

機関番号：13601  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20590564  
 研究課題名（和文）ヘリコバクター・ハイルマニ関連胃粘膜病変の病態解析と菌体の病原性解析  
 研究課題名（英文）Pathogenesis of *H. heilmannii*-related gastric mucosal lesions  
 研究代表者  
 太田 浩良（OTA HIROYOSHI）  
 信州大学・医学部・教授  
 研究者番号：50273107

## 研究成果の概要（和文）：

(1) *H. heilmannii* 感染 BALB/C マウスに慢性胃炎および胃 MALT リンパ腫が惹起された。これらの病変の発症における GlcNAc6ST-1 により硫酸化を受けた L-セレクトリンリガンド糖鎖と MAdCAM-1 を発現する HEV 様血管の関与が示された。(2) *H. heilmannii* 培養条件の基礎的検討として、*H. felis* 培養の至適ガス環境を検討し、①コロニーの大きさの観点、②螺旋型の比率の観点から至適ガス条件を見出した。(3) ヒト由来 *H. heilmannii* 菌株の 16S ribosomal RNA および urease 遺伝子の解析から、新規 *H. heilmannii* (SH6) を見出した。

## 研究成果の概要（英文）：

(1) Chronic gastritis and MALT lymphoma developed in the *H. heilmannii*-infected BALB/c mice. HEV-like vessels expressing GlcNAc6ST-1-mediated L-selectin ligand carbohydrate and MAdCAM-1 may play a crucial role in the pathogenesis of *H. heilmannii*-induced chronic gastritis and MALT lymphoma. (2) In culturing *H. felis* strains, the optimal condition for obtaining cells with the largest colony sizes or for obtaining the highest percentage of spiral forms were demonstrated. (3) Taxonomic analysis of clinically isolated *H. heilmannii* strains disclosed that *H. heilmannii* SH6 represents a novel strain and should constitute a novel taxon in the phylogenetic trees.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：ヘリコバクター・ハイルマニ, *Helicobacter heilmannii*, MALT リンパ腫

## 1. 研究開始当初の背景

ヘリコバクター・ハイルマニ (*Helicobacter heilmannii*: *H. heilmannii*) は、ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*: *H. pylori*) 同様、ヒトおよび動物の胃粘膜に棲息する細

菌である。申請者らは、粘膜関連リンパ組織 (Mucosa associated lymphoid tissue: MALT) の出現を伴った慢性胃炎さらに MALT リンパ腫がみられるヒト胃粘膜において、*H. heilmannii* の感染がみられること、また

*H. heilmannii* 感染実験動物 (スナネズミおよび BALB/c マウス) の胃粘膜に粘膜関連リンパ組織 (Mucosa associated lymphoid tissue: MALT) の出現を伴った慢性胃炎さらに MALT リンパ腫様病変が発生することを報告してきた。さらに、申請者らは、これまでの *H. heilmannii* 感染症に関する一連の研究を通じて、ヒト胃粘膜由来の *H. heilmannii* を収集し、マウスにて継代維持している。

## 2. 研究の目的

今回の研究では、*H. heilmannii* 感染によりマウス胃粘膜に惹起される MALT および MALT リンパ腫類似病変の形成機序の解明、*H. heilmannii* 培養法の検討および現在マウスにて維持しているヒト胃粘膜由来の *H. heilmannii* の系統解析を目指している。

## 3. 研究の方法

(1) MALT および MALT リンパ腫類似病変の形成機序の解明

*H. heilmannii* を感染させた BALB/c マウスの胃粘膜病変のホルマリン固定・パラフィン包埋組織切片に対して以下の検討を行う。

① HE 標本による胃粘膜組織像を経時的に観察する。

② リンパ球サブセット (CD3, CD20 など) の免疫組織化学を行い、HEV 様血管と病変局所に浸潤したリンパ球サブセットの関係を明らかにする。

③ EV 様血管の血管内皮細胞に発現をみる L-selectin ligand である peripheral node addressin (PNAd) 構成する糖鎖抗原に対する単クローン抗体 (MECA-79) および mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) に対する単クローン抗体による免疫組織化学を行い、胃粘膜内の全血管に対する HEV 様血管の出現頻度を定量する。

④ L-selectin および IgM のキメラ蛋白をコードする発現ベクターを COS-1 細胞に遺伝子導入し、L-selectin・IgM キメラ蛋白を培養上清中に発現させる。この培養上清を *H. heilmannii* 感染胃粘膜組織切片上で反応させた後、免疫組織化学的に可視化することにより、L-selectin 結合能を解析する。

