

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590924

研究課題名(和文)ヘリコバクター・ピロリと気管支喘息の関連における免疫学的機序の関与

研究課題名(英文)Association between Helicobacter pylori infection and bronchial asthma

研究代表者

荒川 哲男(Arakawa, Tetsuo)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60145779

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：ヘリコバクター・ピロリ感染は胃炎、潰瘍、胃癌と密接な関連があり、病原菌と認識されているが、疫学調査では逆にピロリ感染が気管支喘息発症を予防することが報告されている。動物モデルを用いてピロリ感染が気管支喘息発症に及ぼす影響について検討した。ピロリ感染させたスナネズミに卵白アルブミン感作暴露による喘息を誘導した。喘息はピロリ感染の有無に関わらず同程度に誘導され、浸潤細胞数・種類、サイトカイン濃度、組織評価に差は認めなかった。ピロリ感染は喘息発症に関連がないと示唆された。

研究成果の概要(英文)：Helicobacter pylori infection is pathogens associated with gastritis, peptic ulcers, and gastric cancer. However, epidemiological studies showed a negative association between H. pylori infection and development of bronchial asthma. The aim of the present project was to determine whether H. pylori infection affects development of bronchial asthma in an animal model. We examined effect of H. pylori infection on severity of ovalbumin-induced asthma in Mongolian gerbil. Ovalbumin induced similar severity of asthma, infiltration of inflammatory cells, cytokines, histological changes in both H. pylori infected and non-infected mice. H. pylori infection might not be associated with development of bronchial asthma.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：ヘリコバクター・ピロリ 気管支喘息

1. 研究開始当初の背景

H. pylori 感染は萎縮性胃炎、胃・十二指腸潰瘍、胃癌、胃 MALT リンパ腫、過形成性胃ポリープ、若年者鉄欠乏性貧血、特発性血小板減少性紫斑病など様々な疾患との関連が指摘されている。本邦では中高齢者では非常に感染率が高く、若年者では欧米並みに感染率は低い。2009年ヘリコバクター学会ガイドラインによれば、除菌治療の適応疾患として疾患の種類に関わらず、「*H. pylori* 感染症」として除菌療法が推奨度 A (勧められる疾患)として提示された。しかしながら、最近 *H. pylori* を胃粘膜に棲息する正常な微生物叢として、生体にとって何らかの Benefit が存在する可能性が報告された (Cover & Blaser. Gastroenterology 2009)。すなわち、GERD、バレット食道、食道腺癌、喘息、アレルギー性鼻炎などアレルギー性疾患、他の感染症のリスクを下げる、グレリン・レプチンなど代謝関連ホルモンへの影響が報告されている。

近年、気管支喘息の有病率の増加が指摘されている。本邦でも、小児喘息については福岡での同一地域の調査において、81-83年 5.7%が 93-95年 7.7%、成人喘息でも地域は異なるが明らかな増加傾向が指摘されている。同様にその他のアレルギー疾患であるアトピー性皮膚炎やアレルギー性鼻炎・花粉症も増加している。このようなアレルギー疾患の増加について、衛生仮説 (Hygiene hypothesis) が提唱されている。アレルギー疾患の保有率と同胞数が逆相関することから、生後早期に同胞から感染すること、すなわち非衛生的な環境がアレルギー疾患の発症を予防しているというものである。*H. pylori* との関連では、感染が喘息のリスクを下げることで疫学的な検討により報告されている (Chen Y, et al. J Infect Dis 2008)。

しかしながら、実際に *H. pylori* 感染が気管支喘息の発症に及ぼす影響については不

明な点が多く、関連病態の機序についての基礎的な検討はなされていない。

われわれは、これまでに *H. pylori* に関して、様々な研究 (Dig Dis Sci 1997, Dig Dis Sci 1999, J Clin Biochem Nutr 2009, Digestion 1997, Aliment Pharmacol Ther 2002, Am J Physiol 2004, Inflammopharmacology 2007, Aliment Pharmacol Ther 2003, Dig Dis Sci 2007, J Submicrosc Cytol Pathol 2000, BBRC 2009, Gut 2008) を行ってきており、それらの成果と実験手技を基に今回の研究課題を遂行しようと考えた。

