

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：17301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890166

研究課題名(和文) Helicobacter 属菌胆道感染と胆道発癌との関連の検討

研究課題名(英文) Helicobacter bilis biliar duct infection and biliary carcinogenesis

研究代表者

小坂 太一郎 (Kosaka, Taiichiro)

長崎大学・大学病院・助教

研究者番号：00437881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：ハムスターにおけるH.Bilis感染モデルの確立に関する研究：6週齢のゴールデンシリアンハムスターに対しH.bilisを 6.0×10^6 CFU経口投与を隔日3日投与を実施し、コントロール群とのH.bilis胆道感染率を投与後1週～24週までPCR法による検出率で比較検討した。

コントロール群ではH.bilis検出率はいずれの時期においてもH.bilis検出率は10～30%であったのに対し、H.bilis投与群は1週、2週目においては60～70%と高い検出率を確認した。また、24週においてはコントロール群が13%に留まったのに対し、H.bilis投与群においては56%と高い検出率を維持した。

研究成果の概要(英文)：A total of 115, 7-week old female Syrian golden hamsters were used. Animals were housed three per cage with sawdust bedding under standard laboratory condition. The Brain-Heart infusion broth containing H.bilis was adjusted to a 1×10^6 CFU of H.bilis per ml, and were used as bacterial suspensions. 1ml of the suspensions were delivered orally to each test hamster of experimentally infected group by using a sterile oral catheter three times each every other days. After dosing, the animals were normal chow and water ad libitum again. After 2, 4, 8 and 24 weeks, hamsters were euthanized and necropsied and PCR analysis for H.bilis.

In experimentally infected group, 24 animals were judged to be positive for H.bilis DNA by the PCR assays for liver and/or biliary tissue specimens. In contrast, 9 animals in control group was positive for H.bilis. Rate of Positive The difference in H.bilis DNA positivity between two groups was statistically significant ($p < 0.01$).

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科学

キーワード：ヘリコバクター 感染 胆道発癌 ヘリコバクターピリス

1. 研究開始当初の背景

1983年の報告以来、*Helicobacter pylori* (*H.pylori*)に関する基礎的研究が進められている。1996年には胃粘膜障害をに關与するIL-8過剰産生の責任遺伝子としてcagPAIが同定され、[(1)Cnsini et al. cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996]また、*H.pylori*が産生する細胞空胞化蛋白毒素VacAの精製が成された[(2)Cover et al. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 1992]ことで、以後、*H.pylori*感染と慢性胃炎、胃・十二指腸潰瘍、胃悪性新生物との関連機序も徐々に解明されてきている。現在では*H.pylori*は胃発癌の一因とされ、臨床においては2000年に*H.pylori*に対する除菌療法が保険適応となり、胃疾患の治療において革新的な変化をもたらした。

一方、胆道癌は最も予後不良の消化器癌の1つであり、わが国における死亡者数は年々上昇の一途をたどっている。我々はこの難治性疾患である胆道癌に対する治療戦略として投薬による発癌予防、chemopreventionに注目し、胆道癌のchemopreventionに関しても先進的な研究を押し進めてきた[(3) Chemopreventative effect of a cyclooxygenase-2-specific inhibitor (etodolac) on chemically induced biliary carcinogenesis in hamsters. *Carcinogenesis* 2005]。胆道癌では肝内結石症、膵胆管合流異常、先天性総胆管拡張症など高危険群が判明しているものの、その発癌機序は解明されていないという問題がある。

近年、胆汁耐性を有する腸肝 *Helicobacter* 属菌として1994年に *Helicobacter bilis* (*H.bilis*) が、1995年には *Helicobacter hepaticus* (*H.hepaticus*) がマウスより同定、分離された。腸肝 *Helicobacter* 属は胆道感染に

おける胆道悪性疾患、肝炎症性疾患、腸感染における炎症性腸疾患との関連が考えられている。

2002年に私達は世界に先駆けて、胆道癌の高危険群である肝内結石症ならびに胆道癌と *Helicobacter* 属菌感染の関連性を報告し、[(4)*Helicobacter pylori* accelerates the biliary epithelial cell proliferation Activityin hepatolithiasis. *Hepato-gastroenterology* 2002. (5) Comparative analysis of *Helicobacter* DNAs and biliary pathology in Patients with and without Hepatobiliary cancer. *Carcinogenesis* 2002]その後も胆道癌の高危険群である膵胆管合流異常と *Helicobacter* 属菌感染の関連性の検討を行い、合流異常を有する症例は69.2%に *H.bilis*陽性で、合流異常を有さない症例と比して陽性率が有意に高率となり、胆道発癌と *Helicobacter* 属菌感染の関連性を強く示唆することを報告した[(9)Kosaka T et al. *Helicobacter bilis* colonization of the biliary system in patients with pancreaticobiliary maljunction. *Br J surg.* 2010]。他施設からも腸肝 *Helicobacter* 属菌、特に *H.bilis* と胆道癌との関連性の報告があり、[(7)Matsukura N et al. Association between *Hicobacter bilis* in Bile from Japanese and Thai Patients with Benign and Marignant Disaeses in the Biliary Tract. *Jpn J Cancer Res* 2002. (8) Murata H et al. *Helicobacter bilis* infection in biliary tract cancer. *Aliment Pharamacol Ther* 2004]疫学的には胆道癌と *H.bilis* の関連性が強く示唆されている。しかし、現在臨床検体における *Helicobacter* 属感染の証明方法は特異的プライマーを用いたPCRによる同定であり、感染の証明において十分でないという問題がある。いまだ組織

