

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790476

研究課題名(和文)

Helicobacter pylori 胃炎発症の制御に関わるヘルパー T 細胞の役割

研究課題名(英文)

Role of Helper T cells on *Helicobacter pylori*-induced gastritis.

研究代表者

永井 重徳 (NAGAI SHIGENORI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：50348801

研究成果の概要(和文): *Helicobacter pylori* 感染においてヘルパー T 細胞が胃炎発症に必要であるが、その役割については不明であった。本研究により、Th17 細胞の産生する IL -17A は、胃粘膜固有層への好中球浸潤には必須ではなく、Th17 細胞よりも Th1 細胞の存在によって浸潤する好中球が、胃炎の重篤化に重要であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文): I demonstrated that although IL -17A was not required for neutrophil infiltration into the gastric lamina propria (gLP) in *Helicobacter pylori*-induced gastritis, infiltrating Th1 cells caused more severe gastritis with massive neutrophil infiltration into gLP.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：*Helicobacter pylori*, Th17

## 1. 研究開始当初の背景

*Helicobacter pylori* (以下 *H. pylori*) は、胃粘膜に定着して胃炎・胃潰瘍を引き起こすグラム陰性桿菌であり、持続的な感染により胃癌に移行すると考えられていることから、その発症機構の解明は重要である。胃炎発症には、菌体の持つ様々な病原因子が胃上皮細胞に打ち込まれることによって引き起こされる、局所的反応によるものと考えられてきた。しかし、Th1/Th2 バランスが Th1 にシフトしたマウスに感染させると炎症が強くなることや、T 細胞を欠損するマウスにおいて胃炎を発症しないことなどから、T 細胞を介する獲得免疫系も重要であることが示唆されていた。我々はマウスに感染する SS1 株を用いた感染実験から、*H.*

*pylori* 抗原特異的 CD4<sup>+</sup> T 細胞が胃炎発症に必須であることを見出した。

Th17 細胞は Kamradt T によって見出されたサブセットであり(*J Immunol* (2000))、ナイーブなヘルパー T 細胞に IL -6 及び TGFβ が作用することによって分化し、IL -23 や IL -21 によって維持されると考えられている。その主な機能として、IL -17A や IL -17F を産生することによって上皮細胞などに働きかけ、その細胞から産生されるケモカインによって好中球など様々な炎症細胞を遊走する。現在までに自己免疫性脳炎や、クローン病などの慢性腸疾患において Th17 細胞の関与が示唆されているが、リンパ球を主体とする慢性炎症の発症に、Th17 細胞がどの様に関わるかについての詳細な作用機序は不明であった。

## 2. 研究の目的

消化管への細菌感染の一つである *Helicobacter pylori* 感染による胃炎発症において、炎症の場である胃粘膜固有層に浸潤するヘルパーT (CD4<sup>+</sup>T) 細胞の役割について、浸潤細胞の割合やサイトカイン産生の違いによって、炎症がどのように制御されるかを検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ヘルパーT 細胞から産生される IFN $\gamma$ 及び IL -17A の役割

T 及び B 細胞を欠損する Rag2 KO マウスに *H. pylori* SS1 株を感染させても、菌は胃粘膜に定着するものの好中球浸潤などの胃炎は全く起きないが、この感染の成立したマウスに CD4<sup>+</sup>T 細胞を後から移入すると、好中球浸潤を伴う胃炎を発症することを我々は報告した。そこでこの系を用いて、IFN $\gamma$  KO や IL -17A KO マウスから CD4<sup>+</sup>T 細胞を単離し、*H. pylori* 感染 Rag2 KO マウスに移入して 2~3 ヶ月後に解剖し、病理学的検討を加えた。

### (2) *H. pylori* 抗原特異的ヘルパーT 細胞サブセットの移入による胃炎発症解析

Th1 あるいは Th17 細胞は、*in vitro* においてナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞に IL -12 +  $\alpha$ IL 4 Ab、あるいは IL 6 + TGF $\beta$  + IL -21 + IL -23 +  $\alpha$ IL -12 Ab +  $\alpha$ IFN $\gamma$  Ab +  $\alpha$ IL 4 Ab を加えて培養することにより、それぞれ分化させることが出来る。そこで抗原特異的なこれらヘルパーT 細胞サブセットを誘導するため、脾臓から CD11c を指標に樹状細胞 (DC) を単離し、ここに *H. pylori* のライセートを抗原として取り込ませた後、上記の条件で培養して両サブセットを作製し、予め *H. pylori* を感染させた  $\gamma_c$ -Rag2 DKO マウス (サイトカイン受容体共通  $\gamma$ 鎖 ( $\gamma_c$ ) 遺伝子と Rag2 遺伝子の二重欠損マウス) にそれぞれの細胞を移入し、2~3 ヶ月後に解剖して Th1 あるいは Th17 細胞が *in vivo* に移入後も保持されたまま胃炎を発症しうるかを検討するとともに、病理学的検討を加えた。

### (3) ヘルパーT 細胞からの IFN $\gamma$ 及び IL -17A がケモカイン産生に及ぼす影響についての検討

Th17 細胞の産生する IL -17 は胃上皮細胞 (gEC) に働きかけて CXCL2 (MIP -2) など好中球遊走ケモカインを、Th1 細胞の産生する IFN $\gamma$  は CXCL 9 (Mig) や CXCL10 (IP -10) など活性化 T 細胞遊走ケモカインを産生し、これらが gLP への様々な免疫細胞遊走に寄与していると考えられる。そこで成体マウスの胃から gEC の初代培養を行い、ここに IFN $\gamma$  及び IL -17A を様々な濃度の組み合わせで添加した後、産生されるケモカインについて、RT -PCR 法及び ELISA 法を用いて遺伝子発現及びタンパク発現レベルで解析する。また、ヘルパーT 細胞自身もケモカインを産生することから、CXCR3 を発現する Th1 細胞あるいは CCR6 を発現する Th17 細胞を遊走するケモカインとして知られる CXCL10 あるいは CCL20 を産生するかについても検討を加える。

## 4. 研究成果

### (1) ヘルパーT 細胞から産生される IFN $\gamma$ 及び IL -17A の役割

IFN $\gamma$  KO や IL -17A KO マウスから CD4<sup>+</sup>T 細胞を単離し、*H. pylori* 感染マウスに移入したところ、IL -17A KO マウス由来 CD4<sup>+</sup>T 細胞を移入した場合には、好中球浸潤を伴う胃炎を発症した。炎症の程度は、野生型マウス由来 CD4<sup>+</sup>T 細胞の移入と比べて、同程度かあるいはそれ以上の好中球浸潤が見られ、これは IL -17A が (間接的に) 好中球浸潤を促すという従来の報告に反していることが示された。

一方、IFN $\gamma$  KO マウス由来 CD4<sup>+</sup>T 細胞を移入した場合には、胃粘膜固有層への細胞浸潤が全く起こらず、ヘルパーT 細胞由来 IFN $\gamma$  が胃炎発症に重要であることが示唆された。

### (2) *H. pylori* 抗原特異的ヘルパーT 細胞サブセットの移入による胃炎発症解析

抗原を取り込ませた樹状細胞と 1 週間共培養した Th1 あるいは Th17 細胞を、*H. pylori* 感染  $\gamma_c$ -Rag2 DKO マウスに移入したところ、Th1 細胞を移入した場合には多くの Th1 細胞と僅

かな Th17 細胞が粘膜固有層に浸潤していた。しかし、Th17 細胞を移入した場合には、Th17 細胞以外に IFN $\gamma$  及び IL -17A を両方産生する細胞 (DP 細胞) が優位に浸潤することを見出した。抗原刺激によるサイトカイン産生を調べたところ、Th1 細胞を移入したマウスの粘膜固有層から単離したヘルパー T 細胞は、刺激に応じて僅かに IFN $\gamma$  や IL -17A を産生したが、Th17 細胞を移入したマウスの粘膜固有層から単離したヘルパー T 細胞では、抗原刺激がなくとも多量の IFN $\gamma$  や IL -17A を産生しており、抗原刺激によって更に産生量が増大した。これらの結果から、抗原刺激によって DP 細胞から多量の IFN $\gamma$  及び IL -17A が産生されることが示唆された。

また、これらマウスの病理学的所見については、Th1 細胞移入マウスの胃粘膜固有層においては、好中球浸潤を主体とする急性炎症様像を呈したのに対し、Th17 細胞移入マウスにおいては、主にリンパ球が浸潤する慢性炎症様の症状が見られた。Th1 細胞を移入したマウスの方が炎症がより強かったことから、DP 細胞はサイトカインを多量に産生するにもかかわらず、好中球浸潤をむしろ抑える働きをしていることが推察された。

(3) ヘルパー T 細胞からの IFN $\gamma$  及び IL -17A がケモカイン産生に及ぼす影響についての検討

胃上皮細胞を野生型マウスから単離し、コラーゲンコートプレートで培養の後、IFN $\gamma$  あるいは IL -17A を添加し、ケモカイン産生について RT -PCR 法を用いて検討した。すると、IFN $\gamma$  によって CXCL9 及び CXCL10 が濃度依存的に産生されること、また IL -17A によって CXCL2 が濃度依存的に胃上皮細胞から産生されることを見出した。すなわち *H. pylori* 感染において、胃上皮細胞を介して、Th1 細胞は Th1 細胞自身を、また Th17 細胞は Th17 細胞自身を遊走する可能性が示された。

また、*in vitro* で分化させた Th1 あるいは Th17 細胞を刺激後、CXCL10 及び CCL20 の発現を ELISA 法にて測定したところ、CXCL10 はどちらの細胞からも全く産生されなかったが、

CCL20 は Th17 細胞からのみ産生された。すなわち Th17 細胞のみが活性化によって Th17 細胞自身を遊走できる可能性が示された。

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5件)

1. Chiba S, Nagai T, Hayashi T, Baba Y, Nagai S, Koyasu S. Listerial invasion protein internalin B promotes the entry into ileal Peyer's patches *in vivo*. *Microbiol Immunol* vol.55(2) pp123-9 (2011). 査読有り .
2. Nagamatsu K, Kuwae A, Konaka T, Nagai S, Watanabe M, Yoshida S, Mimuro H, Koyasu S, Abe A. *Bordetella* Evades the Host Immune System by Inducing IL -10 through a Type III Effector, BopN. *J Exp Med* 2009, vol.206(13):3073-88. 査読有り .
3. Jinushi M, Sato M, Kanamoto A, Itoh A, Nagai S, Koyasu S, Dranoff G, Tahara H. Milk fat globule epidermal growth factor -8 blockade triggers tumor destruction through coordinated cell-autonomous and immune-mediated mechanisms. *J Exp Med* 2009, vol.206(6):1317-26. 査読有り .
4. Matsui T, Nakata N, Nagai S, Nakatani A, Takahashi M, Momose T, Ohtomo K, Koyasu S. Inflammatory cytokines and hypoxia contribute to <sup>18</sup>F-FDG uptake by cells involved in pannus formation in rheumatoid arthritis. *J Nucl Med* 2009, vol.50(6):920-26. 査読有り .
5. Hayashi T, Nagai S, Fujii H, Baba Y, Ikeda E, Kawase T, Koyasu S. Critical Roles of NK and CD8<sup>+</sup> T Cells in Central Nervous System Listeriosis. *J Immunol* 2009, vol.182(10):6360-8. 査読有り .