2. 研究の目的

- (1) マウスモデルを用いて、*H. pylori* 感染が卵白アルブミン (OVA, ovalbumin) 惹起性気管支喘息に及ぼすかどうか
- (2) 気道炎症の程度と胃粘膜炎症とが関連があるかどうかを検討する

3. 研究の方法

(1) *H. pylori* 感染マウスにおける OVA 惹起性気管支喘息に及ぼす影響
C57BL/6J マウス (5 週齢) に Sydney strain である *H. pylori* (SS1) を 6×10^7 CFU 経口投与し感染させ *H. pylori* 感染胃炎を作成する。気管支喘息は水酸化アルミニウム (2.25 mg) をアジュバントとして Day 1、14 に OVA, 20 mg を腹腔内感作し OVA 特異的 Th2 細胞を誘導させ、Day 29、30、31 に 1% OVA を吸入暴露し、作製した。*H. pylori* 長期感染 (12 カ月) マウスと非感染マウス (コントロール) を用いて検討した。喘息のコントロール群として、OVA 感作後、PBS 吸入を同様に行った。

気管支喘息の評価は、肺胞洗浄液 (BALF) を回収し、総細胞数を算定するとともに、サイトスピンを用いて BALF 中の浸潤細胞の標本作製し、ギムザ染色により細胞分画を解析した。また BALF 内に含まれる Th2 サイトカイン (IL-5, IL-13) や INF- γ について ELISA 法にて測定を行った。気管支を採取固定し、

病理組織学的検討を行った。

さらに、アレルギー誘導において重要な役割が報告されている好塩基球の関与について、BALF を用いて FACS により検討した。

(2) 気道炎症の程度と胃粘膜炎症との関連についての検討

胃粘膜炎症の評価は、肉眼的・組織学的に *H. pylori* 感染の有無の確認とヘマトキシリン・エオジン染色により、胃炎の程度を評価した。好中球浸潤に関しては MPO 活性を用いて評価した。

ナイーブ T 細胞から Th1、Th2、Th17、Treg 誘導に重要なサイトカイン mRNA の動態を Real-time RT-PCR にて検討する。主なサイトカインとして Th1 系 (IFN- γ)、Th2 系 (IL-4、IL-5、IL-13)、Th17 系 (IL-6、TGF- β 1、IL-17A)、Treg 系 (IL-2、IL-1) を検討した

4. 研究成果

(1) *H. pylori* 感染マウスにおける OVA 惹起性気管支喘息に及ぼす影響

H. pylori 非感染・PBS 暴露群、*H. pylori* 感染・PBS 暴露群、*H. pylori* 非感染・OVA 暴露群、*H. pylori* 感染・OVA 暴露群における喘息惹起の違いについて検討した。

OVA 暴露により、PBS 群に比して BALF 内の総細胞数は有意に増加していた(図1)。

細胞分画の解析では、BALF 中の細胞はマクロファージが主体であり、その他、リンパ球、好中球数・好酸球数を認めた。喘息惹起により、それぞれ浸潤細胞数は有意に上昇していた。特に好酸球増加が顕著であった。しかし、喘息惹起群において *H. pylori* 非感染・感染では、好酸球数を含めて浸潤細胞数に明らかな有意差は認められなかった

ELISA 法による BALF 内のサイトカインは、OVA 暴露により非暴露群と比較して、有意に IL-13 濃度の上昇を認めたが、IFN- γ 濃度の上昇は認めなかった。*H. pylori* 感染の有無で比較したところ、OVA 暴露による IL-13 濃