培養を用いたヒト胆道組織からの *Helicobacter* 属菌の分離はなされておらず、また、鏡顕法でも菌の感染巣を同定した報告はない。従って、ヒト胆道における腸肝 *Helicobacter* 属感染の証明方法の確立が急務であると考える。

基礎的研究においては、感染動物モデルを用いて *Helicobacter* 属腸感染と炎症性腸疾患との関連を検討した報告がなされており、*H.bilis*、*H.hepaticus* が INF- γ 、IL-10 を介して腸管の炎症の増悪に関与している可能性が示唆されている [(9)Price M N et al. *Helicobacter bilis* Infection Accelerates and *H.hepaticus* infection Delays the Development of Colitis in Multiple Drug Resistance-Deficient(*mdr1a*^{-/-}) Mice. *American J Pathol.* 2002]。また、実験動物の腸肝 *Helicobacter* 属の自然感染に関連する肝炎の発症が問題となり、その除菌の有効性が示唆されているが、その胆道感染と発癌を検討する動物実験モデルは確立されておらず、その検討もいまだなされていない。

2. 研究の目的

Helicobacter 属菌の胆道感染と胆道発癌機序はその疫学的検討から関連が示唆されているが、その関連機序を基礎的研究で検討した報告はほとんどなく、十分な解明がなされていないのが現状である。

本研究では臨床的研究として胆道良性、悪性疾患患者の胆道組織、胆汁検体を用いて *Helicobacter* 属菌感染状況を検討するとともに、基礎的研究として *Helicobacter* 属菌胆道感染モデルの確立を目指す。また、同モデルを用いて *Helicobacter* 属菌の胆道感染と胆道発癌の関連機序を検討、胆道発癌機序の解明の一助とすることが目的である。

3. 研究の方法

臨床検体を用いた検討

胆道良性、悪性疾患患者の胆道検体に対しPCR法を施行し *Helicobacter* 属菌の検出率を検討する。また、鏡検法で

Helicobacter 属の感染像を検索する。免疫組織学的検索を行い、胆道上皮への感染の影響を検討する。

基礎的研究

ヒト正常胆管上皮細胞株に *H.bilis*、*H.hepaticus* を接種後、各種炎症性サイトカイン(IL-6,8,TNF- α)をELISA法にて定量する。あわせて、MTT assayなどで胆管上皮細胞の細胞増殖能への影響を検討する。

ハムスターに *Helicobacter* 属菌を経口摂取させ胆道感染モデルの作成を行い、その後 *Helicobacter* 属感染の胆道への影響を検討する。胆道発癌を認めた場合、同モデルを用いて除菌療法の効果を検討する。

臨床検体を用いた検討

当科で手術を施行する胆道良悪性疾患の胆道、胆汁検体に対し、PCR法を用いて *Helicobacter* 属を検出し、その陽性率との関連を検討する。胆嚢、胆管検体の全域に鏡検法による *Helicobacter* 属の感染像の検索を行う。微好気性環境下に胆汁、胆道組織から組織培養を行い、*Helicobacter* 属の分離を試みる。また、胆道検体に対する免疫組織化学染色を施行し、胆道上皮への免疫組織学的影響を検討する。

症例は2年間で100例ほどを予想しており、胆道癌症例、合流異常症例(拡張症含む)、その他の症例に分類して結果を検討する。手技的には、以下の私達の研究によって確立されている。

[(4)*Helicobacter pylori* accelerates the biliary epithelial cell proliferation Activity in hepatolithiasis. *Hepato-gastroenterology* 2002. (5) Comparative analysis of *Helicobacter* DNAs and biliary pathology in Patients with and without Hepatobiliary cancer. *Carcinogenesis* 2002]

1) ヒト胆道疾患の臨床検体(胆汁、胆道組

織)より DNA を採取、*Helicobacter* 特異的プライマーを用いた PCR 法により *Helicobacter* 属菌 (*H.pylori*, *H.bilis*, *H.hepaticus*)の検出を行う。

- 2) 胆嚢、胆管検体の全域にわたり、HE 染色、Giemsa 染色を用いた検鏡による *Helicobacter* 属感染巣の検索も併せて施行、検出法としての確立を試みる。感染巣が同定された場合は電顕による観察も合わせて施行する。
- 3) *Helicobacter* 属菌の培養至適環境である微好気性環境下 37 で、培地条件を模索しながら、採取した胆汁、胆嚢、胆管検体の組織培養による *Helicobacter* 属分離を試みる。
- 4) 上記の検索より *Helicobacter* 属感染の有無を決定し、各群で感染率を検討する。
- 5) 免疫組織化学染色 (IL-6、IL-8、cox2、iNOS)をあわせて行い、*Helicobacter* 属菌感染の胆道上皮への影響について検討する。
- 6) 血液生化学所見、組織学的所見などについても合わせて検討する。

細胞株を用いた検討

H.pylori 培養液中から細胞空胞化毒素 VacA が精製されて以後、この毒素と胃粘膜障害との関連の解明が進んでいる。腸肝 *Helicobacter* 属と胆管上皮との関連は明らかとなっていないが、*H.pylori* と同様に特異的サイトキシンやサイトカイン過剰反応を介している可能性も十分に考えられる。今回私達は、胆管上皮細胞と腸肝 *Helicobacter* 属との in vitro における関連を検討する。

- 1) ヒト正常胆管上皮細胞株に *H.bilis*, *H.hepaticus* を接種後、各種炎症性サイトカイン (IL-6,8, TNF-) を ELISA 法にて定量する。あわせて、MTT assay などで胆管上皮細胞の細胞増殖能への影響を検討する。また、接種後の胆管上皮細胞株における

TLR9 の発現を RT-PCR で検討する。

- 2) *Helicobacter* 属接種による細胞障害が証明された場合は、培養液中のプロテオーム解析を施行し、特異的毒素、その他を検討する。

ハムスター感染モデルの作製

現在まで、*Helicobacter* 属の胆道感染モデルは確立されていない。今回私達はシリアンハムスターを用いて胆道感染モデル作成を試み、その後 *Helicobacter* 属感染の胆道への影響を検討する。

- 1) 実験モデルとして 7 週齢、雌のハムスターを用いて、*H.bilis*, *H.hepaticus* の経口的胃内注入、腹腔内注入を行う。(培養培地のみ注入のコントロール群も作製)
- 2) 2,4,8,24 週後に犠牲死させて、PCR 法、組織培養、検鏡法で *Helicobacter* 属検出を行う。
- 3) 胆道組織を採取し胆道上皮の組織学的変化を評価する。特に炎症性変化、腫瘍の形態・局在などを詳細に観察し *Helicobacter* 属菌胆道感染との関連を検討する。

4 . 研究成果

臨床検体における *H.bilis* の検討

現在までに小児例 10 例の検体を新たに獲得し、PCR による検討を実施予定。昨年度の症例と併せて結果を学会発表、及び論文にて報告予定。

ハムスターにおける *H.Bilis* 艦船モデルの確立に関する研究

6 週齢のゴールデンシリアンハムスターに対し *H.bilis* を 6.0×10^6 CFU 経口投与を隔日 3 日投与を実施し、コントロール群との *H.bilis* 胆道感染率を投与後 1 週 ~ 24 週まで PCR 法による検出率で比較検討した。コントロール群では *H.bilis* 検出率はいず

れの時期においても H.bilis 検出率は 10～30%出会ったのに対し、H.bilis 投与群は 1 週、2 週目においては 60～70%と高い検出率を確認した。また、24 週においてはコントロール群が 13%に留まったのに対し、H.bilis 投与群においては 56%と高い検出率を維持していることを確認した。

次に Giemsa 染色、鏡顕法で H.bilis の菌体、コロニー形成の検出を試みたが、H.bilis 投与群、コントロール群共に胆嚢、胆管、肝組織いずれの検体からも H.bilis のコロニー形成を確認することは出来なかった。

次に各モデルの胆管、胆嚢、肝内胆管に対し、H-E 染色、鏡顕法による病理学的検討を実施した。1, 2, 4, 8, 24 週モデルにおいては H.bilis 投与群、コントロール群共に胆道粘膜の組織学的変化を認めなかった。24 週モデルにおいては H.bilis 投与群の 34%に胆道上皮組織の過形成を確認した。コントロール群においても 13%に同様の所見を認めた。異形成は認められなかった。
(以上は現在論文作成中)

H.bilis 感染の胆道上皮細胞に対する影響の in vitro における検討
現在実験を進行中。

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)

著者：小坂太一郎 黒木保 江口晋
標題：Helicobacter bilis と胆道発がん
化学療法の領域 Vol.29 No.11 130-135 2013
(査読有)

〔学会発表〕(計 1 件)

発表者：小坂太一郎
発表標題：先天性胆道拡張症小児例における
Helicobacter bilis 感染の検討
第 19 回日本ヘリコバクター学会定期学術集
会 2013 6.28-29 長崎

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小坂太一郎 (Kosaka Taiichiro)
部局：長崎大学病院
職名：助教
研究者番号：00437881

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：