

令和元年5月17日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15684

研究課題名(和文) H. suis感染胃MALTリンパ腫形成に関わるCXCL13発現メカニズムの解明

研究課題名(英文) The mechanism of gastric MALT lymphoma formation after H. suis infection via the activation of CXCL13

研究代表者

山本 幸司 (YAMAMOTO, KOJI)

北海道大学・医学研究院・特任助教

研究者番号：70608322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヘリコバクター・スuis(H. suis)は、ヒト胃MALTリンパ腫発症に関与している細菌であり、感染マウスにおいては、その100%の確率で胃にMALTリンパ腫を発症することが知られている。近年、申請者は、H. suis感染胃MALTリンパ腫形成にはIFN- $\gamma$ ならびにCXCL13の遺伝子が重要であることを示したが、それらの遺伝子発現との関連性を示すメカニズムは明らかにされていない。申請者は、H. suis感染後の胃で高発現するIFN- $\gamma$ が濾胞性樹状細胞を刺激することでCXCL13が産生され、胃MALTリンパ腫を発症させていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヘリコバクター・スuis(H. suis)は、マウス胃粘膜に感染するとCXCL13と呼ばれる遺伝子が高発現しており、抗CXCL13抗体を用いると胃MALTリンパ腫発症を有意に抑制させることが明らかとなっている。よって、H. suis感染後のCXCL13の発現が胃MALTリンパ腫発症に関与していると考えられる。そこで本研究課題では、H. suis感染からどのようなメカニズムでCXCL13を産生させ、どのように胃MALTリンパ腫を発症させられているかの解明を目的とする。これらの詳細を明らかにすることで胃MALTリンパ腫発症を抑制させる新規治療法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Helicobacter suis (H. suis) infects various animals especially in pigs and humans. Interestingly, it has been reported that H. suis infection is able to induce the formation of gastric mucosa associated lymphoid tissue (MALT) lymphomas in 100% of mice. In addition, we recently reported that the formation of gastric lymphoid follicles following H. suis infection is dependence on the high expression of interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) and CXC chemokine ligand 13 (CXCL13). However, the relationship between the expression of IFN- $\gamma$  and the production of CXCL13 in the stomach of H. suis infected mice remains unclear. In this study, we showed that the expression of IFN- $\gamma$  interacting with IFNGR on FDC produces CXCL13 through the activation of I $\kappa$ B- $\beta$ -NF- $\kappa$ B2 pathway. These results suggest that the interaction between IFN- $\gamma$  and IFNGR is important for CXCL13 production from FDCs and is associated with gastric lymph follicle formation after H. suis infection.

研究分野：感染症と粘膜免疫学

キーワード：Helicobacter suis 胃MALTリンパ腫 濾胞性樹状細胞 インターフェロン  $\gamma$  インターフェロン 受容体 CXCL13

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

*H. suis* は、グラム陰性細菌で、イヌ、ネコ、ブタ、ヒトを含む多くの動物種の胃に感染し、動物からヒトへの伝播が想定されていることから、*H. suis* 感染は、人畜共通感染症の原因菌として想定されている。しかしながら、これまで *H. suis* 感染後に誘導される胃 MALT リンパ腫の詳細な形成メカニズムは明らかにされていない。

これまでに申請者は、*H. suis* をマウスに経口感染させると、その 100% で B 細胞、CD4 陽性 T 細胞、樹状細胞 (DC)、さらに、濾胞性樹状細胞 (FDC) で構成される胃 MALT リンパ腫を発症することを報告した。さらに、*H. suis* 感染後の胃粘膜では、IFN- $\gamma$  の発現が亢進しているが、IFN- $\gamma$  の発現と胃 MALT リンパ腫形成との直接的な関係性は明らかにされていなかった。近年、申請者らは、IFN- $\gamma$  欠損マウスを用いた *H. suis* 感染実験では、野生型マウス胃粘膜で観察されていた胃 MALT リンパ腫形成は 100% 抑制されることが明らかにした。さらに、野生型マウス由来脾臓細胞から個々の細胞を精製し、IFN- $\gamma$  欠損マウスに移入したところ、B 細胞を移入した群において胃 MALT リンパ腫形成が認められたほか、マウス胃粘膜における IFN- $\gamma$  の発現が回復していることが明らかになった。これにより、*H. suis* 感染後に誘導される胃 MALT リンパ腫は、胃粘膜に浸潤した B 細胞から産生される IFN- $\gamma$  の発現上昇により形成されることが明らかとなった。

CXCL13 は、B 細胞の走化性に関与するケモカインであり、その受容体である CXCR5 との相互作用は、リンパ節や脾臓中のリンパ濾胞形成に重要な因子であることが知られている。これまでの報告で、CXCL13 は、B 細胞、T 細胞、DC、ならびに、FDC から産生されていることが知られているが、特に、2 次リンパ組織の形成においては、CXCL13 は、B 細胞の存在下で FDC から産生され、リンパ濾胞形成、維持に必須の役割を担っている。近年、申請者らは、*H. suis* 感染マウス胃 MALT リンパ腫では、B 細胞、ならびに、FDC が多数集積しており、その形成に伴い CXCL13 の発現が増加していることを報告した。さらに、*H. suis* 感染マウスに抗 CXCL13 抗体を投与すると、野生型感染マウス胃粘膜で多数認められた胃 MALT リンパ腫形成が有意に抑制されることも明らかにしており、*H. suis* 感染後に胃粘膜で誘導される CXCL13 の発現上昇が胃 MALT リンパ腫形成に重要な遺伝子であることが示唆される。近年の報告で、免疫細胞に組換え IFN- $\gamma$  を処理すると CXCL13 の発現が誘導されることが報告されており、IFN- $\gamma$  の刺激と CXCL13 産生との関連性が示唆されている。興味深いことに、*H. suis* 感染後の IFN- $\gamma$  欠損マウスの胃粘膜では、CXCL13 の発現が低下していたほか、*H. suis* 感染 IFN- $\gamma$  欠損マウスに野生型マウス由来 FDC を移入したところ、CXCL13 の発現が認められないことも明らかとなっている。これらのことから、*H. suis* 感染後に誘導される胃 MALT リンパ腫発症は、感染後に胃粘膜に浸潤した B 細胞から産生される IFN- $\gamma$  が FDC を刺激する結果、CXCL13 を産生することで、胃 MALT リンパ腫形成が促進されるものと予想される。

### 2. 研究の目的

*H. suis* は、グラム陰性細菌で、イヌ、ネコ、ブタ、ヒトを含む多くの動物種の胃に感染し、動物からヒトへの伝播が想定されていることから、*H. suis* 感染は、人畜共通感染症の原因菌として想定されている。しかしながら、これまで *H. suis* 感染後に誘導される胃 MALT リンパ腫の詳細な形成メカニズムは明らかにされていない。

これまでに申請者は、*H. suis* をマウスに経口感染させると、その 100% で B 細胞、CD4 陽性 T 細胞、樹状細胞 (DC)、さらに、濾胞性樹状細胞 (FDC) で構成される胃 MALT リンパ腫を発症することを報告した。さらに、*H. suis* 感染後の胃粘膜では、IFN- $\gamma$ 、ならびに、CXCL13 の発現が亢進しているが、それらの発現と胃 MALT リンパ腫形成との直接的な関係性は明らかにされていない。近年の報告で、免疫細胞に組換え IFN- $\gamma$  を処理すると CXCL13 の発現が誘導されることが報告されており、IFN- $\gamma$  の刺激と CXCL13 産生との関連性が示唆されている。興味深いことに、*H. suis* 感染後の IFN- $\gamma$  欠損マウスの胃粘膜では、CXCL13 の発現が低下していたほか、*H. suis* 感染 IFN- $\gamma$  欠損マウスに野生型マウス由来 FDC を移入したところ、CXCL13 の発現が認められないことも明らかとなっている。これらのことから、*H. suis* 感染後に誘導される胃 MALT リンパ腫発症は、感染後に胃粘膜に浸潤した B 細胞から産生される IFN- $\gamma$  が FDC を刺激する結果、CXCL13 を産生することで、胃 MALT リンパ腫形成が促進されるものと予想される。そこで本研究では、*H. suis* 感染後の胃粘膜で発現する IFN- $\gamma$ 、ならびに、CXCL13 の相互作用が胃 MALT リンパ腫形成にどのように関連しているのかの宿主分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

本申請では、IFN- $\gamma$  の刺激による濾胞樹上細胞からの CXCL13 産生を介した *H. suis* 感染後の胃 MALT リンパ腫発症との関連性を評価するために、*H. suis* 感染 CXCL13 欠損マウスに精製した濾胞樹上細胞を移入する。その後、組換え IFN- $\gamma$  をマウスに 1 週間に 3 回投与し、感染後の胃 MALT リンパ腫形成を評価する。また、IFN- $\gamma$  刺激後の濾胞樹上細胞から産生される CXCL13 を評価するために、組換え IFN- $\gamma$  を用いてマウスから精製した濾胞樹状細胞に刺激させ、CXCL13 産生を *in vitro* で評価する。さらに、IFN- $\gamma$  刺激後の濾胞樹状細胞から誘導される CXCL13 産生の分子メカニズムを詳細に検討するために、組換え IFN- $\gamma$  を用いて細胞刺激実験を行い、その産生機序を明らかにする。具体的には、以下の計画で行った。

**(1) *H. suis* 感染後の胃 MALT リンパ腫形成と濾胞樹上細胞から産生される CXCL13 との役割 (平成 29 年度)**

**方法;** CXCL13 欠損マウスを 8 時間絶食 (飲水可) 後、*H. suis* 感染マウスの胃粘膜ホモジネート液を経口投与する。これまでの予備実験では、*H. suis* 感染野生型マウスでは、B 細胞、CD4 陽性 T 細胞、DC、さらに、FDC で構成される多数の胃リンパ濾胞形成が認められること、また、それに応じて感染胃粘膜の CXCL13 が感染期間が増すにつれて高い発現を有していること、さらに、抗 CXCL13 抗体を用いた *H. suis* 感染マウスへの投与実験の結果、胃 MALT リンパ腫形成が有意に抑制されることを明らかにしている。さらに、 $1.0 \times 10^6$  個の野生型マウス由来濾胞樹上細胞をフローサイトメトリーを用いて精製し、*H. suis* 感染 CXCL13 欠損マウスに移入する。これまでの予備実験で、*H. suis* 感染により胃粘膜内に浸潤した各々の細胞内の CXCL13 の発現をフローサイトメトリーで評価した結果、他の細胞に比べて濾胞樹上細胞で高い CXCL13 の発現が認められることを既に確認している。その後、感染 2 週間後に組換え IFN- $\gamma$  (100  $\mu$ g/ml) を 1 週間に 3 回マウスに投与し、感染後に、感染マウス胃粘膜における胃 MALT リンパ腫形成を病理学的に評価すると共に、胃粘膜浸潤細胞の種類を免疫染色法で、さらに、CXCL13 発現を定量 PCR 法で検討する。

**(2) *H. suis* 感染胃粘膜に浸潤した細胞上の遺伝子発現解析 (平成 29 年度)**

**方法;** *H. suis* に感染させた野生型マウスから胃を摘出し、1 mM のジチオトレイトール、ならびに、1 mM EDTA で上皮組織を除去後、細胞培養液で 1 mg/ml に調製したコラゲナーゼを用いて、37 °C で 3 時間振盪・混和させる。回収される細胞に対して、B 細胞特異的抗体 (B220、ならびに、CD19)、T 細胞特異的抗体 (CD4、ならびに、TCR)、樹上細胞特異的抗体 (CD11c、ならびに、MHC )、濾胞樹状細胞特異的抗体 (FDC-M1)、ならびに、IFNGR 特異的抗体を用いて染色後、フローサイトメトリーにてマウス胃粘膜に浸潤した各々細胞上の IFNGR の発現を評価する。

**(3) IFN- $\gamma$  の刺激による濾胞樹状細胞からの CXCL13 産生メカニズム (平成 30 年度)**

**方法;** 野生型マウス脾臓を摘出し、0.83% の塩化アンモニウムを用いて赤血球を除去後、B 細胞特異的抗体 (B220、ならびに、CD19)、T 細胞特異的抗体 (CD4、ならびに、TCR Chain)、樹上細胞特異的抗体 (CD11c、ならびに、MHC )、ならびに、濾胞樹状細胞特異的抗体 (FDC-M1) を用いてセルソーターで細胞の精製を行う。精製後、 $1 \times 10^6$  個の各々の細胞を培養皿にまき、コントロール群、組換え IFN- $\gamma$  (1  $\mu$ g/ml)、抗 IFNGR 抗体処理群 (10  $\mu$ g/ml)、ならびに、組換え IFN- $\gamma$  (1  $\mu$ g/ml) と抗 IFNGR 抗体処理群 (10  $\mu$ g/ml) で 24 時間、ならびに、48 時間で刺激実験を行い、刺激細胞の CXCL13 を定量的 PCR 法で、さらに、培養上清中に産生される CXCL13 を ELISA 法で検出する。

**(4) IFN- $\gamma$  刺激後の濾胞樹状細胞から産生される CXCL13 の分子メカニズムの解明 (平成 30 年度)**

**方法;** 野生型マウス脾臓を摘出し、0.83% の塩化アンモニウムを用いて赤血球を除去する。その後、B 細胞特異的抗体 (B220、ならびに、CD19)、T 細胞特異的抗体 (CD4、ならびに、TCR)、樹上細胞特異的抗体 (CD11c、ならびに、MHC )、ならびに、FDC 特異的抗体 (FDC-M1) を用いてセルソーターで細胞の精製を行う。精製後、 $1 \times 10^6$  個の各々の細胞を培養皿にまき、コントロール群、組換え IFN- $\gamma$  (1  $\mu$ g/ml)、抗 IFNGR 抗体 (10  $\mu$ g/ml) 処理群、ならびに、組換え IFN- $\gamma$  (1  $\mu$ g/ml) と抗 IFNGR 抗体 (10  $\mu$ g/ml) 処理群で 1 時間、ならびに、24 時間で処理したタンパク質を抽出する。その後、CXCL13 の産生に関連する転写因子 I  $\kappa$ B-、ならびに、NF- $\kappa$ B2 の活性化を評価する。

#### 4. 研究成果

*Helicobacter suis* (*H. suis*) は、ヒト胃 MALT リンパ腫発症に関与しているグラム陰性細菌であり、感染マウスにおいては、その 100% の確率で胃に MALT リンパ腫 を発症することが知られている。近年、申請者は、*H. suis* をマウスに感染すると、*H. suis* 感染後に誘導される IFN- $\gamma$  ならびに CXCL13 の発現上昇が胃 MALT リンパ腫を発症させる重要な遺伝子であることを明らかにしたが、それら 2 つの遺伝子発現と胃 MALT リンパ腫発症との関連性を示す詳細なメカニズムは明らかにされていない。

申請者は、*H. suis* 感染後の胃 MALT リンパ腫内に存在する B 細胞、T 細胞、樹上細胞 (DC)、ならびに、濾胞性樹上細胞 (FDC) 内の CXCL13 の発現についてフローサイトメトリーで解析したところ、他の細胞に比べて FDC に高い CXCL13 の発現を認めた。また、同様に胃粘膜に浸潤した細胞上の遺伝子発現について網羅的に解析した結果、他の細胞に比べて FDC 上で IFNGR の発現が亢進していることが明らかとなった。また、IFN- $\gamma$  の産生を介した FDC からの CXCL13 産生と胃 MALT リンパ腫発症との関連性を明らかにするために CXCL13 欠損マウスを用いて FDC ならびに組換え IFN- $\gamma$  を投与し *H. suis* 感染後の胃 MALT リンパ腫形成を評価した。結果として CXCL13 欠損マウスでは *H. suis* 感染後の胃 MALT リンパ腫が有意に抑制されていたが、FDC ならびに組換え IFN- $\gamma$  を同時投与した群では胃 MALT リンパ腫形成が野生型マウスと同様に回復されていた。

一方で、胃 MALT リンパ腫を構成する B 細胞、T 細胞、DC、ならびに、FDC をフローサイトメトリーで精製し、各々の細胞を *in vitro* で培養した。その後、各々の培養細胞に対して組換え IFN- $\gamma$  で刺激したところ、FDC において CXCL13 が産生されることが明らかとなった。これまで、*H. suis* 感染においては、感染後の胃粘膜で発現する IFN- $\gamma$ 、ならびに、CXCL13 が胃 MALT リンパ腫形成に直接的に関与していることが示されていたが、本研究で、感染後に誘導される

IFN- は、胃 MALT リンパ腫の構成細胞の 1 つである FDC 上の IFNGR を刺激する結果、CXCL13 産生を促進し、胃 MALT リンパ腫の形成維持に機能していることが示唆された。これらの研究成果により、これまで明らかにされていなかった IFN- -FDC-CXCL13 の各々の相互作用を介した *H. suis* 感染胃 MALT リンパ腫形成の詳細なメカニズムが明らかとなった。今後、これらの分子メカニズムの詳細を明らかにすることで *H. suis* 感染胃 MALT リンパ腫形成における新規治療効果が期待される。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Ohara M, Ohnishi S, Hosono H, Yamamoto K, Yuyama K, Nakamura H, Fu Q, Maehara O, Suda G, Sakamoto N. Extracellular vesicles from amnion-derived mesenchymal stem cells ameliorate hepatic inflammation and fibrosis in rats. *Stem Cells International* 2018 Dec 24;2018:3212643. (査読あり)

2. Sugiura R, Ohnishi S, Ohara M, Ishikawa M, Miyamoto S, Onishi R, Yamamoto K, Kawakubo K, Kuwatani M, Sakamoto N. Effects of human amnion-derived mesenchymal stem cells and conditioned medium in rats with sclerosing cholangitis. *Am J Transl Res.* 2018 Jul 15;10(7):2102-2114. (査読あり)

3. Ohara M, Ohnishi S, Hosono H, Yamamoto K, Fu Q, Maehara O, Suda G, Sakamoto N. Palmitoylethanolamide ameliorates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. *Frontiers in Pharmacology* 2018, Jul 13;9:709. (査読あり)

4. Ogawa H, Iwamoto A, Tanahashi T, Okada R, Yamamoto K, Nishiumi S, Yoshida M, Azuma T\*. Genetic variants of *Helicobacter pylori* type IV secretion system components CagL and CagI and their association with clinical outcomes. *Gut pathogens* 2017, Apr; 21;9:21. (査読あり)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 大原正嗣、大西俊介、山本幸司、湯山耕平、中村秀樹、付慶傑、前原経、須田剛生、坂本直哉. Extracellular vesicles from amnion-derived mesenchymal stem cells ameliorate hepatic inflammation and fibrosis in rats. UEGW2018, 2018 年 10 月

2. Ryo Sugiura, hunsuke Ohnishi, Masatsugu Ohara, Marin Ishikawa, Shuichi Miyamoto, Reizo Onishi, Koji Yamamoto, Kazumichi Kawakubo, Masaki Kuwatani, Naoya Sakamoto. Amnion-derived mesenchymal stem cells ameliorates sclerosing cholangitis in rats. UEGW2018, 2018 年 10 月

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。