

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790388

研究課題名(和文)ピロリ菌に含まれる糖脂質による iNKT 細胞の活性化とその機能

研究課題名(英文) Helicobacter pylori cholesteryl alpha-glucosides contribute to immune response by natural killer T cells

研究代表者

伊藤 有紀 (Ito, Yuki)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・助教(特定教員)

研究者番号：10608334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000 円、(間接経費) 1,020,000 円

研究成果の概要(和文)：ヘリコバクター属の細胞壁の構成分子として、コレステリル alpha-グルコース転移酵素(aCgT)から合成されるコレステリル alpha-グルコシド類(aCG類)が知られている。私達はaCG類がピロリ菌感染にどのような影響を及ぼすかを調べた。内視鏡検査で採取されたピロリ菌臨床分離株を用いた結果から、aCgT活性の高いピロリ菌ほど増殖が早く、胃粘膜の萎縮に関与していた。宿主側では、aCG類がインバリアントNKT(iNKT)細胞を活性化し、aCgT活性の高いピロリ菌ほどiNKT細胞に排除される傾向が認められた。これらの点より、aCG類はピロリ菌側と宿主側の双方に重要な役割を果たすことが示唆される。

研究成果の概要(英文)：It has not been determined how cholesteryl alpha-glucosyltransferase (aCgT), which forms cholesteryl alpha-glucosides (aCGs), functions in the pathogenesis of *H. pylori* infection. We show that the activity of aCgT from *H. pylori* clinical isolates is highly correlated with the degree of gastric atrophy. We investigated the role of aCGs in various aspects of the immune response. aCGs were recognized by invariant natural killer T (iNKT) cells, eliciting an immune response in vitro and in vivo. Following inoculation of *H. pylori* harboring highly active aCgT into iNKT cell-deficient (Ja18 KO) or wild-type mice, bacterial recovery significantly increased in Ja18 KO compared to wild-type mice. Moreover, cytokine production characteristic of Th1 and Th2 cells dramatically decreased in Ja18 KO compared to wild-type mice. These findings demonstrate that aCGs play critical roles in *H. pylori*-mediated gastric inflammation and precancerous atrophic gastritis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：ヘリコバクター・ピロリ 臨床分離株 糖脂質 インバリアントNKT細胞

## 1. 研究開始当初の背景

ヘリコバクター・ピロリ(ピロリ菌)は胃に生息するグラム陰性菌で、世界人口の半数に感染しており、慢性胃炎、胃・十二指腸潰瘍に加えて、胃癌や MALT リンパ腫の発症に關与している。ヘリコバクター属の細胞壁を構成する主要な分子としてコレステリル- $\alpha$ -グルコシド( $\alpha$ CGL)と $\alpha$ CGL から合成される誘導体がコレステリル- $\alpha$ -グルコシド類( $\alpha$ CG 類)として同定されている。私達は、以前に $\alpha$ CGL の合成に關与するコレステロール- $\alpha$ -グルコース転移酵素( $\alpha$ CgT)が、胃粘膜深部の粘液に発現している特異的な O-結合型糖鎖によって阻害されることより、ピロリ菌の増殖抑制や形態異常を生じることを報告した(Kawakubo, Ito et al *Science* 2004, Lee et al *Glycobiology* 2008)。

