

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390107

研究課題名(和文) インターロイキン33を標的としたヘリコバクターピロリ慢性胃病変の予防

研究課題名(英文) Roles of IL-33 in the development of gastritis of Helicobacter pylori-infected mice

研究代表者

筒井 ひろ子 (Tsutsui, Hiroko)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：40236914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,200,000円、(間接経費) 4,560,000円

研究成果の概要(和文)：ヘリコバクターピロリは、胃に慢性感染して、慢性胃炎、胃潰瘍、そして時には胃癌を引き起こす。ヘリコバクターピロリが作る毒素そのものがこれらの病変に関ることが報告されてきたが、宿主であるヒトが持つ免疫応答も慢性胃炎に深く関与する可能性がある。私たちは、胃の粘膜細胞が作るIL-33というたんぱく質が慢性胃炎を起こすのに重要であることを、IL-33やIL-33が作用するたんぱく質が無いマウスを用いて証明した。特に、IL-33はヘリコバクターピロリに対する免疫反応に必要なこと、この免疫反応が胃炎を起こすことを見いだした。

研究成果の概要(英文)：Helicobacter pylori is a Gram-negative bacterium and causes chronic gastritis, peptic ulcer, and gastric cancer in human. It is important to know how the bacterium induces gastric cancer. Deletion of pathogenic factor CagA considerably dampens its ability to induce gastritis in mice, indicating the importance of CagA for the gastric alterations. However, mice deficient in Th1 cell ability can evade the disease even after infection with CagA-positive bacterium. This clearly indicates that host response profoundly participates in the development of gastritis. Here, we found that IL-33 signaling is required for the development of gastritis in mice. In particular, mice deficient in IL-33 or its receptor do not have potential to differentiate into H. pylori-specific Th1 cells. These results suggest that IL-33 signaling might be the target for treatment of H. pylori-induced chronic gastric alterations including gastric cancer.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：細菌学(含真菌学)

キーワード：IL-33 ヘリコバクターピロリ 慢性胃炎 好酸球 IL-33受容体 自然リンパ球 IL-13

1. 研究開始当初の背景

Helicobacter pylori はヒトの胃に慢性感染して、胃・十二指腸潰瘍、萎縮性慢性胃炎、胃癌を引き起こす。*H. pylori* が保有する病原因子の解析は進んでいる。とくに、CagA を強制発現したトランスジェニックマウスは悪性腫瘍を自然発症することからも、がん原性細菌であることが証明されている。しかし、マウス感染モデルでは、宿主の免疫応答の重要性も指摘されている。実際、T細胞やB細胞を欠損する Rag2 欠損マウスに *H. pylori* を gavage で接種しても、野生型マウスで観られる胃炎が誘導されない。野生型の CD4⁺T (Th) 細胞を養子移入した Rag2 欠損マウスに接種すると、*H. pylori* 胃炎感受性となり、野生型マウスと遜色の無い胃炎が形成されるが、interferon (IFN)- γ 欠損 Th 細胞の移入では胃炎が誘導されない。このことから、本胃炎には *H. pylori* 特異的な I 型 helper T (Th1) 細胞が不可欠であることが証明された。

最近、上皮細胞から遊離するサイトカインである interleukin (IL)-33 が、腸管蠕虫感染に対する防御応答に大きく寄与することが証明された。また、既に 2008 年度～2010 年度の科研基盤 (B) で報告したように、*H. pylori* 感染局所には、好中球と平行して好酸球の多数の浸潤が観察された。好酸球の活性化に関わるサイトカイン IL-5 や IL-13、およびケモカインの CCL11 などは IL-33 刺激により直接・間接的に産生誘導される。また、胃粘膜上皮細胞は *IL33* を恒常的に発現することから、*H. pylori* 胃炎に IL-33 が影響する可能性が浮上した。

2. 研究の目的

当該研究計画では、*H. pylori* 感染により誘導される好酸球増多を伴う胃炎における、IL-33 とそのシグナリングの役割を明らかにすることを目的にした。

3. 研究の方法

- (1) 野生型マウス、IL-33 欠損マウス、IL-33 の受容体(R)である IL-1R1L 欠損マウス (ここでは、IL-33R 欠損マウスと表記)、並びに IL-13 欠損マウスの胃にチューブを使って、3 日間連続でマウスに馴化した *H. pylori* SS1 株を接種した。
- (2) 野生型マウス、IL-33 欠損マウス、IL-33R 欠損マウスに *Listeria monocytogenes* を経尾静脈的に接種した。
- (3) 摘出胃の longitudinal 切片を作製し、HE 染色。組織学的検索を行い、胃炎の程度をスコア化した。
- (4) 同系の非感染マウスの骨髓細胞を分離し、GM-CSF と共に培養して樹状細胞 (BMDC) を型通り作製した。BMDC を *in vitro* で *H. pylori* と共に培養して感染し、*H. pylori* 抗原提示細胞として用いた。
- (5) Th 脾細胞を *H. pylori* 抗原提示細胞と共に培養し、培養上清の IFN- γ 、IL-4、IL-5、

IL-13 並びに IL-17 を ELISA で測定し、Th1 細胞、Th2 細胞、Th17 細胞分化について検討した。

4. 研究成果

(1) 好酸球増多を伴う胃炎

健常な野生型マウスの胃には、粘膜固有層を含め白血球の顕著な浸潤は認め無かった。しかし、*H. pylori* を接種して 3 ヶ月を経過すると、粘膜層並びに粘膜固有層に、多数の好酸球と好中球の浸潤を特徴とする顕著な炎症像が観察された。

(2) IL-33 シグナルは *H. pylori* 胃炎発症に重要

胃の粘膜上皮細胞は恒常的に核内に IL-33 蛋白質を発現する (未発表データ) ことから、IL-33 とそのシグナリングの重要性を調べるために、IL-33 欠損マウスと IL-33R 欠損マウスに *H. pylori* を接種して調べた。その結果、野生型マウスは 4 点満点の胃炎スコアの約 3 点のスコアを示したが、IL-33 欠損マウス並びに IL-33R 欠損マウスのいずれもが有意に低値の胃炎スコアを示した (図 1 *; $p < 0.05$, [雑誌論文] ②参照)。このことから、*H. pylori* 感染による胃炎には IL-33 とその受容体を介したシグナリングが重要な役割を果たす可能性が示唆された。さらに、IL-33 は細胞外に遊離して作用する可能性も強く示唆された。

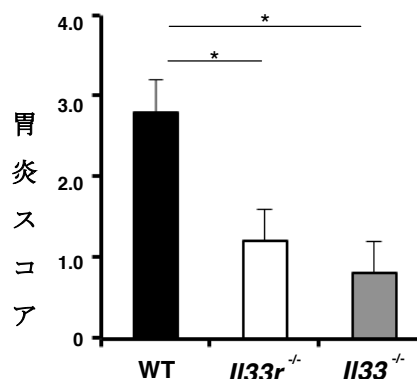


図 1 *H. pylori* 感染 3 ヶ月後の胃炎スコア

(3) IL-33 シグナルは *H. pylori* 感染による Th1 応答に不可欠

背景で述べたように、*H. pylori* 感染による胃炎発症には、Th1 細胞と Th1 細胞から産生される IFN- γ が必須である。そこで、これらの変異マウスに観られる *H. pylori* 胃炎抵抗性が Th1 応答の欠如に基づくのかを検討した。*H. pylori* 感染野生型マウスの脾細胞は、*H. pylori* 抗原提示細胞刺激にตอบสนองして、IFN- γ を産生するだけでなく、IL-13 も産生した。しかし、IL-4 や IL-5、更には IL-17 は産生しなかったことから、Th1 細胞に分化していることが明らかとなった (図 2, [雑誌論文] ②参照)。一方、IL-33 欠損マウスや IL-33R 欠損マウスに *H.*

pylori を感染しても、Th1 細胞分化を示さなかった (図 2)。逆に、Th2 細胞分化や Th17 細胞分化を示すことも無かった。いずれのマウスの Th 脾細胞も、*H. pylori* 抗原提示細胞に対して同等の増殖応答を示したことから、欠損マウスに観られる Th1 細胞分化応答は、*H. pylori* に対する活性かの欠如に基づくものではないことが判明した。

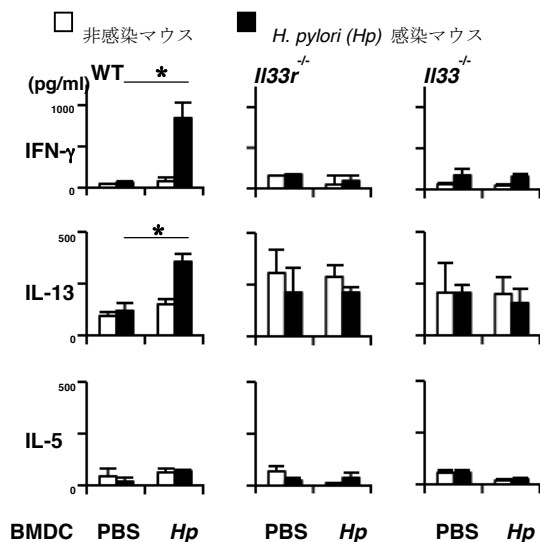


図 2 *H. pylori* 特異的 Th1 細胞分化

(4) IL-33 シグナルは *L. monocytogenes* 感染による Th1 応答には不要

IL-33 シグナルが、細菌感染で誘導される Th1 応答に普遍的に必要なのかを検討するために、細胞内寄生細菌である *L. monocytogenes* 感染実験を行った。*H. pylori* 感染の場合とは異なり、*L. monocytogenes* 特異的な Th1 細胞分化には IL-33 や IL-33R が不要であることが分かった (図 3、未発表データ)。