度は有意差は認められなかった。

FACS による好塩基球は浸潤細胞数が少数であり、有意差は認めなかった。

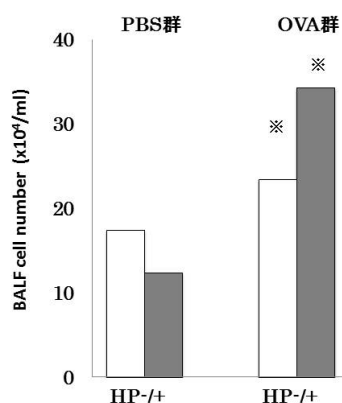


図1. *H. pylori* 感染による BALF 中総細胞数に及ぼす影響

(2) 気道炎症の程度と胃粘膜炎症との関連についての検討

H. pylori 感染群において、すべてのマウスの胃粘膜における感染を確認できた。胃炎の評価は、HE 染色・MPO 活性の測定で行った。*H. pylori* 非感染マウスでは胃炎の変化は認めず、また OVA 暴露により明らかな変化を認めなかったが、*H. pylori* 感染マウスでは、OVA 暴露の有無に関わらず、炎症細胞浸潤、濾胞形成などの胃炎による変化を認めた(図2)。

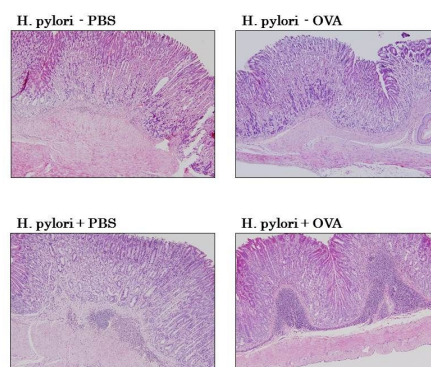


図2. 各群における胃粘膜組織像

MPO 活性についても、*H. pylori* 感染胃粘膜では、非感染胃粘膜に比べて有意に上昇していた (0.21 U/g tissue versus 0.43U/g tissue) が、OVA 暴露の有無では有意差を認めなかった。

胃粘膜炎症の程度と喘息の程度の相関を検討したが、有意な関連は認めなかった。

結語：*H. pylori* 感染は気管支喘息発症に影響を及ぼさないことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1. Watanabe T, Tanigawa T, Shiba M, Nadatani Y, Nagami Y, Sugimori S, Yamagami H, Watanabe K, Tominaga K, Fujiwara Y, Koike T, Arakawa T. Anti-tumour necrosis factor agents reduce non-steroidal anti-inflammatory drug-induced small bowel injury in rheumatoid arthritis patients. *Gut*. 査読有 2014;63:409-14. doi: 10.1136/gutjnl-2013-304713.
2. Tanigawa T, Watanabe T, Otani K, Nadatani Y, Ohkawa F, Sogawa M, Yamagami H, Shiba M, Watanabe K, Tominaga K, Fujiwara Y, Takeuchi K, Arakawa T. Rebamipide inhibits indomethacin-induced small intestinal injury: possible involvement of intestinal microbiota modulation by upregulation of -defensin 5. *Eur J Pharmacol*. 査読有 2013;704:64-9. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.02.010.
3. Nadatani Y, Watanabe T, Tanigawa T, Ohkawa F, Takeda S, Higashimori A, Sogawa M, Yamagami H, Shiba M, Watanabe K, Tominaga K, Fujiwara Y, Takeuchi K, Arakawa T. High-mobility group box 1 inhibits gastric ulcer healing through Toll-like receptor 4 and receptor for advanced glycation end products. *PLoS One*. 査読有 2013;8(11):e80130. doi: 10.1371/journal.pone.0080130.
4. Fujiwara Y, Sugawa T, Tanaka F, Tatsuaki H, Okuyama M, Hayakawa T, Yamamori K, Wada R, Ohtani K, Uno H, Tanigawa T, Watanabe Y, Tominaga K, Watanabe T, Takaishi O, Saeki Y, Nebiki H, Oshitani N, Sato H, Arakawa T. A multicenter study on the prevalence of Eosinophilic Esophagitis and PPI-responsive esophageal eosinophilic infiltration. *Intern Med*. 査読有 2012;51:3235-9. doi.org/10.2169/internalmedicine.51.867
5. Otani K, Tanigawa T, Watanabe T, Nadatani Y, Sogawa M, Yamagami H, Shiba M, Watanabe K, Tominaga K, Fujiwara Y, Arakawa T. Toll-like receptor 9 signaling has anti-inflammatory effects on the early phase of *Helicobacter pylori*-induced gastritis. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有 2012;426:342-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.08.080.
6. Watanabe T, Kobata A, Tanigawa T, Nadatani Y, Yamagami H, Watanabe K, Tominaga K, Fujiwara Y, Takeuchi K, Arakawa T. Activation of the MyD88 signaling pathway inhibits ischemia-reperfusion injury in the small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 査読有 2012;303:G324-34. doi: 10.1152/ajpgi.00075.2012.
7. Nadatani Y, Watanabe T, Tanigawa T, Machida H, Okazaki H, Yamagami H, Watanabe K, Tominaga K, Fujiwara Y, Arakawa T. High mobility group box 1 promotes small intestinal damage induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs through Toll-like receptor 4. *Am J Pathol*. 査読有 2012;181:98-110. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.03.039.
8. Arakawa T, Watanabe T, Tanigawa T, Tominaga K, Otani K, Nadatani Y, Fujiwara Y. Small intestinal injury caused by NSAIDs/aspirin: finding new from old. *Curr Med Chem*. 査読有 2012;19:77-81. DOI: 10.2174/092986712803414105
9. Kohata Y, Fujiwara Y, Machida H, Okazaki H, Yamagami H, Tanigawa T, Watanabe K, Watanabe T, Tominaga K, Wei M, Wanibuchi H, Arakawa T. Role of Th-2 cytokines in the development of Barrett's esophagus in rats. *J Gastroenterol*. 査読有 2011;46:883-93. doi: 10.1007/s00535-011-0405-y.
10. Morimoto K, Hosomi S, Yamagami H, Watanabe K, Kamata N, Sogawa M, Machida H, Okazaki H, Tanigawa T, Nagahara H, Noda E, Tominaga K, Watanabe T, Fujiwara Y, Maeda K, Hirakawa K, Arakawa T. Dysregulated upregulation of T-cell immunoglobulin and mucin domain-3 on mucosal T helper 1 cells in patients with Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol*. 査読

有 2011;46:701-9. doi:
10.3109/00365521.2011.568518.

研究者番号： 70423879

(3)連携研究者 なし

〔学会発表〕(計2件)

1. 木幡幸恵、藤原靖弘、荒川哲男 . 多チャンネル食道インピーダンス-pH モニタリングを用いた PPI 抵抗性 NERD の分類と baseline impedance の関連 . 第 99 回日本消化器病学会総会 2013 年 3 月 23 日、鹿児島
2. 藤原靖弘、須川貴史、荒川哲男 . 酸逆流が関連する好酸球性食道炎の臨床的基礎的研究 . 第 98 回日本消化器病学会総会 2012 年 4 月 20 日、東京

〔図書〕(計2件)

1. 藤川佳子、富永和作、荒川哲男 . 西村書店 . カラー版 消化器病学 基礎と臨床 機能性ディスペプシア 2013 年 総ページ数 1541 ページ、P627-633
2. 藤原靖弘、谷川徹也、山上博一、斯波将次、渡辺憲治、富永和作、渡辺俊雄、荒川哲男 . 最新医学社 . 新しい診断と治療の ABC77 : 機能性食道疾患 GERD と機能性食道障害 2013 年 総ページ数 215 P133-139
3. 荒川哲男 . 医学書院 . 今日の治療指針 急性胃炎・急性胃潰瘍 2012 年 総ページ数 2064 ページ p419-421

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/syoukaki/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

荒川 哲男 (ARAKAWA, Tetsuo)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号： 60145779

(2)研究分担者

藤原 靖弘 (FUJIWARA, Yasuhiro)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号： 40285292

富永 和作 (TOMINAGA, Kazunari)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号： 80336768

渡辺 俊雄 (WATANABE, Toshio)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号： 50336773

谷川 徹也 (TANIGAWA, Tetsuya)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師