そこで、私達は、 $\alpha$ CG 類がピロリ菌感染にどのような影響を及ぼしているかを調べるため、内視鏡検査によって採取された患者からの臨床分離ピロリ菌(24 株)の $\alpha$ CgT 変異の解析をもとに、 $\alpha$ CgT 遺伝子改変ピロリ菌として、野生株(*H. pylori* 26695)に比べて高い $\alpha$ CgT 活性を示す株、低い同酵素活性を持つ株、 $\alpha$ CgT 欠損株( $\alpha$ CgT<sup>-</sup>)を作製した。これらの $\alpha$ CgT 遺伝子改変株の増殖速度は、 $\alpha$ CgT 活性の強さに依存した。殊に、 $\alpha$ CgT<sup>-</sup>株は著しい増殖の遅延を示し、電子顕微鏡による形態観察でも形態異常が認められたことにより、 $\alpha$ CG 類はピロリ菌の増殖と形態の保持に必須であることが示された。 $\alpha$ CG 類の病理学的役割を調べるため胃生検標本の病理学データと臨床分離株の $\alpha$ CgT 活性を解析すると、 $\alpha$ CgT 活性は胃萎縮の程度と正の相関を示し、 $\alpha$ CG 類が胃粘膜障害に關与していることが示唆された。

しかしながら、 $\alpha$ CG 類が宿主側にどのように免疫担当細胞に認識されるか明らかに

なっていない点より、本研究を行った。

## 2. 研究の目的

本研究は、ヘリコバクター属の細胞壁の構成成分であるコレステリル- $\alpha$ -グルコシド類( $\alpha$ CG 類)によって活性化する iNKT 細胞の病理学および免疫学的な機能を明らかにすることを目的とする。申請者らは、ピロリ菌の $\alpha$ CG 類が免疫担当細胞の一つであるインバリアントナチュラルキラー T(iNKT)細胞の活性化を引き起こすことを明らかにしてきた。本研究では、(1)iNKT 細胞による $\alpha$ CG 類の認識、(2)ピロリ菌感染時における iNKT 細胞による Th1/Th2 サイトカインバランスの制御を明らかにする。更に、(3)ピロリ菌の感染から慢性胃炎・胃癌の進行における iNKT 細胞の機能を解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) *in vivo* レベルでの $\alpha$ CG 類による iNKT 細胞の活性化の測定

マウスより採取した骨髓細胞を GM-CSF 存在下で 1 週間培養し、未熟樹状細胞(未熟 DCs)を誘導した。

未熟 DCs( $1 \times 10^6$ )に化学合成した $\alpha$ CG 類をそれぞれ添加し、24 時間培養後、野生型マウスの尾静脈に注入した。

16 時間後に、肝臓より単核球を回収し、FACS 解析にて iNKT 細胞からの TNF- $\alpha$ および INF- $\gamma$ の発現をフローサイトメトリー法を用いて解析した。

(2)  $\alpha$ CG 類と CD1d 分子との分子間相互作用の解析

組換え可溶化 CD1d タンパク質と化学合成した $\alpha$ CG 類の相互作用を等電点電気泳動法によって解析した。

### (3) ピロリ菌の初期感染における iNKT 細胞の制御機構とネットワークの解明

iNKT 細胞欠損(J $\alpha$ 18 KO)マウスと野生型マウスを用いた $\alpha$ CgT 活性の異なるピロリ菌および *H. pylori* 26695 由来の $\alpha$ CgT 欠損ピロリ菌を 1 日おきに 3 回、経口投与した。

3 回目の菌投与後 10 日後に、胃粘膜を採取した。胃粘膜の半分はホルマリン固定し、胃粘膜の HE 標本を作製し胃粘膜障害の程度を調べた。もう半分の胃粘膜は RT-PCR 法により、IL-4、INF- $\gamma$ などのサイトカインの mRNA の発現を解析した。

### (4) パラフィン包埋胃生検ブロックを用いた iNKT mRNA の定量解析

ピロリ菌感染胃粘膜のホルマリン固定パラフィン包埋生検組織を薄切した。

抽出した total RNA から逆転写反応を経た cDNA を鋳型として、リアルタイム PCR 法によりヒト V $\alpha$ 24J $\alpha$ 18 遺伝子の発現量を定量解析した。

## 4 . 研究成果

(1) *in vivo* レベルの実験より、化学合成した $\alpha$ CG 類のうち、コレステリルホフスアチヂルモノアシル  $\alpha$ -グルコピラノシド( $\alpha$ CPG (monoacyl))が、最も iNKT 細胞が活性化することを明らかにした。

(2)  $\alpha$ CPG (monoacyl)と CD1d 分子の結合を等電点電気動泳法で確認した。

(3) iNKT 細胞欠損(J $\alpha$ 18 KO)マウスと野生型マウスを用いた $\alpha$ CgT 改変ピロリ菌の感染実験の結果より、活性化した iNKT 細胞はピロリ菌の排除に関与していることが明らかになった。ピロリ菌感染では、Th1 細胞が優位であることが知られているが、ピロリ菌の長期感染における免疫反応に Th2 細胞も関与する可能性がある

ことが示唆された

(4) パラフィン包埋胃生検ブロック 7 症例を用いた iNKT mRNA の定量解析を行った。ピロリ菌に感染していないコントロールサンプルの iNKT mRNA 発現量を 1 とすると、ピロリ菌感染群では、iNKT mRNA 発現量が 0.34-37.40 であり、iNKT mRNA の発現は大きく変動していた。

先行研究を含めた一連の研究結果より、 $\alpha$ CgT によって生合成される $\alpha$ CG 類は、ピロリ菌側では菌の増殖に必須であり $\alpha$ CgT 活性が高いほど増殖が速く、その結果、胃粘膜の萎縮をはじめとする炎症の惹起に関与していることが示唆された。一方で、宿主側にとって $\alpha$ CG 類が iNKT 細胞に対する免疫応答を引き起こしてピロリ菌の排除に寄与していることが明らかになった。以上の点より、 $\alpha$ CgT によって生合成される $\alpha$ CG 類は、ピロリ菌側では菌の増殖に必須であり $\alpha$ CgT 活性が高いほど増殖が速く、その結果、胃粘膜の萎縮をはじめとする炎症の惹起に関与していることが示唆される。一方で、宿主側にとって $\alpha$ CG 類が iNKT 細胞に対する免疫応答を引き起こしてピロリ菌の排除に寄与している。一見、正反対に思えるこれらの機能より、 $\alpha$ CG 類がピロリ菌側と宿主側の双方に重要な役割を果たしていることが示唆される。

## 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 . Ito Y\*, Vela JL\*, Matsumura F, Hoshino H, Tyznik A, Lee H, Girardi E, Zajonc DM, Liddington R, Kobayashi M, Bao X, Bugaytsova J, Boren T, Jin R, Zong Y,

Seeberger PH, Nakayama J, Kronenberg M, and Fukuda M. *Helicobacter pylori* cholesteryl  $\alpha$ -glucosides contribute to its pathogenicity and immune response by natural killer T cells. *PLoS One*, 8: e78191, 2013 (\* equal contribution)

〔学会発表〕(計 3 件)

1 . **伊藤有紀** ピロリ菌の持つコレステリル- $\alpha$ -グルコシド類の免疫学的機能 新学術領域研究「自然炎症」「脂質マシナリー」合同若手ワークショップ, 徳島市, 2013年7月2日

2 . **Ito Y**, Vela JL, Matsumura F, Hoshino H, Tyzniz A, Lee H, Girardi E, Zajonc MD, Kobayash M, Bao X, Boren T, Seeberger PH, Nakayama J, Kronenberg M, and Fukuda M. *Helicobacter pylori* cholesteryl  $\alpha$ -glucosides are critical for bacterial growth and activation of invariant NKT cells. Joint Meeting of the Society for Glycobiology and American Society for Matrix Biology, San Diego, USA, 2012年11月12日

3 . **Ito Y**. Pathological and immunological functions of cholesteryl  $\alpha$ -glucosides in *Helicobacter pylori*-associated inflammation. Gordon Research Conference (Glycolipid & Sphingolipid Biology), Lucca, Italy, 2012年4月25日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 有紀 (Ito, Yuki)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンタ

ー・助教(特定教員)

研究者番号: 10608334

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし