



“*Helicobacter heilmannii*” can induce gastric lymphoid follicles in mice via a Peyer’s Patch independent pathway

信谷，健太郎

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2010-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5104

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005104>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名 信谷 健太郎
博士の専攻分野の名称 博士(医学)
学位記番号 博い第 5104 号
学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の日付 平成 22 年 9 月 25 日

【学位論文題目】

“*Helicobacter heilmannii*” can induce gastric lymphoid follicles in mice via a Peyer’s Patch independent pathway
 (“*Helicobacter heilmannii*” 菌はパイエル板非依存的にマウス胃粘膜にリンパ濾胞を誘導する)

審査委員

主査 教 授 南 博信
教 授 堀田 博
教 授 伊藤 智雄

"*Helicobacter heilmannii*" can induce gastric lymphoid follicles in mice via a Peyer's Patch independent pathway

"*Helicobacter heilmannii*" 菌はパイエル板非依存的にマウス胃粘膜にリンパ濾胞を誘導する

神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻
消化器内科学
(指導教員: 東 健 教授)

信谷 健太郎

はじめに

胃 MALT リンパ腫発症と *Helicobacter pylori* 菌感染の関連は臨床的に極めて重要である一方で、胃 MALT リンパ腫発症やその前癌病変である胃粘膜リンパ組織（胃 MALT）の形成における、胃粘膜の免疫学的応答のメカニズムについては依然未知の部分が多い。

消化管粘膜の免疫応答においてはパイエル板がその誘導器官として重要であることは広く知られているが、特に *Helicobacter pylori* 菌感染による慢性胃炎の発症においては、パイエル板を介した菌特異的な CD4 陽性 T リンパ球の活性化が必要不可欠であることが、パイエル板欠損マウスを用いた実験により示されている。しかしながら胃 MALT 形成におけるパイエル板を介した免疫応答の役割については明らかではない。

一方、*Helicobacter pylori* 菌の類縁菌である "*Helicobacter heilmannii*" 菌は、ヒト、マウスなどの宿主胃への持続感染により、*Helicobacter pylori* 菌よりも高率に胃 MALT リンパ腫を発症させることが臨床的に、また実験的にも報告されている。特に C57BL6 マウスへの "*Helicobacter heilmannii*" 菌感染においては、わずか 6 ヶ月の感染で 100% という極めて高い確率で胃 MALT リンパ腫が発症することが近年報告されている。

今回我々は、*Helicobacter* 菌感染による胃 MALT 形成における、パイエル板を介した免疫応答の役割を明らかにするため、パイエル板欠損 C57BL6 マウスに、"*Helicobacter heilmannii*" 菌を感染させ、感染胃粘膜の組織学的検討およびサイトカイン、ケモカインの発現パターンの検討を行った。

方法

過去の報告に従い、胎生 14.5 日に抗インターロイキン 7 抗体を投与することでパイエル板欠損 C57BL6 マウスを作成した。野生型マウスおよびパイエル板欠損マウスにそれぞれ "*Helicobacter heilmannii*" 菌を経口感染させ、1 カ月後と 3 カ月後に感染胃を採取し、感染胃粘膜の HE 染色と免疫染色による組織学的検討および定量的 RT-PCR によるサイトカイン、ケモカインの発現パターンの検討を行った。

結果

1. "*Helicobacter heilmannii*" 菌感染により、パイエル板欠損マウスにおいても、胃リンパ濾胞が形成された。
免疫組織学的検討および "*Helicobacter heilmannii*" 菌 16S rRNA に対する定量的 PCR 法において、感染 1 ケ月後、3 カ月後ともに、野生型マウスとパイエル板欠損マウス間に、感染する "*Helicobacter heilmannii*" 菌の菌

量および感染部位に違いは認めなかった。HE 染色による検討では *Helicobacter pylori* 菌感染による慢性胃炎で特徴的なびまん性の細胞浸潤や腺の萎縮などの所見は、いずれの“*Helicobacter heilmannii*”菌感染マウスにおいてもほとんど認められなかつた。一方、感染 1 カ月後には野生型マウス、パイエル板欠損マウスとともに、胃 MALT である胃リンパ濾胞が感染胃粘膜に認められ、3 カ月後にはリンパ濾胞は増大していた。ただし感染 1 カ月後のパイエル板欠損マウスでは、野生型マウスに比べて、観察される濾胞の数は少なく、大きさも小さい傾向が認められた。これらのことから、“*Helicobacter heilmannii*”菌による胃リンパ濾胞形成に、パイエル板を介する免疫応答は必須ではないが、その初期の形成速度には影響を与えていることが示唆された。

2. “*Helicobacter heilmannii*”菌感染により、パイエル板欠損マウスにおいても、胃粘膜に樹状細胞、B 細胞、CD4 陽性 T 細胞の増加を認めた。

次に感染胃粘膜の樹状細胞、B 細胞および CD4 陽性 T 細胞の分布を免疫蛍光染色法にて検討したところ、野生型マウス、パイエル板欠損マウスとともに、これら免疫細胞の増加が認められた。胃リンパ濾胞は B 細胞を中心に構成され、B 細胞集塊の辺縁部と周辺を中心に樹状細胞と CD4 陽性 T 細胞の増加を認めた。一方両マウスとともに、濾胞部以外の部位での細胞浸潤は濾胞部と比べて軽微だった。野生型マウス、パイエル板欠損マウス間でこれら各細胞の分布と比率に違いは認めなかつたが、形成される細胞集塊の数は感染 1 カ月後のパイエル板欠損マウスで少なかつた。感染 3 カ月後には各細胞の分布と比率を保ったまま濾胞は増大し、両マウス間で細胞集塊の数に差は認めなかつた。これらのことから、“*Helicobacter heilmannii*”菌感染により形成される胃リンパ濾胞は、樹状細胞、B 細胞、CD4 陽性 T 細胞で構成され、これら各細胞はパイエル板を介した免疫応答を必要とせずに、感染胃粘膜に浸潤することが示唆された。

3. “*Helicobacter heilmannii*”菌感染により、パイエル板欠損マウスにおいても、サイトカインやケモカインの発現を認めた。

次に、*Helicobacter* 菌感染による感染胃粘膜の炎症反応とリンパ球浸潤およびリンパ濾胞形成に関連すると考えられるサイトカイン(TNF α 、IFN γ)およびケモカイン(CCL2、CXCL13)について、これらの発現を定量的 RT-PCR 法にて比較検討した。感染 1 カ月後には野生型マウス、パイエル板欠損マウスとともに、いずれのサイトカイン、ケモカインも発現の増加傾向を認めたが、野生型マウスに比べ、パイエル板欠損マウスにおいて、両ケモカインの発現が有意差をもって低かった。感染 3 カ月後には、野生型マウス、パイエル板欠損マウスともにサイトカインの発現は減少傾向を認

め、一方、両ケモカインの発現はいずれのマウスにおいても劇的に増加しており、両マウス間に有意差は認めなかつた。これらのことから、“*Helicobacter heilmannii*”菌感染は、パイエル板を介した免疫応答を必要とせずに、胃粘膜におけるサイトカインおよびケモカインの発現を増加させること、またパイエル板の有無が感染早期のケモカインの発現レベルに影響を与えていること、が示唆された。

まとめ

以上のことから、“*Helicobacter heilmannii*”菌感染による胃 MALT の形成と発達において、パイエル板を介した免疫応答はその初期の形成速度に影響を与えるが、必要不可欠ではないことが示された。すなわち胃 MALT は、*Helicobacter* 菌感染による通常の慢性胃炎とは異なり、パイエル板を介した菌特異的な適応免疫系の活性化を必要とせずに形成されることが示唆された。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2137 号	氏名	信谷 健太郎
論文題目 Title of Dissertation	<p>"<i>Helicobacter heilmannii</i>"菌はパイエル板非依存的にマウス胃粘膜にリンパ濾胞を誘導する</p> <p>"<i>Helicobacter heilmannii</i>" can induce gastric lymphoid follicles in mice via a Peyer's Patch independent pathway</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 <u>角 博信</u> Chief Examiner</p> <p>副査 <u>堀田 博</u> Vice-examiner</p> <p>副査 <u>伊藤 博之</u> Vice-examiner</p>		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

はじめに

胃 MALT リンパ腫発症と *Helicobacter pylori* 菌感染の関連は臨床的に重要であるが、胃 MALT リンパ腫発症やその前癌病変である胃粘膜リンパ組織（胃 MALT）の形成における、胃粘膜の免疫学的応答のメカニズムについては依然未知の部分が多い。

パイエル板は消化管粘膜の免疫応答の誘導器官として重要である。特に *Helicobacter pylori* 菌感染による慢性胃炎の発症では、パイエル板を介した菌特異的な CD4 陽性 T リンパ球の活性化が必要不可欠であることが、パイエル板欠損マウスを用いた実験で示されている。一方、胃 MALT 形成におけるパイエル板を介した免疫応答の役割は不明である。

一方、*Helicobacter pylori* 菌の類縁菌である "*Helicobacter heilmannii*" 菌は、ヒト、マウスなどの宿主胃への持続感染により、*Helicobacter pylori* 菌よりも高率に胃 MALT リンパ腫を発症させることが臨床的に、また実験的にも報告されている。特に C57BL6 マウスへの "*Helicobacter heilmannii*" 菌感染においては、わずか 6 ヶ月の感染で 100% という極めて高い確率で胃 MALT リンパ腫が発症することが近年報告されている。

本研究では、*Helicobacter* 菌感染による胃 MALT 形成における、パイエル板を介した免疫応答の役割を明らかにするため、パイエル板欠損 C57BL6 マウスに、"*Helicobacter heilmannii*" 菌を感染させ、感染胃粘膜の組織学的検討およびサイトカイン、ケモカインの発現パターンの検討を行った。

方法

過去の報告に従い、胎生 14.5 日に抗インターロイキン 7 抗体を投与することでパイエル板欠損 C57BL6 マウスを作成した。野生型マウスおよびパイエル板欠損マウスにそれぞれ "*Helicobacter heilmannii*" 菌を経口感染させ、1 カ月後と 3 カ月後に感染胃を採取し、感染胃粘膜の HE 染色と免疫染色による組織学的検討および定量的 RT-PCR によるサイトカイン、ケモカインの発現パターンの検討を行った。

結果

1. "*Helicobacter heilmannii*" 菌感染により、パイエル板欠損マウスにおいても、胃リンパ濾胞が形成された。

免疫組織学的検討および "*Helicobacter heilmannii*" 菌 16S rRNA に対する定量的 PCR 法において、感染 1 カ月後、3 カ月後とともに、野生型マウスとパイエル板欠損マウス間に、感染する "*Helicobacter heilmannii*" の菌量および感染部位に差はなかった。HE 染色では *Helicobacter pylori* 菌感染による慢性胃炎に特徴的なびまん性細胞浸潤や腺萎縮などの所見は、いずれの "*Helicobacter heilmannii*" 菌感染マウスにおいてもほとんど認めなかった。一方、感染 1 カ月後には野生型マウス、パイエル板欠損マウスとともに、胃 MALT である胃リンパ濾胞が感染胃粘膜に認められ、3 カ月後には増大していた。ただし感染 1 カ月後のパイエル板欠損マウスでは、野生型マウスに比べて、濾胞の数は少なく大きさも小さい傾向が認められた。これらのことから、"*Helicobacter heilmannii*" 菌による胃リンパ濾胞形成に、パイエル板を介する免疫応答は必須ではないが、その初期の形成速度には影響を与えていることが示唆された。

2. “*Helicobacter heilmannii*”菌感染により、パイエル板欠損マウスにおいても、胃粘膜に樹状細胞、B細胞、CD4陽性T細胞の増加を認めた。
- 感染胃粘膜の樹状細胞、B細胞およびCD4陽性T細胞の分布を免疫蛍光染色法にて検討したところ、野生型マウス、パイエル板欠損マウスとともに、これら免疫細胞の増加が認められた。胃リンパ濾胞はB細胞を中心に構成され、B細胞集塊の辺縁部と周辺を中心に樹状細胞とCD4陽性T細胞の増加を認めた。一方両マウスともに、濾胞部以外の部位での細胞浸潤は軽微だった。野生型マウス、パイエル板欠損マウス間でこれら各細胞の分布と比率に差は認めなかつたが、形成される細胞集塊の数は感染1ヶ月後のパイエル板欠損マウスで少なかつた。感染3ヶ月後には各細胞の分布と比率を保つたまま濾胞は増大し、両マウス間で細胞集塊の数に差は認めなかつた。これらのことから、“*Helicobacter heilmannii*”菌感染により形成される胃リンパ濾胞は、樹状細胞、B細胞、CD4陽性T細胞らで構成され、これら各細胞はパイエル板を介した免疫応答を必要とせずに、感染胃粘膜に浸潤することが示唆された。
3. “*Helicobacter heilmannii*”菌感染により、パイエル板欠損マウスにおいても、サイトカインやケモカインの発現を認めた。
- Helicobacter* 菌感染による感染胃粘膜の炎症反応とリンパ球浸潤およびリンパ濾胞形成に関連すると考えられるサイトカイン(TNF α 、IFN γ)とケモカイン(CCL2、CXCL13)の発現を定量的 RT-PCR 法にて比較討した。感染1ヶ月後には野生型マウス、パイエル板欠損マウスとともに、いずれのサイトカイン、ケモカインも発現の増加傾向を認めたが、野生型マウスに比べパイエル板欠損マウスでは両ケモカインの発現が有意に低かった。感染3ヶ月後には、野生型マウス、パイエル板欠損マウスとともにサイトカインの発現は減少傾向を認め、両ケモカインの発現はいずれのマウスにおいても劇的に増加しており両マウス間に有意差はなかった。これらより、“*Helicobacter heilmannii*”菌感染はパイエル板を介した免疫応答を必要とせずに、胃粘膜におけるサイトカインおよびケモカインの発現を増加させること、またパイエル板の有無が感染早期のケモカインの発現レベルに影響を与えていること、が示唆された。
- まとめ
- 以上のことから、“*Helicobacter heilmannii*”菌感染による胃 MALT の形成と発達において、パイエル板を介した免疫応答はその初期の形成速度に影響は与えるが、必要不可欠ではないことが示された。すなわち胃 MALT は、*Helicobacter* 菌感染による通常の慢性胃炎とは異なり、パイエル板を介した菌特異的な適応免疫系の活性化を必要とせずに形成されることが示唆された。
- 以上のように、本研究は、パイエル板欠損 C57BL6 マウスにおける“*Helicobacter heilmannii*”菌感染による感染胃粘膜の組織像とサイトカイン、ケモカインの発現を解析したものであるが、胃 MALT 形成におけるパイエル板を介した免疫応答に関する重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。よって本研究は博士（医学）の学位を得る資格があると認められる。