

平成23年5月31日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590445

研究課題名（和文）ピロリ菌感染免疫におけるマクロファージの役割

研究課題名（英文）Role of macrophage in Helicobacter pylori infection

研究代表者

横田 憲治（YOKOTA KENJI）

岡山大学・大学院保健学研究科・准教授

研究者番号：00243460

研究成果の概要（和文）：

HSP60 で刺激した早期胃癌患者と胃炎患者と健常人のリンパ球の反応性を、マクロファージ DEC205 の mRNA 発現量の解析、及び CD4-T 細胞の Th1/Th2 サイトカインの mRNA 発現とその関連性について検討した RT-PCR にて DEC205 遺伝子の発現を、MPCR Kit for Human Th1/Th2 cytokines Set-1 により Th1/2 サイトカインの発現を調べた。HSP60 刺激では Hp-IgG 陰性群の胃癌患者の DEC205 発現量が、Hp-IgG 陽性群の胃癌患者及び胃炎患者と比較して有意に低かった。また、HP 感染者では健常人に比べ発現量が増加していた。MPCR により Th1/Th2 どちらの遺伝子の発現が優位に増加しているかを検討したところ、Th1 優位である胃炎患者や健常人に対して早期胃癌患者は Th2 が優位となることが示された。しかし、胃癌患者の Hp-IgG 陽性群と Hp-IgG 陰性群の間に有意差は認められなかった。また、HSP60 に対する免疫反応が冠動脈疾患と関係があることが示された。

研究成果の概要（英文）：

The HSP60 (groEL) is immune dominant antigen in *H. pylori* infected patients. Expression of DEC205, which is antigen uptake receptor on macrophage, was increased in *H. pylori* infected patients with early gastric cancer. However mRNA of DEC205 was also increased in the patient without gastric cancer. Expression of Th1 cytokines was detected in lymphocyte stimulated with HSP60 from patients with gastric cancer. HSP60 stimulation and its response in T helper CD4 may be available for diagnosis or prediction of gastric cancer caused by *H. pylori* infection. On the other hand, HSP60 antibody may be associated with cardiovascular disease (CVD) induced by *H. pylori* infection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：Helicobacter pylori, 胃癌、DEC205, Th1/2, HSP60, 冠動脈疾患

## 1. 研究開始当初の背景

*Helicobacter pylori* (ピロリ菌) の発見以来、非常に多くの研究 (1年間に1000報以上のペースで10年間以上出ている) が報告され、その中で菌の病原因子、宿主の反応性が複雑に絡まってさまざまな疾患を起すことが報告されている。ピロリ菌は、胃に慢性感染を起し慢性胃炎をおこす。この感染者の一部は、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、MALT リンパ腫などおこし、胃ガンを発症するリスクが高い。消化器以外の疾患でも、血小板減少性紫斑病 (ITP) や動脈硬化などの疾患も、関与している。しかし、ピロリ菌の起す病態の機構については、不明な点が多い。その理由として、感染者の中で、一部の人はしか疾患を発症しないこと、除菌すれば疾患が治ってしまう事などがあげられる。つまり、多くの感染者の中で、どのような人を除菌対象にすれば、このような疾患が防げるのかまったくわかっていない。そこで、われわれは、患者の菌に対する免疫反応を調べることにより、将来の疾患予防 (特に胃ガン) ができないか? と考えた。今回、宿主側の因子として注目している DEC205 の発現の減少と免疫反応の関係は、肺ガン、膀胱ガンの進行に関係しているとの報告もある。

これらの事実は、胃における抗原の認識と免疫反応が、ピロリ菌感染において、不明なことが多いことによると考え、このため、免疫の最初の段階であるマクロファージとピロリ菌の関係を前回の科研で研究してきた。今回はさらに基礎的実験に加え、実際の疾患でのマクロファージの役割について研究をおこなった。

## 2. 研究の目的

我々は、*Helicobacter pylori* (ピロリ菌) 感染におけるマクロファージの機能に注目

し、感染における特異的免疫反応と疾患の関係を研究することにより、ピロリ菌による様々な疾患の病原機構を明らかにすることを目的とする。これまでの我々の研究で、菌の熱ショックタンパク (HSP60) が、マクロファージの活性化能が高いことを報告してきた。これを利用して、宿主の免疫反応の特徴を調べ、病原性の解明、診断への応用を目指す。マクロファージ活性化の指標として、抗原の取り込み関与するマンノースレセプターDEC205 に注目し、この分子の発現と宿主の免疫反応との関係を研究する。一方、菌の病原因子として多くの因子が報告されてきた。これら HSP60 以外の病原因子とマクロファージ活性化の機構も研究する。

## 3. 研究の方法

培養細胞と患者検体を使い、以下のことを目指す。

- 1) NOMO-1、U937細胞に菌を作用させ、マクロファージ細胞内に菌が取り込まれる過程における DEC205 の役割について検討する。(これまでにうけた研究費の項目基盤研究 (C) 「ピロリ菌感染による特異的免疫反応における単球・マクロファージの役割」参照。最終的には、抗原のプロセッシング、抗原提示の経路を調べることにより、
- 2) この系に、横田文献4で分離した、胃潰瘍患者から発ガンを誘発した菌株を作用させ、DEC205 の発現やサイトカイン産生を検討する。
- 3) *cagA*, *vacA*, HSP60 などの遺伝子をノックアウトした菌を作成し、マクロファージ系細胞に作用させ、サイトカイン産生等を検討する。
- 4) 胃ガン患者より、末梢血、胃の生検材料を

採取し、末梢血は、HSP60,菌の破砕物で刺激し、サイトカイン産生、DEC205 の発現を調べる。また胃の生検材料は、凍結標本をDEC205やCD14などを免疫染色し、胃ガン発症との菌に対する免疫反応の特徴を検討する。

#### 4. 研究成果

- 1) HP 刺激による胃炎患者と胃ガン患者の末梢血リンパ球の DEC205 発現量に有意差は認められなかった。しかし、HSP 刺激では Hp-IgG (-) の胃癌患者の発現量が、Hp-IgG (+) 胃癌患者及び胃炎患者に比較して有意に低かった。また、HP 感染者では、健康人に比べ発現量が増加していた。
- 2) また抗原刺激によるサイトカイン mRNA 発現を調べたところ、Th1 (IFN-gamma, IL-2) 優位である胃炎患者や健康人に対して胃ガン患者は有意に Th2 (IL-10, IL-4) が優位となることが示された。また、胃癌患者の Hp-IgG 陽性群と Hp-IgG 陰性群の間に有意差は認められなかった。
- 3) *H. pylori* の抗体価による感染率は冠動脈疾患 (CVD) 群で 56%、non-CVD 群で 52% とほとんど差がなかった。Hp-HSP60 の陽性率は、CVD 群で 84%、non-CVD 群で 62%、オッズ比は 1.47 (p=0.11) であり有意差は認められなかった。Hu-HSP60 に対する抗体価の陽性率は、CVD 群で 39%、non-CVD 群で 22% であり、オッズ比は 2.07 (p=0.012) で有意差が認められた。また、*H. pylori* 感染により Hu-HSP60 に対する抗体価が上昇するヒトは、T cell epitope を含む II 3a (Glu<sup>141</sup>-His<sup>155</sup>), II 3b (Gln<sup>145</sup>-Asn<sup>152</sup>) のペプチドに対する抗体価が上昇していた。このことから、*H. pylori* 感染により、Hu-HSP60 に対する抗

体価が上昇するヒトは CVD 発症のリスクが高い可能性が示された。

#### 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 13 件)

- 1: Kaneko F, Togashi A, Saito S, Sakuma H, Oyama N, Nakamura K, Yokota K, Oguma K. Behçet's disease (Adamantiades-Behçet's disease). Clin Dev Immunol. 査読有 2011;2011:681956. Epub 2010 Nov 1. Review.
- 2: Kawabata T, Mitsui H, Yokota K, Ishino K, Oguma K, Sano S. Induction of antibacterial activity in larvae of the blowfly *Lucilia sericata* by an infected environment. Med Vet Entomol. 査読有 2010 Dec;24(4):375-81.
- 3: Take S, Mizuno M, Ishiki K, Yoshida T, Ohara N, Yokota K, Oguma K, Okada H, Yamamoto K. The long-term risk of gastric cancer after the successful eradication of *Helicobacter pylori*. J Gastroenterol. 査読有 2011 Mar;46(3):318-24. Epub 2010 Nov 20.
- 4: Hirai K, Arimitsu H, Umeda K, Yokota K, Shen L, Ayada K, Kodama Y, Tsuji T, Hirai Y, Oguma K. Passive oral immunization by egg yolk immunoglobulin (IgY) to *Vibrio cholerae* effectively prevents cholera. Acta Med Okayama. 査読有 2010 Jun;64(3):163-70.
- 5: Hamada T, Yokota K, Ayada K, Hirai K,

Kamada T, Haruma K, Chayama K, Oguma K. Detection of Helicobacter hepaticus in human bile samples of patients with biliary disease. Helicobacter. 査読有2009 Dec;14(6):545-51.

6: Ayada K, Yokota K, Hirai K, Fujimoto K, Kobayashi K, Ogawa H, Hatanaka K, Hirohata S, Yoshino T, Shoenfeld Y, Matsuura E, Oguma K. Regulation of cellular immunity prevents Helicobacter pylori-induced atherosclerosis. Lupus. 査読有2009 Nov;18(13):1154-68.

7: Shimomura H, Hosoda K, Hayashi S, Yokota K, Oguma K, Hirai Y. Steroids mediate resistance to the bactericidal effect of phosphatidylcholines against Helicobacter pylori. FEMS Microbiol Lett. 査読有2009 Nov;301(1):84-94.

8: Ayada K, Yokota K, Kawahara Y, Yamamoto Y, Hirai K, Inaba T, Kita M, Okada H, Yamamoto K, Oguma K. Immune reactions against elongation factor 2 kinase: specific pathogenesis of gastric ulcer from Helicobacter pylori infection. Clin Dev Immunol. 査読有 2009;2009:850623. Epub 2009 Jul 14.

9: Hosoda K, Shimomura H, Hayashi S, Yokota K, Oguma K, Hirai Y. Anabolic utilization of steroid hormones in Helicobacter pylori. FEMS Microbiol Lett. 査読有 2009 Aug;297(2):173-9. Epub 2009 Jun 9.

10: Tanaka A, Kamada T, Yokota K, Shiotani A, Hata J, Oguma K, Haruma K. Helicobacter

pylori heat shock protein 60 antibodies are associated with gastric cancer. Pathol Res Pract. 査読有 2009;205(10):690-4.

11: Ayada K, Yokota K, Kobayashi K, Shoenfeld Y, Matsuura E, Oguma K. Chronic infections and atherosclerosis. Clin Rev Allergy Immunol. 査読有 2009 Aug;37(1):44-8. Review.

12: Take S, Mizuno M, Ishiki K, Nagahara Y, Yoshida T, Yokota K, Oguma K, Okada H, Yamamoto K. Helicobacter pylori eradication may induce de novo, but transient and mild, reflux esophagitis: Prospective endoscopic evaluation. J Gastroenterol Hepatol. 査読有 2009 Jan;24(1):107-13.

13: Kaneko F, Oyama N, Yanagihori H, Isogai E, Yokota K, Oguma K. The role of streptococcal hypersensitivity in the pathogenesis of Behçet's Disease. Eur J Dermatol. 査読有 2008 Sep-Oct;18(5):489-98.

[学会発表] (計 20 件)

1) 横田憲治、山本由弥子、鈴木智典、長町栄子、小熊惠二 H. pylori 感染と冠動脈疾患の関係 第 63 回 日本細菌学会中国・四国支部総会 2010 年 10 月 16-17 日 松山

2) 横田憲治、山本由弥子、鈴木智典、長町栄子、小熊惠二 H. pylori 感染と冠動脈疾患の関係 第 63 回 日本細菌学会中国・四国支部総会 2010 年 10 月 16-17 日 松山

3) 大野佑子、横田憲治、申 蓮花、山本由弥子、小熊惠二 ペーチュット病患者由来熱ショックタンパク HSP60 由来ペプチドの免疫活性の研究 第 63 回 日本細菌学会中国・四国支部総会 2010 年 10 月 16-17 日

松山

4) 西田奈々、大野佑子、横田憲治、山本由弥子、鈴木智典、小熊惠二 Helicobacter pylori の除菌後再感染菌の検討  
第 63 回 日本細菌学会中国・四国支部総会  
2010 年 10 月 16~17 日 松山

5) 武進、水野元夫、石木邦治、喜多雅英、横田憲治、小熊惠二 H. pylori 除菌後の再感染についての検討 第 16 回日本ヘリコバクター学会 2010 年 6 月 24~25 日京都

6) 細田浩一、下村裕史、林俊治、横田憲治、小熊惠二、平井義一 ステロイドの抗ピロリ菌活性 第 16 回日本ヘリコバクター学会 2010 年 6 月 24~25 日 京都

