



Helicobacter suis KB1 derived from pig gastric lymphoid follicles induces the formation of gastric lymphoid follicles in mice through the activation of B cells and CD4 positive cells

山本, 幸司

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2011-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5317

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005317>

※ 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。



学位論文の内容要旨

Helicobacter suis KB1 derived from pig gastric lymphoid follicles induces the formation of gastric lymphoid follicles in mice through the activation of B cells and CD4 positive cells

ブタ胃リンパ濾胞由来 *Helicobacter suis* KB1 は、B 細胞および CD4 陽性細胞の活性化を介した、マウス胃にリンパ濾胞を誘導する。

山本 幸司、田中 擴址、西谷 洋輔、西海 信、三木 生也、竹中 完、信谷 健太郎、三村 卓也、ヤハヤベンスレイマン、永野 成人、河合 幹彦、内山 郁夫、吉田 優、東 健

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)

山本 幸司

Key words: *H. suis* KB1; Gastric lymphoid follicles; CD4 positive cells; B cells; Zoonotic infection.

研究論文内容の要旨

Helicobacter pylori (*H. pylori*) は、螺旋構造を示すグラム陰性細菌であり、慢性炎症や消化性潰瘍、胃がんの発症に関与していることが知られている。一方で、*H. pylori* 以外の螺旋構造を有する *Non-Helicobacter pylori helicobacters* (NHPH) もまた、胃炎や胃潰瘍、胃がんの発症に関係することが示唆されている。NHPH は、ヒトやその他の多くの哺乳動物の胃に感染しており、NHPH のうち "*H. heilmannii*" は、MALT リンパ腫の原因菌として報告されている。"*H. heilmannii*" は、*Gastrospirillum hominis* として知られており、長さが 4 から 10 μm 、そして 3 から 8 回のねじれ構造をもつ運動性の細菌で、最大 14 本の単極、または、双極の鞭毛を持つこと、ヒト慢性胃炎患者の 0.2 から 4% で検出されることが明らかにされた。さらに、"*H. heilmannii*" 感染は、イヌやネコ、ブタ、ウシを含む多くの哺乳動物に認められることから、この感染は人獣共通感染症であり、これらの動物からヒトへ感染することが想定されている。これまでに、胃 MALT 型リンパ腫患者やカニクイザルから分離された "*H. heilmannii*" をマウスに経口感染させることにより、胃 MALT 型リンパ腫が誘導されることが報告された。さらに、16SrRNA 遺伝子に基づくシーケンス解析より "*H. heilmannii*" は、"*H. heilmannii*" type1 と "*H. heilmannii*" type2 に分類され、ヒト、ブタ、ならびに、カニクイザル由来 "*H. heilmannii*" は、"*H. heilmannii*" type1 とされている。近年の

研究において、16SrRNA 遺伝子、ならびに、ウレアーゼ遺伝子に基づく系統樹解析が実施され、“*H. heilmannii*” type1 は、分類学上 *H. suis* として定義されている。*H. suis* もまた、*H. pylori* と同様に螺旋構造を有する細菌であり、ブタ胃粘膜の 60%以上、さらには、ヒトの胃粘膜でも感染が確認されていることから、本細菌は、人畜共通感染症の原因菌のひとつとして注目されている。しかし、本細菌は難培養性細菌であることから、これまでにその詳細については研究がなされていない。これまでの報告では、*H. suis* はブタ胃粘膜に感染し、胃のリンパ濾胞形成に関与していることが明らかにされている。そこで我々は、ブタ胃粘膜に感染している *H. suis* と胃病変との関連性について検討した。ブタ胃粘膜の組織学的検討により、14 匹中 9 匹のブタ胃粘膜において、リンパ濾胞の形成を認めた。胃粘膜にリンパ濾胞を認めた組織において、ギムザ染色を行った結果、螺旋構造を示す細菌の存在が観察された。また、胃リンパ濾胞を認めたブタ胃粘膜すべてにおいて、*H. suis* (*H. heilmannii* type1) に特異的な遺伝子が増幅がされ、濾胞が形成されない胃粘膜部位では、その遺伝子の存在は認められなかった。さらに、ブタ胃粘膜における濾胞形成に関与する細菌の情報について詳細に解析するため、系統樹解析を実施した。16SrRNA 遺伝子、ならびに、ウレアーゼ遺伝子に基づく、他の *Helicobacter* 属とのゲノム比較解析の結果、ブタ胃粘膜に感染している *Helicobacter* 細菌は、既存の *H. suis* および“*H.*

heimannii” type1 の遺伝子配列と 98%以上の高い相同性を認めた。また、“*H. heilmannii*” type2 として知られている *H. felis*、*H. bizzozeronii*、ならびに、*H. salomonis* とは、86%程度の一致率であり、細菌学的な相同性は低かった。これらの結果から、ブタ胃粘膜に感染し、かつ、濾胞形成を誘導する細菌を *H. suis* と同定し、本研究において、新たに *H. suis* KB1 として命名した。

これまでに我々は、“*H. heilmannii*” type1 はマウス胃粘膜に感染することを報告したが、今回、ブタ胃粘膜から分離した *H. suis* KB1 も“*H. heilmannii*” type1 感染と同様に、マウス胃粘膜に感染し、胃病変の発症に関与するかについて検討した。*H. suis* KB1 に感染しており、かつ、濾胞形成を認めたブタ胃粘膜、ならびに、濾胞形成を認めない *H. suis* KB1 非感染のブタ胃粘膜のホモジネート液をマウスに経口投与し、マウス胃粘膜における病態を検討した。感染後のマウス胃粘膜における *H. suis* KB1 の存在を確認するために、*H. suis* と交差反応性を示す抗 *H. pylori* 抗体を用いた免疫染色、ならびに、ギムザ染色を実施した。これらの結果、*H. suis* KB1 感染マウスの胃低腺部、ならびに、噴門部領域に螺旋構造を示す *Helicobacter* の存在が観察された。さらに、*H. suis*、および、“*H. heilmannii*” type1 特異的プライマーを用いた PCR 解析により、マウス胃粘膜に感染する細菌は、*H. suis* KB1 であることが明らかとなった。

“*H. heilmannii*” type1 は、マウス胃粘膜に感染し、リンパ濾胞の形成、ならび

に、胃 MALT リンパ腫を誘導することが知られている。そこで我々は、*H. suis* KB1 感染でも同様にマウス胃粘膜にリンパ濾胞の形成や胃 MALT リンパ腫形成を誘導するかどうかを検討した。HE 染色の結果、*H. suis* KB1 感染後 3 ヶ月から、マウス胃粘膜においてリンパ濾胞の形成を認め、感染 6 ヶ月では、濾胞の数、ならびにその大きさが増大した。さらに、*H. suis* KB1 感染により、どのような炎症性細胞がマウス胃粘膜に浸潤するのかを免疫染色法により検討した。*H. suis* KB1 感染後のマウス胃粘膜において、濾胞形成を認めた部位の周囲に、B220 細胞、ならびに、CD4 陽性 T 細胞が多数集積し、それらの数は、感染期間とともに増加傾向にあった。これらの結果は、ブタの胃リンパ濾胞由来の *H. suis* KB1 は、マウス胃粘膜に感染し、獲得免疫系を活性化することで、リンパ濾胞形成を誘導することが示唆している。

本研究において、*H. suis* として定義された "*H. heilmannii*" type1 のうち、ブタ胃粘膜における濾胞の周囲に存在する細菌を *H. suis* KB1 として命名し、それが自然感染したブタ胃粘膜において濾胞性胃炎を誘導する可能性を明らかにした。また、*H. suis* KB1 は、マウス胃粘膜にも感染可能であり、CD4 陽性 T 細胞、ならびに、B 細胞の活性化を介して、胃 MALT リンパ腫形成の初期段階としてのリンパ濾胞形成を誘導する可能性も見出した。*H. suis* KB1 は異種動物間で容易に感染できることから、今後、ヒトへの影響についても検討されることが望ま

れる。

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第 2188 号	氏 名	山本 幸司
論文題目 Title of Dissertation	<p><i>Helicobacter suis</i> KB1 derived from pig gastric lymphoid follicles induces the formation of gastric lymphoid follicles in mice through the activation of B cells and CD4 positive cells</p> <p>ブタ胃リンパ濾胞由来 <i>Helicobacter suis</i> KB1 は、B 細胞および CD4 陽性細胞の活性化を介した、マウス胃にリンパ濾胞を誘導する</p>		
審査委員 Examiner	<p>主 査 川 端 要 人 Chief Examiner</p> <p>副 査 林 祥 剛 Vice-examiner</p> <p>副 査 南 博 信 Vice-examiner</p>		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

題目

Helicobacter suis KB1 derived from pig gastric lymphoid follicles induces the formation of gastric lymphoid follicles in mice through the activation of B cells and CD4 positive cells

ブタ胃リンパ濾胞由来 *Helicobacter suis* KB1 は、B 細胞および CD4 陽性細胞の活性化を介した、マウス胃にリンパ濾胞を誘導する

要旨

Helicobacter pylori (*H. pylori*) は、螺旋構造を示すグラム陰性細菌で、慢性炎症や消化性潰瘍、胃がんの発症に関与していることが知られている。一方で、*H. pylori* 以外の螺旋構造を有する Non-*Helicobacter pylori helicobacters* (NHPH) もまた、胃炎や胃潰瘍、胃がんの発症に関係することが示唆されている。NHPH は、ヒトや他の哺乳動物の胃に感染しており、NHPH のうち "*H. heilmannii*" は、MALT リンパ腫の原因菌として報告されている。"*H. heilmannii*" は、ヒト慢性胃炎患者の 0.2 から 4% で検出されることが明らかにされた。これまでに、胃 MALT 型リンパ腫患者などから分離された "*H. heilmannii*" をマウスに経口感染させることにより、胃 MALT 型リンパ腫が誘導されることが報告された。さらに、"*H. heilmannii*" は、"*H. heilmannii* type1" と "*H. heilmannii* type2" に分類され、ヒト、ブタ、ならびに、カニクイザル由来は、"*H. heilmannii* type1" とされている。近年の研究においては、"*H. heilmannii* type1" は、分類学上 *H. suis* として定義されている。*H. suis* は、ブタ胃粘膜の 60% 以上、ヒトの胃粘膜でも感染が確認されていることから、本細菌は、人畜共通感染症の原因菌のひとつとして注目されている。これまでの報告では、*H. suis* はブタ胃粘膜に感染し、胃のリンパ濾胞形成に関与していることが明らかにされている。そこで我々は、ブタ胃粘膜に感染している *H. suis* と胃病変との関連性について検討した。

ブタ胃粘膜の組織学的検討により、14 匹中 9 匹のブタ胃粘膜において、リンパ濾胞の形成を認めた。胃粘膜にリンパ濾胞を認めた組織において、ギムザ染色を行った結果、螺旋構造を示す細菌の存在が観察された。また、胃リンパ濾胞を認めたブタ胃粘膜すべてにおいて、*H. suis* (*H. heilmannii* type1) に特異的な遺伝子が増幅され、濾胞が形成されない胃粘膜部位では、その遺伝子の存在は認められなかった。さらに、16SrRNA 遺伝、ならびに、ウレアーゼ遺伝子に基づく、他の *Helicobacter* 属とのゲノム比較解析の結果、ブタ胃粘膜に感染している *Helicobacter* 細菌は、既存の *H. suis* および "*H. heilmannii* type1" の遺伝子配列と 98% 以上の高い相同性を認めた。また、"*H. heilmannii* type2" として知られている *H. felis*、*H. bizzozeronii*、ならびに、*H. salmonis* とは、86% 程度の一致率であり、細菌学的な相同性は低かった。これらの結果から、ブタ胃粘膜に感染し、かつ、濾胞形成を誘導する細菌を *H. suis* と同定し、本研究において、新たに *H. suis* KB1

として命名した。

これまでに我々は、"*H. heilmanni*" type1 はマウス胃粘膜に感染することを報告したが、今回、ブタ胃粘膜から分離した *H. suis* KB1 も "*H. heilmanni*" type1 感染と同様に、マウス胃粘膜に感染し、胃病変の発症に関与するかについて検討した。*H. suis* KB1 に感染しており、かつ、濾胞形成を認めたブタ胃粘膜、ならびに、濾胞形成を認めない *H. suis* KB1 非感染のブタ胃粘膜のホモジネート液をマウスに経口投与し、マウス胃粘膜における病態を検討した。感染後のマウス胃粘膜における *H. suis* KB1 の存在を確認するために、抗 *H. pylori* 抗体を用いた免疫染色、ギムザ染色を実施した。これらの結果、*H. suis* KB1 感染マウスの胃低腺部、ならびに、噴門部領域に *Helicobacter* の存在が観察された。さらに、*H. suis* 、および、"*H. heilmanni*" type1 特異的プライマーを用いた PCR 解析により、マウス胃粘膜に感染する細菌は、*H. suis* KB1 であることが明らかとなった。

次に我々は、*H. suis* KB1 感染でも同様にマウス胃粘膜にリンパ濾胞の形成や胃 MALT リンパ腫形成を誘導するかどうかを検討した。HE 染色の結果、*H. suis* KB1 感染後 3 ヶ月から、マウス胃粘膜においてリンパ濾胞の形成を認め、感染 6 ヶ月では、濾胞の数、ならびにその大きさが増大した。さらに、*H. suis* KB1 感染後のマウス胃粘膜において、濾胞形成を認めた部位の周囲に、B220 細胞、ならびに、CD4 陽性 T 細胞が多数集積し、それらの数は、感染期間とともに増加傾向にあった。これらの結果は、ブタの胃リンパ濾胞由来の *H. suis* KB1 は、マウス胃粘膜に感染し、獲得免疫系を活性化することで、リンパ濾胞形成を誘導することが示唆している。

本研究はブタ胃リンパ濾胞由来 *Helicobacter suis* KA1 について、胃病変との関連を研究したものであるが、従来ほとんど行われていなかったマウス胃粘膜にも感染可能であり、CD4 陽性 T 細胞、ならびに、B 細胞の活性化を介して、胃 MALT リンパ腫形成の初期段階としてのリンパ濾胞形成を誘導する可能性を見出し、重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。