori* の菌数の推移は、感染直後一時低下するが、1ヶ月目以降は定常状態を示し、6ヶ月目まで排除されることは無かった。

(2)胃粘膜上皮細胞は恒常的に IL-33 を貯蔵

非感染マウスの胃を採取し、IL-33 発現細胞を検討したところ、胃粘膜上皮細胞内に恒常的に IL-33 が発現していることが判明した。特に、幽門部の胃粘膜上皮が IL-33 を強く産生する傾向が認められた。上皮細胞以外では、恒常的な IL-33 陽性細胞は認められなかった。

(3)*H. pylori* は胃上皮細胞の IL-33 産生を誘導

AGS 細胞は恒常的に IL-33 を発現することが定量 RT-PCR で判明した。さらに、AGS 細胞を *in vitro* で *H. pylori* で感染すると、IL-33 発現がさらに増強した。このことから、*H. pylori* には胃粘膜上皮細胞における IL-33 の発現を誘導する活性があることが判明した。

(4)IL-33 は慢性胃炎に必須

野生型マウスと *Il33r^{-/-}* 欠損マウスに *H. pylori* を経口接種すると、野生型マウスでは好酸球と好中球浸潤を伴う慢性胃炎が

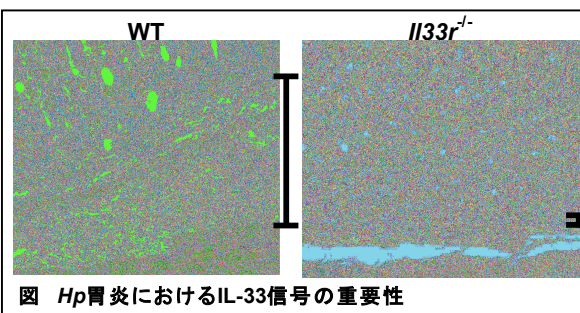


図 Hp胃炎におけるIL-33信号の重要性

観察されたが、*Il33r^{-/-}* 欠損マウスではこれらの所見はほとんど認められなかった(図)。また、感染 *Il33r^{-/-}* 欠損マウスの胃には、野生型マウスに比べて、有意に多い *H. pylori* が観察された。

(5)IL-33mRNA 発現誘導には分泌装置が必要

野生型の場合とは対照的に、タイプ IV 分泌装置を欠損した *H. pylori* は AGS 細胞からの IL-33 発現誘導を認めなかった。このことから、タイプ IV 分泌装置が重要であることが判明した。

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0件)

現在、当該成果については投稿準備中です。

[学会発表] (計1件)

① 福田典子, 内山良介, 筒井ひろ子. 「*Helicobacter pylori* 感染マウスモデルにおける IL-33 依存的な菌の排除機構」第 63 回日本細菌学会関西支部総会 2010 年 11 月 20 日 大阪府枚方市

6. 研究組織

(1)研究代表者

筒井 ひろ子 (TSUTSUI HIROKO)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号: 40236914

(2)研究分担者

中西 憲司 (NAKANISHI KENJI)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号: 60172350

林 周平 (HAYASHI SHUHEI)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号: 40322185

内山 良介 (UCHIYAMA RYOUSUKE)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号：20456891