7) 横田憲治、喜多雅英、綾田潔、林俊治、平井義一、小熊惠二 H. pylori 感染と冠動脈疾患の関係 第 16 回日本ヘリコバクター学会 2010 年 6 月 24~25 日 京都

8) 細田浩一、下村裕史、林俊治、横田憲治、小熊惠二、平井義一 ピロリ菌におけるステロイドホルモンの同化的利用 第 83 回日本細菌学会総会 2010 年 3 月 27~29 日横浜

9) 下村裕史、細田浩一、林俊治、横田憲治、小熊惠二、平井義一 ステロイド吸収によって惹起されるピロリ菌のフォスファチジルコリン耐性の発現 第 83 回日本細菌学会総会 2010 年 3 月 27~29 日 横浜

10) 横田憲治、大野佑子、林俊治、平井義一、長町英子、小熊惠二 Helicobacter pylori の病原遺伝子の多様性と胃粘膜萎縮の関係についての検討 第 83 回日本細菌学会総会 2010 年 3 月 27~29 日 横浜

11) Yokota, K Helicobacter infection and Cancer Disease, Immune reactions in MALT lymphoma and Gastric Cancer The 3rd International Symposium for Future Technology Creating Better Human Health and Society (Molecular Targets for the Development of Therapeutic Agents against Cancer and Infectious Diseases in vitro, in vivo and in silico) 2010 年 2 月 3~4 日 Okayama

12) Keiji Oguma, Dwi Fatmawati, Kiyoshi Ayada, Kenji Yokota, Kazuyuki Hirai, Masahide Kita, Eiji Matsuura, and Shouzou Kusachi. Helicobacter pylori infection may cause the atherosclerosis via Th1-dominant reactions induced HSP60.

Cell Stress Society

International, The 4th International Congress on Stress Responses in Biology and Medicine 2009.10.6~9Sapporo, Japan.

13) Keiji Oguma, Kiyoshi Ayada, Kenji Yokota, Masahide Kita, Dwi Fatmawati, Eiji Matsuura, and Shouzou Kusachi Helicobacter pylori infection may cause the atherosclerosis via Th1-dominant reactions induced mainly by both bacterial- and host- HSP60s. International Workshop on Campylobacter, Helicobacter, and Related Organisms (CHRO). 2009.9.2~5 Niigata

14) Kenji Yokota, Kiyoshi Ayada, Toshihide Hamada, Kazuyuki Hirai, Tomoari Kamada, Ken Haruma, and Keiji Oguma. Detection of Helicobacter hepaticus in human bile samples of patients with biliary disease. International Workshop on Campylobacter, Helicobacter, and Related Organisms (CHRO). 2009.9.2~5 Niigata

15) Kouichi Hosoda, Hirofumi Shimomura, Shunji Hayashi, Kenji Yokota, Keiji Oguma, and Yoshikazu Hirai. Anabolic utilization of steroid hormones in Helicobacter pylori. International Workshop on Campylobacter, Helicobacter, and Related Organisms (CHRO). 2009.9.2~5 Niigata

16) 綾田潔、横田憲治、平井一行、喜多雅英、小熊惠二 Helicobacter pylori 感染動脈硬化モデルマウスにおける T 細胞の関与 第 15 回日本ヘリコバクター学会 2009.6.25~6.26 東京

17) 喜多雅英、横田憲治、岡田裕之、武進、綾田潔、竹中龍太、河原祥朗、山本和秀、小熊惠二 Helicobacter pylori 菌の病原遺伝子の多様性と疾患についての検討 第 15 回日本ヘリコバクター学会 2009.6.25~6.26 東京

18) 横田憲治、綾田潔、武進、水野元夫、小熊惠二 Helicobacter pylori による培養細胞からのサイトカイン誘導性の検討 第 15 回日本ヘリコバクター学会 2009.6.25~6.26 東京

19) 横田憲治、綾田潔、喜多雅英、岡田裕之、山本和秀、小熊惠二 H. pylori 抗原刺激による胃ガン患者の末梢血マクロファージレセプターDEC205 の発現解析

第15回日本ヘリコバクター学会 2009.6.25  
～6.26 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横田 憲治 (YOKOTA KENJI)  
岡山大学・大学院保健学研究科・准教授  
研究者番号：00243460

(2) 研究分担者

綾田 潔 (AYADA KIYOSHI)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助  
教

研究者番号：00379835

(H20→H21：連携研究者)

小熊 恵二 (OGUMA KEIJI)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教  
授

研究者番号：00002262

(H20→H21：連携研究者)