

博士論文

論文題目 マウスモデルを用いた*Helicobacter pylori*感染胃炎の
特徴とその発生机序の検討

氏 名 芹澤 多佳子

マウスモデルを用いた *Helicobacter pylori* 感染胃炎の
特徴とその発生機序の検討

東京大学大学院医学研究科 内科学専攻

指導教員 小池和彦教授

芹澤 多佳子

目次

1. 要旨	4
2. 序文(研究の目的と背景)	5
3. 方法	
(1) 動物	8
(2) <i>H. pylori</i> 菌株の培養と感染条件	8
(3) <i>H. pylori</i> 菌培養定量法	9
(4) サイトカイン定量	9
(5) 病理組織学的検討	11
(6) 免疫染色	11
(7) 臨床分離株の解析	13
1) <i>cagA</i> のシーケンス	13
2) 培養細胞	14
3) ウェスタンブロット解析	14
4) IL-8 ELISA 法	16
(8) 統計学的解析	16

4. 結果	
(1) <i>H. pylori</i> 感染マウスモデルの検討	17
(2) <i>H.pylori</i> PMSS1 感染マウスモデルの検討	23
(3) <i>H. pylori</i> 感染胃粘膜における幹細胞マーカーの発現変化	31
(4) <i>H. pylori</i> 感染における IL-1 β の役割	37
5. 考察	44
6. 結語	52
7. 引用文献	53
8. 謝辞	73

要旨

本研究では、病原因子 *cagPAI* が機能している *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 感染マウスの胃粘膜における変化について解析した。*H. pylori* 感染マウスの胃粘膜では、慢性炎症、萎縮、化生性変化、過形成などの病理組織学的変化や、サイトカイン IL-1 β 、TNF- α の上昇を認めた。また、細胞増殖マーカー Ki67 や PCNA、幹細胞マーカー CD44、DCAMKL-1、SOX9 の発現増加を認めた。特に SOX9 の発現領域は化生性変化のマーカーである TFF2 の発現領域に一致しており、SOX9 が化生性変化に関与している可能性が示唆された。さらに *H. pylori* 感染 IL-1R ノックアウトマウスでは wild type マウスよりも病理組織学的変化は軽度であったが、SOX9 発現も低下しており、IL-1 β もしくは IL-1 α が介在する胃炎と SOX9 発現の間に何らかの関係がある可能性が推測された。

序文（背景及び目的）

Helicobacter pylori (*H. pylori*) 感染は、慢性胃炎や胃十二指腸潰瘍、MALT lymphoma、胃癌発症と深く関係している(1, 2, 3)。特に胃癌との関連については、これまでのいくつかの疫学的研究によって明らかにされ(4 - 12)、1994年には世界保健機構/国際癌研究機構 WHO/the International Agency for Research on Cancer (IARC) により、人の胃癌の group1 definite carcinogen として定義されている(13)。

H. pylori は1984年に Marshall、Warren により発見されたグラム陰性桿菌であり(14)、重要な病原因子の一つである *cagPAI* (cytotoxin-associated gene pathogenicity island) を持つ菌株は、持たない菌株より発癌に強く関係しているといわれている(15, 16)。これまでの疫学的研究からも、*cagA* 陽性の *H. pylori* に感染した人のほうが、*cagA* 陰性の *H. pylori* に感染した人よりも、炎症の程度が強く、発癌のリスクが増加することが報告されている(17, 18)。

cagPAI は全長約 40kb、約 30 の遺伝子から成り、type IV secretion system (T4SS) を code している。*cagPAI* 陽性の *H. pylori* は感染した胃粘膜上皮の転写因子 nuclear factor κ B (NF- κ B) や、mitogen-activated protein kinase (MAPK) を活性化させ、interleukin-8 (IL-8) の誘導、IL-1 β や IL-6、tumor necrosis factor alpha (TNF- α) などの炎症性サイトカイン産生、細胞の増殖、アポトーシスなどに関与している(19 - 21)。IL-8 は *H. pylori* 感染によって持続的に産生され、好中球やリンパ球を感染胃粘膜へ集積させ、病態の発症に深く関わっている(21 - 25)。IL-1 β も *H. pylori* 感染によって産生が増加す

るが、胃酸分泌の抑制に関与したり(26, 27)、腫瘍に対する免疫力を抑制する MDSC (myeloid- derived suppressor cells) を誘導することが報告されている(28, 29)。また、これらのサイトカインの遺伝子の多型が胃炎や胃癌と関係しているといわれており(30 - 38)、*Helicobacter* 感染による萎縮性胃炎や胃癌発症の機序を考える上では、宿主側の遺伝的要素を考慮することも必要不可欠である。

H. pylori の病原性については、培養細胞を用いた検討、感染動物モデルを用いた検討がある。これまでの *Helicobacter* 感染 C57BL/6 マウスモデルとして、*Helicobacter felis* (*H. felis*) 長期感染によって、慢性胃炎(39, 40)、粘膜萎縮(41)、化生性変化や異形成(42 - 45)、胃癌(46, 47)を発症することや、*Helicobacter pylori* Sydney strain-1 (*H. pylori* SS1) 株の長期感染によって、慢性胃炎、化生性変化や異形成を発症することが報告されてきた(48, 49)。*Helicobacter* 感染マウスの胃粘膜の病理組織像では、感染初期には炎症細胞の浸潤、その後に壁細胞や主細胞が消失した状態の萎縮が起こり、化生性変化が出現する。萎縮粘膜では、消失した壁細胞や主細胞の代わりに増殖細胞や腺管頸部の分泌細胞などが置き換わっている(50)。胃粘膜の化生性変化として、腸上皮化生(intestinal metaplasia)と SPEM (spasmolytic polypeptide expressing metaplasia)がある。腸上皮化生は、腸上皮類似の杯細胞やパネート細胞、PAS 陽性の刷子縁を有する吸収上皮細胞などが増殖し、固有胃底腺と置き換わった状態である(51)。SPEM は、幽門腺細胞の形質をもち、TFF2 (trefoil factor2) を発現した粘液細胞の出現を特徴とする(52 - 57)。

腸上皮化生はヒトの胃癌の発生母地と一般に考えられている (58, 59) が、SPEMのほう
がむしろ腸上皮化生よりも発癌と深く関連しているとの報告がある (60 - 62)。ヒトの
場合は *H. pylori* 感染によって腸上皮化生と SPEM の両方が認められるのに対し、マウス
の *Helicobacter* 感染胃炎では腸上皮化生は出現せず、SPEM のみが認められる (51, 63,
64) が、このような違いの原因については、まだ十分に解明されていない。

本研究の目的は、マウスモデルを用いて *H. pylori* 感染による慢性胃炎、化生性変化、
胃癌発症の機序を検討することである。これまで *Helicobacter* 感染モデルで用いられ
ていた *H. felis* と *SSI* 株は、*cagPAI* を有していない菌であるため (65, 66)、*cagPAI* 陽性
の *H. pylori* 感染によって引き起こされるヒトの胃炎の病態を十分に模倣していない
可能性がある。*H. pylori* 感染で汎用されている *SSI* 株はマウス胃粘膜への生着菌量は
 10^6 - 10^7 cfu/g tissue と高く、長期に感染が持続するが、*cagPAI* を構成する *cagY* が機
能していない点のみが *PMSSI* 株と異なっている。一方最近、用いられるようになって
きた *PMSSI* 株は、*SSI* より後で発見された *cagPAI* が機能している菌株で、*in vitro* の
実験では NF- κ B の活性化や IL-8 誘導能があることが報告されており、*in vivo* の実験
では *SSI* 株感染マウスよりも強い炎症を発症することが報告されているが、長期感染
マウスモデルの報告はまだない。そこで本研究では、臨床分離株等を用いて East Asian
type の *cagPAI* 陽性の *H. pylori* 感染モデルの樹立と、*cagPAI* 陽性 *H. pylori* 感染による
胃炎の発生の機序の解明を試みた。

方法

(1) 動物

6週齢の雄 C57BL/6 マウスを CLEA Japan, Inc (Tokyo, Japan) より購入、IL-1 receptor ノックアウト (IL-1R^{-/-}) マウスを Jackson Laboratory より購入した。マウスは標準的な飼育環境下 (室温 23°C ± 2°C、湿度 55% ± 5%、12/12 時間の明暗周期) で、市販の食餌 (CLEA Japan) と水を与えて飼育した。以下、動物実験に関連するすべての手順については、東京大学動物実験実施マニュアル及び東京大学医学部動物実験指針に従って行った。

(2) *H. pylori* 菌株の培養と感染条件

H. pylori 臨床分離株は、内視鏡所見上慢性胃炎、十二指腸潰瘍あるいは胃潰瘍の既往がある患者から生検にて採取した *H. pylori* 菌 10 株を用いた。PMSSI 株は Anne Müller 教授 (Institute of Molecular Cancer Research, University of Zürich) より、SSI 株は Hazel Mitchell 教授 (School of Biotechnology and Biomolecular Sciences, University of New South Wales, Sydney, Australia) より供与を受けた。7.5% 牛胎児血清 (FBS) と、Glaxo selective supplement A (10 mg/L vancomycin, 3.3 mg/L polymyxin B, 20 mg/L bacitracin, 10.7 mg/L nalidixic acid, and 5 mg/L amphotericin B) を含んだ Brucella Broth (Becton Dickinson, Cockeysville, Maryland) プレート培地にて微好気性条件下

(Aeropack System、Mitsubishi Gas Chemical Co. Tokyo, Japan)、37°Cで培養した。48時間後、プレート培地より *H. pylori* のコロニーを採取し、Brucella Broth 液体培地に希釈し、さらに24時間培養した。*H. pylori* 感染マウス群に、投与前24時間の絶食後、100µl の 1.0×10^8 CFU (colony-forming units) の菌液を経口的にカテーテルを用いて胃内投与した。投与回数は2日置きに1週間で計3回投与した。*H. pylori* 非感染マウス群には同量の Brucella Broth 液体培地を投与した。感染後、3週、6週、12週、24週、48週、72週にそれぞれ屠殺した。摘出した胃の1/2は病理組織用とし、1/6は菌の培養定量法、残りの1/3はタンパク、DNA、RNA解析用に-80°Cで保存した。

(3) *H. pylori* 菌培養定量法

胃内に生着した菌の定量は既報 (67)に従って行った。まず、摘出した胃を大彎切開し、1/6を Brucella Broth 液体培地に入れてホモジナイズし、Brucella Broth 液体培地にて10倍、100倍、1000倍に希釈した後、それぞれ10µlずつ Brucella Broth プレート培地に塗布し、好気性条件下で37°C、5日間培養した。生育したコロニーはウレアーゼ活性により *H. pylori* と同定した。プレート上のコロニー数を計測し、一つの胃あたりのCFUsを \log_{10} で表示した。

(4) サイトカイン定量

- RNAのRT-PCR定量

マウスの胃の組織から NucleoSpin RNA II (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan) kit を用い、添付のプロトコールに従って RNA を抽出した。抽出した RNA は ImProm- II™ Reverse Transcriptase System (Promega Corp., Wiaconain, USA) を使用し、同キットの手順に従って逆転写反応を行い、1st strand cDNA へと変換した。合成した 1st strand cDNA をテンプレートとした定量 PCR はインターカレーション法に基づいた検出法である FastStart Universal SYBR Green Master (Roche Applied Science) を用い、ABI 7000 Real-time PCR System (Life Technologies Corp.) を用いて行った。以下に使用したプライマーを示した。

IL-1 α	forward	5'- AAGTTTGTGCATGAATGATTCCCTC-3'
	reverse	5'- GTCTCACTACCTGTGATGAGT -3'
IL-1 β	forward	5'- AACGTGTGGGGGATGAATTG-3'
	reverse	5'- CATACTCATCAAAGCAATGT -3'
TNF- α	forward	5'- CATCTTCTCAAATTCGAGTGACAA-3'
	reverse	5'- TGGGAGTAGACAACGTACAACCC -3'
GAPDH	forward	5'- ATCAACGACCCCTTCATTGAC -3'
	reverse	5'- CCAGTAGACTCCACGACATACTCAGC -3'

・ IL-1 β ELISA 法

H. pylori 感染マウスの胃の組織を Lysis Buffer (50mM pH7.6 Tris-Hcl、1% TritonX-100、5mM EDTA 、1mM Na₃VO₄、 protease inhibitor cocktail tablets (complete Mini, F-Hoffmann-La Roche, Ltd., Basel Switzerland) 1T/10ml) を添加して溶解後、15000回転 x 15分間遠心分離し、得られた上清のタンパク濃度を Bio-Rad Protein Assay を使用し、そのプロトコールに従って測定した。算出したタンパク濃度から、各サンプルのタンパ

ク濃度を均一にし、ELISA MAXTM Standard SET Mouse IL-1 β (Biolegend Inc. San Diego, CA)を用いて測定した。

(5) 病理組織学的検討

摘出した胃の半分を 10%緩衝ホルマリン液 (pH 7.4)により固定した。病理組織学的検討用に処理し、パラフィン包埋した切片を幽門腺部領域から胃底腺部領域が一つの切片に入るような形で3枚内切り出し、ヘマトキシリン・エオジン(H&E)染色を行った。胃炎の程度は参考文献(68, 69)に準じ、i) 慢性炎症、ii) 萎縮、iii) 化生性変化、iv) 過形成の4項目について、それぞれ0~6点で評価した。

(6) 免疫染色

- ・ 免疫組織化学染色

壁細胞の指標として、抗 H/K-ATPase マウスモノクローナル IgG 抗体 (Medical & Biological Laboratories co.,LTD、200 倍希釈)、増殖細胞の指標として抗 Ki67 ラビットポリクローナル IgG 抗体 (abcam、200 倍希釈)と抗 PCNA ラビットポリクローナル IgG 抗体(Santa Cruz Biotechnology, INC.、200 倍希釈)を用いた。SPEM の指標として用いた TFF2 マウスモノクローナル IgM 抗体は、当大学胃食道外科 准教授 野村幸世先生より供与して頂いた。幹細胞マーカーの指標として、抗 SOX9 ラビットポリクローナル IgG 抗体(Santa Cruz Biotechnology, INC.、100 倍希釈) 、抗 CD44 ラットモノクロー

ーナル IgG2b 抗体 (Bio-Rad Company、100 倍希釈)、抗 DCAMKL-1 ラビットポリクローナル IgG 抗体 (ABCAM PLC、200 倍希釈) を用いた。

TFF2 以外の免疫化学染色以下のように行った(67)。ホルマリン固定パラフィン包埋切片をキシレン、アルコールにて脱パラフィンを行い、蒸留水で洗浄後に 10mM のクエン酸緩衝液にて 20 分間加熱沸騰することにより抗原賦活化を行った。蒸留水で 3 回洗浄後、3% 過酸化水素水を 5 分間室温にて反応させ、内因性ペルオキシダーゼを除去した。PBS-T にて 3 回洗浄後、発色までの操作は VECTASTAIN Elite ABC kit (Vector Laboratories, Inc. CA, USA) を用いて、添付のプロトコールに従って行った。DAB 発色を行い、水道水で洗浄後にヘマトキシリンにて核染色を行った。アルコール、キシレンにて脱水処理後、包埋した。一次抗体は 4°C で一晩インキュベートした。

TFF2 に関しては、上記と同様に内因性ペルオキシダーゼ除去を行った後、M.O.M. Immunodetection Kit (Vector Laboratories, Inc. CA, USA) を用いて使用説明書に従い処理を行った。一次抗体をのせて 4°C で一晩インキュベート後、PBS にて洗浄し、200 倍希釈した二次抗体の Goat Anti-Mouse IgM, Human ads-HRP (Southern Biotech) をのせて 1 時間室温にてインキュベートした。PBS にて洗浄後、上記と同様に DAB による発色後、ヘマトキシリン核染色、脱水処理し、Clarion Mounting Medium (Biomedica Corp., CA, US) で封入後、カバーガラスをのせて光学顕微鏡にて観察した。また、化生性変化の評価のためアルシアンブルー染色 (pH 2.5, Sigma-Aldrich) を使用説明書に

従い行った。

- ・ 蛍光免疫染色

SOX9の発現部位を同定するため、biotinylated GSII (Vector Laboratories, Inc. CA, USA) とSOX9の二重染色を行った。前述のように脱パラフィン、抗原賦活化を行った後、正常ヤギ血清にて1時間ブロッキングを行い、その後AVIDIN/BIOTIN Blocking Kit (Vector Laboratories, Inc. CA, USA) を用いて添付プロトコールに従いブロッキングを行った。その後100倍希釈した抗SOX9抗体、3000倍希釈した抗GS II 抗体をのせて4°Cで一晩インキュベートした。PBS-Tにて3回洗浄後、1000倍希釈したAlexa Fluor 555 標識二次抗体(Life Technologies Corp.)で1時間室温・暗室にてインキュベートした。PBSにて洗浄後、PBSにて1000倍希釈したHoechst 33342 (Dojindo Molecular Technologies, Inc. Kumamoto, Japan) を室温下に1分間反応させ、PBSにて洗浄し、Fluorescence Mounting Medium (Daco)で封入し、カバーガラスをのせ、蛍光顕微鏡で観察した。

(7) 臨床分離株の解析

1) *cagA* のシーケンス

*H. pylori*菌のペレットから、Cepa Gene (EIDIA Co., Ltd.) を用いて添付のプロトコールに従ってDNAを抽出し、*cagA* 遺伝子についてPCR ダイレクトシーケンス法を用いて解析した。シーケンスには以下のプライマーを使用した(69)。

			Location
cagA	forward	5'-AACAGGACAAGTAGCTAGCC-3'	2,700–2,719*
	reverse	5'-TATTAATGCGTGTGTGGCTG-3'	3,400–3,381*

(*GenBank accession no)

DNAポリメラーゼはAmpli Taq Gold (Life Technologies Corp)を使用した。PCRによって目的の長さのDNAが確認できた産物を、QIAquick PCR purification Kit (Qiagen)で精製し、Big Dye Terminator Cycle Sequence Kit (Life Technologies Corp)でシーケンス反応を行った。最後にDye Ex2.0 Spin Kit (Qiagen)を用いて反応産物を精製し、ABI 3100 Genetic Analyzer (Life Technologies Corp)にて塩基配列を解析した。

2) 培養細胞

ヒト胃癌細胞 AGS 細胞は ATCC より入手した。細胞培養液として、FBS 10%、抗生剤としてペニシリンーストレプトマイシン液 (Life Technologies Corp., USA)を 1% 添加した Nutrient Mixture F-12 HAM: Ham's F12 を用いた。すべての細胞は 37°C、5% CO₂ を含む環境下で培養した。

