

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K10703

研究課題名(和文)ヘリコバクター属菌感染によるTLR9を介した肝内胆管癌発癌機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of TLR9-mediated intrahepatic cholangiocarcinogenesis by Helicobacter sp. infection

研究代表者

足立 智彦 (Adachi, Tomohiko)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・講師

研究者番号：60437879

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：今回ヘリコバクターウイルスと胆道発癌の機序を解明すべく次の検討を行った。方法：購入したヒト不死化胆管上皮細胞(MMNK-1)にヘリコバクターウイルスを各条件で共培養、細胞由来の炎症性サイトカインや活性酸素種、細胞増殖活性をそれぞれELISA法、蛍光法、WST-1 assayにて検出し、非共培養群と比較検討した。結果として、MMNK-1とヘリコバクターウイルスの短時間共培養でも、細胞を悪性化や侵襲性へと変換しうるIL-6やIL-8、活性酸素種の分泌増加を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヘリコバクターウイルスと胆道発癌ではPCRを用いた検討では関連性が示唆されるものの、菌体自体が明瞭に確認できることが少なく、今回の検討にて、胆道上皮と菌体との接触で何らかのreactionが生じていることは認識し得たので、今後の検討につながるものと考え。胆道癌は予後不良の疾患である。胃癌においては、ヘリコバクターピロリとの関連が明白となった以降、除菌にて明らかな有病率の低下に繋がった。胆道癌において最たる抗癌治療は発癌抑制であり、今後ヘリコバクターウイルスと胆道発癌の関連がより明らかとなり、かつ除菌での発癌抑制へ向けての基礎研究結果となれば、今回の研究の社会的意義は高いと思われる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the mechanism of biliary carcinogenesis with *H. bilis*.

Methods: *H. bilis* was co-cultured with purchased immortalized human bile duct epithelial cells (MMNK-1) under various conditions, and cell-derived inflammatory cytokines, reactive oxygen species, and cell proliferation activity were detected by ELISA, fluorescence, and WST-1 assay, respectively, and compared with those of the non-cultured group. The results showed that even in short-term co-culture of MMNK-1 and *H. bilis*, there was an increase in secretion of IL-6, IL-8, and reactive oxygen species that can convert cells to malignant and invasive forms.

研究分野：消化器外科、胆道・膵臓癌

キーワード：ヘリコバクターウイルス 胆道発癌

1. 研究開始当初の背景

胃癌と *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) の関連性はよく知られる。*H.pylori* は胃癌の一因とされ、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、肝内胆管癌を含む胆道癌に於いても、胆汁耐性を有する腸肝 *Helicobacter* 属菌として 1994 年にグラム陰性桿菌である *Helicobacter bilis* (*H.bilis*) がマウスより分離同定された。以後、*H.bilis* の胆道感染と肝内胆管癌を含む胆道悪性疾患との関連性が検討され、2002 年に我々は世界に先駆け、胆道癌の高危険群である肝内結石症と *H.bilis* の関連性 (*Hepatogastroenterology*. 2002; 49(45): 648-51) あるいは肝内胆管癌を含む胆道癌と *H.bilis* の関連性を報告し (*Carcinogenesis*. 2002; 23(11): 1927-31.) その後胆道癌の高危険群である膵胆管合流異常と *H.bilis* の関連性を見出した (*Br J Surg*. 2010; 97(4): 544-9.) 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はあり、疫学的には胆道癌と *H.bilis* の関連性が強く示唆される。しかしながら、ヒトの盲腸など腸管からは *H.bilis* の菌体も同定されるものの、胆汁あるいは胆管組織における *H.bilis* 感染の証明は DNA 特異的プライマーを用いた PCR による同定のみであり、組織培養を用いたヒト胆道組織からの *H.bilis* の分離あるいは鏡顕法でも *H.bilis* の感染巣を同定は成し得ていない。これらから考えるに、肝内胆管癌の発癌には *H.bilis* の菌体が肝内胆管に存在せずとも、*H.bilis* DNA のみで発癌し得るのではとの発想に至った。

本検討では上記仮定から、特に肝内胆管癌に絞って、ヘリコバクター属菌感染による TLR9 を介した肝内胆管癌発癌機構の解明を検討したが難渋し、まずは *in vitro* での細胞同士の接着検討から行った。

2. 研究の目的

本検討では、DNA 自体が発癌の因子になっているのではと仮定し、特に肝内胆管癌に絞って、ヘリコバクター属菌感染による TLR9 を介した肝内胆管癌発癌機構の解明を検討したが難渋し、まずは *in vitro* での細胞同士の接着検討から行った。

方法：購入したヒト不死化胆管上皮細胞 (MMNK-1) に *H.bilis* を各条件で共培養、細胞由来の炎症性サイトカインや活性酸素種、細胞増殖活性を非共培養群と比較検討した。

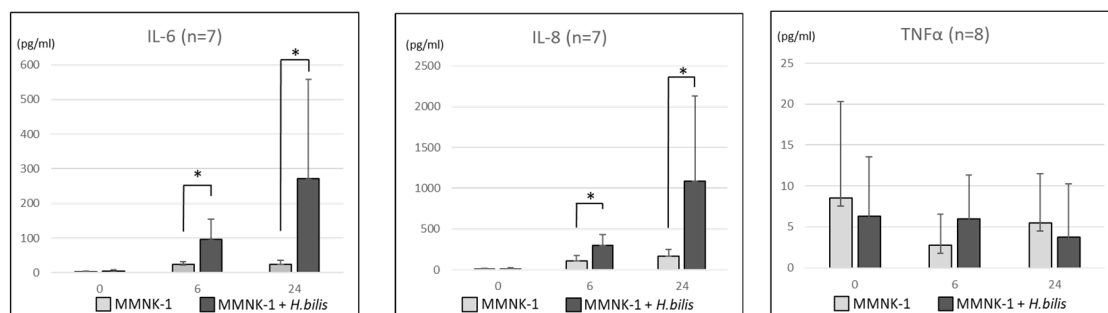
3. 研究の方法

行った検討内容は以下の通り。

- ・ サイトカイン分泌 (0, 6, 24 時間の共培養)
- ・ 活性酸素種の生成 (24 時間, MOI 50, 100 の共培養)
- ・ 細胞増殖能 (24 時間の共培養)
- ・ DNA 損傷 (24 時間の共培養)
- ・ DNA 修復 (24 時間の共培養, mRNA)

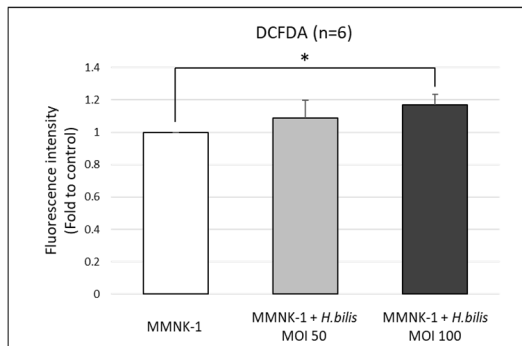
4. 研究成果

- ・ サイトカイン分泌 (0, 6, 24 時間の共培養) :



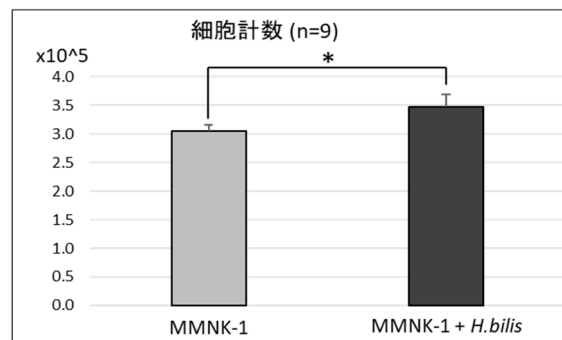
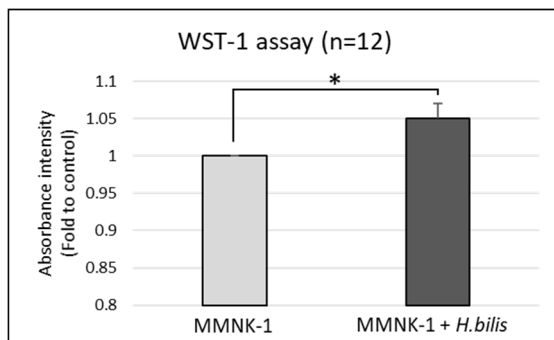
IL-6, IL-8 は *H.bilis* との 6, 24 時間共培養で上昇した。

- ・ 活性酸素種の生成 (24 時間, MOI 50, 100 の共培養)



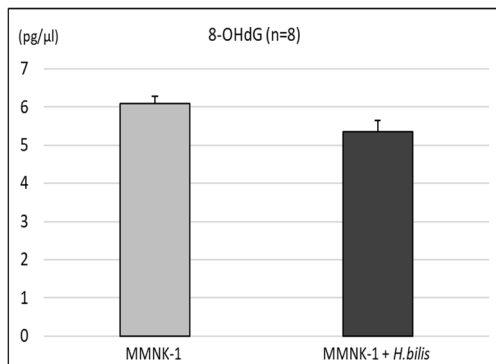
MOI 100 の共培養で活性酸素種の生成は上昇した。

• 細胞増殖能 (24 時間の共培養)



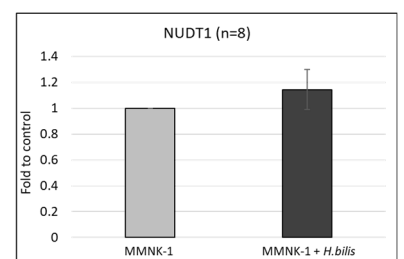
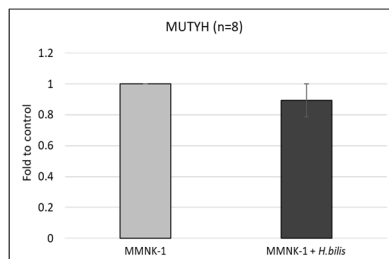
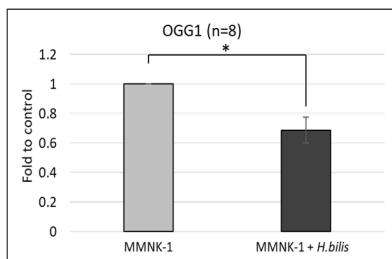
共培養で細胞増殖能は亢進した。

• DNA 損傷 (24 時間の共培養)



活性酸素種による DNA 損傷はみられない

• DNA 修復 (24 時間の共培養、mRNA)



OGG1 は酵素活性の抑制を認めるが、MUTYH と NUDT1 は同程度であった。

まとめ : *H. bilis* の存在により、胆管細胞において炎症性サイトカインを介した炎症が誘発されることが示唆された。また、胆管細胞の DNA にはダメージを与えないものの、活性酸素の生成も確認された。慢性炎症と酸化ストレスは胆管がんの危険因子であるため、*H. bilis* が胆管細胞に及ぼす影響についてさらに検討する必要があると思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 山下万平、足立智彦、大野慎一郎、松村尚美、夏田孔史、日高匡章、金高賢悟、高槻光寿、江口晋
2. 発表標題 Helicobacter bilisが関与する胆道発癌の機序解明
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019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	小坂 太一郎 (Kosaka Taichiro) (00437881)	長崎大学・病院 (医学系)・助教 (17301)	
研究分担者	江口 晋 (Eguchi Susumu) (80404218)	長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・教授 (17301)	
研究分担者	大野 慎一郎 (Ono Shinichiro) (90567174)	長崎大学・病院 (医学系)・助教 (17301)	

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
---------	---------