〔学会発表〕(計 14 件)

1. 生体内で優れた抗菌活性を有するインプラントの開発. 船尾 陽生, 石井 賢, 永井 重徳, 佐々木 あや, 干川 智之, 相澤 守, 岡田 保典, 千葉 一裕, 小安 重夫, 戸山 芳昭, 松本 守雄. 2010年10月14日. 第25回日本整形外科学会基礎学術集会. 京都国際会館. 京都.
2. *In vivo imaging* を用いた定量的マウス慢性骨髄炎モデルの確立. 船尾 陽生, 石井 賢, 永井 重徳, 佐々木 あや, 干川 智之, 相澤 守, 岡田 保典, 千葉 一裕, 小安 重夫, 戸山 芳昭, 松本 守雄. 2010年10月14日. 第25回日本整形外科学会基礎学術集会. 京都国際会館. 京都.
3. Nagai S, Katori R, Oyama M, Koyasu S. Establishment of a novel collagen-induced arthritis model by manipulating dendritic cells. The 11<sup>th</sup> International Symposium on Dendritic Cells. Sep 28<sup>th</sup> 2010. Lugano, Switzerland.
4. Nagai S, Kurebayashi Y, Baba Y, Koyasu S. Role of phosphoinositide 3 kinase on helper T cell differentiation in *Helicobacter pylori*-induced gastritis. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology. 2010年8月25日. 神戸国際会議場. 兵庫.
5. Katori R, Oyama M, Nagai S, Koyasu S. Establishment of a novel collagen-induced arthritis model by manipulating dendritic cells. 2010年8月24日. 神戸国際会議場. 兵庫.
6. Kurebayashi Y, Nagai S, Baba Y, Koyasu S. Regulation of Th17 cell differentiation by PI3K-Akt-mTORC1 axis. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology. 2010年8月23日. 神戸国際会議場. 兵庫.
7. Ikejiri A, Nagai S, Koyasu S. Reoxygenation accelerates the differentiation of Th17 cells primed under hypoxia. 2010年8月23日. 神戸国際会議場. 兵庫.
8. 永井 重徳, 小安 重夫. 細菌感染における宿主免疫応答 第11回 Pharmaco Hematology シンポジウム 2010年6月18日. 日本薬学会館(東京). 東京.
9. Kurebayashi Y, Nagai S, Baba Y, Koyasu S. Regulation of Th17 cell differentiation by PI3K-Akt-mTORC1 axis. 第82回日本生化学会大会. 2009年10月22日. 神戸国際会議場. 兵庫.
10. Funao H, Ishii K, Nagai S, Sasaki A, Hoshikawa T, Aizawa M, Okada Y, Chiba K, Koyasu S, Toyama Y, Matsumoto M. Establishment of Quantitative Model of Staphylococcal Osteomyelitis Using Bioimaging Techniques. The 9<sup>th</sup> World Congress on Inflammation. 2009年7月8日. 京王プラザホテル. 東京.
11. Kurebayashi Y, Nagai S, Baba Y, Koyasu S. Role of PI3K-mTOR pathway in Th17 cell differentiation. The 9<sup>th</sup> World Congress on Inflammation. 2009年7月8日. 京王プラザホテル. 東京.
12. Nagai S, Kurebayashi Y, Baba Y, Koyasu S. Role of IL-17A in *Helicobacter pylori*-induced gastritis. The 9<sup>th</sup> World Congress on Inflammation. 2009年7月8日. 京王プラザホテル. 東京.
13. Hayashi T, Nagai S, Fujii H, Baba Y, Ikeda E, Kawase T, Koyasu S. Critical roles of NK and CD8<sup>+</sup> T cells in central nervous system listeriosis. The 17<sup>th</sup> International Symposium of Macrophage Molecular and Cell Biology 2009. 2009年7月3日. KKR ホテル金沢. 石川.
14. Nagai S. The role of helper T cells in *Helicobacter pylori*-induced gastritis. GI Executive Meeting 2009. 2009年6月19日. 京都ブライトンホテル. 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  
<http://www.koyasu.umin.ne.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

永井 重徳 (NAGAI SHIGENORI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：50348801

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし