

令和 6 年 5 月 9 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07366

研究課題名（和文）ピロリ菌感染に伴う硝酸塩還元菌の胃内動向と疾患との関連

研究課題名（英文）Relationship between gastric nitrate-reducing bacteria and disease associated with *Helicobacter pylori* infection

研究代表者

横田 憲治（YOKOTA, KENJI）

岡山大学・保健学域・教授

研究者番号：00243460

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：胃粘膜の萎縮が進行した患者から硝酸塩還元菌を分離し、ピロリ菌と硝酸塩還元菌をマウスに共感染させた。共感染により免疫を液性に傾け細胞性免疫が低下した。また胃粘膜の炎症は強まり、RT-PCRとウエスタンブロットの結果から特に*K.pneumoniae*の共感染においてその傾向が強く現れることが示唆された。さらにK167による免疫染色では、*Actinomyces*の共感染により要請結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ピロリ菌は胃癌発症の重要なリスク因子であるが、近年、ピロリ菌感染に付随して胃内で増殖する硝酸塩還元菌も胃癌発症に関与しているのではないかと考えられている。患者から分離される主な硝酸塩還元菌は口腔細菌と腸内細菌の2種類に分類できるが、過去の研究で胃の病態が悪化するほど腸内細菌の割合が優位になっていることが判明した。

研究成果の概要（英文）：*Helicobacter pylori* is an important risk factor for the development of gastric cancer, and in recent years, it has been suggested that nitrate-reducing bacteria that grow in the stomach in association with *Helicobacter pylori* infection may also be involved in the development of gastric cancer. The main nitrate-reducing bacteria isolated from patients can be divided into two types: oral bacteria and intestinal bacteria, and past research has revealed that the proportion of intestinal bacteria becomes more prevalent as the gastric condition worsens.

研究分野：感染免疫学

キーワード：*Helicobacter pylori* 硝酸塩還元菌 細胞性免疫 液性免疫 *Klebsiella* *Rothia*

1. 研究開始当初の背景

Helicobacter pylori (ピロリ菌)は家族間や保育園内での経口感染により感染し、胃炎、胃潰瘍、胃癌、MALT リンパ腫などの疾患を引き起こす。ピロリ菌はウレアーゼを産生して胃酸を中和することで、胃内に感染することができる。長期のピロリ菌感染により、胃粘膜萎縮が進行すると胃酸分泌が低下し、胃内の pH が上昇する。ピロリ菌感染とそれに伴う萎縮性胃炎、腸上皮化生は胃の常在細菌叢に影響を与えるという報告もある¹⁾。ピロリ菌による胃癌発癌の原因の一つとして、CagA が挙げられるが、これはピロリ菌から分泌され、慢性的な炎症を引き起こすことから胃がんの原因となると考えられている。一方で、発癌には CagA 発がんタンパク以外の因子も考えられる。ピロリ菌以外の細菌の増殖、硝酸塩の還元、N-ニトロソ化合物の生成などが胃癌発癌に影響を与える²⁾や発癌物質である N-ニトロソ化合物の生成に参与する細菌が胃癌のリスクを高める³⁾という報告があり、当研究室でもピロリ菌培養検査を行った際に、ピロリ菌以外の菌が多く分離される患者とピロリ菌が純培養で分離される患者がいたが、ピロリ菌以外の菌がどのような性質の菌であるか不明であったことから、ピロリ菌以外の細菌に注目して研究を行ってきた。中でも、発がん物質であるニトロソ化合物を産生する硝酸塩還元菌に注目して研究を行ってきた。硝酸塩還元菌はヒトの常在細菌の一つだが、これらがどのような影響を与えているかは不明であった。硝酸塩還元菌とは、硝酸塩を還元し亜硝酸を生じる菌である。亜硝酸はチーズ、清酒、食肉製品などに添加物として使用され、ヒトの体内で還元され亜硝酸塩に変化し、ニトロソ化合物の生成に参与するとされる。ニトロソ化合物は食品からの影響は少ないとされており、ピロリ菌感染の影響による硝酸塩還元菌の胃への定着と増加が証明されれば、発がん機構の新しい原因が証明できる可能性がある。前年度までの研究により、胃炎患者の胃粘膜萎縮の進行に伴い、胃内の硝酸塩還元菌の検出率を高めることを報告している。

2. 研究の目的

本研究ではピロリ菌培養を行った患者を対象に、ピロリ菌とともに培養された硝酸塩還元菌の硝酸塩還元能について、胃炎患者由来株と胃癌患者由来株とで比較検討することで硝酸塩還元菌と胃癌発癌の関連を調べることを目的としている。マウスにピロリ菌および、胃癌患者から検出された腸内細菌を投与し、胃の病態や免疫機構の変化を比較することを目的として実験を行った。

3. 研究の方法

1. マウス感染モデルの作製

(1) ピロリ菌投与

マウス 11 匹にピロリ菌 (SS1 株) の経口投与を週 1 回、60 日間行い、ピロリ菌感染マウスを作製した。

(2) ピロリ菌血清抗体価の測定

定期的に尾採血を行った。採取した血液を遠心して血清を分離し、ELISA 法によりピロリ菌血清抗体価を測定した。

(3) IL-10 投与

すべてのマウスに細胞性免疫を抑制する目的で IL-10 の腹腔内投与を週 1 回、60 日間行った。

(4) マウスの群分けと硝酸塩還元菌投与

以下のようにマウスの群分けを行い、Group B-D のマウスに胃癌患者の胃内より分離した硝酸塩還元菌 (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. parasanguinis*) の経口投与を 2 週間の間隔を空けて計 6 回行った。

< マウスの群分け >

- Group A (3 匹): 菌投与なし
- Group B (3 匹): *H. pylori* (SS1 株) + *E. coli*
- Group C (3 匹): *H. pylori* (SS1 株) + *K. pneumoniae*
- Group D (3 匹): *H. pylori* (SS1 株) + *S. parasanguinis*
- Group E (2 匹): *H. pylori* (SS1 株) のみ

この間も継続してすべてのマウスに IL-10 の腹腔内投与を 2 週間の間隔を空けて計 6 回行った。

その後、60 日間の観察期間を経て、イソフルラン吸入により麻酔をかけて心臓採血を行った。採血後、頸椎脱臼により屠殺し、脾臓と胃を摘出した。

2. ピロリ菌に対する血清抗体価の測定

マウスの心臓から採取した血液を 15,000 rpm で 10 分間遠心して血清を分離し、ELISA 法により

血清抗体価の測定を行った。まず、Coating Buffer を用いてピロリ菌抗原を 50 µg/mL に希釈し、抗原希釈液を 96 ウェルマイクロプレートのウェルに加えて室温で 1 時間抗原の固相化を行った。ウェル内の液を捨て、10 %スキムミルク PBS を加えて室温で 1 時間ブロッキングを行った。再びウェル内の液を捨て、10 %スキムミルク PBS で 100 倍希釈した血清を加えて室温で 1 時間反応させた。その後洗浄して、10 %スキムミルク PBS で 1000 倍希釈した以下の IgG1/ IgG2a 抗体を反応させ、さらに HRP 標識二次抗体を室温で 1 時間反応させた。

<使用した抗体>

- ・ Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP (Dako)
- ・ Goat Anti-Mouse IgG1 (Southern Biotechnology Associates)
- ・ Goat Anti-Mouse IgG2a (Southern Biotechnology Associates)

洗浄後、基質として -フェニレンジアミンを加えた発色試薬をウェルに加えて発色させ、6N 硫酸で反応停止後、492 nm で吸光度を測定した。

3. 脾臓の処理

摘出した脾臓をスライドガラスですり潰し、シャーレ内で RPMI1640 10 mL と混和したものを 15 mL チューブに移して静置した。チューブ内の沈殿物を取り除くために上清のみを別の 15 mL チューブに移した。作製した細胞浮遊液 100 µL とトリパンブルー 100 µL を混和し、血球算定板を用いて細胞数をカウントした後、各検体の細胞数が 106 個/mL になるように RPMI1640 で希釈した。その後、24 ウェルのマイクロプレートをを用いて 1 検体あたり 4 ウェルに 1 mL ずつ細胞浮遊液を分注し、CO2 インキュベーターで 48 時間培養した。

ウェルの底に付着した細胞をピペティングによって剥がし、細胞浮遊液を 1.5 mL チューブに回収した。回収した細胞浮遊液を 10000 rpm で 10 分間遠心し、細胞と培養上清に分離した。培養上清を別の 1.5 mL チューブに移し、細胞と培養上清を -80 °C で保存した。

4. 培養細胞の RT-PCR

培養細胞を用いて RT-PCR 法によりサイトカイン mRNA の発現を確認した。

(1) RNA 抽出

QIAGEN QIAshredder を使用して 10000 rpm で 2 分間遠心し、サンプルをホモジナイズした。TaKaRa NucleoSpin® RNA を使用し、プロトコルに従い RNA 抽出を行った。

(2) cDNA 合成

Invitrogen SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR のプロトコルに従い、cDNA 合成を行った。

(3) PCR

0.5 mL チューブに 10X Ex Taq Buffer 5 µL、dNTP Mixture 4 µL、cDNA サンプル 1 µL、Primer (Forward) 1 µL、Primer (Reverse) 1 µL、TaKaRa Ex Taq 0.5 µL を加え、さらに全量が 50 µL になるように滅菌水を加えて混和した。プライマーは以下のものを使用した。

<使用したプライマー>

- ・ -actin : F-tggaatcctgtggcatccatgaaac、R-taaaacgcagctcagtaacagtcgc
- ・ IL-4 : F-agaacaccacagagagtggag、R-tgcagcttatcgatgaatcc
- ・ IL-12 : F-ccctgtgccttggtagcatc、R-aggccaagaccacctgactc
- ・ IFN- γ : F-gaactggcaaaaggatggtga、R-tgtgggtgttgacctaacc

その後、96 °C : 1 分、60 °C : 4 分を 3 サイクル、94 °C : 1 分、60 °C : 2 分を 36 サイクル、70 °C : 10 分の条件で PCR を行った。増幅した PCR 産物を 2 % アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、エチジウムブロマイド (1 µg/mL) で 20 分間染色後、紫外線照射によりバンドを観察した。

5. 培養細胞のウエスタンブロットティング

培養細胞を用いてウエスタンブロット法により転写因子の発現を確認した。

(1) SDS-PAGE

培養細胞の入った 1.5 mL チューブに蒸留水 50 µL を加えてボルテックスにかけ、さらに SDS サンプルバッファー 50 µL を加えて混和後、超音波処理を 10 分間行った。その後、サンプルを 100 °C で 5 分間加熱した。TEFCO 10 % SDS-PAGE mini を使用し、サンプルをウェルに 5 µL ずつ注入して 60 mA で 1 時間電気泳動を行った。

(2) メンブレンへの転写

メンブレンには PVDF 膜を用い、使用前に 100 %メタノールに浸した。Tris-HCl 3.03 g、glycine 14.4 g、メタノール 200 mL を混和し、全量が 1 L になるように蒸留水を加えて転写バッファーを作製した。作製した転写バッファーにスポンジ、ろ紙、PVDF 膜を浸しておき、陰極側からスポンジ、ろ紙、ゲル、PVDF 膜、ろ紙、スポンジの順に重ねて泳動槽にセットした。その後、泳動槽に転写バッファーを注いで 100 mA で 4 時間通電し転写を行った。

(3) ブロッキング、抗体反応

転写後のメンブレンを 10 %スキムミルク PBS に浸して 4 時間一晩ブロッキングを行った。洗浄後、10 %スキムミルク PBS で 1000 倍希釈した以下の一次抗体を加えて、室温で 2 時間振盪後、4 °C で一晩反応させた。

<使用した一次抗体>

- ・ Tubulin (Santa Cruz Biotechnology)

- STAT4 (Santa Cruz Biotechnology)
- T-bet (Santa Cruz Biotechnology)
- STAT6 (Santa Cruz Biotechnology)
- GATA-3 (Santa Cruz Biotechnology)

再び洗浄し、10 %スキムミルク PBS で 1000 倍希釈した二次抗体 (m-IgG Fc BP-HRP (Santa Cruz Biotechnology)) を加えて室温で 2 時間振盪した。その後洗浄し、メンブレンに試薬 (Thermo Pierce™ ECL Western Blotting Substrate) をかけ、化学発光検出装置で 10 分間露光し、バンドを観察した。

6. 培養上清のサイトカイン測定

Invitrogen IL-1beta Mouse Uncoated ELISA Kit With Plates、Invitrogen IL-2 Mouse Uncoated ELISA Kit With Plates、Invitrogen IL-4 Mouse Uncoated ELISA Kit With Plates、Invitrogen IL-6 Mouse Uncoated ELISA Kit With Plates を使用し、付属のプロトコルに従って培養上清の IL-1beta、IL-2、IL-4、IL-6 を測定した。

7. 胃組織の HE 標本作製

摘出した胃を大弯切開してホルマリン固定し、包埋、薄切、HE 染色を行って組織標本作製した。その後作製した標本を鏡検し、胃粘膜組織の炎症の程度を観察した。

4. 研究成果

ピロリ菌血清抗体価の結果より、ピロリ菌の単独感染に比べ、硝酸塩還元菌を共感染させた方が免疫をより液性免疫に傾ける可能性が示唆された。また、RT-PCR およびウエスタンブロッティングの結果より、K.pneumoniae を共感染させたグループにおいて、細胞性免疫に關与するサイトカインである IL-12 と INF- γ の発現がやや低下していること、液性免疫に關与する転写因子である STAT6 の発現が認められたことから、ピロリ菌と K.pneumoniae の共感染により細胞性免疫が抑制され、免疫が液性に傾いたと考えられた。

以上より、ピロリ菌と硝酸塩還元菌の共感染は免疫を液性免疫に傾け、さらに K.pneumoniae の共感染においてその影響が強い可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kenji Yokota, Takako Osaki, Shunji Hayashi, Shin-ichi Yokota, Hiroaki Takeuchi, Emiko Rimbara, Hinako Ojima, Toyotaka Sato, Hideo Yonezawa, Keigo Shibayama, Kengo Tokunaga, Shigeru Kamiya, Kazunari Murakami, Mototsugu Kato, Toshiro Sugiyama	4. 巻 27
2. 論文標題 Establishment of a reference panel of Helicobacter pylori strains for antimicrobial susceptibility testing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Helicobacter	6. 最初と最後の頁 e12874
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/hel.12874	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hinako Ojima, Sakiko Kuraoka, Shyoutarou Okanoue, Hiroyuki Okada, Kazuyoshi Gotoh, Osamu Matsushita, Akari Watanabe, Kenji Yokota	4. 巻 10
2. 論文標題 Effects of Helicobacter pylori and Nitrate-Reducing Bacteria Coculture on Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 2495-2505
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/microorganisms10122495	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kenji Yokota, Takako Osaki, Shunji Hayashi, Shin-Ichi Yokota, Hiroaki Takeuchi, Emiko Rimbara, Hinako Ojima, Toyotaka Sato, Hideo Yonezawa, Keigo Shibayama, Kengo Tokunaga, Shigeru Kamiya, Kazunari Murakami, Mototsugu Kato, Toshiro Sugiyama	4. 巻 e12874.
2. 論文標題 Establishment of a reference panel of Helicobacter pylori strains for antimicrobial susceptibility testing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Helicobacter	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/hel.12874	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小嶋日菜子、横田憲治、倉岡沙樹子、岡上昇太郎、河野吉泰、岡田裕之
2. 発表標題 Helicobacter pyloriと共培養される胃内硝酸塩還元菌の細胞に対する作用
3. 学会等名 第28回 日本ヘリコバクター学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	岡田 裕之 (Okada Hiroyuki) (60263563)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・特命教授 (15301)	
研究分担者	渡辺 朱理 (Watanabe Akari) (80585026)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・講師 (16101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------