

平成 30 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：2015～2016

課題番号：15H06502

研究課題名(和文) Helicobacter pylori VacAの肺内同定とその呼吸器への作用

研究課題名(英文) Identification of Helicobacter pylori VacA in Human Lung and its Effects on Airway Epithelial Cells

研究代表者

中島 章太 (NAKASHIMA, Shota)

長崎大学・病院(医学系)・助教

研究者番号：20755730

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの肺組織を用いて抗VacA抗体による免疫染色を行い、下気道内にヘリコバクターピロリが産生する外毒素であるVacAが存在することを明らかにした。

VacAがA549細胞と正常ヒト気管支上皮細胞を空胞化させ、A549細胞からIL-8やIL-6を、正常ヒト気管支上皮細胞からIL-8を産生させることを明らかにした。

マウスの気管内に高濃度のVacAを投与することで肺組織で炎症細胞浸潤が起こることを明らかにした。ただし、マウスの生存率や体重変化率に有意な変化はなく、VacAに対するマウスの感受性やVacAを投与する濃度や時間、投与間隔を検討することなどが今後の課題である。

研究成果の概要(英文)：Prior reports suggested that infection with Helicobacter pylori was associated with respiratory diseases; pathogenetic mechanisms however, were not defined. We tested the hypothesis that VacA, an exotoxin of Helicobacter pylori, a gastric pathogen, was aspirated into the lung and could stimulate secretion of inflammatory cytokines by lung epithelial cells.

VacA was detected with anti-VacA antibodies in bronchial epithelial cells and alveolar epithelial cells from 10 of 72 patients with interstitial pneumonia. Incubation of A549 cells and normal human bronchial epithelial cells with VacA for 24 h was cytotoxic, and resulted in vacuolation. VacA induced interleukin-8 production by A549 cells and normal human bronchial epithelial cells and interleukin-6 production by A549 cells.

VacA could have a role in the pathogenesis of respiratory diseases by its cytotoxic effects and by inducing the secretion of interleukin-8 and interleukin-6 by targeted airway epithelial cells.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：ヘリコバクターピロリ VacA A549細胞 気管支上皮細胞

## 1. 研究開始当初の背景

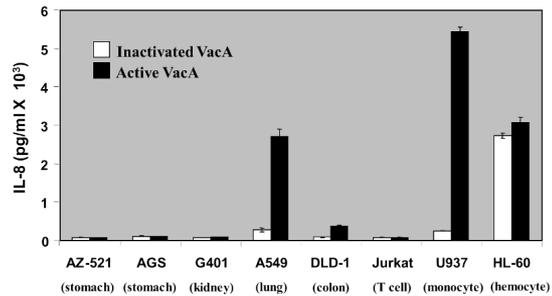
本邦の *H. pylori* 感染者は5,000 万人以上と推定されている。*H. pylori* は胃炎や消化性潰瘍、胃癌等の消化器疾患の原因とされているが、*H. pylori* の除菌により種々の皮膚・神経、循環器、自己免疫、内分泌、血液疾患等が軽快することから、消化管外の種々の臓器の病変にも関与が疑われており、なかでも血小板減少性紫斑病患者における除菌後の血小板増加がよく知られている。

呼吸器領域では、気管支拡張症患者で抗 *H. pylori* 抗体の陽性率が高かったとの報告 (Tsang KW et al. Am J Respir Crit Care Med 1998) に引き続き、慢性気管支炎患者や肺結核患者、肺癌患者で同様に抗 *H. pylori* 抗体の陽性率が高かったとの報告 (Caselli M et al. Scand J Gastroenterol 1999, Roussos A et al. J Gastroenterol 2002, Filippou N et al. J Clin Gastroenterol 2002, Gocyk W et al. Med Sci Monit 2000, Ece F et al. Respir Med 2005, Zhuo WL et al. Arch Med Res 2009) が相次ぎ、*H. pylori* 感染が呼吸器疾患にも関与している可能性が示唆された。

胃食道逆流が呼吸器疾患と関連していることは古くから知られていたが、特発性肺線維症患者には胃食道逆流が多いという報告 (Tobin RW et al. Am J Respir Crit Care Med 1998, Raghu G et al. Eur Respir J 2006) に次いで、最近、特発性肺線維症患者に対してプロトンポンプインヒビターや H2 ブロッカーなどの制酸薬を使用することにより、生命予後を改善させることができることを示唆する報告がなされている (Lee JS et al. Am J Respir Crit Care Med 2011)。特発性肺線維症に限らず、嚢胞性肺線維症患者やその対照群として測定された健常者群でも気管支肺胞洗浄液中にペプシンが同定されていること (McNally P et al. Thorax 2011) や、肺移植後の閉塞性細気管支炎症候群では無症状であっても気管支肺胞洗浄液中に胆汁酸が同定されている (D' Ovidio F et al. J Thorac Cardiovasc Surg 2005) ことは、日常的に不顕性誤嚥により消化液が下気道内に流入していることを示している。気管支拡張症患者の気管支肺胞洗浄液や肺組織で行った *H. pylori* の PCR は陰性であったとの報告 (Gulhan M et al. Arch Med Res 2007) から、*H. pylori* 自身は下気道内で生育することはできないと思われるが、*H. pylori* から菌体外へ分泌された外毒素が胃食道逆流によりペプシンや胆汁酸とともに下気道内に流入し、呼吸器疾患に関与している可能性は十分にある。

*H. pylori* の外毒素として、*H. pylori* の病原因子の一つである空胞化毒素

(vacuolating cytotoxin: VacA) が知られている。本研究の研究協力者である帯広畜産大学の倉園らは本邦で初めて *H. pylori* の培養液から VacA を精製し、VacA を認識する抗体を作製した (Yahiro K et al. J Biol Chem 1997, Yahiro K et al. Biochem Biophys Res Commun 1997, Padilla PI et al. J Biol Chem 2000, Yahiro K et al. J Biol Chem 2003)。また、VacA が単球系の株化細胞である U937 細胞から IL-8 を産生させることを報告した (Hisatsune J et al. J Immunol 2008)。



## 2. 研究の目的

*H. pylori* の外毒素である VacA が下気道内に存在し、呼吸器系細胞から IL-8 等のサイトカインを産生させることで呼吸器疾患に関与していることを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 下気道における VacA の同定

72 例の間質性肺炎患者の肺組織を用いて、抗 VacA 抗体による免疫染色を施行した。

### (2) VacA による呼吸器系細胞の空胞化

呼吸器系の細胞である A549 細胞 (肺癌患者の肺由来株化細胞) と正常ヒト気管支上皮細胞を培養し、VacA と VacA を熱 (100、10 分間) で失活させた inactivated VacA を添加し、空胞化の有無を光学顕微鏡で観察した。

### (3) VacA による呼吸器系細胞からのサイトカイン産生

A549 細胞と正常ヒト気管支上皮細胞を培養し、VacA と inactivated VacA を添加し、その培養液中の 10 種類のサイトカイン (GM-CSF、IFN- $\gamma$ 、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、TNF- $\alpha$ ) を Multiplex Luminex<sup>®</sup> アッセイを用いて測定した。

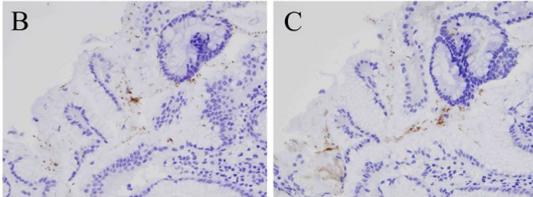
### (4) VacA のマウス気管内投与

VacA をマウスの気管内に投与し、生存率や体重変化、肺の組織学的変化について検討した。

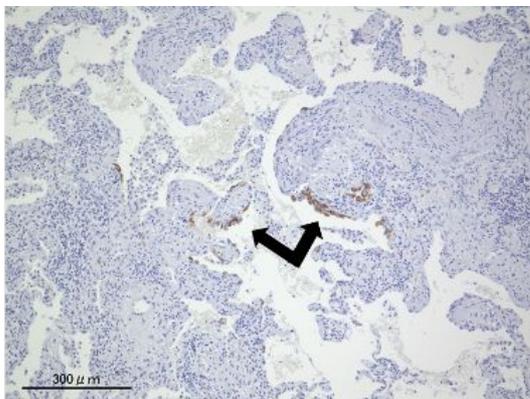
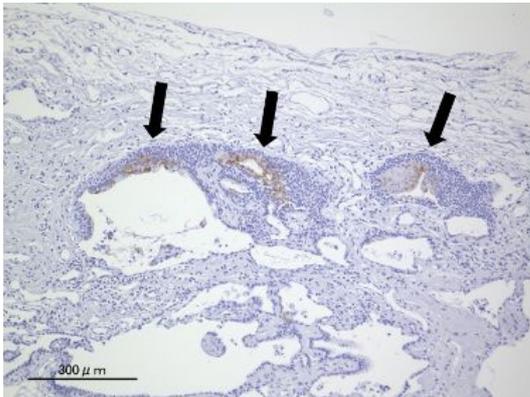
## 4. 研究成果

### (1) 下気道における VacA の同定

まず、抗 VacA 抗体による免疫染色の妥当性を評価するため、*H. pylori* 感染の明らかな胃生検標本を用いて、抗 *H. pylori* 抗体(下図 B)と抗 VacA 抗体(下図 C)による免疫染色を行った。連続切片で評価し、VacA は *H. pylori* の菌体やその周囲に染まっており、良好な染色結果であった。



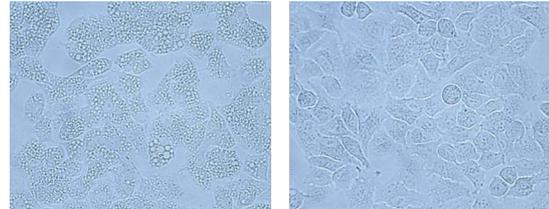
次に 72 例の間質性肺炎患者の肺組織を用いて、抗 VacA 抗体による免疫染色を施行した。結果、そのうちの 10 例が陽性であり、VacA は気管支上皮細胞(下図 上)や肺泡上皮細胞(下図 下)に陽性所見を認めた。この結果から、下気道内に VacA が存在することが示された。



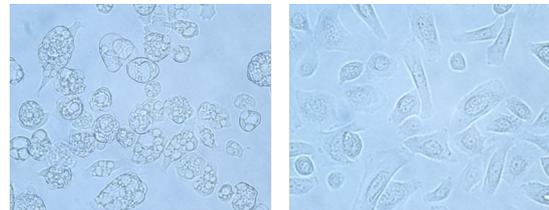
### (2) VacA による呼吸器系細胞の空胞化

VacA を A549 細胞や正常ヒト気管支上皮細胞に添加したところ、いずれの細胞でも各図の左側のように細胞の空胞化がみられ、これらの呼吸器系の細胞が VacA に対して感受性を有することが示された(各図の右側は VacA を熱で失活させた inactivated VacA を添加したもの)。

#### A549 細胞の空胞化

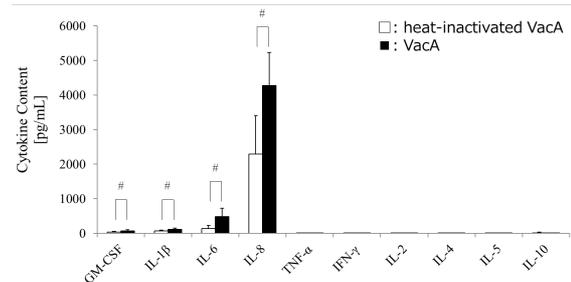


#### 正常ヒト気管支上皮細胞の空胞化

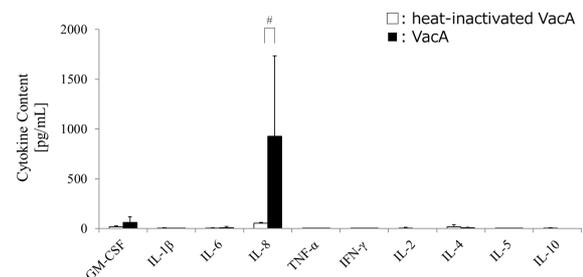


### (3) VacA による呼吸器系細胞からのサイトカイン産生

A549 細胞に VacA を添加したところ、IL-8 と IL-6 の産生が亢進した。GM-CSF と IL-1 にも有意差があったが、これらのサイトカインレベルは微量であった。



同様に、正常ヒト気管支上皮細胞に VacA を添加したところ、IL-8 の産生が亢進した。正常ヒト気管支上皮細胞では、IL-6 の産生亢進はみられなかった。



#### (4) VacA のマウス気管内投与

SPF 雄性 6 週齢の BALB/c マウスを用いて、5 µg の VacA と同量の生理食塩水を気管内に投与し、生存率や体重変化を観察したところ、生存率や体重変化に有意差は認められなかった。

SPF 雄性 6 週齢の BALB/c マウスを用いて、10 µg の VacA と同量の生理食塩水を、1 日目と 2 日目に連日で気管内に投与し、4 日目、7 日目、10 日目、14 日目の肺の病理組織像を観察した。

VacA 投与群の肺では軽度の炎症細胞浸潤が認められた。

SPF 雄性 6 週齢の C57BL/6J マウスを用いて、44 µg の VacA と同量の生理食塩水を気管内に投与し、生存率や体重変化率に加えて、4 日目、10 日目、14 日目の肺の病理組織像を観察した。

44 µg の VacA を気管内投与した群では、肺組織に炎症細胞の浸潤を認めたが、生存率や体重変化率には群間に有意差はなかった。

マウスの気管内に高濃度の VacA を投与することで、肺組織に炎症細胞浸潤が起こることが明らかとなった。しかしながら、マウスの生存率や体重変化率に有意な変化はなく、VacA に対するマウスの感受性や投与する VacA の濃度や時間、投与間隔を検討することなどが今後の課題である。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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 なし

#### 6 . 研究組織

##### (1) 研究代表者

中島 章太 (NAKASHIMA, Shota)  
長崎大学・病院 (医学系)・助教  
研究者番号：20755730

##### (2) 研究分担者 なし

##### (3) 連携研究者 なし

##### (4) 研究協力者 なし