

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790155

 研究課題名（和文） ヘリコバクター・ハイルマニイ感染による胃 MALT リンパ腫形成機構の
 解明と治療効果

 研究課題名（英文） Molecular mechanism of gastric MALT lymphoma formation by infection
 with *H. heilmannii*

研究代表者

高橋 哲史 (TETSUFUMI TAKAHASHI)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：40449004

研究成果の概要（和文）：*Helicobacter heilmannii*(*H. heilmannii*)感染による胃 MALT リンパ腫発症時における宿主遺伝子発現解析を行った。その結果、*H. heilmannii* 感染により、宿主胃粘膜において、CD86 依存的な B 細胞活性化パスウェイ中の各種遺伝子群の発現亢進が認められた。さらにこれら胃粘膜では、CD86 抑制系受容体 CTLA4 の発現誘導が認められず、炎症の異常亢進による MALT リンパ腫病態形成機構が明らかとなった。また、本病態には IL-10 が重要な役割を果たしている事が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：In this study, we identified the molecular mechanism of gastric MALT lymphoma formation by infection with *H. heilmannii*. The results showed that the induced expression of several genes in CD86-dependent B cell activation pathway was observed. In this gastric mucosa, CTLA4, which is potent inhibitory receptor of CD80/86 dependent inflammation signal, is not induced regardless the chronic inflammation, resulting MALT lymphoma formation. In addition, we also demonstrated IL-10 is a crucial factor in this MALT lymphoma formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：環境系薬学

科研費の分科・細目：環境系薬学

キーワード：ヘリコバクターハイルマニイ、胃 MALT リンパ腫、細菌

1. 研究開始当初の背景

16S rRNA 遺伝子の配列が明らかにされた *Helicobacter* 属細菌は、これまでに 23 種類が報告されている。これらのうちヒトに対する病原性が確認されているのは、胃に寄生する *H. pylori*, *H. heilmannii* と腸肝循環 (enterohepatic) 菌である、*H. hepaticus*, *H. bilis*, *H. fennelliae* である。また、近縁に位置する *H. heilmannii*, *H. felis*, *H. bizzozeronii*, *H. salomonis*, *H. suis* の 5 種は、*Helicobacter heilmannii*-like organisms (HHL0s) として表記される。

これまで、*H. heilmannii* や *H. suis* をの臨

床での感染率に関する疫学的検討や、HHL0s の病原性に関する基礎研究はほとんど行なわれておらず、その詳細は明らかとなっていなかった。近年、申請者らの検討により胃 MALT (Mucosa-associated lymphoid tissue) リンパ腫感染患者において高頻度に HHL0s 感染が認められ、本菌感染と胃 MALT リンパ腫との関連が示唆されている。これら HHL0s のうち *H. heilmannii* や *H. suis* は培養法が確立しておらず純粋培養が不可能であるため、これら細菌の基礎的研究は困難であった。そこで申請者らは、カニクイサル由来の *H. heilmannii* 感染した C57BL/6 マウスの胃粘膜

懸濁液を非感染マウスに継代投与することにより、*H. heilmannii* の実験的感染モデル系を構築した (Infect. Immun., 2007, 75:1214-1222)。構築した感染モデル系では、感染3ヶ月から全てのマウスの胃底部粘膜層に、臨床での MALT 症状と同様な B 細胞性のリンパ濾胞の形成が肉眼で確認され、本病態をマウスの MALT リンパ腫とした。実験動物を用いて胃 MALT リンパ腫を自然発症させるモデルはほとんど報告されておらず、本モデルは、これまで基礎的検討が行えず不明な点の多かった胃 MALT リンパ腫の病態解析に、非常に有用である。

2. 研究の目的

本研究課題は、*H. heilmannii* 感染による胃 MALT リンパ腫発症の分子機構を明らかにすることを目的とし、本病態において特異的に活性化される宿主シグナル経路を明らかにする。また、本病態形成におけるインターロイキン-10 (IL-10) の役割についても明らかにする。

3. 研究の方法

1) *H. heilmannii* 感染および非感染6ヶ月後の野生型および IL-10KO マウスの胃粘膜より RNA を抽出し、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行う。マイクロアレイにより得られた結果をさらに、KEGG の pathway 解析処理を行う。

2) *H. heilmannii* 感染野生型マウスに対し、アモキシシリン (15 mg/Kg)、クラリスロマイシン (50 mg/Kg)、ランソプラゾール (50 mg/Kg) を1日2回、7日間経口投与し、最終投与1ヶ月後のマウス胃粘膜について、組織学的解析および宿主遺伝子発現解析を行う。

3) *H. heilmannii* 感染マウスの胃粘膜より MALT リンパ腫細胞を分離し、B220、CD3、CD86、CD28、CTLA4 に対する抗体を用いたフローサイトメトリー解析を行う。

4. 研究成果

マイクロアレイ解析および定量的 RT-PCR の結果、胃 MALT リンパ腫形成が認められた *H. heilmannii* 感染野生型マウスの胃粘膜において、CD86、CD28、およびこれらの下流に位置する TNF 受容体スーパーファミリー遺伝子を含む B 細胞活性化に関与する遺伝子群の発現増加が認められた (図1)。

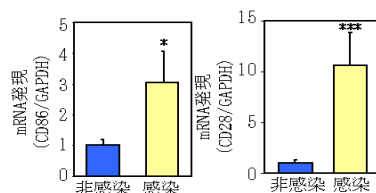


図1. 定量的RT-PCRを用いた*H. heilmannii* 感染マウスにおける遺伝子発現解析

また、除菌治療後のマウス胃粘膜において、これら遺伝子の発現は、胃 MALT リンパ腫を形成する B 細胞の減少 (図2) と共に著明に低下した。

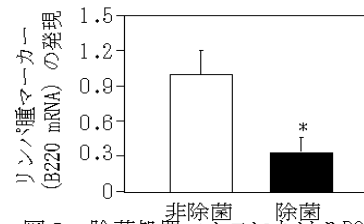


図2. 除菌処置マウスにおけるB220の遺伝子発現解析

一方、IL-10 KO マウスでは、*H. heilmannii* 感染による病態形成の抑制 (図3) と共に、野生型マウスで発現上昇の認められた多くの遺伝子について、遺伝子発現上昇の抑制が認められた。

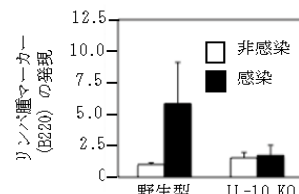


図3. *H. heilmannii* 感染 IL-10KO マウスにおける胃MALTリンパ腫形成抑制

フローサイトメトリー解析の結果、*H. heilmannii* 感染マウスの胃粘膜における CD86 の発現は、B 細胞と共に T 細胞においても認められた。これら CD86 陽性 T 細胞について更に解析した結果、これら細胞の多くが CD86 シグナル抑制系の CD152 に対して陰性を示した。

以上の結果から、本研究により *H. heilmannii* 感染胃粘膜では、CD86 を上流とする遺伝子シグナルが抗原依存的に異常活性化され、これら強固な炎症反応により胃 MALT リンパ腫の病態が形成されることが示唆された (図4)。また、本病態形成に IL-10 が重要な役割を担う事が明らかとなった。さらに、本病態に対する除菌療法の有用性が示唆された。

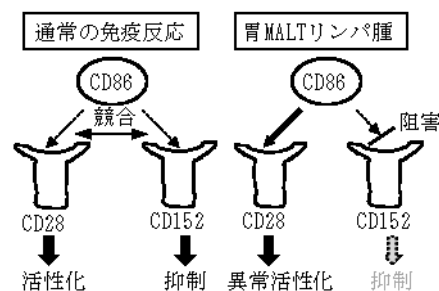


図4. *H. heilmannii* 感染マウスにおける CD86-CD152 シグナル阻害

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) 高橋哲史, 松井英則, 瀧沢麻子, 品川桂子, 小松陽子, 高橋信一, 中村正彦, 土本寛二, *Helicobacter heilmannii* 感染による胃 MALT リンパ腫発症機構の解明と IL-10 の役割, 潰瘍, 査読無, 38 巻, 2011, 118-120

[学会発表] (計6件)

国際学会

(1) Takahashi T., Matsui H., Takizawa A., Takahashi S., Hibi T., Nakamura M., Tsuchimoto K. Induced expression of CD86 in gastric MALT lymphoma by *Helicobacter heilmannii* infection. Digestive Disease Week 2012, San Diego, USA, 20th, May, 2012 (Poster Session).

(2) Takahashi T., Matsui H., Takizawa A., Takahashi S., Hibi T., Nakamura M., Tsuchimoto K. Molecular mechanism of gastric MALT lymphoma formation by *Helicobacter heilmannii* infection. Digestive Disease Week 2011, Chicago, USA, 7th, May, 2011 (Poster Session).

国内学会

(1) 高橋哲史, 松井英則, 瀧沢麻子, 伊香萌菜, 松田唯, 土本寛二, 中村正彦. *Helicobacter heilmannii* 感染惹起胃 MALT リンパ腫病態形成時における CD86 依存的シグナルの活性化. 第31回 Cytoprotection 研究会, 京都, 3月15日, 2013.

(2) 高橋哲史, 松井英則, 瀧沢麻子, 高橋信一, 中村正彦, 土本寛二. *Helicobacter heilmannii* 感染による胃 MALT リンパ腫形成機構の解明と除菌治療の効果. 日本薬学会第132年会, 札幌, 3月30日, 2012年.

(3) 高橋哲史, 中村正彦, 松井英則, 関谷幸江, 土本寛二. *Helicobacter heilmannii* 感染による胃 MALT リンパ腫病態形成時における宿主遺伝子発現の解析. 第39回日本潰瘍学会, つくば, 11月18日, 2011年.

(4) 高橋哲史, 松井英則, 瀧沢麻子, 高橋信一, 土本寛二, 中村正彦. *Helicobacter heilmannii* 感染によるB細胞活性化機構の解析. 第17回日本ヘリコバクター学会学術集会, 富山, 6月25日, 2011年.

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 哲史 (TETSUFUMI TAKAHASHI)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号: 40449004