

[別紙1]

論文の内容の要旨

論文題目 *Helicobacter pylori* における胃粘膜障害因子の動物モデルによる検討

指導教官 小俣政男 教授  
東京大学大学院医学系研究科  
平成10年4月入学  
医学博士課程  
内科学専攻  
氏名 赤沼 真夫

[研究の背景および目的]

種々の胃粘膜障害の原因として認識されている *Helicobacter pylori* の感染率は非常に高率であるが、その病原性はそれぞれの患者において大きく異なっている。この原因の一部は菌株の多様性によるものと考えられており、様々な病原遺伝子がこれまでに報告されてきた。

それらの遺伝子の中で、*cag* pathogenicity island (*cag* PAI) と名付けられた遺伝子群は最も頻繁に研究されており、ヒト細胞を用いた *in vitro* の系において完全型 *cag* PAI の存在が NF- $\kappa$ B の活性化及び IL-8 の誘導に不可欠である事や *cag* PAI の中の遺伝子のひとつである *cagE* 遺伝子をノックアウトした *H. pylori* 変異株を用いた *in vivo* の系において *cag* PAI が Mongolian gerbils (モンゴル スナネズミ) における胃炎と胃潰瘍の発生に重要な役割を果たしている事を我々は報告してきた。

また最近 *cag* PAI の外部にある HP0499 遺伝子や HP0638 遺伝子が胃粘膜への生着や IL-8 の誘導に関係するとの報告がされているが、これらの遺伝子の *in vivo* における病原性に関わる重要性については報告がない。

*H. pylori* 長期感染において胃腺癌を生じ得る Mongolian gerbils モデルは *H. pylori* による発癌の解析のみならず *in vivo* における病原因子の評価においても有用であり、本研究において我々は HP0499 と HP0638 及び *cag* PAI の *in vivo* における炎症への関与を3週間の Mongolian gerbils 感染モデルにおいて検討した。

## [方法]

### 1) 細菌株と培養

以前の報告で Mongolian gerbils に胃癌を生じた TN2GF4 株を元株とする *H. pylori* の臨床分離株 (TN2)、その単遺伝子ノックアウト株 (TN2  $\Delta$ cagE, TN2  $\Delta$ HP499, TN2  $\Delta$ HP638)、cag PAI 全長ノックアウト株 (TN2  $\Delta$ cag PAI) を使用した。*in vitro* で一回液体継代培養の後、Mongolian gerbils に生着できなかった TN2  $\Delta$ HP638 を除いた全ての株は Mongolian gerbils の胃内でさらに一回継代培養してから本実験に使用した。

### 2) 変異株の作製

TN2のcagE, HP0499, HP0638ノックアウト株 (TN2  $\Delta$ cagE, TN2  $\Delta$ HP499, TN2  $\Delta$ HP638) はそれぞれの遺伝子配列の途中にカナマイシンまたはクロラムフェニコール耐性遺伝子を挿入したコンストラクトを作製し、これをelectroporation 法によりTN2に挿入して作製した。cag PAI全長ノックアウト株 (TN2  $\Delta$ cag PAI) は cag PAI の両端塩基配列をそれぞれPCR法にて増幅し、これらの産物の間にカナマイシン耐性遺伝子を挿入したコンストラクトを作製し、これをelectroporation 法によりTN2に挿入して作製した。

### 3) サザンブロット解析

培養した TN2 の変異株から DNA を抽出、制限酵素で切断後電気泳動し、ナイロンメンブレンにブロットした後、ラベルした DNA プローブとハイブリダイゼーションを行った。その後メンブレンを2回洗浄しX線写真を撮影した。

### 4) 動物

6週令の雄 Mongolian gerbils を標準的な飼育環境下で市販の食餌と水を与えて飼育した。各々5匹ずつの動物を5群に振り分け、TN2野生株, TN2 $\Delta$ cagE, TN2 $\Delta$ HP499, TN2 $\Delta$ HP638 or TN2 $\Delta$ cag PAI の培養液  $5.5 \pm 0.5 \times 10^7$  colony-forming units (CFUs) 1ml ずつを経口投与した。他の5匹は自然経過群として*H. pylori*培養液を与えずに飼育した。*H. pylori*培養液投与後3週に全ての動物を屠殺し、摘出した胃は2分割し、半分は組織標本として固定し、半分は生着菌の定量の為に使った。

### 5) 菌培養定量法

摘出した胃の半分を生理食塩水に入れホモジナイズした後直ちに寒天培地に塗布し微好気性条件下で37°Cにて4日間培養し、生育したコロニーは鏡検上の形態と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量し、ひとつの胃あたりのCFU数をlogで表示した。

### 6) 組織学的検討

もう一方の胃の半分は濾紙に張り付けカルノア固定液で固定、処理し、パラフィン包埋した切片を切り出し、hematoxylin and eosin (H&E) または May-Grunwald-Giemsa により染色した。活動性慢性胃炎の程度は考案した基準に基づき、0から3点ま

でスコア化した。スコアは統計学的に比較検討し、p-value が 0.05 以下の時に有意差有りとした。

## 7) IL-8 蛋白分析

24穴プレート上の培養液中で、胃上皮細胞を細菌細胞の存在または非存在下に24時間培養した。細胞培養上清中の IL-8 蛋白濃度は適宜希釈した後 enzyme immunoassay (EIA) で測定した。

## [結果]

### 1) 変異株の構造確認

TN2 ΔHP499 または TN2 ΔHP638 の構造は、各々の HP0499 遺伝子 または HP0638 遺伝子がクロラムフェニコール耐性遺伝子の挿入の為に延長している事をサブプロット解析で証明し確かめた。TN2Δcag PAI の構造は、cag PAI の両端に設定したプライマーを使った long PCR 法により electroporation で置き換わったカナマイシン耐性遺伝子+cag PAI の両端塩基配列が増幅される事で確かめた。

### 2) 胃内への菌の生着

胃に生着した菌の濃度はTN2野生株, TN2 ΔcagE, TN2 ΔHP499 及び TN2 Δcag PAI 投与群においてほぼ同数 (P=NS) であったが、TN2 ΔHP638 は他の10匹にも追加して投与したが感染は全く成立しなかった。

### 3) 組織学的検討

*H. pylori* 経口投与後 3 週の Mongolian gerbils の胃粘膜組織において TN2 ΔcagE または TN2 Δcag PAI の感染した胃粘膜は TN2 野生株の感染した胃粘膜と比べて有意に弱い炎症を示した。しかし TN2 ΔHP499 は野生株に匹敵する中等度から高度の胃炎を引き起こした。自然経過群においては胃炎は全く認めなかった。

### 4) *H. pylori* 各菌株の胃上皮細胞の IL-8 分泌に与える影響

AGS 細胞において TN2 野生株, TN2 ΔHP499 及び TN2 ΔHP638 によって誘導される IL-8 の分泌量は TN2 ΔcagE または TN2 Δcag PAI によって誘導される IL-8 の分泌量より多い傾向を示した。TN2 ΔcagE または TN2 Δcag PAI によって誘導される IL-8 の分泌量は菌体を加えない base line と比べて有意差を認めなかった。

## [考察]

今回報告した *H. pylori* 投与後 3 週間の検討において確認された胃粘膜障害の程度は、以前我々が報告した 62 週の検討結果と同様に TN2 野生株投与群と cagE 欠損株投与群の間で有意差を認め、短期感染モデルは *H. pylori* 各菌株の炎症病原性のスクリーニングの為に十分使用できると考えられる。

本研究において我々は、胃への生着菌数は野生株と同等であるにも関わらず cag PAI の全ての遺伝子の欠損は cagE 遺伝子単独の欠損とほぼ同等に胃の炎症を減弱する事を示した。つまりこれらの遺伝子の欠損は菌の生着、増殖能力は変化させないが宿主細胞の

炎症反応を直接的に変化させる事が明らかとなり、このデータは以前我々が *in vitro* の系で示した完全型の *cag* PAI が NF- $\kappa$ B や MAPK カスケードの活性化に不可欠であるという結果を裏付けている。

我々はまた本研究において HP0499 と HP0638 という最近報告された 2 つの病原因子についても検討した。HP0499 はマウスの胃粘膜への生着の成立に関係すると報告されているが、我々の検討においては野生株と HP0499 欠損株を投与した Mongolian gerbils の間で生着菌量や炎症の程度に差を認めず、野生株と HP0499 欠損株は胃癌細胞からの IL-8 分泌も同等に誘導した。また HP0638 は IL-8 の誘導に関係すると報告されているが、本研究では野生株と HP0638 欠損株の IL-8 の誘導は差がなく、更に、ヒトにおいては無機能型の HP0638 が臨床分離株中に存在すると報告されているが、我々の検討においては HP0638 欠損株は他の株が全て感染したにもかかわらず、Mongolian gerbils に全く感染できなかった。これらの相違はおそらく宿主種の特異性によるものとし、現在の所は結論し得ない。

まとめとして、人工的な変異菌株を用いた 3 週間の Mongolian gerbils 感染モデルは *H. pylori* の *in vivo* における胃の炎症の病原因子のスクリーニングに有用である。*cag* PAI の重要性は確認されたが HP0499 の重要性に関しては疑問が残る。HP0638 は Mongolian gerbils への生着に必要である。