⑤ *H. heilmannii* を感染させた BALB/c マウスの胃粘膜から作成した cDNA を基に、L-selectin ligand を構成する 6-sulfo sialyl 1 Lewis X の生合成に関与する糖鎖転移酵素 (C1 $\beta$ 3GnT, C2GnT) および硫酸転移酵素 (GlcNAc 6ST-2) の各酵素の遺伝子発

現レベルをリアルタイム定量 PCR 法により解析する。

(2) *H. heilmannii* の培養法の検討

*H. heilmannii* 培養条件の基礎的検討として、*H. heilmannii* に近縁の *H. felis* (The *H. felis* strain ATCC49179, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) を使用し、Anoxomat Mark II® (MART Microbiology, Lichtenvoorde, The Netherlands) を用いて培養の至適ガス条件を検討する。指摘条件判定の指標として、最大 7 日目まで培養を続け、5 日目と 7 日目にコロニーの数、コロニーの直径、spiral form の割合を計測する。

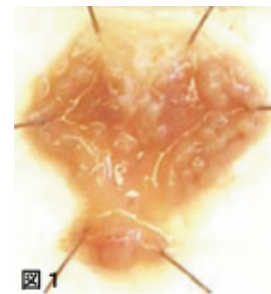
(3) ヒト胃粘膜由来の *H. heilmannii* の系統解析

ヒト胃粘膜由来の *H. heilmannii* を収集しマウスにて継代維持を行う。また、現在継代維持している臨床材料由来 *H. heilmannii* 感染マウス胃組織から *H. heilmannii* のゲノム DNA を抽出する。抽出した *H. heilmannii* のゲノム DNA を対象に *Helicobacter* 特異的な 16S rRNA、urease 遺伝子 primer を用いて PCR 増幅し、シーケンスを行い、得られた遺伝子塩基配列を BLAST search、Clustal W を用いて解析し、*Helicobacter* 属における系統解析を行う。

## 4. 研究成果

(1) MALT および MALT リンパ腫類似病変の形成機序の解明

肉眼的に感染マウスの胃粘膜には感染後 26 週で小結節が出現し、83 週では多数の小結節が観察された (図 1)。



組織学的には、感染マウスにおいては慢性胃炎が発症し、感染の経過に伴い炎症の増強をみた。非感染マウスでは観察期間を通じて組織学的に変化が認められなかった。CD45R/B220 陽性の杯中心細胞様細胞の集簇とリンパ上皮性病変を認める MALT リンパ腫が感染後 54 週および 83 週のマウスでそれぞれ 11.1% (1/9)、77.8% (7/9) に認められた (図 2)。

胃炎や MALT リンパ腫を発症した感染マウ

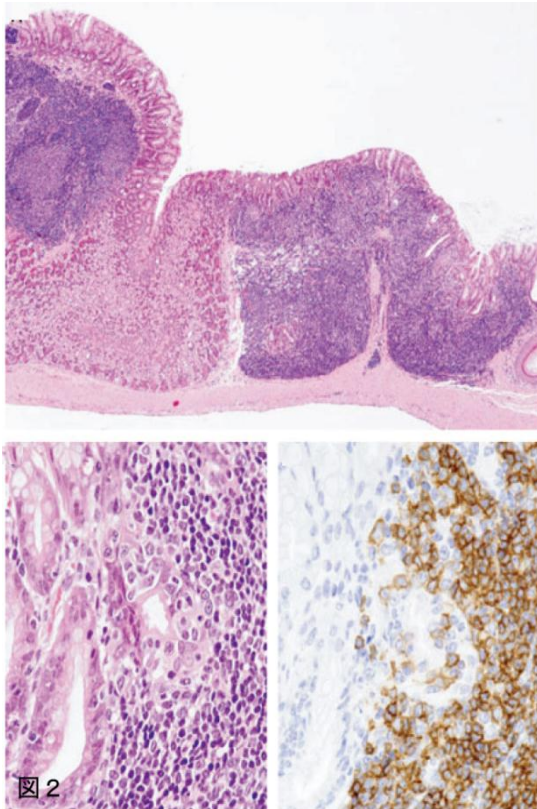
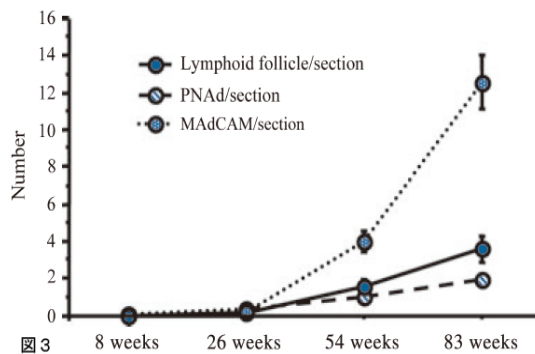
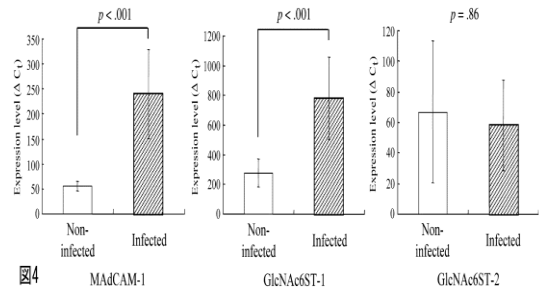


図2 ス胃粘膜にはPNAdおよびMadCAM-1を発現した高内皮細静脈(HEV)様血管が認められた。慢性胃炎の進行に伴い、HEV様血管の数は増加した(図3)。



誘導された HEV 様血管には  $Ca^{2+}$  の存在下に L-セレクチン・IgM キメラ蛋白が結合し、EDTA の存在下ではこれらの結合は認められなかった。

*GlcNAc6ST-1* mRNA と *MadCAM-1* mRNA の発現が感染後 83 週のマウスにおいて亢進していた(図4)。



以上の結果より、*GlcNAc6ST-1* により硫酸化を受けた L-セレクチンリガンド糖鎖と *MadCAM-1* を発現する HEV 様血管がヘリコバクター・ハイルマーニによる慢性胃炎と MALT リンパ腫の発症に重要な役割を担っていることが示された (*Helicobacter*, 15, 538-548, 2010)。

### (2) *H. heilmannii* の培養法の検討

*H. heilmannii* に近縁の *H. felis* 培養の至適ガス環境として、①コロニーの大きさの観点からは、 $O_2$  12%、 $CO_2$  10% のガス環境が、また、②螺旋型の比率の観点からは  $O_2$  18%、 $CO_2$  5% のガス環境が至適条件であることを見出した (*Microbiol Immunol*, 53, 251-258, 2009)。

### (3) ヒト胃粘膜由来の *H. heilmannii* の系統解析

8 菌株の *H. heilmannii* を ddy マウスにて継代維持しており、16S ribosomal RNA および urease 遺伝子の解析から、新規 *H. heilmannii* (SH6) を見出した (*J Microbiol*, 47, 201-207, 2009)。

urease 遺伝子の部分配列に基づいた HHL の系統樹と分類

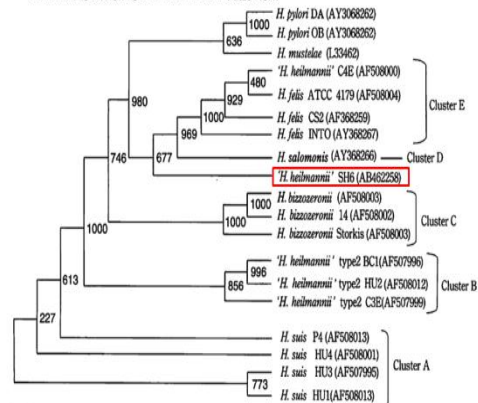


図5

## 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 13 件)

- ① Suzuki A, Kobayashi M, Matsuda K, Matsumoto T, Kawakubo M, Kumazawa S, Koide N, Miyagawa S, Ota H. Induction of high endothelial venule-like vessels expressing GlcNAc6ST-1-mediated L-selectin ligand carbohydrate and mucosal addressin cell adhesion molecule 1 (MAdCAM-1) in a mouse model of “Candidatus *Helicobacter heilmannii*”-induced gastritis and gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma, *Helicobacter*, 15, 538-548, 2010, 査読有
- ② Nobutani K, Yoshida M, Nishiumi S, Nishitani Y, Takagawa T, Tanaka H, Yamamoto K, Mimura T, Bensleiman Y, Ota H, Takahashi S, Matsui H, Nakamura M, Azuma T, *Helicobacter heilmannii* can induce gastric lymphoid follicles in mice via a Peyer’s Patch independent pathway, *FEMS Immunol Med Microbiol*, 60, 156-164, 2010, 査読有
- ③ Asaka M, Kato M, Takahashi S, Fukuda Y, Sugiyama T, Ota H, Uemura N, Murakami K, Satoh K, Sugano K; Japanese Society for *Helicobacter* Research. Guidelines for the management of *Helicobacter pylori* infection in Japan: 2009 revised edition, *Helicobacter*, 15, 1-20, 2010, 査読有
- ④ 太田浩良, 羽山正義. 【*Helicobacter pylori* の診断と臨床応用】  
*Helicobacter pylori* の病理診断, 臨床検査 54 巻, 177-181, 2010, 査読無
- ⑤ 太田浩良 【いきなり名医! ピロリ除菌治療 A to Z もう迷わない保健診療を基本とした除菌治療】ピロリ菌はここに棲息していますー顕微鏡でみた粘液中のピロリ菌, *Jmed* 8 号, 88, 2010, 査読無
- ⑥ 松本竹久, 太田浩良, 川上由行. *Helicobacter heilmannii* の新知見, 日本ヘリコバクター学会誌, 12 巻, 32-35, 2010, 査読無
- ⑦ Shiohara M, Kawakubo M, Matsumoto T, Kumagai T, Yamauchi K, Oana K, Ota H, Kawakami Y. Laboratory appraisal of optimal gaseous conditions for growth of zoonotic *Helicobacter felis* ATCC

49179. *Microbiol Immunol*, 53, 251-258, 2009, 査読有

- ⑧ Matsumoto T, Kawakubo M, Shiohara M, Kumagai T, Hidaka E, Yamauchi K, Oana K, Matsuzawa K, Ota H, Kawakami Y. Phylogeny of a novel “*Helicobacter heilmannii*” organism from a Japanese patient with chronic gastritis based on DNA sequence analysis of 16S rRNA and urease genes. *J Microbiol*, 47, 201-207, 2009, 査読有
- ⑨ 太田浩良, 赤松泰次: *Helicobacter pylori* 除菌後胃癌の特徴 病理医からみた現状と今後の課題, *Helicobacter Research*, 13 巻, 48-53, 2009, 査読無
- ⑩ 浅香正博, 菅野健太郎, 高橋信一, 福田能啓, 杉山敏郎, 太田浩良, 上村直実, 村上和成, 佐藤貴一, 加藤元嗣, 日本ヘリコバクター学会ガイドライン作成委員会. 日本ヘリコバクター学会 “*H. pylori* 感染の診断と治療のガイドライン” 2009 改訂版, 日本ヘリコバクター学会誌, 10 巻, 104-128, 2009, 査読無
- ⑪ 中山淳, 小林基弘, 増本純也, 太田浩良: 病理学と社会 ヘリコバクター・ピロリ, 病理と臨床, 27 巻(臨時増刊号), 169-174, 2009, 査読無
- ⑫ 太田浩良, 浅野直子, 山内一由, 赤松泰次, *H. pylori* 感染と胃癌, 胃 MALT リンパ腫, 臨床病理, 57 巻, 861-869, 2009, 査読無
- ⑬ 川久保雅友, 太田浩良, 図説: *Helicobacter pylori* の分子構造, 日本臨床, 67 巻, 2222-2223, 2009, 査読無

〔学会発表〕(計 2 件)

- ① 塩原真弓, 川久保雅友, 松本竹久, 熊谷俊子, 山内一由, 太田浩良, 川上由行, *Helicobacter felis* の培養至適ガス環境の検討, 第 15 回日本ヘリコバクター学術集会, 2009. 6. 25, 東京
- ② 塩原真弓, 松本竹久, 春日恵理子, 小穴こず枝, 川上由行, *Helicobacter felis* の培養における至適ガス環境に関する検討, 第 20 回日本臨床微生物学会総会, 2009. 1. 31, 仙台

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

太田 浩良 (OTA HIROYOSHI)  
信州大学・医学部・教授

研究者番号：50273107

(2) 研究分担者

小林 基弘 (KOBAYASHI MOTOHIRO)

信州大学・医学系研究科・講師

研究者番号：00362137

川上 由行 (KAWAKAMI YOSHIYUKI)

信州大学・医学部・教授

研究者番号：90283275

佐野 健司 (SANO KENJI)

信州大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50205994