



## Interferon- $\gamma$ -producing B cells induce the formation of gastric lymphoid follicles after *Helicobacter suis* infection

Yang, L

---

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2015-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6368号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006368>

※ 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。



Interferon- $\gamma$ -producing B cells induce the formation of gastric lymphoid follicles after *Helicobacter suis* infection

インターフェロン- $\gamma$  産生 B 細胞は、ヘリコバクタースイス感染後の胃リンパ濾胞形成を誘導する

楊 林、山本 幸司、西海 信、中村 正彦、松井 英則、高橋 信一、土肥 多恵子、岡田 俊彦、柿本 一城、星 奈美子、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)

楊 林

Key words: *H. suis*; gastric lymphoid follicles; gastric B cells; IFN- $\gamma$

【結果】

*H. suis* 感染は、IFN- $\gamma$  依存的に B 細胞、CD4 陽性 T 細胞、DCs、ならびに、FDCs からなる胃リンパ濾胞形成を誘導する。

近年、我々は、*H. suis* 感染マウス胃粘膜では、IFN- $\gamma$  の発現が上昇しており、その IFN- $\gamma$  が胃リンパ濾胞形成に関与している可能性を明らかにしてきた。そこで、本研究では、*H. suis* 感染後の IFN- $\gamma$  の活性化と胃リンパ濾胞形成との関連性を明らかにするために、IFN- $\gamma$  欠損(IFN- $\gamma$  KO)マウス、ならびに、その野生型マウスに *H. suis* を 6 ヶ月間感染させ実験を行った。その結果、*H. suis* 感染マウスの胃粘膜では、B 細胞、CD4 陽性細胞、DCs、ならびに、FDCs で構成される胃リンパ濾胞が多数形成されるのに対し、IFN- $\gamma$  KO マウスの胃粘膜では、リンパ濾胞形成は、全く観察されなかった。さらに、B 細胞リンパ腫形成に重要な遺伝子である活性化誘導シチジンデアミナーゼ (AID) の活性化が、感染マウス胃粘膜で確認できた。これらの結果から、IFN- $\gamma$  の活性化が、*H. suis* 感染後の胃リンパ濾胞形成に重要であることが示唆された。

IFN- $\gamma$  は、*H. suis* 感染胃粘膜で高い活性化を示す。

次に、我々は、*H. suis* 感染後のマウス胃粘膜において、IFN- $\gamma$  が活性化しているか否かについて検討した。定量的 PCR を行った結果、*H. suis* 感染マウス胃粘膜では、IFN- $\gamma$  の発現は、非感染マウスと比較して有意に上昇しており、さらに、免疫染色法の結果から、IFN- $\gamma$  は、胃リンパ濾胞内、ならびに、その周辺に存在することが明らかとなった。

*H. suis* は、胃粘膜に局在し、IFN- $\gamma$  KO マウスの胃粘膜では、菌量は維持される。

続いて、我々は、感染 6 ヶ月後のマウス胃粘膜における *H. suis* の感染の程度について検討した。*H. suis* 特異的プライマーを用いた定量的 PCR 法の結果、*H. suis* 感染野生型マウスの胃粘膜と比較して、*H. suis* 感染 IFN- $\gamma$  KO マウス胃粘膜の方が、*H. suis* の菌量は高値を示した。これらの結果から、IFN- $\gamma$  の産生は、ヘリコバクター感染を制御している可能性が示唆された。

IFN- $\gamma$  活性化関連遺伝子は、*H. suis* 感染野生型マウス胃粘膜で高い発現上昇を示す。

IL-12、ならびに、T-bet は、主要な IFN- $\gamma$  産生因子として知られており、特に、IL-12 によって刺激された T 細胞、B 細胞、ならびに、DCs では、T-bet-IFN- $\gamma$  受容体依存的経路を介して IFN- $\gamma$  が产生されることが報告されている。そこで、我々は、*H. suis* 感染後のマウス胃粘膜における、IFN- $\gamma$  活性化関連遺伝子の発現変動について検討した。その結果、野生型マウスにおける *H. suis* 感染によって、その胃粘膜での IL-12、T-bet、ならびに、IFN- $\gamma$  受容体の発現が、有意に上昇していたが、IFN- $\gamma$  KO マウス胃粘膜では、それらの遺伝子発現上昇は認められなかった。これらの結果、IL-12、T-bet、ならびに、IFN- $\gamma$  受容体の発現は、*H. suis* 感染後の IFN- $\gamma$  の産生に寄与していることが示唆された。

最後に、筆者は、*H. suis* 感染後の IFN- $\gamma$  産生細胞を特定するために、マウス胃粘膜に浸潤した細胞内の IFN- $\gamma$  を FACS により検出した。その結果、*H. suis* 感染後の胃粘膜に浸潤した IFN- $\gamma$  産生細胞は、B 細胞であることが明らかとなった。B 細胞には、大きく分けて B1 細胞と B2 細胞の 2 種類の亜集団が存在し、B1 細胞は、体腔内に、また、B2 細胞は、二次リンパ組織に存在し、サイトカイン産生や免疫反応を含む粘膜領域に浸潤することが報告されている。そこで、筆者は、どのタイプの B 細胞が、*H. suis* 感染後の IFN- $\gamma$  産生に寄与しているかを FACS により検討した。その結果、マウス胃粘膜に浸潤した IFN- $\gamma$  産生 B 細胞は、B2 細胞であることが同定された。さらに、免疫染色法により、IFN- $\gamma$  の活性化は、*H. suis* 感染後の野生型マウスとともに、野生型 B 細胞を移入した IFN- $\gamma$  KO マウスの胃粘膜に浸潤した B 細胞において認められ、これらは、TCR KO マウス胃粘膜に浸潤した B 細胞でも同様に観察された。そこで、筆者は、*H. suis* 感染マウス、ならびに、非感染マウス胃粘膜から B 細胞を FACS により精製し、B 細胞における IFN- $\gamma$  の発現について確認した。その結果、*H. suis* 感染胃粘膜に浸潤した胃粘膜 B 細胞は、非感染マウス胃粘膜由来 B 細胞に比べて有意に IFN- $\gamma$  の発現が上昇していることが明らかとなり、*H. suis* 感染後の胃粘膜に浸潤した B 細胞は、IFN- $\gamma$  の産生を促進させ、胃リンパ濾胞形成に重要な役割を担うことが示された。

#### 【結語】

本研究において、筆者は、*H. suis* 感染マウス胃粘膜に浸潤した濾胞性 B 細胞が産生する IFN- $\gamma$  が胃リンパ濾胞形成に関連するということを明らかにした。今後、IFN- $\gamma$  を阻害する抗体の投与により、効率的にリンパ濾胞形成を抑制し、胃 MALT リンパ腫を含むヘルコバクター関連疾患における有用な治療法の開発が期待される。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2482 号	氏名	楊 林
論文題目 Title of Dissertation			インターフェロンγ産生 B 細胞は、ヘリコバクタースuis 感染後の胃リンパ濾胞形成を誘導する Interferon- $\gamma$ -producing B cells induce the formation of gastric lymphoid follicles after <i>Helicobacter suis</i> infection
審査委員 Examiner			主査 南 博信 Chief Examiner 副査 南 康博 Vice-examiner 副査 王 廣子 Vice-examiner

(要旨は1, 000字～2, 000字程度)

*Helicobacter suis*は、ヒト胃Mucosa-Associated Lymphoid Tissue (MALT)リンパ腫患者から検出され、*H. suis*をマウスに経口感染させると胃MALTリンパ腫を発症する。*H. suis*感染マウスの胃粘膜では、IFN- $\gamma$ の発現が上昇しリンパ濾胞を形成するが、本研究ではその機序を解明した。

#### 【方法】

IFN- $\gamma$ 欠損(IFN- $\gamma$  KO)マウスおよび野生型マウスに*H. suis*を6ヶ月間感染させ胃粘膜をHEおよび免疫染色で観察するとともに、RNAを抽出しIFN- $\gamma$ 、IFN- $\gamma$ 受容体、IL-12、CXCL13、T-betのmRNA、*H. suis*のrRNAなどの発現を定量的real-time PCRで比較し、fluorescence-activated cell sorting (FACS)を用いて胃粘膜の浸潤細胞の性状を検討した。また、非感染の野生型マウスより脾臓B細胞、骨髓由来の樹上細胞(DCs)、脾臓由来の濾胞樹状細胞(FDCs)を精製し、それぞれを *H. suis*を感染させた IFN- $\gamma$  KOマウスに輸注し、3ヵ月後に同様にリンパ濾胞形成、関連分子の発現を検討しIFN- $\gamma$ 産生細胞を同定した。

#### 【結果】

野生型マウスでは*H. suis*感染により胃粘膜に B細胞、CD4陽性細胞、DCs、FDCsからなる胃リンパ濾胞が形成され、B細胞リンパ腫形成に重要な活性化誘導シチジンデミナーゼ(AID)が活性化していたが、IFN- $\gamma$  KOマウスの胃粘膜ではリンパ濾胞は形成されなかった。また、野生型マウスの胃粘膜では*H. suis*感染によりIFN- $\gamma$ は胃リンパ濾胞内およびその周辺で発現が亢進していた。定量的PCR法で検討した胃粘膜内の*H. suis*の菌量は野生型マウスに比しIFN- $\gamma$  KOマウスで高値を示し、IFN- $\gamma$ は*H. suis*感染を抑制していることが示唆された。

IL-12 によって刺激された T 細胞、B 細胞、DCs は、T-bet-IFN- $\gamma$  受容体依存経路を介して IFN- $\gamma$  を產生する。そこで、*H. suis* 感染後のマウス胃粘膜でこれら遺伝子の発現を検討したところ、野生型マウスの胃粘膜では *H. suis* 感染により IL-12、T-bet、IFN- $\gamma$  受容体の発現が有意に上昇していたが、IFN- $\gamma$  KO マウスの胃粘膜では IL-12 の発現は誘導されていたが、IFN- $\gamma$  受容体の発現は誘導されていなかった。

リンパ濾胞形成に関与するIFN- $\gamma$ 産生細胞を特定するため、脾臓B細胞、骨髓由来のDCs、脾臓由来のFDCsを個別に *H. suis*感染IFN- $\gamma$  KOマウスに輸注し胃リンパ濾胞形成を調べたところ、野生型B細胞の輸中時に胃リンパ濾胞形成が形成されIFN- $\gamma$ が発現していた。また、B細胞走化性に重要なケモカイン CXCL13は、*H. suis*感染IFN- $\gamma$  KOマウスの胃粘膜では野生型感染マウスと比較して有意に低下していたが、野生型B細胞を移入した*H. suis*感染IFN- $\gamma$  KOマウスの胃粘膜では回復していた。これは、*H. suis*感染により誘導されるIFN- $\gamma$ の発現がCXCL13の産生を誘導していることを示唆する。最後に、マウス胃粘膜に浸潤した細胞内のIFN- $\gamma$ をFACSにより検討した結果、*H. suis*感染後のIFN- $\gamma$ はB細胞 (B2細胞) であることが判明した。

#### 【結論】

本研究は、*H. suis* 感染マウスで胃リンパ濾胞形成に関与する IFN- $\gamma$  は、胃粘膜に浸潤した濾胞性 B 細胞により產生されることを明らかにした。IFN- $\gamma$  を阻害することにより、リンパ濾胞形成さらには MALT リンパ腫を抑制する治療法開発に発展する可能性があ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、本研究者は博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。