

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590354

研究課題名(和文)

ピロリ菌のヒトへの新たな感染経路の解明

研究課題名(英文)

Mechanisms of infection of *Helicobacter pylori* in human.

研究代表者

山田 健人 (YAMADA TAKETO)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：60230463

研究成果の概要(和文): ピロリ菌は、胃への感染により胃炎や潰瘍を惹起し、さらに癌やリンパ腫を発症させる。本研究は、胃ではなく、小腸パイエル板でcoccoïd型ピロリ菌が感染するかを検討した。ピロリ菌感染者の小腸パイエル板におけるピロリ菌の局在とその形態を解析し、ピロリ菌感染症例パイエル板内に球状の菌体を見出した。ITPおよびシェーグレン症候群症例では、菌体は見出せなかった。これは、パイエル板がピロリ菌に対する細胞性免疫能の獲得に重要であり、coccoïd型菌がパイエル板で樹状細胞に貪食される可能性を示す。

研究成果の概要(英文): *Helicobacter pylori* (HP) causes gastritis and gastric ulcer, and then induces gastric carcinoma and MALToma. We examined whether coccoïd type HP was transmitted in Peyer patches. The localization of HP in Peyer patches of the infectee was detected as a spherical bacterial body. In the ITP and Sjogren's syndrome case, the bacterial body was not found. These results may indicate that Peyer patches is important in a gain of cellular immunity against HP and coccoïd type HP may be done phagocytosis by dendritic cells in Peyer patches.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：病理学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：ピロリ菌、パイエル板、胃炎、胃潰瘍、リンパ腫、樹状細胞

## 1. 研究開始当初の背景

*Helicobacter pylori* (以下 HP) は、ヒト胃に感染するグラム陰性桿菌であり、世界中の約半数の人が感染していると推測されてい

るが、症状を呈する人はその中の一部にとどまる。この HP の胃への感染により胃炎や胃潰瘍が惹起されるが、さらに感染が遷延化す

ること胃癌や MALT リンパ腫を発症させると考えられている。また特発性血小板減少症（以下 ITP）やシェーグレン症候群の発症にも *HP* の感染が関与している可能性が指摘されている。

この *HP* は胃に感染し、粘膜上皮細胞や粘膜下層の細胞に IV 型分泌機構を通じてエフェクター分子が注入されることが知られている。その結果、ケモカイン産生や細胞障害による防御機構の低下による炎症反応が惹起され、好中球やリンパ球の浸潤が起こる。しかし、この炎症には、抗原提示されプライムされた CD4 陽性 T リンパ球や胃粘膜上皮細胞における組織適合抗原 MHC class II 発現が必要であることが知られていた。しかし、リンパ組織の無い胃粘膜内でどのように T リンパ球が *HP* 抗原によりプライムされるかは不明であった。また *HP* は、胃では螺旋状の桿菌の形態をとり細胞分裂して増殖するが、ストレス存在下では、増殖不能な coccoid 型に変換して生存することが知られている。この coccoid 型は細菌が体外にあって、ヒト-ヒト感染の時に重要と推測されていたが、coccoid 型 *HP* の体内での挙動、局在、その生物学的意味は不明であった。

最近、われわれは、様々な免疫担当細胞の欠如したマウスを用いることで、1) 小腸のパイエル板が *HP* に対する細胞性免疫能の獲得に必須であること、2) 通常の胃で観察される helical 型 *HP* ではなく coccoid 型 *HP* がパイエル板で樹状細胞に貪食されること、を報告した (Proc Natl Acad Sci U S A. 104:8971-6. 2007)。しかし、ヒトにおいて実際に小腸パイエル板で coccoid 型 *HP* が感染し、さらに樹状細胞に貪食されることで、細胞性免疫が獲得されるか否かについてはいまだ不明であった。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、1) インフォームドコンセントの得られた小児・成人の臨床検体(胃、小腸、脾、リンパ節)を用いて、パイエル板、リンパ節、脾臓における *HP* の局在の有無とその形態を明らかにすること、2) ITP およびシェーグレン症候群患者におけるインフォームドコンセントの得られた臨床検体(胃、小腸、脾、骨髄、リンパ節、唾液腺)を用いて、パイエル板、リンパ節、骨髄、脾臓における *HP* の局在の有無とその形態を明らかにすること、を目的とするものである。

## 3. 研究の方法

血清学的に同定された *HP* 感染者 (12 症例) および非感染者 (8 症例) より、インフォームドコンセントを得て採取された小児 (4 症例)・成人 (16 症例) の臨床検体 (胃、小腸、リンパ節、脾臓) あるいは ITP (6 症例すべて抗 *HP* 抗体陽性) およびシェーグレン症候群患者 (抗 *HP* 抗体陽性 4 症例および陰性 3 症例) の臨床検体 (胃、小腸、リンパ節、脾臓、骨髄、唾液腺) である。

1) *HP* 感染者 (12 症例中 3 症例) および非感染者 (8 症例中 2 症例) のヒト・パイエル板における *HP* の局在の有無とその形態を観察する。検出方法は、抗 *HP* 抗体 (Biomedica 社および DAKO 社) を用いた免疫染色、*HP* 特異的 rRNA 配列を用いた in situ hybridization および in situ RT-PCR 法、および電子顕微鏡による。電子顕微鏡での観察では、厚切り標本にて subepithelial dome および濾胞間領域を同定し、この部分の超薄切片を重点的に観察する。

2) 同様に *HP* 感染者 (12 症例中 3 症例) および非感染者 (8 症例中 2 症例) のリンパ節 (それぞれ 1 症例) 脾臓 (それぞれ 1 症例) において、*HP* の検出を試みる。

3) ITP (6 症例すべて抗 *HP* 抗体陽性) およびシェーグレン症候群患者 (抗 *HP* 抗体陽性 4 症例および陰性 3 症例) における臨床検体 (胃、小腸、脾、骨髄、リンパ節、唾液腺) を用いて、パイエル板、リンパ節、骨髄、脾臓における *HP* の局在の有無とその形態を上記の方法で明らかにする。

#### 4. 研究成果

血清学的に同定された *HP* 感染者 (18 症例) および非感染者 (12 症例) より、小児 (6 症例)・成人 (24 症例) の臨床検体 (胃、小腸、リンパ節、脾臓) を用いて、パイエル板、リンパ節、脾臓における *HP* の局在の有無とその形態を解析した。その結果、抗 *HP* 抗体 (Biomedica 社および DAKO 社) を用いた免疫染色にて、*HP* 感染者の 5 症例にてパイエル板内に球状菌体の陽性所見を得た。また電子顕微鏡により、subepithelial dome および濾胞間領域に coccoid 型 *HP* 菌体を観察した (図 1)。また *HP* 特異的 rRNA 配列を用いた coccoid 型 *HP* 菌体の検出を感染マウス組織にて検討し、その検出に成功し、上記の subepithelial dome および濾胞間領域にシグナルを検出した (図 2)。ITP およびシェーグレン症候群症例の脾臓の検討では、2 症例において *HP* 菌体様の構造物に免疫染色にて陽性所見を得たが、電子顕微鏡や in situ RT-PCR 法では *HP* 菌体は見出せなかった。これらの結果は、ヒトにおいての小腸のパイエル板がこの *HP* に対する細胞性免疫能の獲得に重要であり、helical 型ではなく coccoid 型 *HP* がパイエル板で樹状細胞に貪食される可能性を示す。

*HP* は、胃粘膜上皮細胞へ付着した後、巧妙な機構を用いてヒト胃に長期間生息することが知られている。しかし、*HP* の胃への生着と粘膜障害作用だけでは、胃炎や胃潰瘍は起こりにくく、Tリンパ球を介した細胞性免疫

が重要と考えられていた。われわれは、小腸のパイエル板がこの *HP* に対する細胞性免疫能の獲得に必須であり、helical 型ではなく coccoid 型 *HP* がパイエル板で樹状細胞に貪食される、というマウスでの観察をもとに、ヒトにおいても coccoid 型 *HP* がパイエル板で樹状細胞に貪食されるかどうかをまず明らかにすることが重要と考えた。本研究の成果は、この点において、ヒトにおいても coccoid 型 *HP* が、ヒトへの感染と胃炎や胃潰瘍の形成に関与するという新たな感染経路を示す知見となりえたと考える。また coccoid 型 *HP* のパイエル板での樹状細胞への貪食により、*HP* 抗原への Tリンパ球のプライムが起こるのであれば、多剤耐性菌などの除菌療法が困難な症例に対する新規の免疫療法の可能性も開けると思われ、実際にヒト樹状細胞への貪食やそのメカニズムの解明が次の課題と考えている。

図 1 *HP* 感染者のパイエル板内の coccoid 型 *HP* 菌体

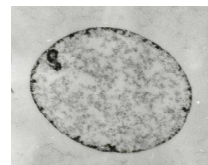
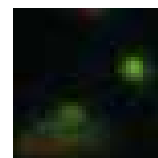


図 2 *HP* 特異的 rRNA 配列を用いた in situ hybridization によるパイエル板内の coccoid 型 *HP* 菌体の検出



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4件)

1. Uchida H, Yamazaki K, Fukuma M, Yamada T, Hayashida T, Hasegawa H, Kitajima M, Kitagawa Y, Sakamoto M Overexpression of leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 in colorectal cancer. *Cancer Science*101: 1731-1737, 2010 査読有
2. Moro K, Yamada T, Tanabe M, Takeuchi T, Ikawa T, Kawamoto H, Furusawa J, Ohtani M, Fujii H, Koyasu S Innate production of  $T_H2$  cytokines by adipose tissue-associated c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup> lymphoid cells. *Nature* 463: 540-544, 2010 査読有
3. Nishida H, Yamazaki H, Yamada T, Iwata S, Dang NH, Inukai T, Sugita K, Ikeda Y, Morimoto C CD9 correlates with cancer stem cell potentials in human B-acute lymphoblastic leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 382: 57-62, 2009 査読有
4. Kondoh K, Nakata Y, Yamaoka T, Itakura M, Hayashi M, Yamada K, Hata J, Yamada T Altered cellular immunity in transgenic mice with T cell-specific expression of human D4-guanine diphosphate-dissociation inhibitor (D4-GDI), a regulator of Rho GTPases. *International Immunology* 20: 1299-1311, 2008 査読有

〔学会発表〕(計3件)

1. Moro, K., Yamada, T., Tanabe, M., Takeuchi, T., Ikawa, T., Kawamoto, H., Furusawa, J., Ohtani, M., Fujii, H.,

Koyasu, S.: Innate production of  $T_H2$  cytokines by adipose tissue-associated c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup> lymphoid cells. The 14<sup>th</sup>. International Congress of Immunology 2010 年8月25日、神戸

2. 茂呂和世, 山田健人, 伊川友活, 河本 宏, 藤猪英樹, 小安重夫 マウス腸間膜に存在する natural helper cell の自然免疫機構における役割 第39回日本免疫学会総会 2009年12月2日 大阪

3. Nagai S, Yamada T, Iwakura Y, Koyasu S Roles of IL-17A in *Helicobacter pylori*-induced gastritis. 第38回日本免疫学会総会・学術集会 2008年12月1日、京都

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕  
ホームページ等なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 健人 (YAMADA TAKETO)  
慶應義塾大学・医学部・准教授  
研究者番号: 60230463

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし