

機関番号：14301

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20390207

研究課題名 (和文) ヘリコバクター胃炎形成におけるパイエル板を介した宿主免疫応答とその制御機構の解析

研究課題名 (英文) Immunologic response to *Helicobacter* involved in the development of chronic gastritis

研究代表者

渡部 則彦 (WATANABE NORIHIKO)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：50419446

研究成果の概要 (和文)：ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*: *H. pylori*) 感染における宿所免疫応答と慢性胃炎形成機構の解析を行い、*H. pylori* 感染にてパイエル板を介した免疫応答誘導から Th1 型に依存した慢性萎縮性胃炎が形成されるには、*H. pylori* の持つ病原因子 CagA が必要であること、一方で、胃上皮細胞には CagA 依存性に thymic stromal lymphopoietin (TSLP) 産生が誘導され、樹状細胞 (dendritic cell:DC) を介した Th2 型サイトカイン産生が惹起され、胃粘膜に慢性濾胞性胃炎が形成される可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：*H. pylori* CagA in the stomach plays an important role in the migration of *H. pylori*-primed CD4<sup>+</sup> T cells in the gastric mucosa from the Peyer's patches. In addition, *H. pylori* CagA can directly trigger epithelial cells to produce TSLP and TSLP-mediated DC activation may be involved in Th2 responses triggering B cell activation in *H. pylori*-induced gastritis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2009 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2010 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
総計	10,100,000	3,030,000	13,130,000

研究分野：消化器内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：内科学、免疫学、細胞・組織、生体分子、感染症

## 1. 研究開始当初の背景

*H. pylori* 感染では、本来免疫組織でない胃粘膜に炎症が誘導され慢性胃炎が形成される。*H. pylori* 感染による慢性胃炎では、interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 産生を産生する T helper (Th) 1 型 CD4 陽性 T 細胞の浸潤を特徴とする萎縮性胃炎の形成がみられる。一方、その慢性胃炎でも胚中心をもった B 細胞によるリンパ濾胞形成がみられることが

知られており、特に、小児、若年者ではそのリンパ濾胞が特徴的な濾胞性胃炎が高頻度に形成される。しかし、*H. pylori* 感染によってこのような慢性胃炎が形成される機序は十分には明らかでなかった。

最近、*H. pylori* 感染における Th1 型の宿主免疫応答誘導には、腸管粘膜関連免疫組織における主要な免疫誘導組織である小腸パイエル板が重要であることが明らかとな

った。*H. pylori* は、パイエル板において樹状細胞(dendritic cell: DC)に取り込まれ、活性化した DC は Th1 細胞の分化を誘導し、その Th1 細胞が *H. pylori* が感染した胃粘膜にホーミングすることにより萎縮性胃炎が形成される。そして、この Th1 型免疫応答誘導には、胃粘膜に *H. pylori* が存在することが重要であることが明らかとなっている。しかし、*H. pylori* が持つ病原因子 CagA が、この宿主免疫応答にどのような影響を与えるのかは明らかではない。

一方、*H. pylori* 感染で生じる瀧胞性胃炎でみられるリンパ瀧胞での胚中心応答を誘導する B 細胞の活性化には、瀧胞ヘルパー T 細胞が重要と考えられるが、他の感染免疫実験モデルでの解析から、interleukin (IL)-4 を産生する Th2 型 CD4 陽性 T 細胞から瀧胞ヘルパー T 細胞が誘導されることが示唆されている。しかし、胃粘膜環境において、Th2 細胞が誘導される機序には不明である。IL-7 に類似したサイトカイン TSLP は、主として上皮細胞から分泌され DC を活性化する。TSLP は、炎症の場で上皮に強く発現誘導され、DC 活性化を介して CD4 陽性 T 細胞を炎症性 Th2 型サイトカイン産生細胞へと分化させることが明らかとなっている。

## 2. 研究の目的

*H. pylori* 感染によって生じるパイエル板を介した Th1 型免疫応答誘導と、その存在下で Th2 型免疫応答が生じえる機序を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) *H. pylori* 感染と TSLP 発現の関係

ヒト臨床検体を用いて、定量的 RT-PCR 法、抗 TSLP 抗体を用いた免疫組織染色にて TSLP 発現解析を行った。また、ヒト消化管粘膜上皮細胞株を用いて、定量的 RT-PCR 法、培養上澄を用いた ELISA 法にて *H. pylori* 感染による TSLP 発現誘導解析を行った。

### (2) TSLP 発現誘導条件での免疫応答誘導の解明

*H. pylori* 感染による TSLP 発現誘導を行い、TSLP を含む粘膜上皮細胞株の上澄を回収し、ヒト DC の活性化誘導と、活性化 DC による CD4 陽性 T 細胞分化誘導解析を、ヒト末梢血から精製した CD4 陽性 T 細胞と DC を用いた共培養系にて行った。

### (3) *H. pylori* 感染モデル、TSLP 受容体遺伝子欠損マウス、PD-1 遺伝子欠損マウスを用いた解析

病原因子 CagA の *H. pylori* 感染免疫応答での役割を明らかにする目的で、CagA 欠損 *H. pylori* 株を用いて、C57/BL6 野生型 (B6) マウスと B6 系統の RAG2 遺伝子欠損 (RAG2KO) マウスに経口的に感染させ、感染 8 週後の B6 マウスの脾臓細胞を *H. pylori* 感染 RAG2KO マウスに移入し、移入 4 週後に胃の組織学的免疫学的解析を行った。また、TSLP 受容体欠損マウスを用いて慢性胃炎における TSLP シグナルが Th1 型免疫応答誘導に与える影響を解析した。また、抑制性共刺激分子 PD-1 についても同様に解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) *H. pylori* 感染と TSLP 発現の関係

ヒト腸管上皮のみならず、瀧胞性胃炎を発症した粘膜上皮においても TSLP が発現しており、TSLP 発現部位には、活性化 DC 局在が確認でき、TSLP による DC 活性化が粘膜局所で生じている可能性が示唆された。また、消化管粘膜上皮細胞株に、*H. pylori* を感染させると、腸管上皮細胞株 Caco2 のみならず、胃上皮細胞株でも TSLP 発現が誘導された。この *H. pylori* 感染による TSLP 発現誘導には、*H. pylori* と胃粘膜上皮細胞の直接的な接触が必要であり、CagA の存在が必須であることが明らかとなった。また、同じ条件下で、骨髄系 DC を粘膜局所に誘導可能なケモカイン MIP-3 $\alpha$  が分泌され、さらに B 細胞活性化因子として重要なサイトカイン BAFF の発現誘導が生じることが明らかとなった。

### (2) TSLP 発現誘導条件での免疫応答誘導の解明

ヒト末梢血から TSLP レセプターを高発現し未熟 DC を精製し、TSLP を含む *H. pylori* 感染粘膜上皮細胞株の上澄を用いて、DC 活性化が生じることを明らかにした。さらに、この活性化 DC と同種 naïve CD4 陽性 T 細胞の共培養系にて、CD4 陽性 T 細胞が IFN- $\gamma$  とともに IL-4 や IL-13 などの Th2 サイトカインを産生する CD4 陽性 T 細胞へと分化することが明らかとなった。

### (3) *H. pylori* 感染モデル、TSLP 受容体遺伝子欠損マウス、PD-1 遺伝子欠損マウスを用いた解析

*H. pylori* 感染胃炎モデルにおいて、CagA<sup>+</sup> *H. pylori* が胃粘膜に感染している RAG2KO マウスに、CagA<sup>+</sup> *H. pylori* 感染 B6 マウスの脾臓細胞を移入すると、高度の CD4 陽性 T 細胞浸潤による慢性胃炎が生じた。しかし、CagA<sup>-</sup> *H. pylori* 感染

RAG2KO マウスに CagA<sup>+</sup> *H. pylori* 感染 B6 マウスの脾臓細胞を移入すると、CD4 陽性 T 細胞の浸潤による慢性胃炎の形成が抑制されていた。これらのことから、*H. pylori* 感染でプライミングされた Th1 細胞の胃粘膜への移行には、胃粘膜に CagA が存在していることが必要であることが示唆された。また一方で、CagA<sup>+</sup> *H. pylori* が胃粘膜に感染している RAG2KO マウスに、CagA<sup>-</sup> *H. pylori* 感染 B6 マウスの脾臓細胞を移入すると、CagA<sup>+</sup> *H. pylori* 感染 B6 マウスの脾臓細胞の移入と比較して、CD4 T 細胞の胃粘膜への浸潤は同程度に生じるが、胃粘膜での FoxP3 陽性細胞の増加が抑制され、萎縮性胃炎が悪化した。これらのことから、CagA<sup>+</sup> *H. pylori* によるプライミングは抑制性の FoxP3 陽性 CD4 T 細胞の分化も同時に誘導し、萎縮性胃炎の形成に対して抑制的にも働いていることが示唆された。

末梢での抑制性 T 細胞の分化に必要な PD-1 と PDL1 相互作用を欠失させるために PD-1 遺伝子欠損マウスを用いて、*H. pylori* 感染実験を行うと、*H. pylori* 感染により胃粘膜上皮に PD1 リガンドである PDL1 の発現が誘導されるが、PD-1 遺伝子欠損マウスでは *H. pylori* 感染にて、Th1 型の萎縮性胃炎が増悪していた。これらのことから PD-1 と PDL1 相互作用を介した抑制性 T 細胞の分化誘導は、*H. pylori* 感染による Th1 型の萎縮性胃炎の抑制に重要であることが示唆された。

また一方で、*H. pylori* 感染による萎縮性胃炎と同様の胃炎が生じる自己免疫性胃炎モデルにおいて、胃炎の形成とともに、胃粘膜局所において TSLP の発現誘導が生じており、TSLPR 遺伝子欠損マウスでは、局所の Th1 型免疫応答の増強から自己免疫性胃炎が増悪し、萎縮性変化が悪化していた。これらの結果から、マウスモデルにおいて、TSLP シグナルが胃粘膜での Th1 応答に抑制的に働くことが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- 1) Aoki N, Kido M, Iwamoto S, Nishiura H, Maruoka R, Tanaka J, Watanabe T, Okazaki T, Chiba T, Watanabe N. Dysregulated generation of follicular helper T cells in the spleen triggers fatal autoimmune hepatitis in mice. *Gastroenterology*. 査読有 140: 1322-1333: 2011.
- 2) Kido M, Tanaka J, Aoki N, Iwamoto S, Nishiura H, Chiba T, Watanabe N. *Helicobacter pylori* promotes the production of thymic stromal lymphopoietin by gastric epithelial cells and induces dendritic cell-mediated inflammatory Th2 responses. *Infect Immun*. 査読有 78: 108-114: 2010.
- 3) Tanaka J, Saga K, Kido M, Nishiura H, Akamatsu T, Chiba T, Watanabe N. Proinflammatory Th2 cytokines induce production of thymic stromal lymphopoietin in human colonic epithelial cells. *Dig Dis Sci*. 査読有 55: 1896-1904: 2010.
- 4) Arima K, Watanabe N, Hanabuchi S, Chang M, Sun SC, Liu YJ. Distinct signal codes generate dendritic cell functional plasticity. *Sci Signal*. 査読有 3(105): ra4: 2010.
- 5) Hanabuchi S, Ito T, Park WR, Watanabe N, Shaw JL, Roman E, Arima K, Wang YH, VooKS, Cao W, Liu YJ. Thymic stromal lymphopoietin-activated plasmacytoid dendritic cells induce the generation of forkhead box P3+ regulatory T cells in human thymus. *J Immunol*. 査読有 184: 2999-3007: 2010.
- 6) Asada M, Nishio A, Akamatsu T, Tanaka J, Saga K, Kido M, Watanabe N, Uchida K, Fukui T, Okazaki K, Chiba T. Analysis of Humoral Immune Response in Experimental Autoimmune Pancreatitis in Mice. *Pancreas*. 査読有 39: 224-231: 2010.
- 7) Tanaka J, Watanabe N, Kido M, Saga K, Akamatsu T, Nishio A, Chiba T: Human TSLP and TLR3 ligand promote differentiation of Th17 cells with central memory phenotype under Th2-polarizing conditions. *Clin Exp Allergy*. 査読有 39: 89-100: 2009.
- 8) Akamatsu T, Watanabe N, Kido M, Saga K, Tanaka J, Kuzushima K, Nishio A, Chiba T. Human TSLP directly enhances expansion of CD8+ T cells. *Clin Exp Immunol*. 査読有 154: 98-106: 2008.
- 9) Kido M, Watanabe N, Okazaki T, Akamatsu T, Tanaka J, Saga K, Nishio A, Honjo T, Chiba T. Fatal autoimmune hepatitis induced by concurrent loss of naturally arising regulatory T

cells and PD-1-mediated signaling. Gastroenterology. 査読有 135: 1333-1343: 2008.

- 10) Chiba T, Marusawa H, Seno H, Watanabe N. Mechanism for gastric cancer development by *Helicobacter pylori* infection. J Gastroenterol Hepatol. 査読無 23: 1175- 1181: 2008.

[学会発表] (計 10 件)

- 1) 木戸政博, 岩本諭, 青木信裕, 西浦尚代, 田中淳也, 千葉勉, 渡部則彦. Differential roles of PD-1 mediated signaling in inflammation in mouse models of *Helicobacter* infection and autoimmune gastritis. 第 16 回日本ヘリコバクター学会学術集会 2010. 6. 24. 京都大学医学部芝蘭会館
- 2) Watanabe N. Regulatory T cells and PD-1-mediated signaling in AIH. International Forum of the 96<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Gastroenterology 2010. 4. 24. 新潟県新潟市朱鷺メッセ
- 3) 青木信裕, 渡部則彦, 千葉勉. Regulatory roles of PD1 mediated signaling in the development of *Helicobacter*-induced gastritis and autoimmune gastritis. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会 2009. 12. 4. 大阪国際会議場
- 4) 西浦尚代, 渡部則彦, 千葉勉. TSLP regulates autoantibody production and inflammation in mouse models of autoimmune gastritis. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会 2009. 12. 4. 大阪国際会議場
- 5) 田中淳也, 渡部則彦, 千葉勉. Proinflammatory Th2 cytokines induce production of thymic stromal lymphopoietin in human colonic epithelial cells. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会 2009. 12. 2. 大阪国際会議場
- 6) Watanabe N. Role of Peyer's patches in *H. pylori* immunity. XXI<sup>st</sup> International Workshop on *Helicobacter* and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer 2009. 9. 18. Fundação Eng. António de Almeida, Porto, Portugal
- 7) Watanabe N, Kido M, Tanaka J, Chiba T. *Helicobacter* promote gastric

epithelial cells to produce TSLP and induce DC-mediated inflammatory Th2 responses. 米国消化器病週間 (DDW)2009 会議 2009. 6. 2. McCormick Place Convention Center, Chicago, USA.

- 8) 木戸政博, 渡部則彦, 千葉勉. *Helicobacter pylori* 感染に対する宿主免疫応答でのTSLPの役割 第45回日本消化器免疫学会総会 2008. 7. 3. 京都市京都メルパルク
- 9) 木戸政博, 渡部則彦, 千葉勉. *Helicobacter pylori* 感染に対する宿主免疫応答でのTSLPの役割 第14回日本ヘリコバクター学会学術集会 2008. 6. 27. 神戸ポートピアホテル
- 10) 木戸政博, 渡部則彦, 千葉勉. *Helicobacter pylori* 感染に対する宿主免疫応答でのTSLPの役割 第94回日本消化器病学会総会 2008. 5. 10. 福岡国際会議場

[図書] (計 1 件)

- 1) Chiba T, Marusawa H, Seno H, Watanabe N: *H. pylori* infection -The route from inflammation to cancer. In Sansonetti P, ed, Infection Biology Handbook Series. Bacterial Virulence. Basic principles, models and global approaches. Willey-Blackwell 2010: 31-41.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

渡部 則彦 (WATANABE NORIHIKO)  
京都大学・医学研究科・准教授  
研究者番号: 50419446

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし