

論文の内容の要旨

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機序の検討

芹澤 多佳子

【背景】*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が、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ている。*H. pylori* の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。*cagPAI* 陽性の *H. pylori* は、感染した胃粘膜上皮の因子 NF- κ B 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や、細胞の増殖、アポトーシスなどに関与している。これまでの*Helicobacter*感染C57BL/6 マウスモデルは、*Helicobacter felis* (*H. felis*)や*H. pylori* Sydney strain-1(SS1) 株の長期感染によって、慢性胃炎、粘膜萎縮、過形成、異型成、化生性変化を発症することが報告されてきた。*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。化生性変化である SPEM (spasmolytic polypeptide expressing metaplasia)や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が、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。これまで*Helicobacter* 感染モデルで用いられていた *H. felis* や SS1 株は、*cagPAI* を有していない菌であるため、*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にそのまま当てはめることはできない可能性がある。本研究では *cagPAI* 陽性の *H. pylori* の感染モデルの樹立を試み、その胃炎の特徴を検討した。さらに、*cagPAI* 陽性の *H. pylori* 感染における幹細胞マーカーの発現変化とその機序について検討した。

【方法】1) 動物：6週齢の雄の C57BL/6 マウス、IL-1 receptor ノックアウト(IL-1R^{-/-})マウスを用い、マウスは標準的な飼育環境下（室温 23°C \pm 2°C、湿度 55% \pm 5%、12/12 時間の明暗周期）で、市販の食餌と水を与えて飼育した。2) *H. pylori* 菌株の培養と感染条件：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、既存の PMSS1 株, SS1 株を用いた。*H. pylori* 感染マウス群に、投与前 24 時間の絶食後、 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。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、12 週、24 週、48 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) 菌培養定量法は既報の通りに行った。プレート上のコ

ロニー数を計測し、一つの胃あたりの CFU 数を \log_{10} で表示した。4) サイトカイン定量：RNA の RT-PCR 定量法、ELISA 法を用いて行った。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、ヘマトキシリン・エオジン(H&E)染色により染色した。胃炎の程度は既報に準じ、①慢性炎症、②萎縮、③ 化生性変化、④ 過形成の4項目について、0~6点で評価した。6)免疫染色：免疫組織化学染色では、抗 H/K-ATPase 抗体、抗 Ki67 抗体、抗 PCNA 抗体、抗 TFF2 抗体を用いた。化生性変化の評価にはアルシアンブルー染色、幹細胞マーカーの指標として、抗 SOX9 抗体、抗 CD44 抗体、抗 DCAMKL-1 抗体を用い、それぞれ手順に従って行った。蛍光免疫染色は、SOX9 の発現部位を同定するため、biotinylated GSII と SOX9 の二重染色をプロトコールに従って行った。7) 臨床分離株の解析：①cagA のシーケンス：*H. pylori* 菌のペレットから 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。②培養細胞は ATCC より入手したヒト胃癌細胞 AGS を用いた。細胞培養液として、FBS 10%、抗生剤としてペニシリン・ストレプトマイシン液を 1%添加した 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ウエスタンブロット解析：*H. pylori* 感染 1 時間後に AGS 細胞を回収し、NF- κ B、MAPK 経路の活性化を確認した。④IL-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 個まいて、*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。上清の IL-8 タンパク濃度は Human IL-8 ELISA kit 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】（実験1）*H. pylori*感染マウスモデルの検討：①マウス感染*H. pylori* 臨床分離株の樹立：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10人の患者から生検にて採取した*H. pylori*菌株を、6週齢の雄のC57BL/6 マウスに感染させた。3週間マウスに持続感染した菌株を回収し、さらに6週齢の雄のC57BL/6 マウスに再感染させ、安定して感染したcagA陽性の菌株をMouse Adapted Clinical Strain 3 (MACS3), MACS4, MACS5と命名した。これら3株はいずれもcagPAIが機能していることを確認した。また、cagAを有さない菌株はMACS6と命名した。②*H. pylori* MACS3 ~MACS6のマウスへの感染実験：樹立したMACS3~MACS6の4株と既に樹立されているPMSSI株やSSI株を、6週齢の雄のC57BL/6 マウスに同時に感染させ、12週後に比較・検討した。これらの菌株間で生着菌量に有意差は認められなかった。病理組織像は、MACS3~MACS6の4株とも、慢性炎症、萎縮、化生性変化、過形成の全てスコアにおいて、PMSSI株よりも低値であった。以上より、MACS3~MACS6は、いずれもマウス胃粘膜に生着したが、PMSSI株と比較してマウスの胃粘膜に強い炎症を起こす菌株ではないことが判明した。

（実験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適さないことが判明したため、PMSSI株を用いて*H. pylori*感染胃炎マウスの胃粘膜でみられる変化について検討した。病理組織像では、HE染色にて慢性炎症、

粘膜の萎縮、化生性変化、過形成が認められた。病理組織学的スコアでは、慢性炎症、粘膜萎縮は24週まで、化生性変化や過形成は48週までは有意に上昇を認めたが、それ以降は増悪は認められなかった。*H. pylori*感染胃粘膜ではサイトカインIL-1 β 、TNF- α の上昇が認められた。抗H⁺-K⁺-ATPase抗体の免疫染色で胃粘膜の萎縮を評価した結果、*H. pylori*感染では壁細胞の減少が認められた。次に細胞の増殖マーカーKi67、PCNAの免疫染色を行った結果、非感染マウスではKi67、PCNAは胃腺管の峽部に発現しているが*H. pylori*感染では峽部から腺管底部へ発現領域の拡大が認められた。アルシアンブルー染色、TFF2の免疫染色にて化生性変化の評価を行った結果、*H. pylori*感染では、発現が増加し、経時的に頸部から腺管底部へ発現領域の拡大が認められた。

(実験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。そこで、*H. pylori*感染における幹細胞マーカー発現について、胃癌の幹細胞マーカーと考えられるCD44、DCAMKL-1、SOX9の免疫染色を行った。その結果、*H. pylori*感染マウスの胃粘膜でこれらの幹細胞マーカー発現が増加していた。特に、SOX9の発現パターンと、化生性変化あるいはTFF2の発現パターンとは、ほぼ一致していた。

(実験4) *H. pylori*感染におけるIL-1 β の役割：*H. pylori*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。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、*H. pylori*感染で萎縮性胃炎や発癌発症のリスクが高くなることが報告されている。そこでIL-1R^{-/-}マウスを用いて、*H. pylori*感染胃炎におけるIL-1 β の関与について検討した。IL-1R^{-/-}マウス、wild typeマウスにPMSS1株を感染させ、感染12週で比較検討した。生着菌量は、wild typeマウスとIL-1R^{-/-}マウスとの間に有意差は見られなかった。病理組織像はHE染色ではIL-1R^{-/-}マウスの方が、慢性炎症、萎縮、化生性変化、過形成は有意に低下した。抗H⁺-K⁺-ATPase抗体の免疫染色では、IL-1R^{-/-}マウスでは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。アルシアンブルー染色、TFF2の免疫染色ではIL-1R^{-/-}マウスで発現が低下していた。さらに、CD44、DCAMKL-1、SOX9の免疫染色を行い、陽性細胞数を定量化して比較した結果、CD44、DCAMKL-1陽性細胞数は、IL-1R^{-/-}マウスとwild typeマウスとの間に統計学的有意差は認められなかったが、SOX9の陽性細胞数は、IL-1R^{-/-}マウスでは有意に低下していた。よって、IL-1 β はマウス胃粘膜への*H. pylori*の生着には関与していないが、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と考えられた。

【考察】本研究で樹立したマウス感染*H. pylori*臨床分離株は、in vitroではcagPAIが機能し、IL-8分泌やNF- κ BやMAPK経路の活性化が確認されたものの、in vivoではマウスに強い胃炎を起こす菌株ではなかった。このことから、胃炎の発症にはcagPAI以外の因子が強く影響している可能性が示された。本研究では、*H. pylori*感染胃粘膜で幹細胞マーカーの発現が増加することが明らかとなったが、特にSOX9の発現拡大パターンが化生性変化の指標であるTFF2の発現拡大パターンと一致していたことから、SOX9と化生性変化の間に何

らかの関連があることが予想された。さらに、*H. pylori* 感染 IL-1R^{-/-}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 シグナルが介在する胃炎と 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。今後は実際に 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検討すること、そして IL-1 シグナルは直接 SOX9 発現に関与しているのかどうか明らかにすることが課題であるといえる。

【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か否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。