3) ウェスタンブロット解析

i) *H. pylori* 臨床分離株 10 株のペレットを 1x sampling buffer 30μl にて回収し、95°Cで 5 分間静置し、変性処理を行った。

ii) AGS 細胞を 12 ウェルマイクロプレートに 1 ウェルあたりそれぞれ 2.0×10^5 cells まき、一晩インキュベートし、その後 FBS、抗生剤が添加されていない Nutrient Mixture F-12 HAM: Ham's F12 に交換し一晩インキュベートを行った。その後数種類の *H. pylori* 菌株を AGS に感染させ、1 時間後に回収した。感染 AGS 細胞は、PBS にて 3 回洗浄の後、12 ウェルマイクロプレートの 1 ウェルあたり 1x sampling buffer 150 μ l にて回収し、95°C で 5 分間静置し、変性処理を行った。

上記 i)、ii) のサンプルは、10% ポリアクリルアミドゲル (SuperSepTM Ace ; Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) にアプライし、SDS-PAGE にて展開した。その後、PDF 膜 (Pall Life Science, Port Washington, NY) へと転写し、0.1% Tween20 (Wako Pure Chemical Industries Co., Ltd, Osaka, Japan) Tris buffered saline: T-TBS で溶解した 5% (w/v) スキムミルクで室温下にて 1 時間ブロッキングを行った。その後、T-TBS で 3 回洗浄し、5% ウシ血清アルブミン Bovine Serum Albumin: BSA (Wako Pure Chemical Industries Co., Ltd, Osaka, Japan) TBS 溶液で 1000 倍釈した一次抗体を 4°C で一晩インキュベートした。T-TBS で 3 回洗浄後、最後に HRP を ECL plus (Amersham International plc, mersham Place, England) で発色し、LAS3000mini (FUJIFILM Corp., Tokyo, Japan) により検出した。抗 CagA 抗体、抗 CagM 抗体は小椋啓司先生より供与頂いた。抗 p-IkBa ラビットモノクローナル IgG 抗体 (#2859、1000 倍希釈)、抗 p-SAPK/JNK ラビットポリクローナル IgG 抗体 (#9251、1000 倍希釈)、抗 p-Erk1/2 ラビットモノクローナル IgG 抗体

(#9101、1000 倍希釈)、p-p38 MAPK ラビットモノクローナル IgG 抗体 (#9215、1000 倍希釈)は Cell Signaling Technology より、抗 β -Tubulin マウスモノクローナル IgG 抗体 (T4026、1000 倍希釈)は、Sigma Aldrich より購入した。

4) IL-8 ELISA 分析

24 ウェルマイクロプレートに AGS 細胞を 1 ウェルあたり 1.0×10^4 個まき、*H. pylori* を 1 ウェルあたり 1.0×10^6 CFUs 感染させ、24 時間後に上清を回収した。IL-8 タンパク濃度は Human Interleukin-8 Enzyme Immunoassay kit (BioSource International, Inc, California, USA)を用いて、説明書に従って行った。

(8) 統計学的解析

得られたデータは平均±標準誤差で示した。2 群の統計学的有意差の解析には Mann-Whitney *U* test を用いた。P<0.05 を統計学的有意とした。

結果

(1) *H. pylori* 感染マウスモデルの樹立

1) マウス感染 *H. pylori* 菌株の樹立

内視鏡所見で、慢性胃炎、十二指腸潰瘍あるいは胃潰瘍瘢痕のある 10 人の患者から生検にて採取した *H. pylori* 菌液を 6 週齢の雄の C57BL/6 マウスに感染させた。これらのマウスに持続感染した菌株を回収し、*cagA* のシーケンスを行い、East Asian type の *cagA* を持つ菌株であることを確認した(図 1)。回収した菌株のうち、*cagA*、*cagPAI* を構成する *cagM* 陽性の菌株を 6 週齢の雄の C57BL/6 マウスに再度感染させ、安定して感染した菌株を Mouse Adapted Clinical Strain (MACS) の MACS3、MACS4、MACS5 とした。さらに *cagA*、*cagM* を持っていない菌株を 6 週齢の雄の C57BL/6 マウスに再度感染させ、6 週安定して感染した菌株を MACS6 として樹立した(図 2)。

まずこれらの菌株と、すでに樹立されている、Western type の *cagA* を有する *PMSS1*、*SSI* 株の *cagPAI* の機能について、感染した AGS 細胞の NF- κ B、MAPK 経路の活性化と、IL-8 誘導能によって確認した。これらのマウス感染臨床分離株 (MACS3~MACS6) の *cagPAI* 陽性の菌 MACS3~MACS5 株を感染させた AGS 細胞では p-I κ B α 、p-JNK、p-Erk、p-p38 の増加を認めた (図 3)。また、その上清を用いて IL-8 ELISA を行った結果、*cagPAI* 陽性の菌株では IL-8 の上昇が認められた(図 4)。

以上より、*cagPAI* が機能的で、*cagA* タンパクを持つ臨床分離株のマウス感染モデルを樹立した。

図1.

1	TGQVASPEEPIYAQVAKKVS	SAKIDQLNEATSAINRKIDRINKIASAGKGVGGFSGARSS	60
1	AGQAASPEEPIYAQVAKKVS	SAKIDQLNEATSAINRKIDRINKIASAGKGVGGFSGARSS	60
1	TGQVASPEEPIYAQVAKKVN	AKIDQLNQAAASGLGGVQAGFPLKRHDKVDDLSKVGRSVS	60
61	PEPIYATIDDEANQFPLRRS	AAVNDLSKVGLSREQLTRRIGDLNQAVSEAKTGHFDNLE	120
61	PEPIYATIDDEANQFPLRRS	AAVNDLSKVGLSREQLTRRIGDLNQAVSEAKTGHFDNLE	120
61	PEPIYATIDDLGGPFPLK	KKHAKVEDLSKVGLSREQLTQKIDNLNQAVSEAKAGFFGNLE	120
121	QKIDELKDSTKKNALKLW	VESAKQVPTSLSAKLDNYATNSHTRIN	165
121	QKIDELKDSTKKNALKLW	VESAKQVPTGLQAKLDNYATNSHTRIN	165
121	QTIDNLKDSTKKNPMNL	WAVESAKRVPAASLSAKLDNYATNSHTRIN	165

図1. *cagA* のシーケンス
 (上段：臨床分離株、中段：J198 株 (East Asian type)、下段：PMSS1 株)
 回収された菌は、East Asian type の *cagA* を有していた。

図2.

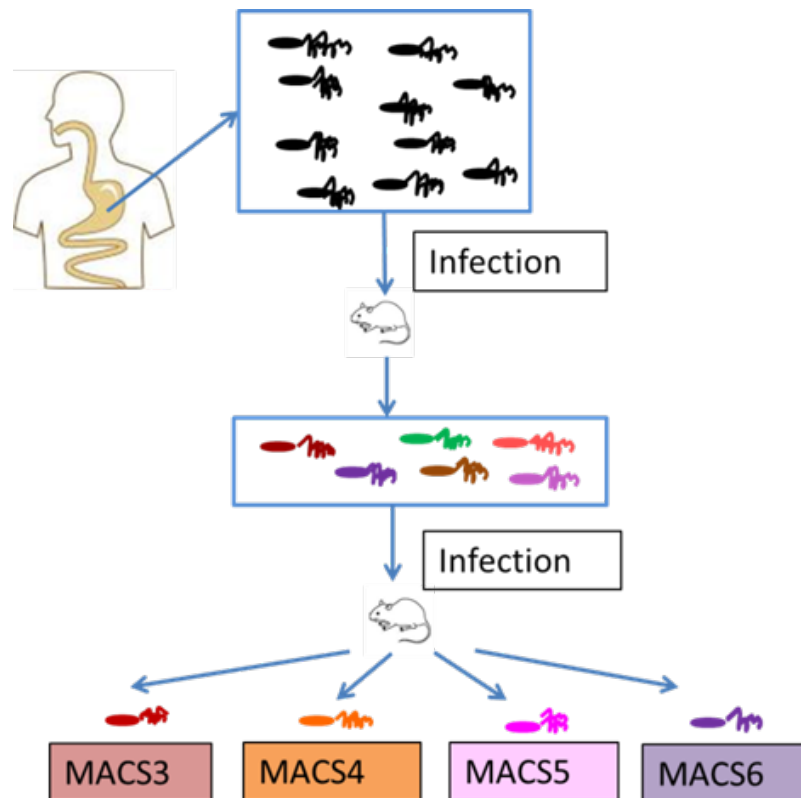


図2. *H. pylori* 感染マウスモデルの樹立方法

図 3.

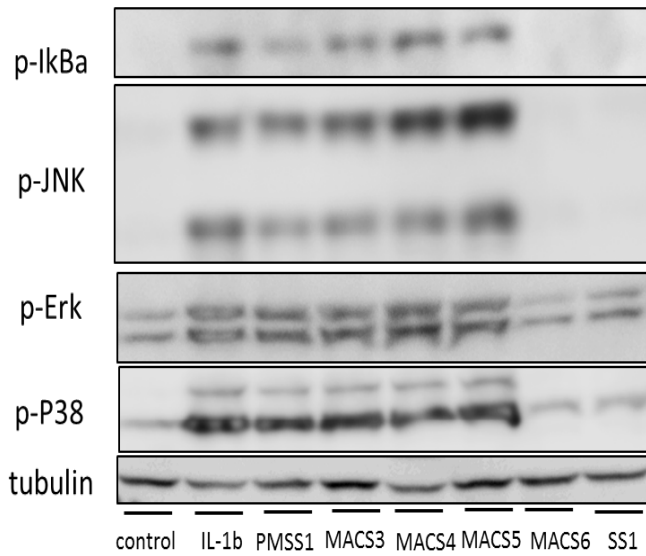


図 4.

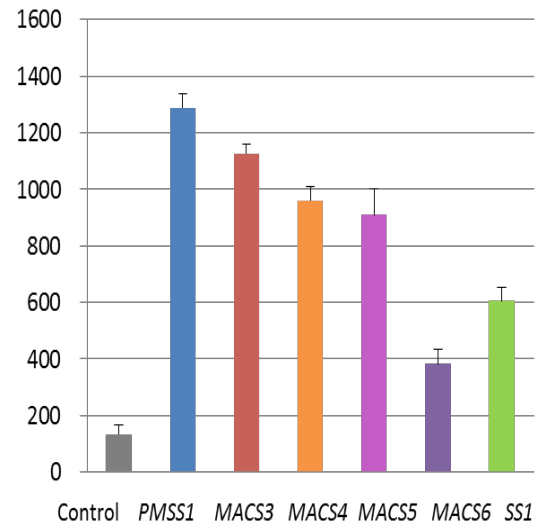


図 3. 臨床分離株感染 1 時間後の AGS 細胞のウエスタンブロット
cagPAI 陽性菌株感染では、p-IκBα、p-JNK、p-Erk、p-p38 の増加が認められた。

図 4. 臨床分離株感染 AGS 細胞の IL-8 ELISA
cagPAI 陽性菌株感染 24 時間後の培養上清では IL-8 の増加が認められた。

2) 樹立した *MACS3*~*MACS6* のマウスへの感染実験

続いて、樹立した *MACS3*、*MACS4*、*MACS5*、*MACS6* の 4 株を、6 週齢の雄の C57BL/6 マウスに感染させ、12 週後に生着菌量、病理組織像など評価検討を行った。マウス感染臨床分離株として汎用されている *SSI* 株、最近、他のグループで樹立された *cagPAI* 陽性の *H. pylori PMSSI* 株も同時に感染させ比較した。

生着菌量の平均値は、*SSI* 株は 5.0 ± 0.5 、*PMSSI* 株では 4.36 ± 0.37 、*MACS3* では 4.30 ± 0.16 、*MACS4* では 4.36 ± 0.19 、*MACS5* では 4.18 ± 0.18 、*MACS6* では 4.49 ± 0.41 と、*SSI* 株、*PMSSI* 株と *MACS3*~*MACS6* 株で有意差は認められなかった (図 5)。

病理組織像を HE 染色で比較すると、*PMSSI* 株では炎症細胞浸潤が著明で、壁細胞の消失も目立ち、最も強い炎症が認められたが、それ以外の菌株感染では、炎症細胞浸潤や壁細胞の消失はあまり認められなかった (図 6)。

病理組織スコアで比較すると、*PMSSI* 株感染マウスでは、慢性炎症、萎縮、化生性変化、過形成の全ての項目において最もスコアが高値であった (図 7)。また、臨床分離株の中では *cagPAI* が機能していない *MACS6* は *MACS3*~*MACS5* 株と比較すると、炎症の程度は軽度であった。

以上の結果より、我々が樹立した臨床分離株 *MACS3* ~*MACS5* は、いずれもマウスの胃粘膜に生着し、*cagPAI* が機能していたが感染 12 週の時点では *PMSSI* 株感染マウスと比較すると胃炎は軽度であった。

図 5.

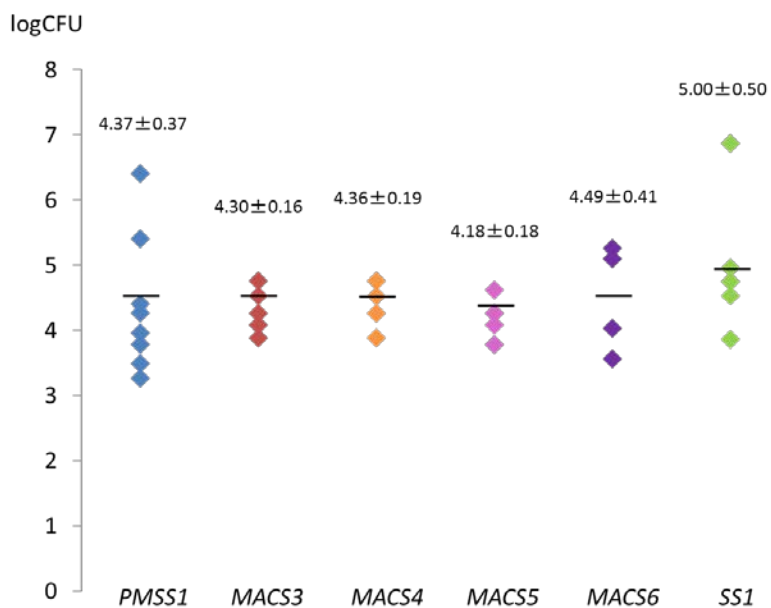
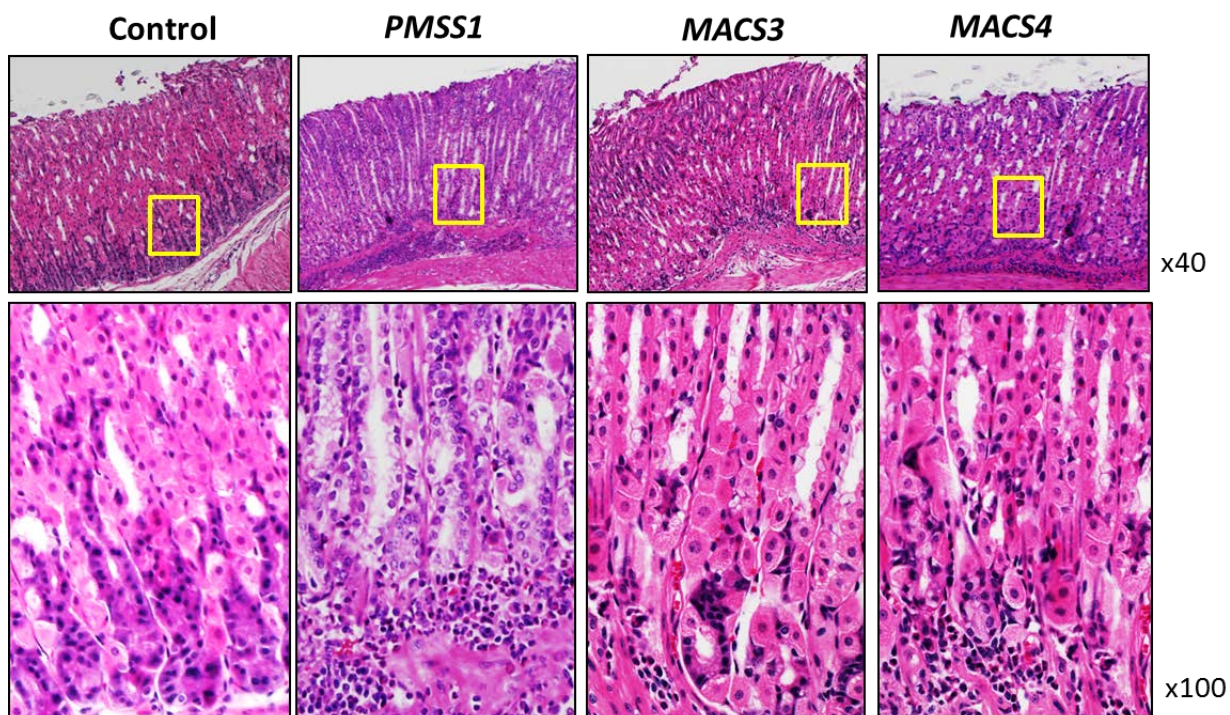


図 5. *H. pylori* 株の生着菌量の比較

C57BL/6 マウスに感染後 12 週の胃内 *H. pylori* 菌量を定量した。

SS1 株、PMSS1 株と、MACS3~MACS6 株では、マウスへの生着菌量に有意差は認められなかった。(n=4~8)

図 6.



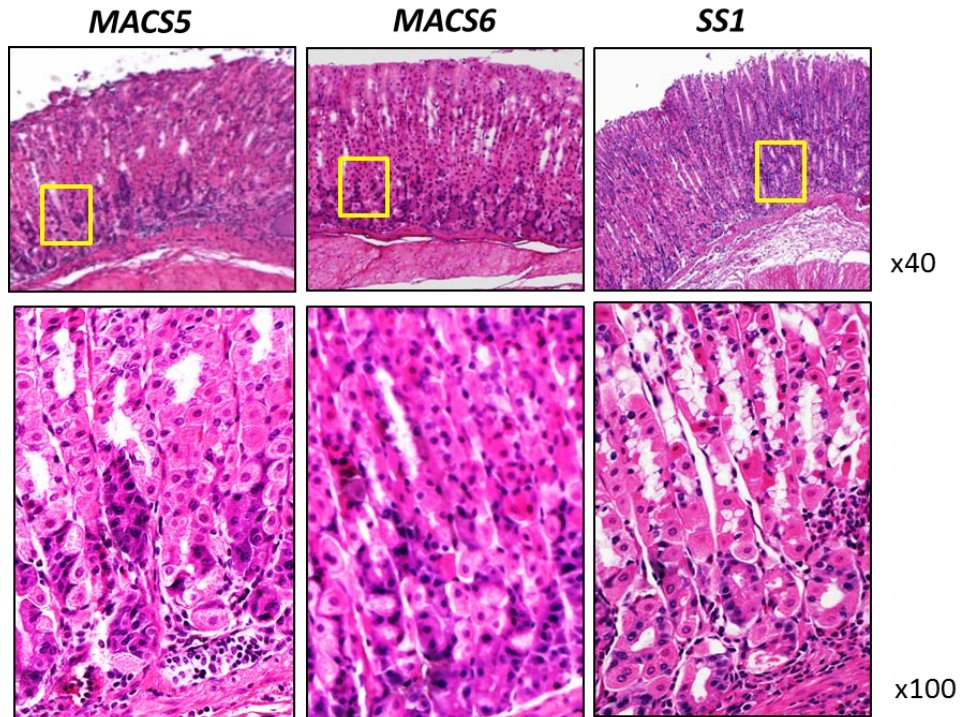


図 6. 病理組織像(HE 染色)

PMSS1 株感染では炎症細胞浸潤が著明で、壁細胞の消失も目立ち、最も強い炎症が認められたが、それ以外の菌株感染では炎症細胞浸潤や壁細胞の消失は軽度であった。

図 7.

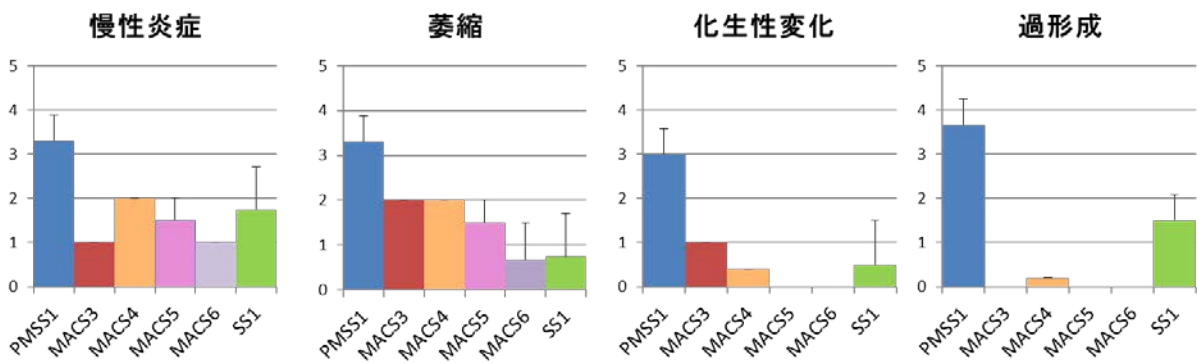


図 7. 病理組織像のスコア化

PMSS1 株感染マウスでは、慢性炎症、萎縮、化生性変化、過形成の全ての項目において最もスコアが高値であった。また、臨床分離株の中では *cagPAI* が機能していない *MACS6* は *MACS3* ~ *MACS5* 株と比較すると、炎症の程度は軽度であった。

(n= 4~8)

(2) *H. pylori* PMSSI 感染マウスモデルの検討

樹立した臨床分離株が、*H. pylori* 感染胃炎のマウスモデルとしては適さないことが明らかとなったため、*H. pylori* PMSSI 株を用いて、C57BL/6 マウスへの生着菌量や *H. pylori* 感染胃炎マウスの胃粘膜でみられる経時的な変化について検討した。

生着菌量は感染 6 週までは増加傾向であるが、12 週以降は時間経過とともに低下傾向を示し、24 週以降は胃粘膜への菌の感染を確認できないマウスも認められた(図 8)。マウス胃粘膜への生着率は 12 週までは 100%であったが、24 週では 78%、48 週では 35%、72 週では 0%と 24 週以降は経時的に減少を認めた(図 9)。

PMSSI 株を感染させたマウスの胃の病理組織像を経時的に検討した。HE 染色では PMSSI 感染によって、胃体部で粘膜下層から粘膜内へかけての炎症細胞浸潤による慢性炎症、粘膜萎縮、化生性変化、過形成が認められた。化生性変化については、いずれのマウスの胃粘膜でも感染 12 週後より出現した。スコア化すると、慢性炎症、粘膜萎縮は 24 週までは経時的に増悪したが、それ以降は増悪を認めなかった。化生性変化、過形成は、48 週までは感染期間に比例して増悪したが、その後は増悪は認められなかった(図 10、図 11)。

PMSSI 感染マウスの胃粘膜では、サイトカインの IL-1 β 、TNF- α の mRNA が経時的に増加したが、IL-1 α の増加は認められなかった(図 12、図 13、図 14)。また、IL-1 β は ELISA では 24 週までは上昇を認めた(図 15)。

図 8.

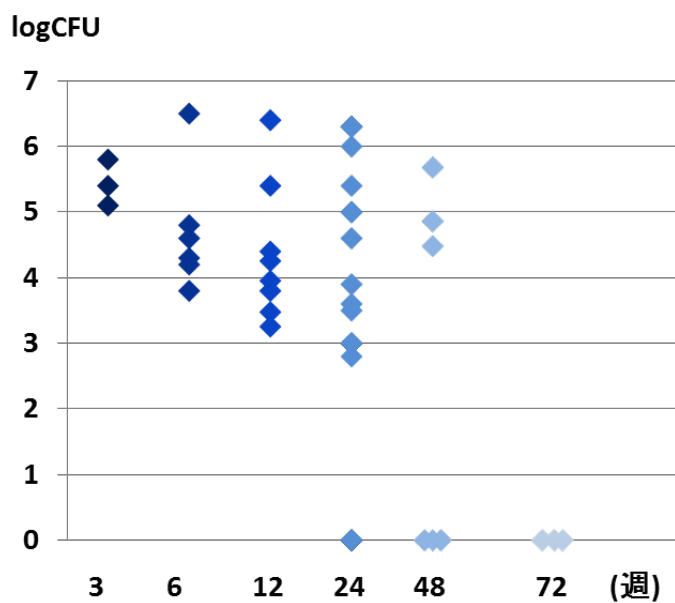


図 9.

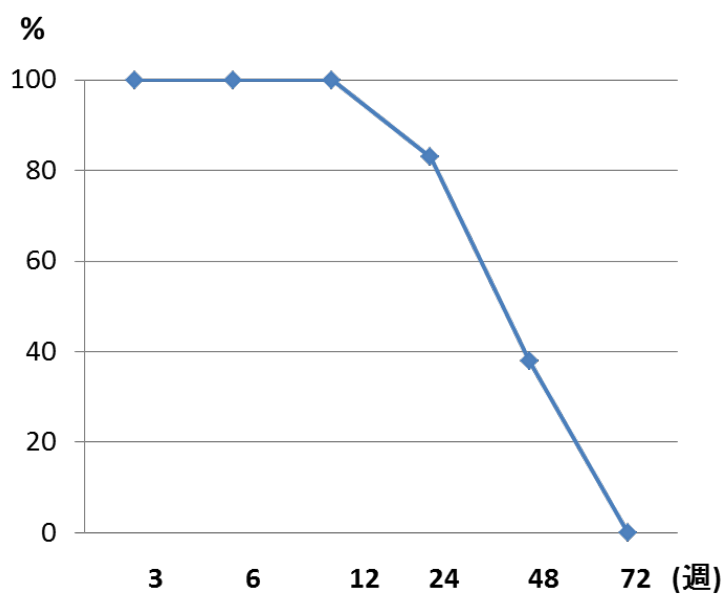


図 8. マウス胃粘膜への生着菌量の推移

6 週までは徐々に増加傾向であるが、12 週以降は経時的に減少傾向を認めた。

図 9. マウス胃粘膜への *PMSSI* 株生着率の推移

生着率は 12 週までは 100% であるが、24 週以降は経時的に減少を認めた。

(n=3~12)

図 10.

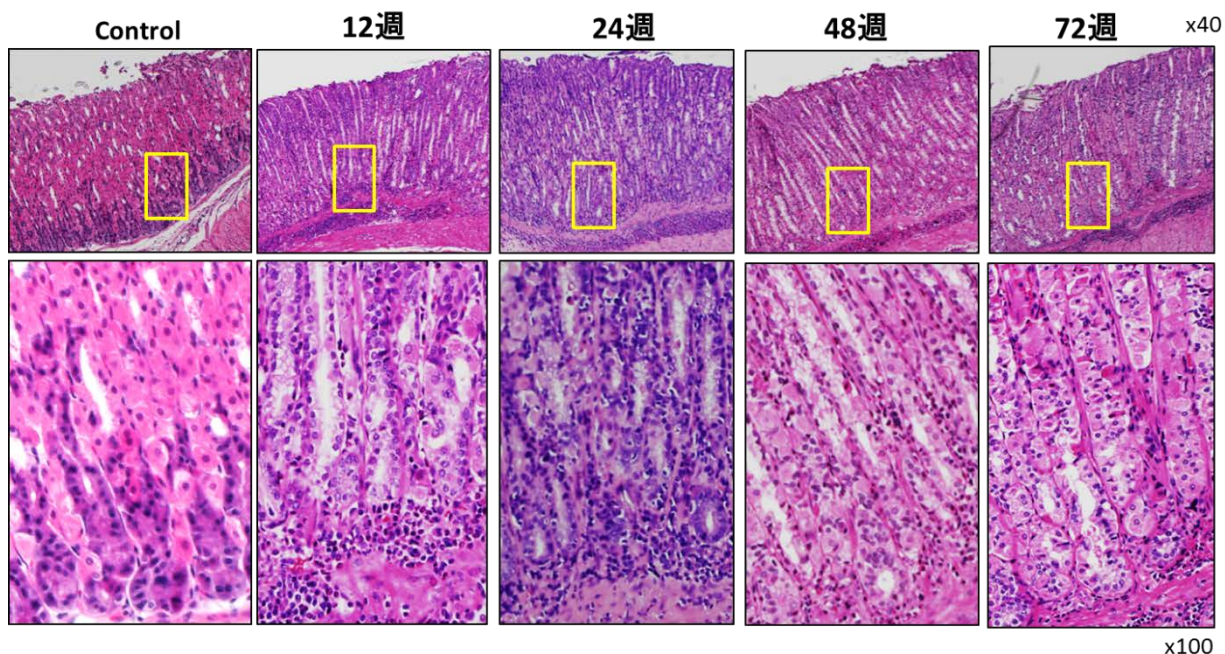


図 10. *PMSSI* 株感染マウスの病理組織像 (HE 染色)
PMSSI 株感染によって、胃体部に慢性炎症、粘膜萎縮、化生性変化、過形成が認められた。

図 11.

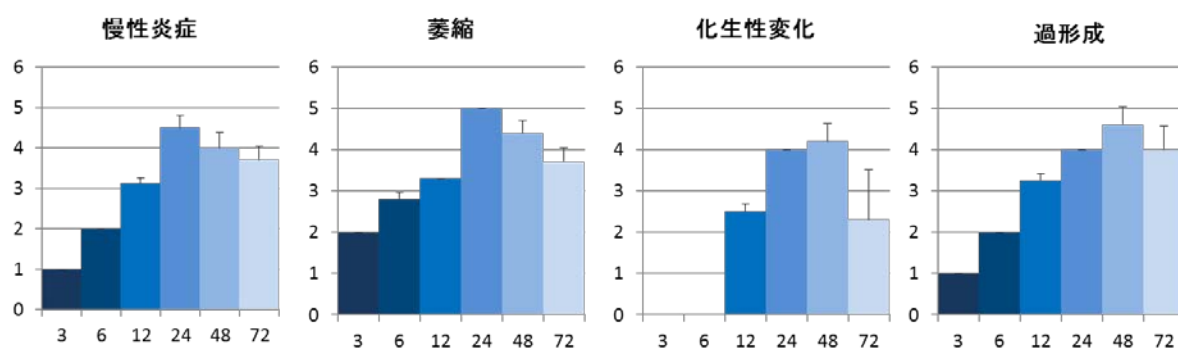


図 11. *PMSSI* 株感染マウスの病理組織のスコアの推移
 慢性炎症、粘膜萎縮は 24 週までは増悪したが、それ以降は増悪は認められなかった。
 化生性変化、過形成は 48 週まで増悪したが、それ以降は増悪は認められなかった。
 (n= 3~12)

図 12.

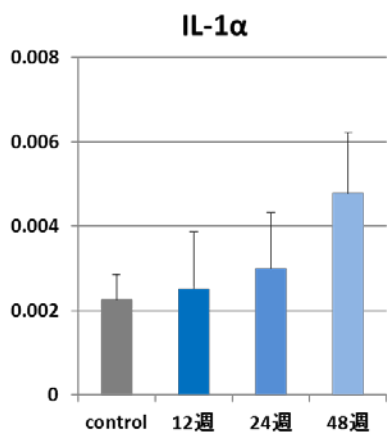


図 13.

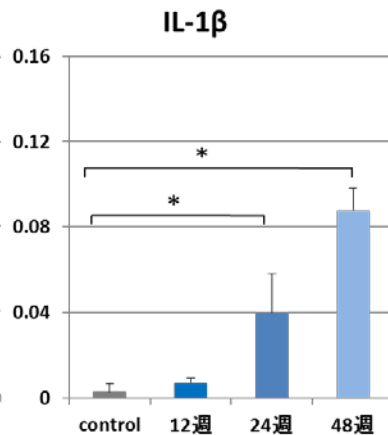


図 14.

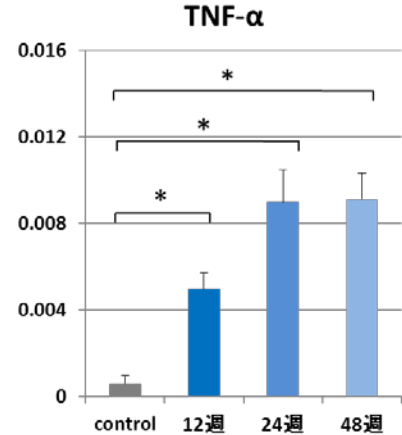


図 12. IL-1α mRNA 発現量

図 13. IL-1β mRNA 発現量

図 14. TNF-α mRNA 発現量

PMSSI 感染マウスの胃粘膜では、IL-1β、TNF-α は経時的に上昇したが、IL-1α の上昇は認められなかった。(n= 6~12) *P < 0.05

図 15.

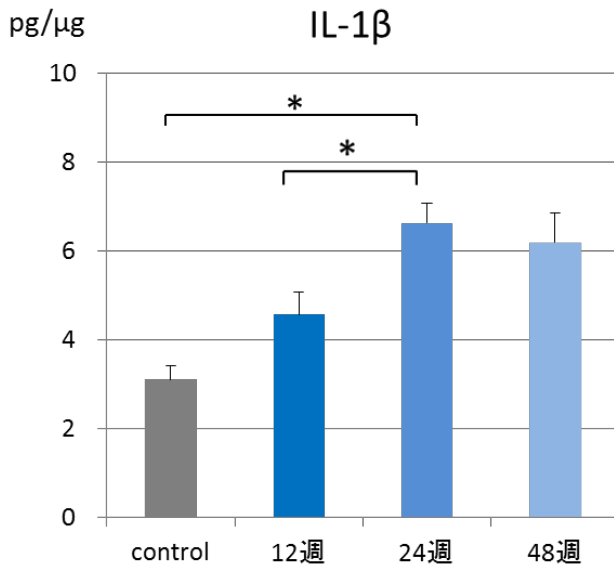


図 15. IL-1β の ELISA

PMSSI 感染マウスの胃粘膜では、24 週までは経時的に IL-1β の上昇を認めた。(n= 6~12) *P < 0.05

抗 $H^+-K^+-ATPase$ 抗体の免疫染色を行い、*H. pylori* 感染マウスの胃粘膜の萎縮について評価した。その結果、*H. pylori* 感染によって胃体部の壁細胞の減少が認められた。感染 12 週後では、まず体部の前胃に近い領域中心に壁細胞が減少し、24 週後では壁細胞の減少は体部全体に拡大していた。しかし、48 週後になると壁細胞は回復傾向が認められた(図 16)。

続いて、細胞の増殖マーカー PCNA、Ki67 の免疫染色を行った。PCNA、Ki67 は正常では胃腺管の峽部の増殖帯に発現しているが、*H. pylori* 感染によって峽部から腺管の表層や底部へ発現領域の拡大が認められた。PCNA、Ki67 ともに感染 12 週後では主に腺管底部に発現が増加したが、24 週以降は腺管全体に発現領域が拡大した。(図 17、図 18)。

さらにアルシアンブルー染色、TFF2 の免疫染色を行い、化生性変化について評価した。非感染マウスでは、体部にアルシアンブルー陽性細胞はほとんど認められないが、*H. pylori* 感染 12 週後では、アルシアンブルー陽性細胞が腺管頸部から底部に出現し、24 週以降は時間経過とともに腺管全体に拡大した(図 19)。TFF2 は、正常では胃腺管の頸部に発現しており、非感染マウスでは頸部のみに発現がみられたが、*H. pylori* 感染 12 週後ではまず腺管底部に発現が増加し、その後は時間経過とともに、腺管全体へと発現領域の拡大を認めた(図 20)。

図 16.

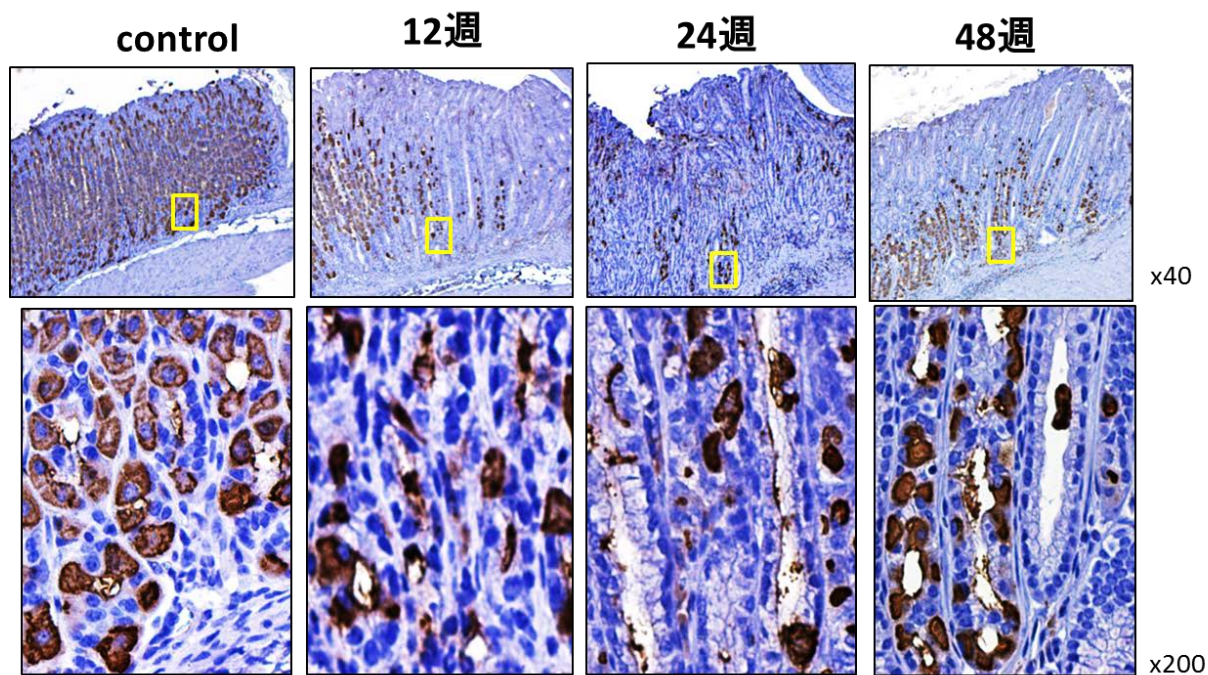


図 16. 抗 $H^+-K^+-ATPase$ 抗体の免疫染色

12 週後では壁細胞の減少は前胃に近い体部が中心であるが、24 週後になると体部全体で壁細胞の減少が認められた。しかし、48 週後では体部の壁細胞数は回復していた。

図 17.

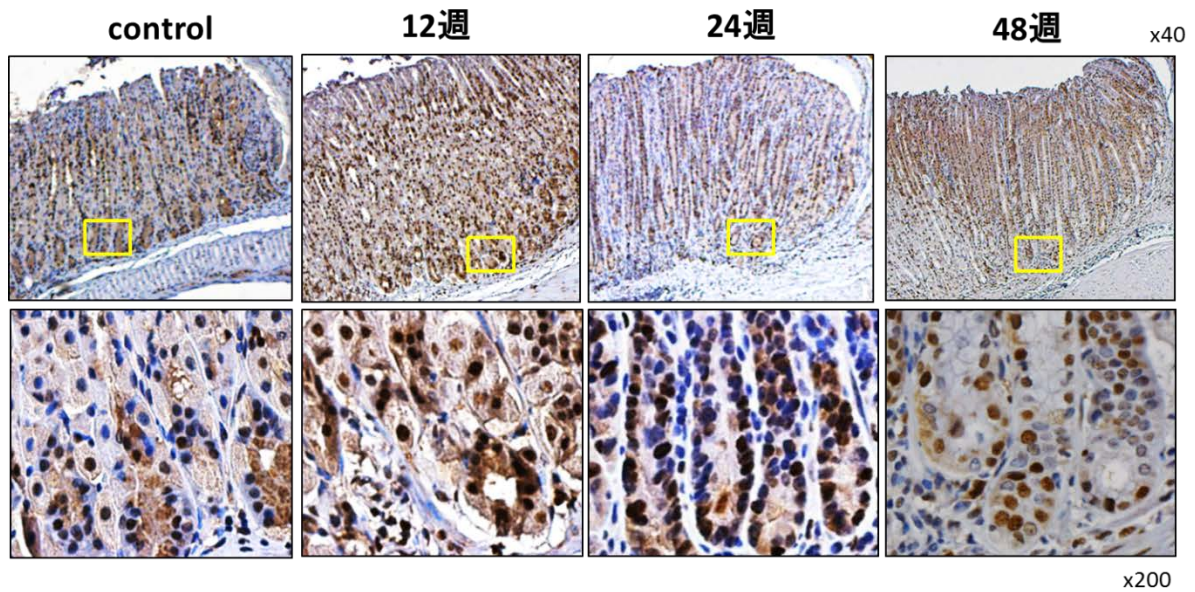


図 17. 細胞の増殖マーカーPCNA の免疫染色

H. pylori 感染 12 週後では峽部から腺管底部、24 週以降は腺管全体へ時間経過とともに発現領域が拡大した。

図 18.

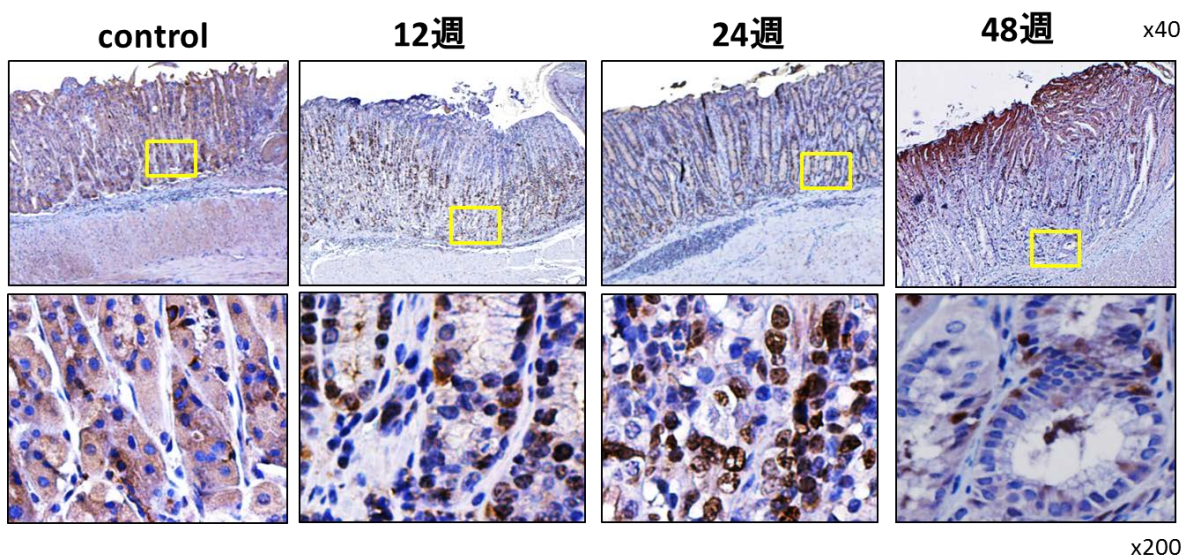


図 18. 細胞の増殖マーカーKi67 の免疫染色

H. pylori 感染後 12 週後では峽部から腺管底部、24 週以降は腺管全体へ時間経過とともに発現領域が拡大した。

図 19.

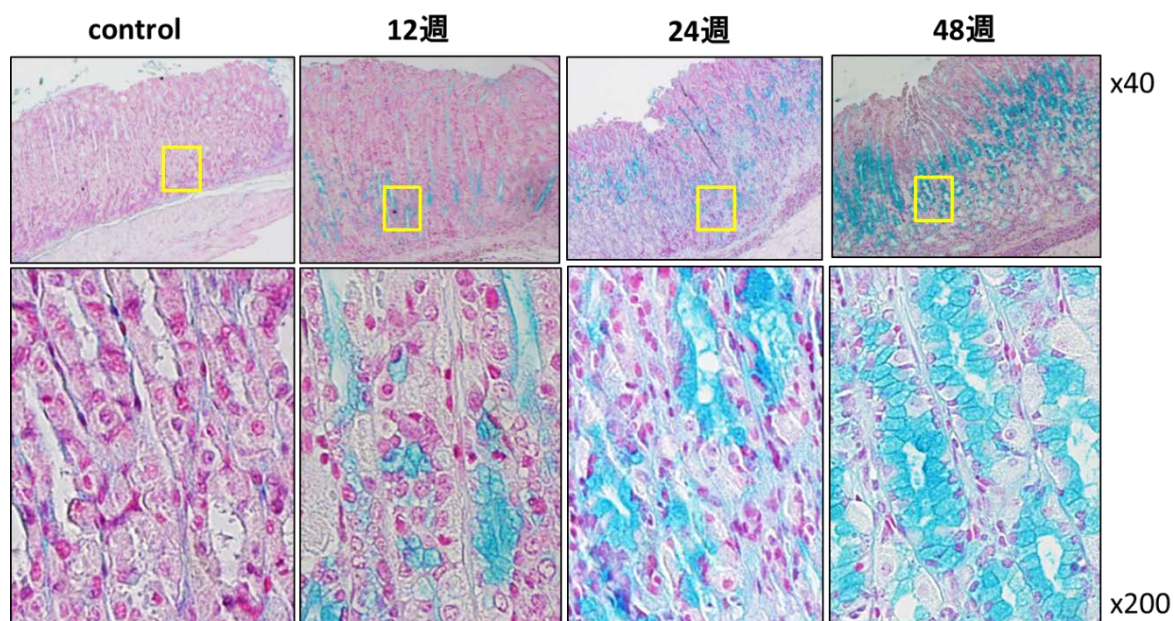


図 19. アルシアンブルー染色

H. pylori 感染により、経時的に発現量の増加と発現領域の拡大を認めた。

図 20.

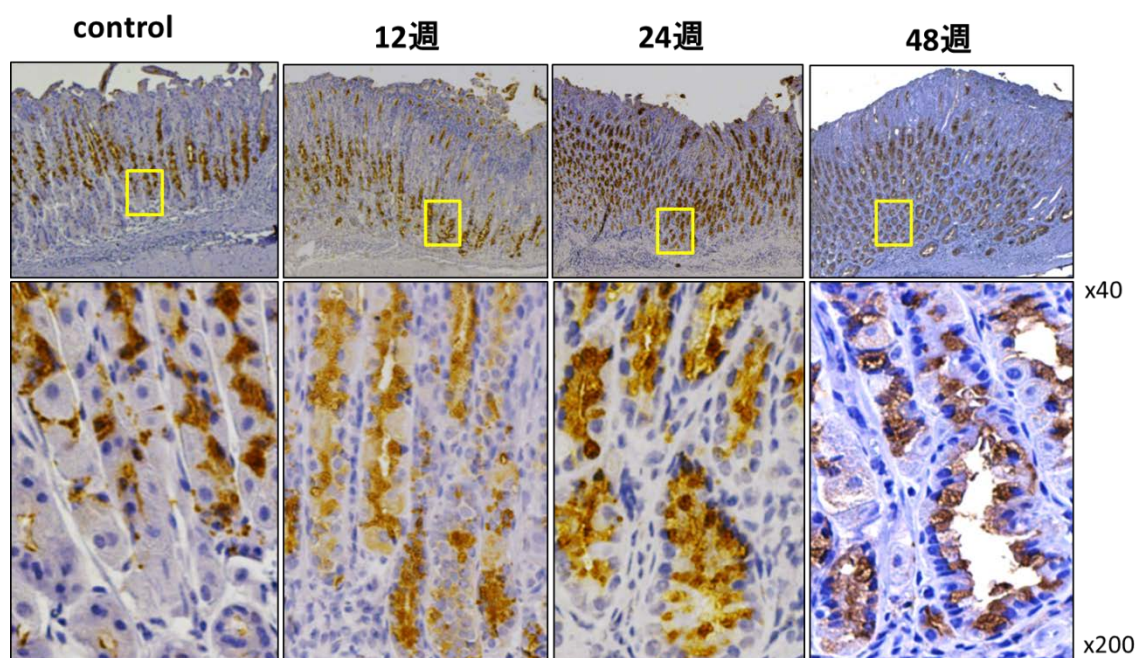


図 20. TFF2 の免疫染色

H. pylori 感染により、経時的に TFF2 の発現量増加と発現領域の拡大を認めた。

(3) *H. pylori* 感染胃粘膜における幹細胞マーカーの発現変化

最近、正常胃腺管の維持や発癌に幹細胞が関与していることが示唆されているが、慢性胃炎や腸上皮化生との関係はあまり知られていない。幹細胞とは、一般には自己複製能と様々な細胞に分化する能力（多分化能）を持つ細胞と定義され、発生や組織・器官の維持に関与している。胃の幹細胞マーカーとして、Lgr5（leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5）や SOX2（Sry related HMG box2）、Troy、CD44、DCAMKL-1（Doublecortin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase-like-1）、SOX9（Sry related HMG box9）が推測されている。本研究では、*H. pylori* 感染マウスの胃粘膜における幹細胞マーカーの発現について、癌の幹細胞マーカーと推測される CD44、DCAMKL-1、SOX9 について免疫染色を行い、検討した。

CD44 はヒアルロン酸レセプター/膜貫通型タンパク質であり、種々の癌幹細胞の表面マーカーである。正常の胃前庭部と SCJ に発現し、体部では発現が少ないといわれている。しかし CD44 の免疫染色の結果、*H. pylori* 感染マウスの体部の胃粘膜特に腺管底部に強く発現が認められた（図 21）。CD44 陽性細胞数を定量化すると、CD44 陽性細胞数は *H. pylori* 感染 24 週まで持続していたが、それ以降は低下傾向が認められた（図 22）。

DCAMKL-1 は、胃、大腸、小腸の幹細胞で発現しており、正常胃粘膜では頸部領域に発現が限局しているといわれている。DCAMKL-1 の免疫染色を行うと、*H. pylori*

感染マウスの胃粘膜では、頸部から腺管全体へ発現の増加が認められた(図 23)。

DCAMKL-1 陽性細胞数を定量化した結果、時間経過とともに増加傾向が認められた(図 24)。

SOX9 は小腸、大腸の幹細胞マーカーとして知られ、正常胃体部の増殖帯で発現しているといわれている。SOX9 の免疫染色を行った結果、*H. pylori* 感染マウスの胃粘膜では、体部での発現細胞数の増加と腺管頸部から底部への発現領域の拡大が認められた(図 25)。SOX9 陽性の細胞数の定量を行うと、SOX9 の発現は感染 48 週経過しても持続していた(図 26)。

さらに、この SOX9 の発現拡大パターンは、化生性変化あるいは TFF2 の発現拡大パターンとほぼ一致していた(図 27)。そこで、TFF2 の代わりに頸部細胞や化生性細胞が染色されるレクチンの GS II を用いて、SOX9 との二重染色を行った。その結果、*H. pylori* 感染マウスの胃腺管では、SOX9 と GS II の発現は共に腺管の底部に増加し、両者の発現領域はほぼ一致することが明らかとなった(図 28)。

これらの結果から、*H. pylori* 感染胃粘膜で、種々の幹細胞マーカーの発現増加が見られることが分かった。また、幹細胞マーカーである SOX9 の発現と化生性変化に相関が認められた。

図 21.

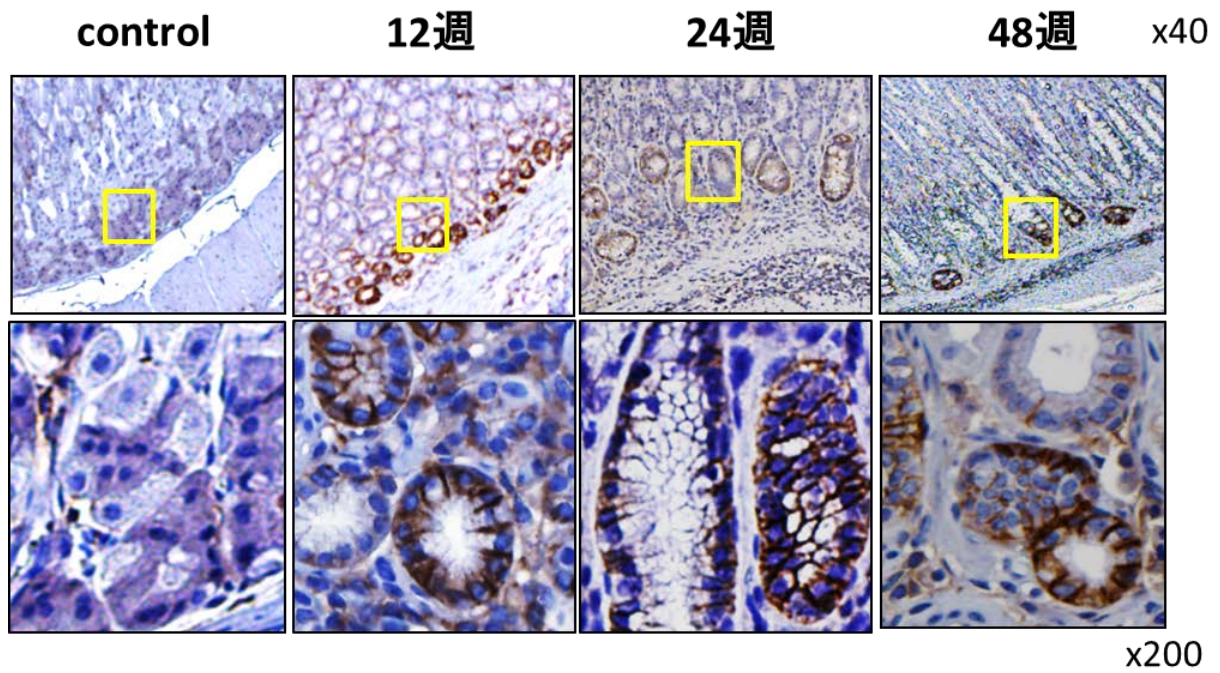


図 22.

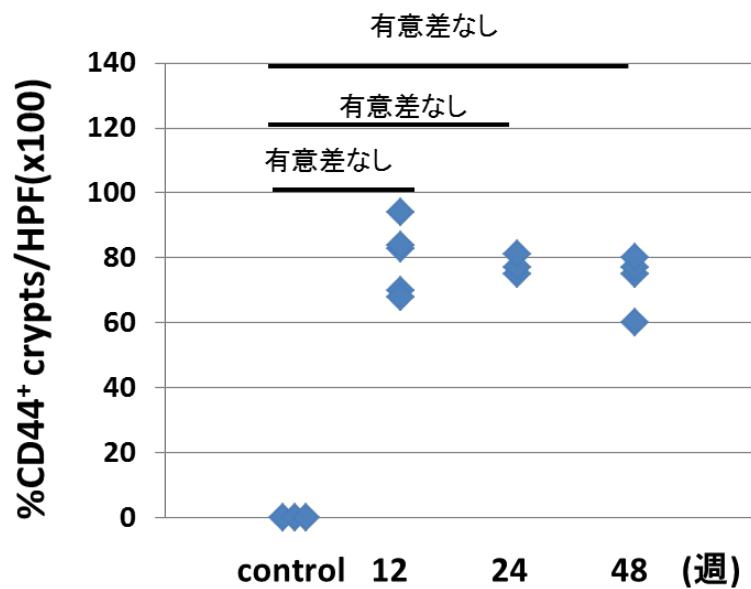


図 21. CD44 の免疫染色

図 22. CD44 陽性細胞数定量

H. pylori 感染によって CD44 の発現増加が認められた。CD44 の発現は *H. pylori* 感染 48 週まで持続していた。(n=4~5)

図 23.

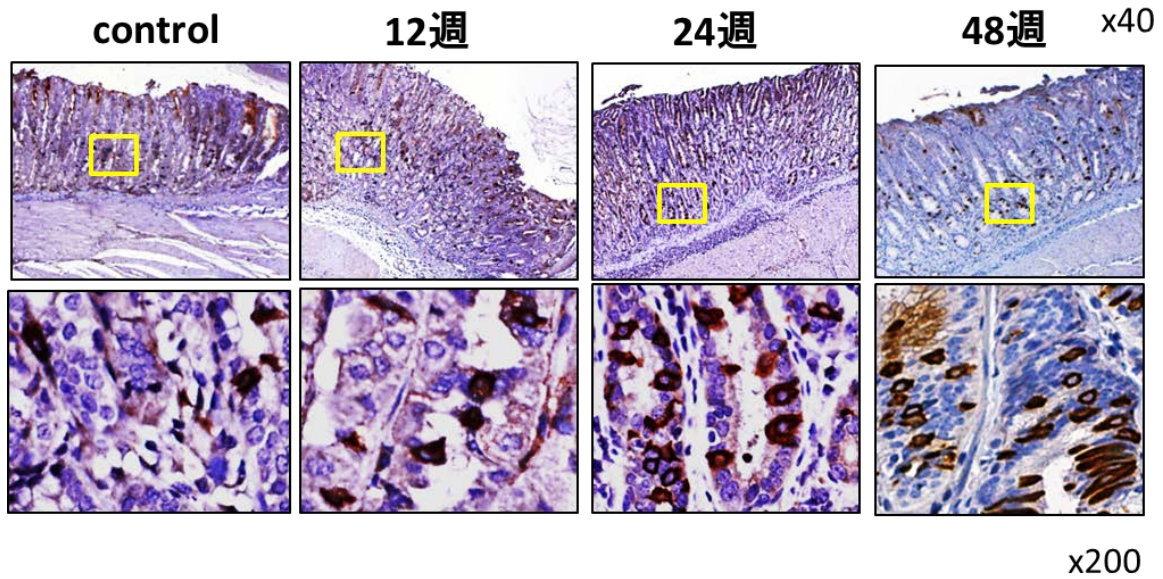


図 24.

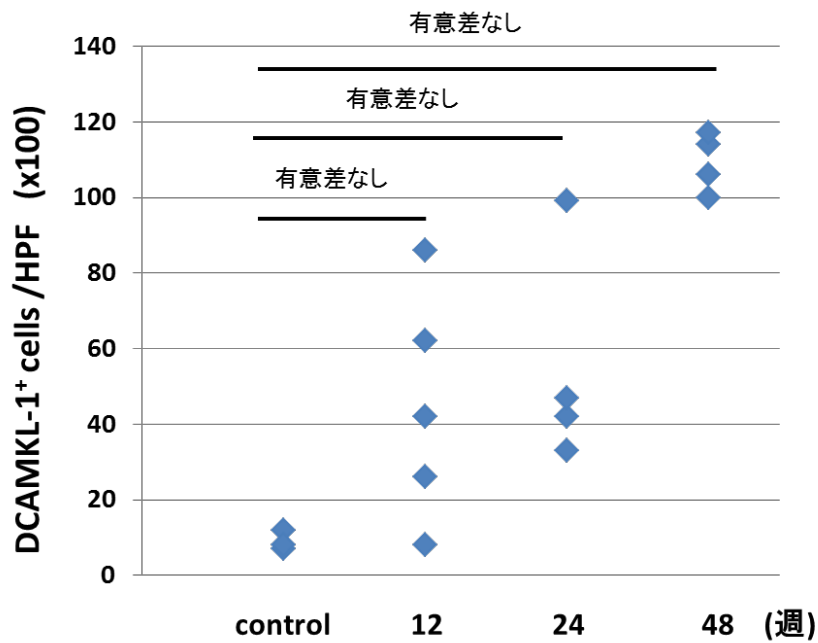


図 23. DCAMKL-1 の免疫染色

図 24. DCAMKL-1 陽性細胞数定量

H. pylori 感染によって DCAMKL-1 の発現増加が認められた。統計学的有意差は認められないが、経時的に増加傾向が認められた。(n= 4~5)

図 25.

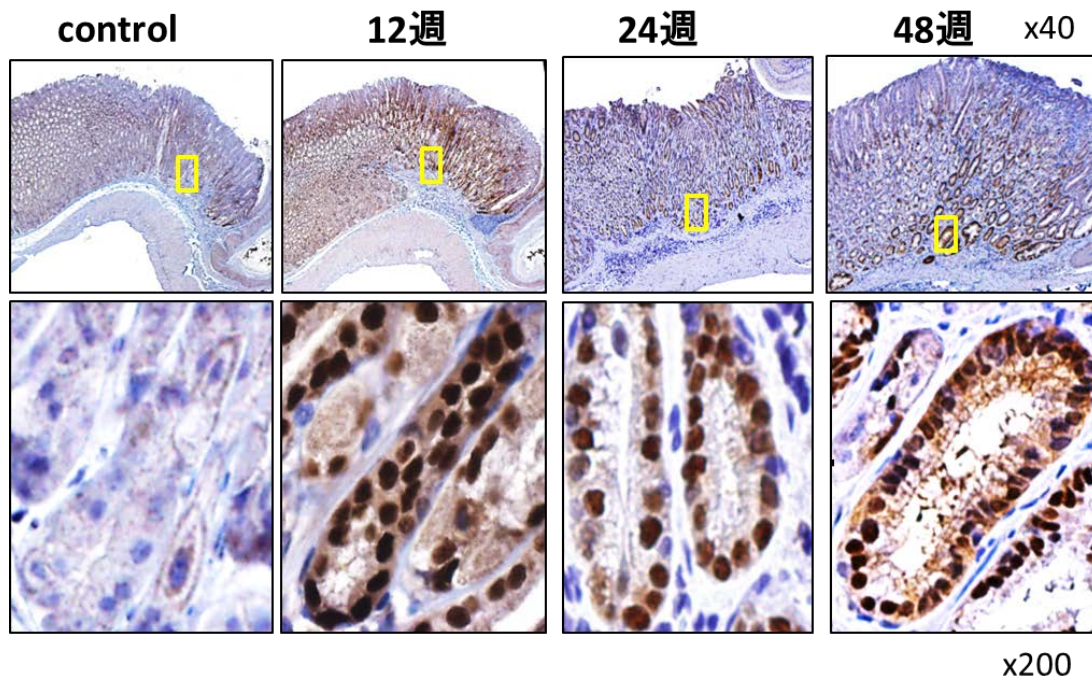


図 26.

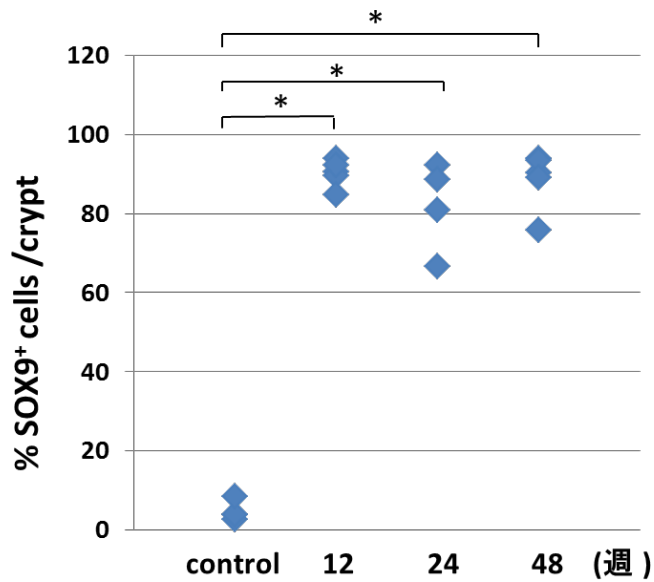


図 25. SOX9 の免疫染色

図 26. SOX9 陽性細胞数定量

H. pylori 感染マウスの胃粘膜で SOX9 は発現増加、発現領域の拡大が認められた。SOX9 の発現は感染 48 週経過しても持続していた。(n= 4~5) *P < 0.05

図 27.

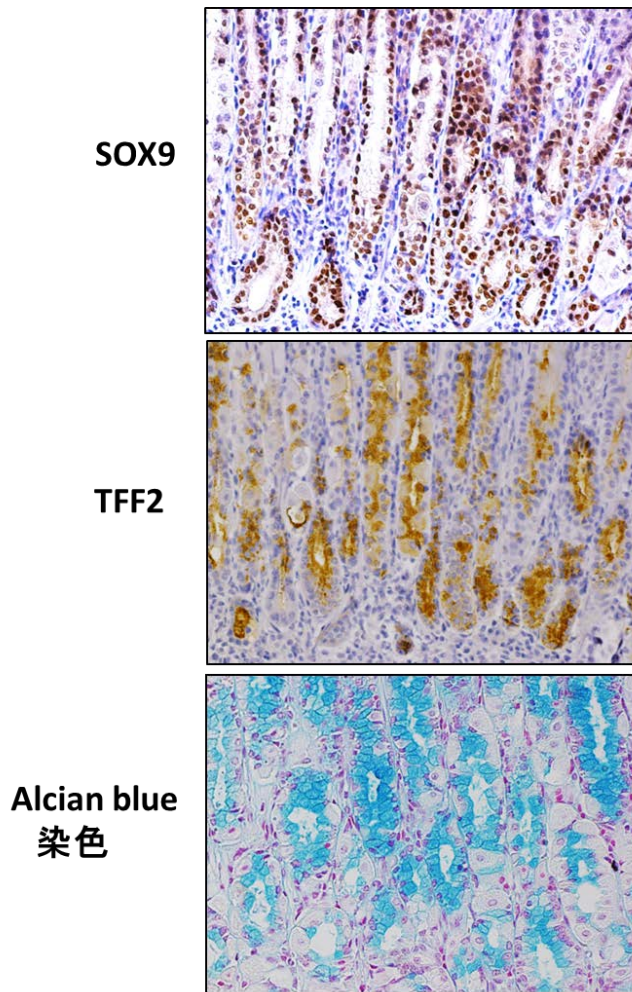


図 28.

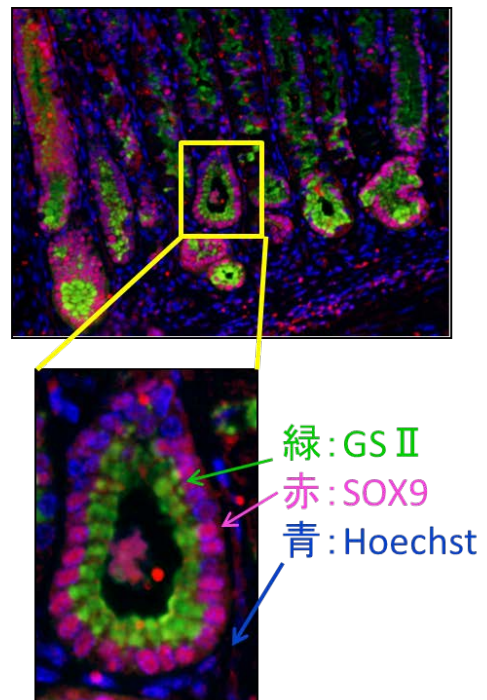


図 27. SOX9 と TFF2 の発現パターン
SOX9 と TFF2 の発現パターンやアルシアンブルー陽性細胞の発現領域は一致した。

図 28. GS II と SOX9 の蛍光二重染色
SOX9 の発現領域は GS II の発現領域に一致した。

(4) *H. pylori* 感染胃炎における IL-1 β の役割

H. pylori PMSSI 感染マウスの胃炎で IL-1 β mRNA、蛋白がともに増加していた (図 12、図 14)。ヒトでは、IL-1 β 遺伝子の多型が胃炎や胃癌と関係しているといわれており (30 - 32)、IL-1 β 遺伝子の転写開始領域より -511 番目が T の遺伝子や -31 番目が C の遺伝子、IL-1 受容体拮抗遺伝子 (IL-1RN) IL-1RN2 のホモ接合体 (IL-1RN*2/*2) を持つ場合は、*H. pylori* に感染すると萎縮性胃炎や発癌発症のリスクが高くなることが明らかとなっている (32 - 38)。そこで IL-1R KO マウスを用いて、*H. pylori* 感染胃炎における IL-1 β の役割について検討した。

まず、wild type マウスと IL-1R KO マウスに PMSSI を 12 週感染させ、胃内への生着菌量について検討した。その結果、wild type マウスでは 4.37 ± 0.37 、IL-1R KO マウスでは 4.01 ± 0.24 と両者の間でマウスの胃内への生着菌量に有意差はみられなかった (図 29)。

続いて、PMSSI 感染 12 週後のマウス胃体部の病理組織像について検討した。

HE 染色では wild type マウスよりも IL-1R KO マウスの方が、炎症細胞浸潤や、壁細胞の減少、化生性変化の程度が軽度であった (図 30)。スコア化すると慢性炎症は wild type では 3.3 ± 0.21 に対し、IL-1R KO マウスでは 2.3 ± 0.24 、萎縮は、wild type では 3.3 ± 0.21 に対し、IL-1R KO マウスでは 2.2 ± 0.15 、化生性変化は、wild type では 3.3 ± 0.21 に対し、IL-1R KO マウスでは 2.2 ± 0.15 、過形成は wild type では 3.7 ± 0.21

に対し、IL-1R KO マウスでは 1.9 ± 0.26 といずれの項目においても有意に低下した(図 31、図 32)。

次に、抗 $H^+-K^+-ATPase$ 抗体の免疫染色を行い、萎縮の程度について検討した。*PMSSI* 感染 12 週後の IL-1R KO マウスの胃体部では、wild type マウスと比較して壁細胞は保たれており、萎縮は軽度であった(図 32)。化生性変化の評価のためアルシアンブルー染色を行った結果、IL-1R KO マウスの方が wild type マウスよりアルシアンブルー陽性細胞は少なく、化生性変化は軽度であった(図 33)。同様に TFF2 の免疫染色を行うと、IL-1R KO マウスの体部の胃粘膜では wild type マウスと比較して、TFF2 発現の低下、特に腺管底部での TFF2 の発現が低下していた(図 34)。

これらの結果より、IL-1 β は慢性炎症や粘膜萎縮、化生性変化などの胃粘膜の病理組織像に関与している可能性が考えられた。

図 29.

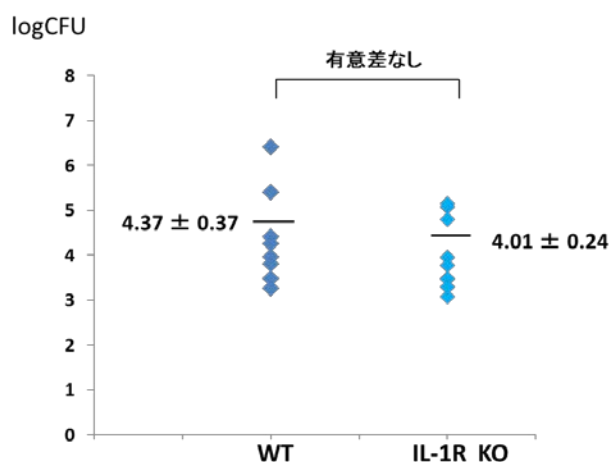


図 29. wild type マウスと IL-1R KO マウスの *PMSSI* 感染 12 週後の生着菌量
wild type マウスと IL-1R KO マウスで、生着菌量に有意差は認められなかった。
(n= 7~8)

図 30.

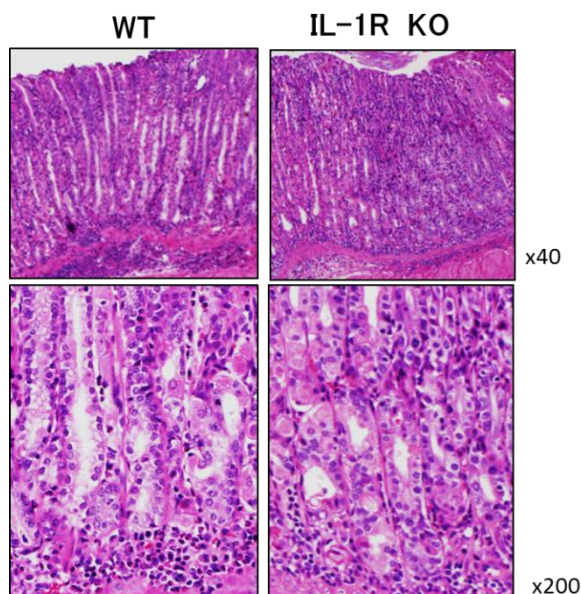


図 31.

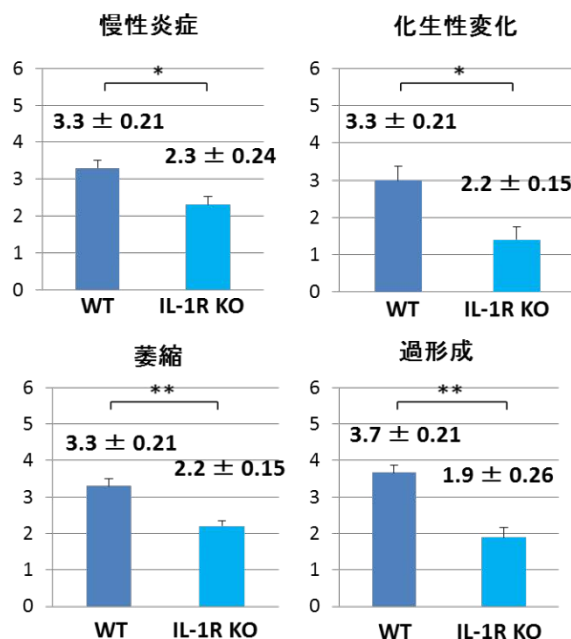


図 30. *PMSSI* 感染 12 週後の体部の病理組織像 (HE 染色)

図 31. *PMSSI* 感染 12 週後の病理組織学的スコア

IL-1R KO マウスの胃では、慢性炎症、萎縮、化生性変化、過形成のいずれの項目においても有意に低下を認めた。(n= 7~8) *P < 0.05、** P < 0.001

図 32.

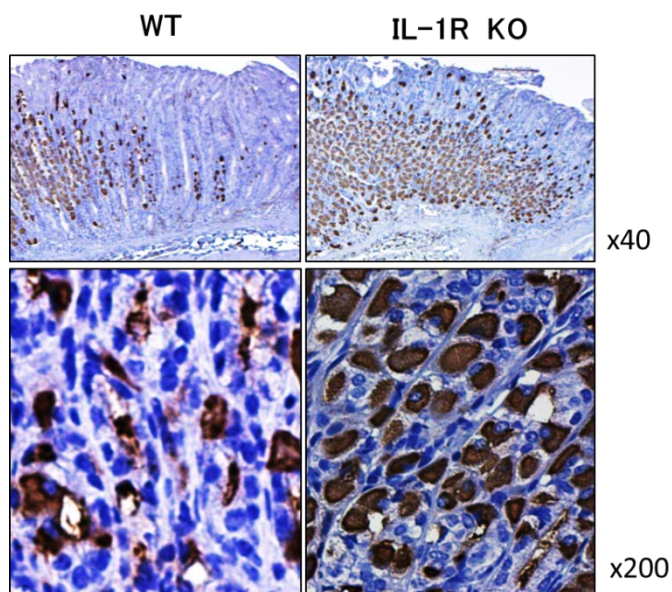


図 32. 抗 H^+K^+ -ATPase 抗体の免疫染色
IL-1R KO マウスでは wild type マウスと比較して体部の壁細胞は保たれており、萎縮の程度は軽度であった。

図 33.

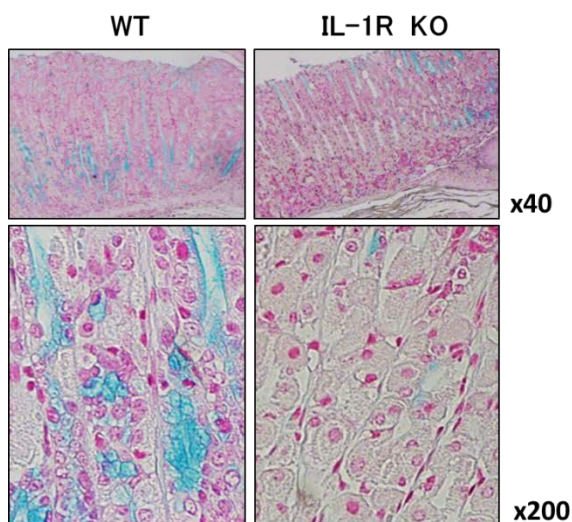


図 33. アルシアンブルー染色

IL-1R KO マウスは wild type マウスと比較して、体部でのアルシアンブルー陽性細胞数は減少していた。

図 34.

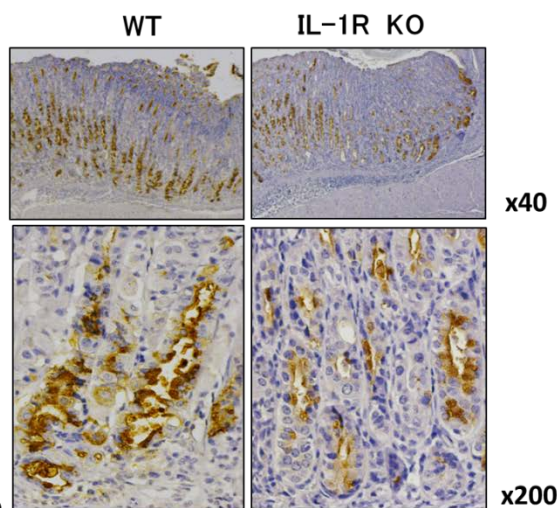


図 34. TFF2 の免疫染色

IL-1R KO マウスは wild type マウスと比較して体部での TFF2 発現の低下を認めた。

さらに、*H. pylori* 感染 12 週後の IL-1R KO マウスの胃粘膜における幹細胞マーカーの CD44、DCAMKL-1、SOX9 発現について検討した。

CD44 の免疫染色の結果、IL-1R KO マウスでは wild type マウスよりも発現が低下している印象であったが、CD44 陽性細胞数の定量化を行うと、統計学的には発現量や発現領域に有意差は認められなかった (図 35、図 36)。DCAMKL-1 についても、IL-1R KO マウスでは wild type マウスよりも発現が低下している印象であったが、DCAMKL-1 陽性細胞数を定量化した結果、IL-1R KO マウスと wild type マウスとの間で、統計学的な有意差は認められなかった (図 37、図 38)。

一方 SOX9 については、IL-1R KO マウスでは wild type マウスと比較して体部での発現低下が認められた。SOX9 陽性細胞数を定量化すると、IL-1R KO マウスでは wild type マウスと比較して有意に低下していた (図 39、図 40)。

以上の結果より、IL-1 β は *H. pylori* 感染に伴う幹細胞マーカー SOX9 の発現に関与している可能性が示唆された。

図 35.

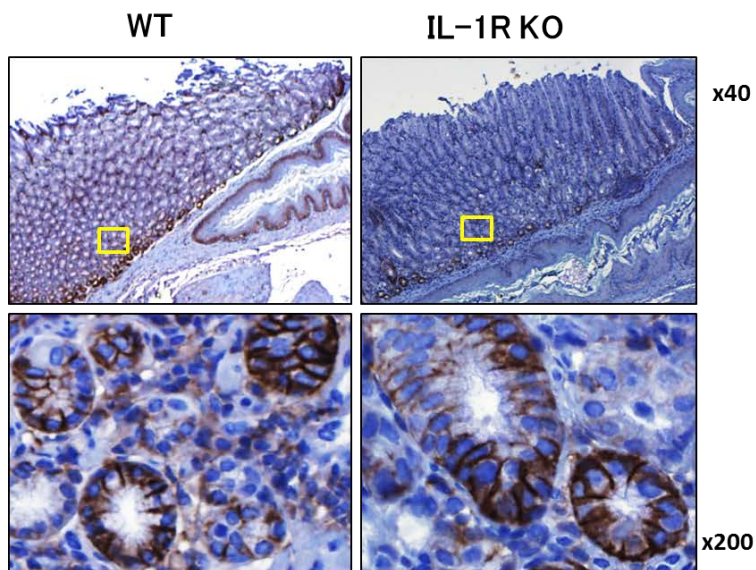


図 35. CD44 免疫染色

図 36.

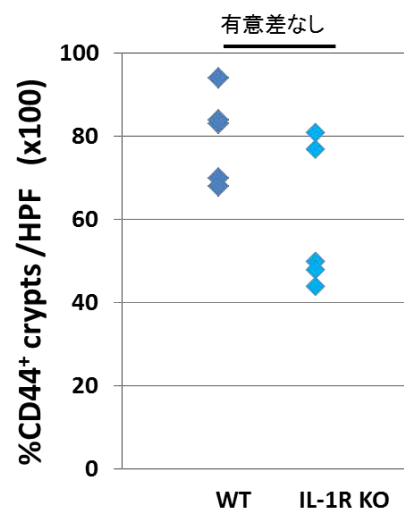


図 36. CD44 陽性細胞数定量

IL-1R KO マウスでは wild type マウスよりも、CD44 の発現領域や発現量が低下している印象であるが、統計学的有意差は認められなかった。(各群 n=5)

図 37.

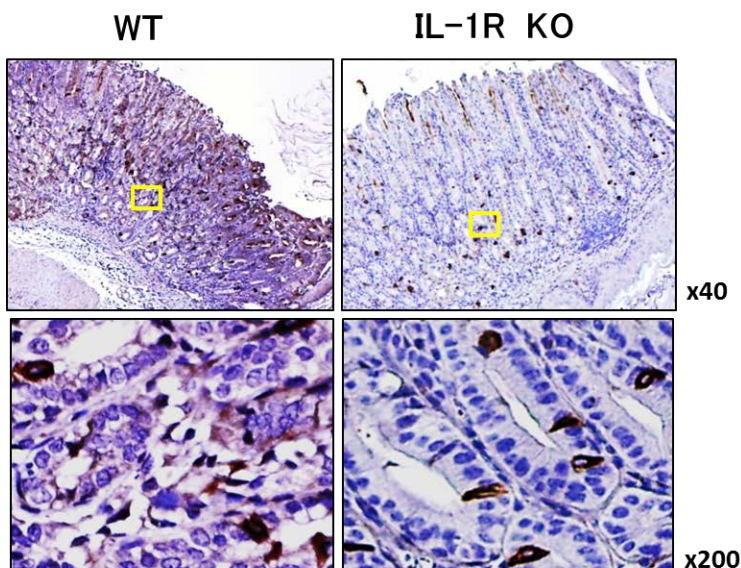


図 37. DCAMKL-1 の免疫染色

図 38.

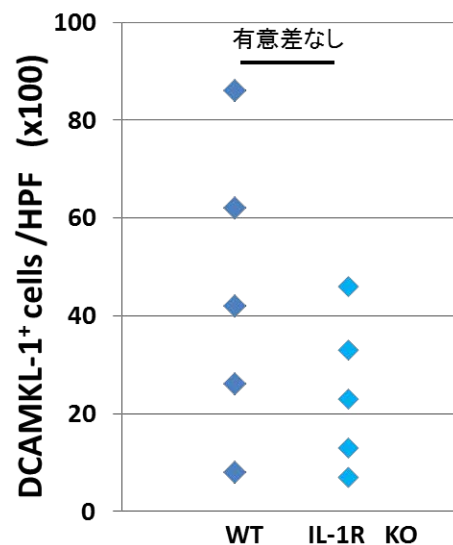


図 38. DCAMKL-1 陽性細胞数定量

IL-1R KO マウスでは wild type マウスよりも、DCAMKL-1 の発現パターンや発現量が低下している印象であるが、統計学的有意差は認められなかった。(各群 n=5)

図 39.

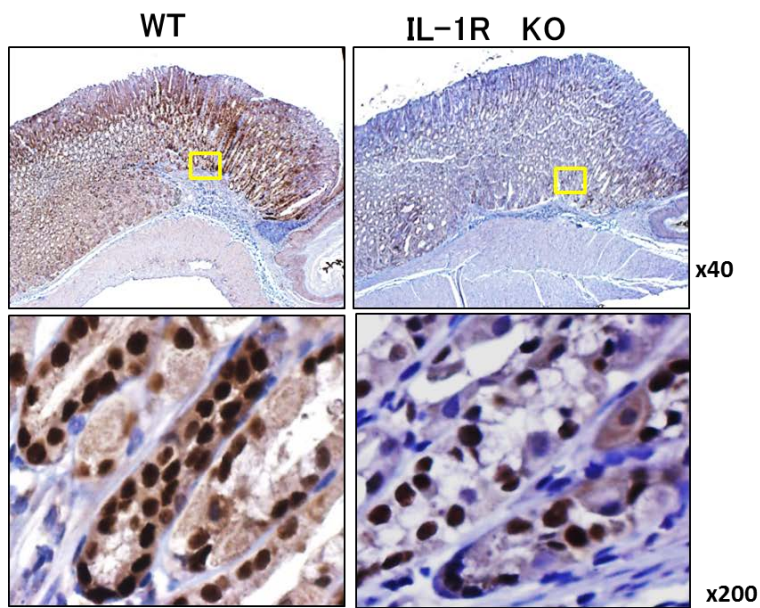
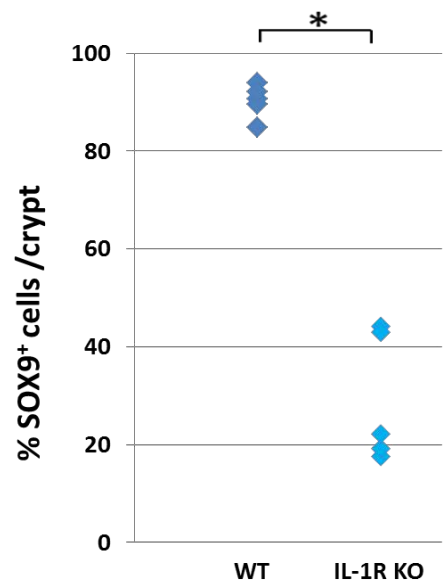


図 39. SOX9 の免疫染色

図 40. SOX9 陽性細胞数定量

SOX9 の陽性細胞数は、IL-1R KO マウスでは wild type マウスと比較して有意に低下していた。(各群 n=5) *P < 0.05

図 40.



考察

本研究ではマウスモデルを用いて、*H. pylori* 感染胃炎の変化とその機序の検討を行った。最初に *H. pylori* のマウスへの感染が成功した実験は、日本で樹立された *cagA* 陽性の *H. pylori* 臨床分離株である CPY2052 株、CPY3401 株、CPY1351 株のヌードマウスへの感染実験である (71, 72)。その後、この CPY2052 株や CPY3401 株を用いた C57BL/6 マウスへの感染実験が報告されており (41, 42, 73, 74)、さらに、Marchetti らが別の *H. pylori* 臨床分離株でマウスへの感染実験を行っている (75)。CPY2052 株や CPY3401 株の生着菌量は $3.4 \pm 0.1 \sim 3.8 \pm 0.1$ と低く、炎症が起こりにくい点が原因でマウスの *H. pylori* 感染実験には汎用されていない (43)。本研究で樹立したマウス感染 *H. pylori* 臨床分離株 MACS3、MACS4、MACS5、MACS6 の生着菌量 (logCFU) は感染 12 週で $4.18 \pm 0.18 \sim 4.49 \pm 0.41$ であり、CPY2052 株や CPY3401 株の生着菌量よりも高値であったが、現在、*H. pylori* 感染マウスモデルに汎用される SS1 株の生着菌量 4.6~6.9 と比較すると低値であった。本研究では、MACS3~MACS6 と PMSS1、SS1 の菌株間の生着菌量には有意差はなく、*cagA* を有する臨床分離株の MACS3、MACS4、MACS5 はいずれも *in vitro* の実験では PMSS1 株同様 *cagPAI* が機能し、AGS 細胞の IL-8 分泌や NF- κ B pathway や MAPK pathway の活性化が確認されたにも関わらず、*in vivo* の実験ではマウスに胃炎はほとんどみられなかった。この結果より、*H. pylori* 感染胃炎の発症には菌の病原因子である *cagPAI* の有無だけ説明できない因子が深く関与している可能性が示唆される。

H. pylori がマウスの胃粘膜には感染しにくいことや、*H. pylori* 感染のみではマウスは発癌には至らないことから、*H. pylori* 菌側の因子だけでなく、宿主側の因子も大きく関係することが推測される。今回 *PMSSI* 株を長期に感染させたマウスの胃粘膜の検討においても、菌の生着率も時間経過とともに低下傾向であり、化生性変化→発癌は認められなかった。この点では *PMSSI* 株と C57BL/6 マウスを用いた *H. pylori* 感染胃炎モデルは、慢性胃炎→萎縮性胃炎→化生性変化→発癌に至るメカニズムの解明には適していないかもしれない。しかし、例えば INS-GAS マウスなどの Transgenic mouse では、*H. felis* 感染 24 週で、*SSI* 株感染では 28 週で胃癌を発症するという報告があり (64)、このような宿主モデルに *PMSSI* を用いれば、より早い段階で発癌がみられる可能性が高く、モデルとしての解析も容易になる可能性がある。

宿主側の因子の一つとして、免疫応答の関与については数多く研究が行われている。免疫応答はマウスの系統によっても違いがあるとされ、C57BL/6 マウスは T-helper 1 (Th1) 免疫応答が優位であるが、BALB/c マウスは T-helper 2 (Th2) 免疫応答が優位であるといわれている。BALB/c マウスの胃粘膜では *H. pylori* に感染しても、ほとんど胃炎が認められないが、C57BL/6 マウスでは強い胃炎が認められた (76 - 78)。逆に C57BL/6 マウスに腸管の寄生線虫である *Heligmosomoides polygyrus* を感染させ Th2 免疫応答が優位の状態にした後、*H. felis* を感染させると、16 週後では *H. felis* 単独感染のマウスと比較して慢性炎症や萎縮、化生性変化や過形成のスコアが有意に低下していたとの報告がある (79)。よって、宿主の免疫応答が胃炎の進行や抑制を制御してい

る可能性がある。特に、Th1 反応は胃癌の発生過程にも大きく関わっているといわれている(80)、CD4⁺ T cell による免疫応答は、*H. pylori* 感染による萎縮性胃炎や胃の前癌病変の発症を促進するとされている。T cell が欠損しているマウスは *H. pylori* に感染しても胃炎を発症しにくい、CD4⁺ T cell を投与されると萎縮性胃炎を発症することが報告されている(29)。このように、*H. pylori* 感染による萎縮性胃炎や胃の前癌病変の発症には宿主の免疫応答が大きく関与していると考えられる。Th2 免疫応答が優位な系統である BALB/c マウスの胃粘膜では、*H. pylori* が持続して感染しても胃炎を発症しないことから、*H. pylori* 感染に対して排除しようとするための免疫応答が、むしろ宿主の胃炎を増悪させ、発癌に至るきっかけとなっている可能性がある。

最近、正常胃腺管の維持や発癌に幹細胞が関与していることが示唆されているが、慢性胃炎や腸上皮化生との関係はあまり知られていない。本研究においては癌の幹細胞マーカーと推測される CD44、DCAMKL-1、SOX9 の発現と *H. pylori* 感染との関連について検討した。CD44 は胃癌患者の胃粘膜や、腸上皮化生、異形成で発現が増加していることが報告されている(81 - 84)が、*H. pylori* 感染患者の胃粘膜上皮細胞では、非感染の患者と比較して、変異体である CD44v9 発現が有意に増加していたとの報告がある(85 - 87)。本研究においても、*H. pylori* 感染マウスの胃粘膜では、CD44 の発現増加が認められた。さらに *cagPAI* が機能している *H. pylori* 感染では、*cagPAI* 陰性の *H. pylori* よりも CD44 の発現が増加することが *in vitro* の実験で報告されており(80)、*cagPAI* が幹細胞の発現にも関与している可能性も示唆される。実際、*cagPAI*

が機能していない *SSI* 株感染マウスの胃粘膜では、*PMSSI* 株感染マウスの胃粘膜と比較すると CD44 の発現はかなり低下していたことを確認している。

DCAMKL-1 は *Helicobacter* 感染で発現が増加するが(88)、細胞増殖マーカーKi67やPCNA、GS II の発現増加形式とは一致していないといわれている(89)。本研究においても、*H. pylori* 感染によって DCAMKL-1 の発現領域は、頸部から腺管全体に拡大しており、この発現拡大形式は Ki67 や PCNA、GS-II とは異なっていた。よって、DCAMKL-1 は *H. pylori* 感染によって増加はするが、化生性変化や過形成には直接関係はしていないと推測された。また、本研究で認められた DCAMKL-1 の *H. pylori* 感染による発現は、CD44 や SOX9 とは違い徐々に増加しており、CD44 や SOX9 とは違う機序が働いていることが示唆される。

SOX9 は、関節軟骨や男性生殖腺、小腸・膵臓・肝臓などの様々な臓器の形成において、細胞の分化を調節する High Mobility Group (HMG) box superfamily に属する転写制御因子として重要な働きをしていることが報告されている(90-92)。例えば小腸では SOX9 はパネート細胞の分化に必要であり、SOX9 の不活性化は パネート細胞の消失につながることや、大腸では杯細胞が減少するなど、腸上皮の形態変化につながることを報告されている(91,93)。SOX9 と慢性胃炎や胃癌との関係については、ヒトの腸型胃癌細胞や腸上皮化生で SOX9 の発現が増加していた(92,94,95)との報告がある。しかも、より進行し、浸潤能が強い胃癌で強く発現していることから、SOX9

の発現が腫瘍細胞の増殖や周囲環境への接着能を強めることによって、腫瘍の進行を促進しているという可能性も考えられている(95)。本研究で *H. pylori* 感染マウスの胃炎で SOX9 の発現が増加することが示されたが、*H. pylori* 感染と SOX9 の関連についてはこれまで報告はない。

SOX9は、ヒトの正常胃粘膜では増殖帯や前庭部の腺管底部の腸上皮化生領域に発現しているが(94)、我々が検討した*H. pylori*感染胃炎の患者の胃粘膜病理組織像では、体部の腸上皮化生領域においてもSOX9の発現増加が認められた(図41)。一方、本研究の*H. pylori*長期感染マウスの胃体部の胃炎においても、48週までは時間経過とともに腺管頸部から腺管底部への発現領域の拡大が認められた。さらにこの発現拡大パターンがTFF2やアルシアンブルーなどの化生性変化のマーカーの発現拡大パターンと一致していたことから、*H. pylori*感染マウスにおいてもSOX9と化生性変化の関連が予想された。よって、ヒトの腸型胃癌細胞や腸上皮化生でSOX9の発現が増加しているという報告(92,94,95)を考慮すると、*H. pylori*感染胃炎から化生性変化に至る機序にSOX9が関わっており、この機序を解明することが化生性変化から発癌へ至る過程の一機序の解明につながる可能性がある。今後、SOX9が化生性変化にどのように関与しているのかを分子レベルで明らかにすることが課題であると思われる。

ただし、本研究にて示された*H. pylori*感染マウスの胃粘膜におけるSOX9の増加が、*H. pylori*感染以外の薬剤やアルコールなどが原因の胃炎や化生性変化においても認め

られる所見であるのか、検討が必要と思われる。DMP777投与マウスは、*H.felis*感染よりも短期間で胃粘膜萎縮を発症し、炎症がなくても萎縮出現3~7日後にSPEMを発症する(96, 97)ことが知られているが、DMP777投与マウスの胃粘膜においてSOX9が増加するという報告はない。また、Tamoxifen投与マウスの胃粘膜ではSPEMに類似した病理組織像を示し、さらにSOX9が増加していたとの報告があり(98)、SOX9が*H. pylori*感染以外の胃炎においても増加する可能性が示唆される。また、アルコール投与(99)の長期の影響を検討した報告はない。従って、*H. pylori*感染以外のマウスの胃炎におけるSOX9発現についても、今後検討を行う必要があると思われる。

先に述べたように本研究では、*H. pylori* 感染野生型マウスで SOX9 発現が増加していたが、*H. pylori* 感染 IL-1R KO マウスでは wild type マウスと比較して SOX9 発現が有意に減少したことから、IL-1 β もしくは IL-1 α が介在する胃炎と SOX9 の発現の間に何らかの関係がある可能性が推測された。IL-1 β の抑制によって SOX9 の発現も抑えられた可能性が考えられるが、IL-1 β と SOX9 との関連については、IL-1 β 増加によって関節軟骨内の SOX9 レベルが低下するという報告がある(100-103)のみで、消化管分野で IL-1 β と SOX9 との関連を直接示す報告はない。また、本研究では IL-1 α の有意な増加は認められなかったが、IL-1 α が胃癌発症に重要な役割を担っているとの報告がある(104)。しかし、SOX9 との関連については報告はなく、IL-1 シグナルが実際に SOX9 発現を制御しているのかどうか、3 か月以上の長期 *H. pylori* 感染ではど

のような結果が得られるのか、さらに検討が必要と考えられた。

IL-1R KO マウスでは *Helicobacter* に感染しても病理組織像上胃炎を発症しないという結果が報告されているが(26, 105)、本研究においても *H. pylori* 感染 IL-1R KO マウスの胃粘膜では wild type マウスと比較して病理組織像上、慢性炎症、萎縮、化生性変化、過形成は有意に低下していた。よって IL-1 シグナルの抑制が、病理組織学的に *H. pylori* 感染胃炎の発症抑制につながることを期待できる。さらに、最近 IL-1 β が Myeloid Derived Suppressor cells (MDSCs) の活性化に重要な役割を果たしている可能性が示唆されており(80)、*H. pylori* 感染胃炎において、IL-1 β が胃粘膜へ影響を与える以外に、MDSCs を活性化させることで腫瘍免疫を抑制し、発癌を誘導する可能性も考えられている。よって *H. pylori* 感染胃炎から胃癌発生の機序を解明する上で、今後 *H. pylori* 感染 IL-1R KO マウスにおける MDSCs の関与についても検討が必要と考えられる。

マウスモデルにおける *H. pylori* 感染胃炎発生の機序をまとめると、*H. pylori* 感染によって、炎症細胞浸潤による慢性炎症、その後壁細胞や主細胞の減少により粘膜が萎縮し、化生性変化の出現、表層粘液細胞が増殖した過形成が進行する。この中で Ki67、PCNA は過形成に関与し、化生性変化に SOX9 が関与している可能性が推測された。また IL-1 シグナルが、慢性炎症や粘膜萎縮だけでなく、SOX9 発現に関与している可能性も示唆された。

図 41.

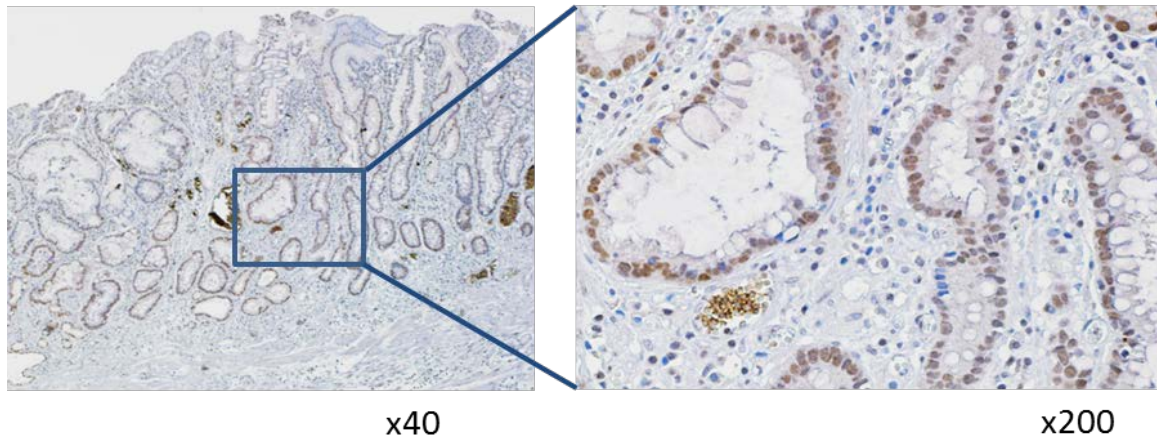


図 41. ヒトの胃体部の SOX9 染色

H. pylori 感染胃粘膜の腸上皮化生領域では、SOX9 発現が増加した。

図 42.

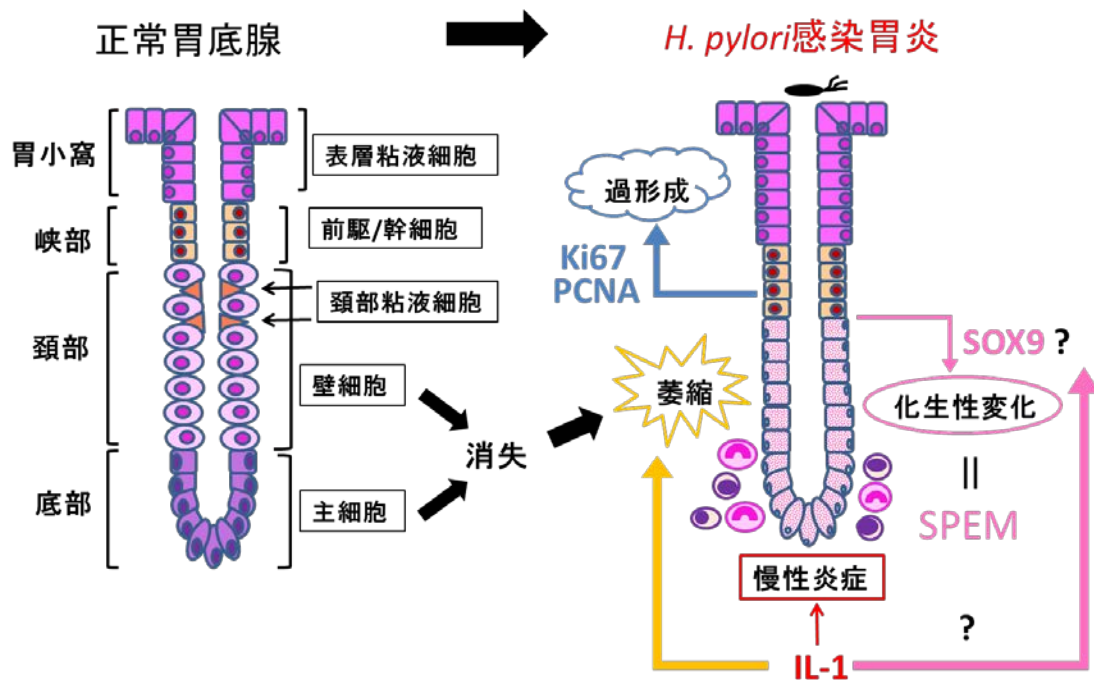


図 42. *H. pylori* 感染胃炎発生の機序

Ki67、PCNA は過形成に関与し、化生性変化に SOX9 が関与している可能性が推測された。また IL-1 シグナルが、慢性炎症や粘膜萎縮だけでなく、SOX9 発現に関与している可能性も示唆された。

結語

本研究によって、*cagPAI* 陽性 *H. pylori* による胃炎では幹細胞マーカーの発現増加が認められた。特に、**SOX9** の発現が化生性変化に関与している可能性が推測された。また、**IL-1** シグナルが炎症及び **SOX9** 発現を制御している可能性が示唆された。

ヒトでは *H. pylori* 除菌後に、胃粘膜の萎縮や腸上皮化生が改善するのかどうか、という疑問はまだ解決されていない重要な問題である。腸上皮化生 → 胃癌への進行が推測されているため、*H. pylori* 感染マウスの胃粘膜における **SOX9** 発現と化生性変化の関連について解析を進めることは、*H. pylori* 感染による胃癌発生の一機序の解明に有用であると考えられる。

引用文献

1. Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Clinical Microbiology Reviews* 19, 449-490, 2006
2. de Vries AC, van Grieken NC, Looman CW, Casparie MK, de Vries E, Meijer GA, Kuipers EJ. Gastric cancer risk in patients with premalignant gastric lesions: a nationwide cohort study in the Netherlands. *Gastroenterology* 134, 945-952, 2008
3. Maeda S, Mentis AF. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 12, 10-14, 2007
4. Forman D, Newell DG, Fullerton F, Yarnell JW, Stacey AR, Wald N, Sitas F. Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer; evidence from a prospective investigation. *BMJ* 302, 302-305, 1991
5. Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH, Kato I, Perez-Perez GI, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *N Engl J Med* 325, 1132-1136, 1991
6. Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelman JH, Orentreich N, Sibley RK. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* 325, 1127-1131, 1991

7. Eslick GD, Lim LL, Byles JE, Xia HH, Talley NJ. Association of *Helicobacter pylori* infection with gastric carcinoma: a meta-analysis. *The American Journal of Gastroenterology* 94, 2373-2379, 1999
8. Ernst PB, Gold BD. The disease spectrum of *Helicobacter Pylori*: The immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Annu. Rev. Microbiol.*54, 615-640, 2000
9. Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, Taniyama K, Sasaki N, Schlemper RJ. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* 345, 784-789, 2001
10. Peek RM Jr, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer*2, 28-37, 2002
11. Correa P. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. *Am. J. Surg. Pathol.*19, S37-S43, 1995
12. Correa P, Fox J, Fontham E, Ruiz B, Lin YP, Zavala D, Taylor N, Mackinley D, de Lima E, Portilla H. *Helicobacter pylori* and gastric carcinoma: serum antibody prevalence in populations with contrasting cancer risks. *Cancer* 66, 2569-2574, 1990
13. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans

Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Monogr Eval Carcinogen Risks Hum 61, 1-241, 1994

14. Warren JR, Marshall BJ. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1(8336), 1273-1275, 1983
15. Bessède E, Staedel C, Acuña Amador LA, Nguyen PH, Chambonnier L, Hatakeyama M, Belleannée G, Mégraud F, Varon C. *Helicobacter pylori* generates cells with cancer stem cell properties via epithelial–mesenchymal transition-like changes. *Oncogene* 32, 1-9, 2013
16. Parsonnet J, Friedman GD, Orentreich N, Vogelman H. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 40, 297-301, 1997
17. Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, Cover TL, Peek RM, Chyou PH, Stemmermann GN, Nomura A. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing cagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Research* 55, 2111-2115, 1995
18. Yamaoka Y, Kita M, Kodama T, Sawai N, Kashima K, Imanishi J. Induction of various cytokines and development of severe mucosal inflammation by *cagA* gene positive *Helicobacter pylori* strains. *Gut* 41, 442-451, 1997

19. Barnes PJ, Karin M. Nuclear Factor- κ B a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N. Engl. J. Med.* 336, 1066-1071, 1997
20. Baeuerle PA, Baltimore D. NF- κ B : ten years after *Cell* 87, 13-20, 1996
21. Maeda S, Amarsanaa J, Mitsuno Y, Hirata Y, Akanuma M, Ikenoue T, Ogura K, Yoshida H, Shiratori Y, Omata M. Relationship between nuclear factor- κ B activation and virulence factors of *Helicobacter pylori* in Japanese clinical isolates. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 17, 556-562, 2002
22. Keates S, Hitti YS, Upton M, Kelly CP. *Helicobacter pylori* infection activates NF- κ B in gastric epithelial cells. *Gastroenterology* 113, 1099 - 1109, 1997
23. Crabtree JE, Covacci A, Farmery SM, Xiang Z, Tompkins DS, Perry S, Lindley IJ, Rappuoli R. *Helicobacter pylori* induced interleukin-8 expression in gastric epithelial cells is associated with CagA positive phenotype. *J Clin Pathol* 48, 41-45, 1995
24. Ogura K, Takahashi M, Maeda S, Ikenoue T, Kanai F, Yoshida H, Shiratori Y, Mori K, Mafune KI, Omata M. Interleukin-8 production in primary cultures of human gastric epithelial cells induced by *Helicobacter pylori*. *Dig. Dis. Sci.* 43, 2738 -2743, 1998.
25. Suzuki M, Mori M, Miyayama A, Iwai N, Tsunematsu N, Oonuki M, Suzuki H, Hibi

- T, Ishii H. Enhancement of neutrophil infiltration in the corpus after failure of *Helicobacter pylori* eradication. *J Clin Gastroenterol.*25, S222-S228, 1997
26. Beales IL, Calam J. Interleukin 1 α and tumor necrosis factor α inhibit acid secretion in cultured rabbit parietal cells by multiple pathways. *Gut* 42, 227-234, 1998
27. Waghray M, Zavros Y, Saqui-Salces M, El-Zaatari M, Alamelumangapuram CB, Todisco A, Eaton KA, Merchant JL. Interleukin-1 β promotes gastric atrophy through suppression of Sonic Hedgehog. *Gastroenterology*138, 562-572, 2010
28. Bunt SK, Yang L, Sinha P, Clements VK, Leips J, Ostrand-Rosenberg S. Reduced inflammation in the tumor microenvironment delays the accumulation of myeloid-derived suppressor cells and limits tumor progression. *Cancer Res* 67, 10019-10026, 2007
29. Tu S, Bhagat G, Cui G, Takaishi S, Kurt-Jones EA, Rickman B, Betz KS, Penz-Oesterreicher M, Bjorkdahl O, Fox JG, Wang TC. Overexpression of interleukin-1beta induces gastric inflammation and cancer and mobilizes myeloid-derived suppressor cells in mice. *Cancer Cell.* 14(5), 408–419, 2008
30. Taguchi A, Ohmiya N, Shirai K, Mabuchi N, Itoh A, Hirooka Y, Niwa Y, Goto H. Interleukin-8 promoter polymorphism increases the risk of atrophic gastritis and gastric cancer in Japan. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*14, 2487-2493, 2005

31. Sugimoto M, Furuta T, Shirai N, Nakamura A, Xiao F, Kajimura M, Sugimura H, Hishida A. Different effects of polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta on development of peptic ulcer and gastric cancer. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 22, 51-59, 2007
32. El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, Herrera J, Lissowska J, Yuan CC, Rothman N, Lanyon G, Martin M, Fraumeni JF Jr, Rabkin CS. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 404, 398-402, 2000
33. Figueiredo C, Machado JC, Pharoah P, Seruca R, Sousa S, Carvalho R, Capelinha AF, Quint W, Caldas C, van Doorn LJ, Carneiro F, Sobrinho-Simões M. *Helicobacter pylori* and interleukin 1 genotyping: an opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* 94, 1680-1687, 2002.
34. Fox JG, Wang TC. Inflammation, atrophy, and gastric cancer. *The Journal of Clinical Investigation* 117, 60-69, 2007
35. Furuta T, El-Omar EM, Xiao F, Shirai N, Takashima M, Sugimura H. Interleukin 1beta polymorphisms increase risk of hypochlorhydria and atrophic gastritis and reduce risk of duodenal ulcer recurrence in Japan. *Gastroenterology* 123, 92-105,

2002

36. Hwang IR, Kodama T, Kikuchi S, Sakai K, Peterson LE, Graham DY, Yamaoka Y. Effect of interleukin 1 polymorphisms on gastric mucosal interleukin 1beta production in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* 123, 1793-1803, 2002
37. Machado JC, Figueiredo C, Canedo P, Pharoah P, Carvalho R, Nabais S, Castro Alves C, Campos ML, Van Doorn LJ, Caldas C, Seruca R, Carneiro F, Sobrinho-Simões M. A proinflammatory genetic profile increases the risk for chronic atrophic gastritis and gastric carcinoma. *Gastroenterology* 125, 364-371, 2003
38. Zambon CF, Basso D, Navaglia F, Germano G, Gallo N, Milazzo M, Greco E, Fogar P, Mazza S, Di Mario F, Basso G, Rugge M, Plebani M. *Helicobacter Pylori* virulence genes and host IL-1RN and IL-1beta genes interplay in favouring the development of peptic ulcer and intestinal metaplasia. *Cytokine* 18, 242-251, 2002
39. Lee A, Fox JG, Otto G, Murphy J. A small animal model of human *Helicobacter pylori* active chronic gastritis. *Gastroenterology* 99, 1315-1323, 1990
40. Lee A, Chen M, Coltro N, O'Rourke J, Hazell S, Hu P, Li Y. Long-term infection of the gastric mucosa with *Helicobacter* species does induce atrophic gastritis in an

- animal model of *Helicobacter pylori* infection. *Zentralbl Bakteriol.*280, 38-50, 1993
41. Fox JG, Beck P, Dangler CA, Whary MT, Wang TC, Shi HN, Nagler-Anderson C. Concurrent enteric helminth infection modulates inflammation and gastric immune responses and reduces helicobacter induced gastric atrophy. *Nat Med.*6, 536-542, 2000
42. Takaishi S, Tu S, Dubeykovskaya ZA, Whary MT, Muthupalani S, Rickman BH, Rogers AB, Lertkowitz N, Varro A, Fox JG, Wang TC. Gastrin is an essential cofactor for *Helicobacter*-associated gastric corpus carcinogenesis in C57BL/6 mice. *The American Journal of Pathology* 175, 365-375, 2009
43. McCracken VJ, Martin SM, Lorenz RG. The *Helicobacter felis* model of adoptive transfer gastritis. *Immunol Res* 33,183-194, 2005
44. Mohammadi M, Redline R, Nedrud J, Czinn S. Role of the host in pathogenesis of *Helicobacter*-associated gastritis: *H. felis* infection of inbred and congenic mouse strains. *Infect Immun* 64, 238-245, 1996
45. Schmitz JM, Durham CG, Ho SB, Lorenz RG. Gastric mucus alterations associated with murine *Helicobacter* Infection. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 57, 457-467, 2009

46. Fox JG, Sheppard BJ, Dangler CA, Whary MT, Ihrig M, Wang TC. Germ-line p53-targeted disruption inhibits *Helicobacter*-induced premalignant lesions and invasive gastric carcinoma through down-regulation of Th1 proinflammatory responses. *Cancer Res.* 62, 696-702, 2002
47. Cai X, Carlson J, Stoicov C, Li H, Wang TC, Houghton J. *Helicobacter felis* eradication restores normal architecture and inhibits gastric cancer progression in C57BL/6 mice. *Gastroenterology* 128, 1937-1952, 2005
48. Lee A, O'Rourke J, De Ungria MC, Robertson B, Daskalopoulos G, Dixon MF. A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the Sydney strain. *Gastroenterology* 112, 1386 - 1397, 1997
49. Pritchard DM, Przemeck SM. Review article: how useful are the rodent animal models of gastric adenocarcinoma? *Aliment Pharmacol Ther* 19, 841–859, 2004
50. Sakagami T, Dixon M, O'Rourke J, Howlett R, Alderuccio F, Vella J, Shimoyama T, Lee A. Atrophic gastric changes in both *Helicobacter felis* and *Helicobacter pylori* infected mice are host dependent and separate from antral gastritis. *Gut* 39, 639-648, 1996
51. Mori-Akiyama Y, van den Born M, van Es JH, Hamilton SR, Adams HP, Zhang J,

- Clevers H, de Crombrughe B. SOX9 is required for the differentiation of Paneth cells in the intestinal epithelium. *Gastroenterology* 133, 539-546, 2007
52. Nomura S, Yamaguchi H, Ogawa M, Wang TC, Lee JR, Goldenring JR. Alterations in gastric mucosal lineages induced by acute oxyntic atrophy in wild-type and gastrin-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288, G362-G375, 2005
53. Nozaki K, Ogawa M, Williams JA, Lafleur BJ, Ng V, Drapkin RI, Mills JC, Konieczny SF, Nomura S, Goldenring JR. A molecular signature of gastric metaplasia arising in response to acute parietal cell loss. *Gastroenterology* 134, 511-522, 2008
54. Nomura S, Baxter T, Yamaguchi H, Leys C, Vartapetian AB, Fox JG, Lee JR, Wang TC, Goldenring JR. Spasmolytic polypeptide expressing metaplasia to preneoplasia in *H. felis*-infected mice. *Gastroenterology* 127, 582-594, 2004
55. Kurt-Jones EA, Cao L, Sandor F, Rogers AB, Whary MT, Nambiar PR, Cerny A, Bowen G, Yan J, Takaishi S, Chi AL, Reed G, Houghton J, Fox JG, Wang TC. Trefoil family factor 2 is expressed in murine gastric and immune cells and controls both gastrointestinal inflammation and systemic immune responses. *Infect Immun* 75, 471-480, 2007

56. Goldenring JR, Nam KT, Mills JC. The origin of pre-neoplastic metaplasia in the stomach: Chief cells emerge from the Mist *Experimental Cell Research* 317, 2759-2764, 2011
57. Weis VG, Goldenring JR. Current understanding of SPEM and its standing in the preneoplastic process *Gastric Cancer*12, 189-197, 2009
58. Ogawa M, Nomura S, Varro A, Wang TC, Goldenring JR. Altered metaplastic response of *waved-2* EGF receptor mutant mice to acute oxyntic atrophy *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*290, G793-G804, 2006
59. Correa P. A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Research* 48, 3554-3560, 1988
60. Halldórsdóttir AM, Sigurdardóttir M, Jónasson JG, Oddsdóttir M, Magnússon J, Lee JR, Goldenring JR. Spasmolytic Polypeptide-Expressing Metaplasia (SPEM) associated with gastric cancer in Iceland. *Digestive Diseases and Sciences* 48, 431-441, 2003
61. Yamaguchi H, Goldenring JR, Kaminishi M, Lee JR. Identification of Spasmolytic Polypeptide Expressing Metaplasia (SPEM) in remnant gastric cancer and

surveillance postgastrectomy biopsies. *Digestive Diseases and Sciences* 47, 573-578, 2002

62. Dhar DK, Wang TC, Maruyama R, Udagawa J, Kubota H, Fuji T, Tachibana M, Ono T, Otani H, Nagasue N. Expression of cytoplasmic TFF2 is a marker of tumor metastasis and negative prognostic factor in gastric cancer. *Laboratory Investigation* 83, 1343-1352, 2003
63. Fox JG, Li X, Cahill RJ, Andrutis K, Rustgi AK, Odze R, Wang TC. Hypertrophic gastropathy in *Helicobacter felis*-infected wild-type C57BL/6 mice and p53 hemizygous transgenic mice. *Gastroenterology* 110,155–166, 1996
64. Fox JG, Wang TC, Rogers AB, Poutahidis T, Ge Z, Taylor N, Dangler CA, Israel DA, Krishna U, Gaus K, Peek RM Jr. Host and microbial constituents influence *Helicobacter pylori*-induced cancer in a murine model of hypergastrinemia. *Gastroenterology* 124, 1879–1890, 2003
65. Arnold IC, Lee JY, Amieva MR, Roers A, Flavell RA, Sparwasser T, Müller A. Tolerance rather than immunity protects from *Helicobacter pylori* -induced gastric preneoplasia. *Gastroenterology*.140, 199–209, 2011
66. Crabtree JE, Ferrero RL, Kusters JG. The mouse colonizing *Helicobacter pylori*

- strain *SSI* may lack a functional *cag* pathogenicity island. *Helicobacter* 7, 139–151, 2002
67. Watanabe T, Tada M, Nagai H, Sasaki S, Nakao M. *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in mongolian gerbils. *Gastroenterology* 115, 642–648, 1998
68. Sayi A, Kohler E, Hitzler I, Arnold I, Schwendener R, Rehrauer H, Müller A. The CD4+ T cell-mediated IFN-gamma response to *Helicobacter* infection is essential for clearance and determines gastric cancer risk. *J. Immunol.* 182, 7085–7101, 2009
69. Ikenoue T, Maeda S, Ogura K, Akanuma M, Mitsuno Y, Imai Y, Yoshida H, Shiratori Y, Omata M. Determination of *Helicobacter pylori* virulence by simple gene analysis of the *cag* Pathogenicity Island. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 8 181–186, 2001
70. Hirata Y, Yanai A, Shibata W, Mitsuno Y, Maeda S, Ogura K, Yoshida H, Kawabe T, Omata M. Functional variability of *cagA* gene in Japanese isolates of *Helicobacter pylori*. *Gene* 343, 165–172, 2004
71. Karita M, Kouchiyama T, Okita K, Nakazawa T. New small animal model for human gastric *Helicobacter pylori* infection: success in both nude and euthymic mice. *Am J Gastroenterol* 86, 1569–1603, 1991

72. Karita M, Tsuda M, Okita K, Sugiyama T, Nakazawa T. Evaluation of a new bismuth-free triple therapy in nude mice and humans. *Eur J Gastroenterol Hepatol*7, S31–S34, 1995
73. Sawai N, Kita M, Kodama T, Tanahashi T, Yamaoka Y, Tagawa Y, Iwakura Y, Imanishi J. Role of gamma interferon in *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammatory responses in a mouse model *Infection and Immunity* 67, 279–285, 1999
74. Tsuda M, Karita M, Morshed MG, Okita K, Nakazawa T. A urease-negative mutant of *Helicobacter pylori* constructed by allelic exchange mutagenesis lacks the ability to colonize the nude mouse stomach. *Infection and Immunity*62, 3586-3589 ,1994
75. Marchetti M, Aricò B, Burroni D, Figura N, Rappuoli R, Ghiara P. Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. *Science* 267,655–1658, 1995
76. Qiao Y, Gray BM, Sofi MH, Bauler LD, Eaton KA, O'Riordan MX, Chang CH. Innate-like CD4 T cells selected by thymocytes suppress adaptive immune responses against bacterial infections. *Open J Immunol.* 2, 25–39, 2012

77. Panthel K, Faller G, Haas R. Colonization of C57BL/6J and BALB/c wild-type and knockout Mice with *Helicobacter pylori*: effect of vaccination and implications for innate and acquired immunity. *Infection and Immunity* 71, 794–800, 2003
78. Thompson LJ, Danon SJ, Wilson JE, O'Rourke JL, Salama NR, Falkow S, Mitchell H, Lee A. Chronic *Helicobacter pylori* infection with Sydney Strain 1 and a newly identified mouse-adapted strain (Sydney Strain 2000) in C57BL/6 and BALB/c mice. *Infection and Immunity* 71, 4668–4679, 2004
79. Mohammadi M, Czinn S, Redline R, Nedrud J. *Helicobacter*-specific cell-mediated immune responses display a predominant Th1 phenotype and promote a delayed-type hypersensitivity response in the stomachs of mice. *The Journal of Immunology* 156, 4729-4738, 1996
80. Roth KA, Kapadia SB, Martin SM, Lorenz RG. Cellular immune responses are essential for the development of *Helicobacter felis*-associated gastric pathology. *The Journal of Immunology* 163, 1490–1497, 1999
81. Chong JM, Fukayama M, Hayashi Y, Funata N, Takizawa T, Koike M, Muraoka M, Kikuchi-Yanoshita R, Miyaki M, Mizuno S. Expression of CD44 variants in gastric carcinoma with or without Epstein-Barr virus. *Int J Cancer* 74, 450-454, 1997

82. Higashikawa K, Yokozaki H, Ue T, Taniyama K, Ishikawa T, Tarin D, Tahara E. Evaluation of CD44 transcription variants in human digestive tract carcinomas and normal tissues. *Int J Cancer* 66, 11-17, 1996
83. Dhingra S, Feng W, Brown RE, Zhou Z, Khoury T, Zhang R, Tan D. Clinicopathologic significance of putative stem cell markers, CD44 and nestin, in gastric adenocarcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 4, 733-741, 2011
84. Jang BI, Li Y, Graham DY, Cen P. The role of CD44 in the pathogenesis, diagnosis, and therapy of gastric cancer. *Gut and Liver*.5, 397- 405, 2011
85. Fan X, Long A, Goggins M, Fan X, Keeling PW, Kelleher D. Expression of CD44 and its variants on gastric epithelial cells of patients with *Helicobacter pylori* colonization. *Gut* 38, 507-512, 1996
86. Udhayakumar G, Jayanthi V, Devaraj N, Devaraj H. Nuclear translocation of β -catenin correlates with CD44 upregulation in *Helicobacter pylori*-infected gastric carcinoma. *Mol Cell Biochem* 357, 283–293 ,2011
87. Takaishi S, Okumura T, Tu S, Wang SS, Shibata W, Vigneshwaran R, Gordon SA, Shimada Y, Wang TC. Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem Cells* 27, 1006-1020, 2009

88. Fukui T, Kishimoto M, Nakajima A, Yamashina M, Nakayama S, Kusuda T, Sakaguchi Y, Yoshida K, Uchida K, Nishio A, Matsuzaki K, Okazaki K. The specific linker phosphorylation of Smad2/3 indicates epithelial stem cells in stomach; particularly increasing in mucosae of Helicobacter-associated gastritis. *J Gastroenterol* 46, 456–468, 2011
89. Zhang Y, Huang X. Investigation of doublecortin and calcium /calmodulin dependent protein kinase-like-1-expressing cells in the mouse stomach. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 25, 576–582, 2010
90. Formeister EJ, Sionas AL, Lorance DK, Barkley CL, Lee GH, Magness ST. Distinct SOX9 levels differentially mark stem/progenitor populations and enteroendocrine cells of the small intestine epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 296, G1108–G1118, 2009
91. Blache P, van de Wetering M, Duluc I, Domon C, Berta P, Freund JN, Clevers H, Jay P. SOX9 is an intestine crypt transcription factor, is regulated by the wnt pathway, and represses the *CDX2* and *MUC2* genes. *The Journal of Cell Biology* 166, 37–47, 2004
92. Zhou CJ, Guo JQ, Zhu KX, Zhang QH, Pan CR, Xu WH, Wang HJ, Liu B. Elevated expression of SOX9 is related with the progression of gastric carcinoma.

Diagnostic Cytopathology 39, 105-109, 2010

93. Furuyama K, Kawaguchi Y, Akiyama H, Horiguchi M, Kodama S, Kuhara T, Hosokawa S, Elbahrawy A, Soeda T, Koizumi M, Masui T, Kawaguchi M, Takaori K, Doi R, Nishi E, Kakinoki R, Deng JM, Behringer RR, Nakamura T, Uemoto S. Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. *Nature Genetics* 43, 34-41, 2011
94. Yasui W, Oue N, Sentani K, Sakamoto N, Motoshita J. Transcriptome dissection of gastric cancer: Identification of novel diagnostic and therapeutic targets from pathology specimens. *Pathology International* 59, 121–136, 2009
95. Sashikawa Kimura M, Mutoh H, Sugano K. SOX9 is expressed in normal stomach, intestinal metaplasia, and gastric carcinoma in humans. *J Gastroenterol* 46, 1292–1299, 2011
96. Weis VG, Sousa JF, LaFleur BJ, Nam KT, Weis JA, Finke PE, Ameen NA, Fox JG, Goldenring JR. Heterogeneity in mouse spasmodic polypeptide-expressing metaplasia lineages identifies markers of metaplastic progression. *Gut*. 62, 1270-1279, 2013
97. Goldenring JR, Nomura S. Differentiation of the gastric mucosa III. Animal models of oxyntic atrophy and metaplasia, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*

291, G999–G1004, 2006

98. Gupta A, Wodziak D, Tun M, Bouley DM, Lowe AW. Loss of Anterior Gradient 2 (*Agr2*) expression results in hyperplasia and defective lineage maturation in the murine stomach, *Journal of biological chemistry* 288. 4321–4333, 2013
99. Andrade MC, Menezes JS, Cassali GD, Martins-Filho OA, Cara DC, Faria AM. Alcohol-induced gastritis prevents oral tolerance induction in mice
Clinical and Experimental Immunology 146, 312–322, 2006
100. Simsa-Maziel S, Monsonogo-Ornan E. Interleukin-1 promotes proliferation and inhibits differentiation of chondrocytes through a mechanism involving down-regulation of FGFR-3 and p21. *Endocrinology* 153, 296–2310, 2012
101. Hwang SG, Yu SS, Poo H, Chun JS. c-Jun/Activator Protein-1 mediates interleukin-1 β -induced dedifferentiation but not cyclooxygenase - 2 expression in articular chondrocytes. *J. Biol. Chem.* 280, 29780-29787, 2005
102. Murakami S, Lefebvre V, de Crombrughe B. Potent inhibition of the master chondrogenic factor *Sox9* gene by interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor- α . *The Journal of Biological Chemistry* 275, 3687–3692, 2000
103. Akiyama H, Lyons JP, Mori-Akiyama Y, Yang X, Zhang R, Zhang Z, Deng JM, Taketo MM, Nakamura T, Behringer RR, McCrea PD, de Crombrughe B.

Interactions between Sox9 and β -catenin control chondrocyte differentiation.

Genes & Development 18,1072–1087, 2004

104. Sakamoto K, Hikiba Y, Nakagawa H, Hayakawa Y, Yanai A, Akanuma M, Ogura

K, Hirata Y, Kaestner KH, Omata M, Maeda S. Inhibitor of κ B kinase beta

regulates gastric carcinogenesis via Interleukin-1 α expression

Gastroenterology 139, 226-238, 2010

105. Hitzler I, Sayi A, Kohler E, Engler DB, Koch KN, Hardt WD, Müller A. Caspase-1

has both proinflammatory and regulatory properties in *Helicobacter* infections,

which are differentially mediated by its substrates IL-1 β and IL-18. *The Journal of*

Immunology 188, 3594–3602, 2012

謝辞

本論文の作成にあたり、懇切なる御指導ならびに御鞭撻を賜りました東京大学医学部消化器内科 小池 和彦教授に謹んで御礼申し上げます。

本研究の遂行に当たりましては以下の先生方に特に多大なる御協力を賜りましたことをここに記し、深く感謝申し上げます。

東京大学消化器内科

平田喜裕先生、鈴木伸三先生、木下裕人先生、坪内光子氏

朝日生命成人病研究所附属医院消化器内科

崎谷康祐先生、引場陽子氏

その他、様々な点でご協力頂いた東京大学消化器内科の先生方に感謝致します。