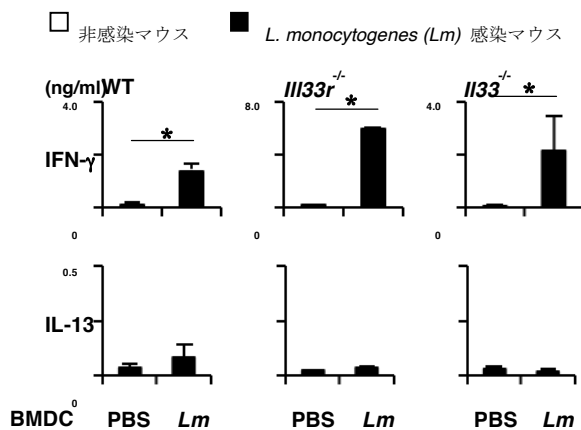


図 3 *L. monocytogenes* 特異的 Th1 細胞分化

(5) T 細胞の IL-33 応答性は *H. pylori* 胃炎に不要

H. pylori 感染に基づく胃炎の発症に IL-33 シグナルを介した Th1 応答が不可欠であることが分かった。加えて、T 細胞そのものの IL-33 応答性が必要なのか否か、検討した。T 細胞の無い Rag2 欠損マウスは、既報通り、*H. pylori* 胃炎抵抗性であった。野生型マウスの脾細胞をあらかじめ移入しておく、Rag2 欠損マウスは *H. pylori* 胃炎感受性となった。想定外であったが、IL-33R 欠損マウスの脾細胞を移入しても、Rag2 欠損マウスは、野生型細胞移入 Rag2 欠損マウスと遜色無く、*H. pylori* 胃炎感受性になった。これらのことから、IL-33 シグナルは T 細胞そのものに必要ではないことが判明した。今後は、IL-33 応答性が必要な細胞の特定を試みると共に、*H. pylori* 感染による Th1 細胞分化に、IL-33 シグナルがどのような分子機序で関与するかを明らかにする予定である。

考察

当該研究成果から、IL-33/IL-33R シグナルは Th1 細胞分化に寄与することで、*H. pylori* 胃炎の発症に深く関与することが分かった。この成果は、大学院生の学位論文として発表した (下記の参考雑誌論文参照)。加えて、T 細胞の IL-33 応答性が不要なことが判明した。しかし、これらの結果だけでは、論文として不十分であると考えられる。特に、IL-33 が作用する標的細胞とその分子機構が全く解明できていない。今後は、IL-33 の標的細胞の代表細胞である II 型自然免疫細胞の重要性とその分子機構を解明する。また、Th1 細胞分化に不可欠な樹状細胞における IL-33 シグナルの関与を解明する。IL-33 応答性の責任細胞において IL-33 がどのような分子メカニズムで当該胃炎に関与するのかを詳細に解明したい。さらに、胃粘膜下層に増多する好酸球が胃炎進展にどのような役割を果たすのかを解明する予定である。これらの検討結果を加えて、原著論文として公刊する予定である。

[参考雑誌論文]

福田典子、谷澤隆邦. *Helicobacter pylori* 感染による好酸球浸潤を伴う胃炎発症における IL-33 の関与.「兵庫医科大学医学雑誌」2014;38:81-87.<査読有り>なお、本論文は学位論文であるため、指導教官の筒井ひろ子は共著者には含まれない。

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)

- ① 内山良介、筒井ひろ子. ヘリコバクター・ピロリ感染による胃炎発症機序の研究. (総説)「化学療法の領域」2012;28:1906-1912. <査読無し>

[学会発表] (計3件)

- ① Uchiyama Ryosuke, Fukuda Noriko, Tsutsui Hiroko. Contribution of IL-33 in induction of gastric inflammation in mice infected with *Helicobacter pylori*. (ワークショップ) 第85回日本細菌学会総会 2013 3 28.長崎
- ② 内山良介 *Helicobacter pylori* 感染によるIL-33 依存的な胃炎発症のメカニズム. 第6回細菌学会若手コロッセウム 2013 8 9. 東京
- ③ Tsutsui Hiroko, Uchiyama Ryosuke. IL-33 signaling contributes to *Helicobacter pylori*-induced gastritis via induction of Th1 response. (シンポジウム) 第86回日本細菌学会総会 2013 3 20.千葉

6. 研究組織

(1) 研究代表者

筒井 ひろ子 (Tsutsui Hiroko)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：40236914

(2) 研究分担者

中西 憲司 (Nakanishi Kenji)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：60172350

(3) 研究分担者

内山 良介 (Uchiyama Ryosuke)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：20456891