

研究種目：若手研究（B）  
研究期間：2008 ～ 2009  
課題番号：20790494  
研究課題名（和文） ヘリコバクター感染胃がんモデルにおける Th 細胞の役割  
研究課題名（英文） The role of helper T cells in *Helicobacter* infection  
研究代表者  
高川 哲也（TAKAGAWA TETSUYA）  
神戸大学・医学研究科・医学研究員  
研究者番号：20444614

## 研究成果の概要（和文）：

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*)にて誘導される胃発癌に、宿主 CD4 陽性 T 細胞が関与しているかどうかを明らかにすることである。本研究により宿主の産生する IFN- $\gamma$  を中心とした Th1 型の免疫応答が、胃粘膜炎症、発癌に重要な役割を持つ知見が得られつつある。*H. pylori* の胃粘膜免疫応答を正しく理解し病態を把握する事が、将来の免疫療法、発癌制御法の開発にとって重要であり、本研究で得られた知見が、より有効な新規治療法の開発につながる事が期待される。

## 研究成果の概要（英文）：

The aim of this study is to clarify the role of CD4+ T cells in the development of *H. pylori* induced gastric cancer. It has been revealed gradually that Th1 type immune responses play critical roles in the development of gastritis and gastric cancer by our studies. It is very important to clarify the detailed mechanisms of host immune responses against *H. pylori* infection, which leads to the advancement in the treatment strategy for *H. pylori* related diseases, such as the immunotherapy and the control of oncogenesis.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：消化器内科学

キーワード：感染症、T細胞、ヘリコバクター属細菌

## 1. 研究開始当初の背景

*H. pylori* はヒトの胃内に特異的に生息するグラム陰性桿菌である。全世界総人口の約半数に感染が認められ、胃・十二指腸潰瘍、胃癌、慢性胃炎、胃 MALT リンパ腫などさまざまな疾患に関与していることが判明している。現在日本では胃癌の罹患患者は年間 10 万人、また死亡数は 5 万人とされている。本感染症に対して除菌療法が推奨されているが、日本の人口においても世界人口と同様、約半分が *H. pylori* 陽性であるため、抗生物質による多剤抗菌薬治療は耐性菌の出現などの点からも好ましくない。*H. pylori* の胃粘膜免疫応答を正しく理解し病態を把握する事が、将来の免疫療法、発癌制御法の開発にとって重要である。*H. pylori* 感染における病態の多様性は、菌体の病原因子の多様性と宿主の反応因子の多様性とが関与し、さらにそれらの因子の相互作用により生じると考えられている。1997 年に *H. pylori* のゲノムの全塩基配列が決定され *cag* pathogenicity island と呼ばれる外来性遺伝子群の多様性が疾患と関わることを示唆されており、*H. pylori* 遺伝子産物により、細胞障害から発癌へ至るメカニズムが分子レベルで検討されている。宿主側因子側の検討では、約 100 例の *H. pylori* 感染患者から胃粘膜浸潤リンパ球を精製し、表面抗原ならびに T 細胞のサイトカイン産生能を検討した実験から、全浸潤細胞の 30-40% が CD4 陽性 T 細胞であること、末梢血と比較して IFN- $\gamma$  を高産生すること、*H. pylori* 感染によりその作用が増強されることが明らかにされている。これは胃粘膜浸潤リンパ球が IFN- $\gamma$  産生 Th1 細胞に分化するメカニズムがあり、*H. pylori* 感染によりその産生が増強することが慢性胃炎の病態と関係していることを示唆している。IL-4 ならびに IFN- $\gamma$  欠損マウスを用いた *H. pylori* の感

染実験において、Th1 優位である IL-4 欠損マウスでは胃粘膜局所で IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  の高産生ならびに胃粘膜の高度な障害が、一方 IFN- $\gamma$  欠損マウスにおいては菌体が胃粘膜に多数存在しているにもかかわらず胃炎がほとんど認められないことから、胃粘膜の障害には Th1 優位の炎症反応、とくに IFN- $\gamma$  が重要な役割を持つことが示唆されている (*Gastroenterology* 116, G1530, 1999)。胃癌との関連に関しては、これまで菌体の病原遺伝子産物による細胞傷害や発癌に至るメカニズムが検討されているが、宿主側因子である免疫反応がこの病態に果たす役割についてはまだ明らかではない。*H. pylori* 感染においては胃粘膜局所で Th1 型優位 (INF- $\gamma$  産生 CD4 陽性 T 細胞) の反応が起こっており、胃粘膜傷害・前癌病変の形成から癌に至る過程において重要な役割を果たしていると考えられる。これらより申請者は、*H. pylori* の慢性炎症から発癌に至る過程においても、宿主免疫応答が重要であると着想した。しかし、これまで胃における免疫制御機構の知見が極めて乏しいこと、解析可能な小動物モデル (マウス) が存在しないことで、局所の免疫・炎症反応と組織の再生リモデリングや前癌組織病変の出現との関係を解析することは困難であった。スナネズミは、*H. pylori* 感染により胃癌を発症するが、その免疫機構は明らかでなく、解析に必要なツール/各種抗体、遺伝子欠損動物が存在しない。これまで申請者のグループはマウスに *H. pylori* (SS1 株) を感染させることにより、6 ヶ月で慢性胃炎を誘導できることを確認してきた。しかしながら、胃がんを誘発するには確実性がなく、また長期間の感染実験を必要とする。近年 Wang らによりヒトガストリン過剰発現マウス (insulin-gastrin transgenic (INS-GAS) mice) が作成され、*Helicobacter*

*felis*の感染により8ヶ月以内に80-90%が粘膜内癌を、約50%が粘膜下浸潤癌を発生すること(*Gastroenterology*, 118, 36-47, 2000)、またFoxらは*H. pylori*感染でも同マウスに同様の病変を引き起こすことを明らかにした(*Gastroenterology*, 124, 1879-90, 2003)。本申請ではヘリコバクターピロリ感染により胃癌を発症するヒトガストリントランスジェニックマウス(INS-GASマウス)を用いて、*H. pylori*感染にて誘導される炎症から発癌の過程における宿主因子の役割を免疫学的見地から検討する。これらの実験により、*H. pylori*ならびに高ガストリン血症で誘導される発癌に、Th1型の免疫応答が関与していることが明らかになると考えられる。本研究で、宿主CD4陽性T細胞のサイトカイン産生能が胃発癌に関与していることが明らかになれば、宿主の免疫制御によって発癌を制御できる可能性があると考えられる。

## 2. 研究の目的

(1) *H. pylori*感染 INS-GAS マウスの慢性胃炎から発癌過程における免疫細胞の役割

① *H. pylori*感染 INS-GAS マウスの胃粘膜浸潤細胞種の同定ならびに CD4 陽性 T 細胞によるサイトカイン産生能の解析

② T 細胞免疫応答制御による *H. pylori* 感染 INS-GAS マウスの胃発癌抑制効果

(2) *H. pylori* 感染 INS-GAS マウス胃癌成立における Th1 細胞ならびに Th2 細胞の役割

① INS-GAS/IFN- $\gamma$  欠損マウス、INS-GAS/IL-4 欠損マウスを用いた *H. pylori* 感染実験

② *H. pylori* 特異的 Th1 ならびに Th2 型 CD4 陽性 T 細胞移入による INS-GAS マウス/Rag-1 欠損マウスを用いた *H. pylori* 感染実験

## 3. 研究の方法

(1) *H. pylori* 感染 INS-GAS マウスの慢性胃炎から発癌過程における免疫細胞の役割

① *H. pylori* 感染 INS-GAS マウスの胃粘膜浸潤細胞の同定ならびに T 細胞によるサイトカイン産生能の解析

方法；INS-GASマウスを8時間絶食(飲水可)後、 $1 \times 10^9$  CFUの*H. pylori* (SS1株)を経口感染させる。感染4ヶ月後ならびに8ヶ月後に胃組織と周囲リンパ節を採取し、組織病理学的評価ならびに胃粘膜浸潤細胞の種類、CD4陽性T細胞のサイトカイン産生能、ならびに血清の*H. pylori*特異的IgG抗体のサブクラスなど、免疫学的検討を行う。

② T細胞免疫応答制御による *H. pylori* 感染 INS-GAS マウスの胃発癌抑制効果

方法；INS-GASマウスは8時間絶食(飲水可)後、 $1 \times 10^9$  CFUの*H. pylori* (SS1株)を経口感染させる。感染前後より一週間に一回100  $\cdot$  g/miceの抗IL-12抗体と抗IFN- $\gamma$ 抗体をそれぞれ投与する。コントロールにはisotypeが同じコントロール抗体を投与する。4および8ヶ月後、胃組織と周囲リンパ節を採取し、組織病理学的ならびに免疫学的検討を行う。

(2) *H. pylori* 感染 INS-GAS マウス胃癌成立における Th1 細胞ならびに Th2 細胞の役割

① INS-GAS/IFN- $\cdot$  欠損マウス、INS-GAS/IL-4 欠損マウスを用いた *H. pylori* 感染実験

方法；INS-GASマウスをIFN- $\cdot$  欠損マウスならびに、IL-4 欠損マウスにそれぞれ交配する。INS-GAS  $\cdot$  IFN- $\cdot^{-/-}$ の雄マウスとINS-GAS  $\cdot$  IFN- $\cdot^{-/+}$ の雌マウスの交配により、生まれたINS-GAS/IFN- $\cdot^{-/+}$ とINS-GAS/IFN- $\cdot^{-/-}$ を用いて感染実験を行う。IL-4欠損マウスも同様にINS-GASマウスと掛け合わせて感染実験に用いる。それぞれ $1 \times 10^9$  CFUの*H. pylori* (SS1株)を経口感染さ

せる。4 および 8 ヶ月後、胃組織と周囲リンパ節を採取し、組織病理学的ならびに免疫学的検討を行う。

② *H. pylori* 特異的 Th1 ならびに Th2 型 CD4 陽性 T 細胞移入による INS-GAS マウス・Rag-1 欠損マウスを用いた *H. pylori* 感染実験

方法; *H. pylori* 感染 INS-GAS マウスの胃癌発症に如何なる CD4 陽性 T 細胞が必要かどうかを検討するため、INS-GAS マウスを T 細胞・B 細胞を欠損する Rag-1 欠損マウスに掛け合わせ、INS-GAS・Rag1 欠損マウスを作成する。また IFN- $\gamma$  欠損マウスならびに IL-4 欠損マウスに *H. pylori* 抗原を皮下免疫し、皮下局所リンパ節より CD4 陽性 T 細胞を精製することで、*H. pylori* 特異的 Th1 型細胞 (IL-4 欠損) ならびに Th2 型細胞 (IFN- $\gamma$  欠損) を作成する。これらの細胞をそれぞれ INS-GAS・Rag-1 欠損マウスに移入し、その後上記と同様に *H. pylori* の感染実験を行う。4 および 8 ヶ月後、胃組織と周囲リンパ節を採取し、組織病理学的ならびに免疫学的検討を行う。

#### 4. 研究成果

これまでの報告とは異なり、*H. pylori* 感染 8 ヶ月後の INS-GAS マウスでは 80% に胃粘膜炎症を認めたが、粘膜内癌や浸潤癌を確認できなかった。胃粘膜浸潤リンパ球は、これまでヒト *H. pylori* 慢性胃炎患者からの生検材料から得たものと同様、約 40% が T 細胞で、その約半分が CD4 陽性 T 細胞であった。胃粘膜組織を用いた Real time PCR によるサイトカインの検討では、IFN- $\gamma$  が高産生されており、また、*H. pylori* 特異的血清 IgG 抗体の多くは IgG2a 型であった。

INS-GAS/IL-4 欠損マウス、INS-GAS/IFN- $\gamma$  欠損マウスを交配により作成した。INS-GAS/IL-4 欠損マウスではそのコントロールと比較して、感染 8 カ月の時点で、胃粘

膜の炎症は高度であった。現在、より長期の感染群の解析を検討している。また INS-GAS/IFN- $\gamma$  欠損マウスでは、そのコントロールと比較して炎症がほとんど認められなかった。さらに、今後、Th1 型細胞を移入した群と Th2 型細胞を移入した群とを比較して、*H. pylori* 感染により炎症、胃腫瘍の発生率・大きさ・浸潤率を比較する予定である。コントロールで用いる細胞移入をしない INS-GAS・Rag-1 欠損マウスでは、慢性胃炎ならびに胃癌がまったく発生しないと予想する。また Th2 型細胞移入にて胃癌の発生は軽度ながらも認められると予想している。ピットフォールとして、Th1 型 (IL-4 欠損) ならびに Th2 型細胞 (IFN- $\gamma$  欠損) をそれぞれ移入するが、レシピエントマウスには IFN- $\gamma$  ならびに IL-4 がそれぞれリンパ球以外の細胞にも発現しているため、このサイトカインの影響を考慮する必要があると思われる。

#### 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 1 件)

① Masuda A, Yoshida M, Shiomi H, Ikezawa S, Takagawa T, Tanaka H, Chinzei R, Ishida I, Morita Y, Kutsumi H, Inokuchi H, Wang S, Kobayashi K, Mizuno S, Nakamura A, Takai T, Blumberg RS, Azuma T. Fc $\gamma$  Receptor Regulation of *Citrobacter rodentium* Infection. *Infect Immun* 2008 Apr;76(4):1728-37.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

高川 哲也 (TAKAGAWA TETSUYA)  
神戸大学・医学部・医学研究員  
研究者番号：20444614