

氏名	宮田 なつ美
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	甲第 496 号
学位授与年月日	平成 27 年 3 月 18 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学位論文名	胃内から検出される非 <i>Helicobacter pylori</i> 細菌の lipopolysaccharides による胃上皮細胞での interleukin-8 産生の誘導
論文審査委員	(委員長) 教授 吉田 行雄 (委員) 准教授 早田 邦康 准教授 細谷 好則

論文内容の要旨

1 研究目的

Helicobacter pylori はヒトの胃粘膜に感染し、慢性胃炎・消化性潰瘍・胃癌などの原因となるが、本菌の病原メカニズムについては不明な点が多い。グラム陰性菌の持つ最も重要な炎症誘導物質は Lipopolysaccharide (LPS) であるが、*H. pylori* の LPS の活性は極めて低い。*H. pylori* 陽性者の胃には、本菌以外にも様々な細菌が生息しており、これらの Non-*H. pylori* 細菌の胃粘膜病変形成における関与が疑われる。我々は胃粘膜から分離された Non-*H. pylori* 細菌の LPS の活性を分析し、胃粘膜の炎症における Non-*H. pylori* 細菌の役割を解析した。

2 研究方法

本学消化器内科の林芳和が分離保存した菌株を材料として検討を行った。*H. pylori* 感染者の胃粘膜から分離される Non-*H. pylori* 細菌のうち、主たるグラム陰性菌は *Neisseria*, *Haemophilus*, *Fusobacterium*, *Veillonella* であり、これらの菌および *H. pylori* を研究材料とした。

Neisseria, *Haemophilus*, *Fusobacterium*, *Veillonella*, *H. pylori* の各 5 菌株を大量培養し、得られた菌を凍結乾燥し、フェノール法にて LPS を抽出する。また各菌株の種の同定を行った。

集菌した *Neisseria* (*N. subflava*) により作成した抗 *N. subflava* ポリクローナル抗体と市販の抗 *H. pylori* モノクローナル抗体を用いて胃生検組織の二重染色を行った。

胃癌由来株細胞 MKN45 細胞、MKN28 細胞を上記の細菌から抽出した LPS で刺激し、細胞から分泌される IL-8 の量を測定し、その結果から各菌株の IL-8 誘導能を解析した。

また MKN45 細胞を用いて *H. pylori* 由来 LPS と *Neisseria* 由来 LPS 二重刺激、*H. pylori* 生菌及び *N. subflava* 生菌による IL-8 誘導能の解析を行った。また LPS 刺激後の TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ の産生と mRNA 発現を解析した。フローサイトメトリー、ウェスタンブロット、免疫染色、RT-PCR 法で細胞内シグナル伝達経路の解析を行った。

3 研究成果

Neisseria (*N. subflava*) , *Haemophilus* (*H. parahaemolyticus* 2 株 , *H. parainfluenzae*

2 株、 *H. influenza* 1 株), *Fusobacterium* (*F. periodonticum*), *Veillonella* (*V. rogasae* 2 株, *V. parvula* 1 株, *V. dispar* 1 株, *V. atypia* 1 株,)各 5 株と *H. pylori* 3 株の大量培養と LPS 抽出を行った。*H. pylori* の培養効率は他の菌に比べて悪いが、継代培養を繰り返すと *H. pylori* の培養効率が上昇することが判明した。

各細菌から得られた LPS で胃癌由来細胞株の刺激を行った。MKN-45 細胞を用いた場合、*H. pylori* 由来 LPS 刺激による IL-8 産生量は先行する研究で示されたように少ない事が確認された。*Haemophilus* および *Fusobacterium*, *Veillonella* 由来 LPS で細胞を刺激した場合には陽性対照として用いた *E. coli* 由来 LPS とほぼ同等の IL-8 誘導能が認められた。*N. subflava* 由来 LPS は極めて高い IL-8 誘導能を示し、IL-8 産生量は刺激に用いた各 LPS の量に依存した。

MKN28 細胞を使用しての実験でも類似の結果が認められたが、「LPS の種類と IL-8 の産生量」および「LPS の量と IL-8 の産生量」の関係は、MKN45 細胞を用いた時ほど明瞭ではなかった。生菌を使用した実験においても、MKN45 細胞において *N. subflava* は *H. pylori* よりも高い IL-8 誘導能を示した。

H. pylori 由来 LPS との二重刺激による *N. subflava* LPS の IL-8 誘導能の相乗効果は認められなかった。

MKN28、45 細胞表面の TLR2、4、及び補助分子である MD2、CD14 の発現はわずかであり先行する研究で報告された LPS 刺激による TLR4 受容体の up-regulation は認められなかった。NF- κ B 阻害薬により *N. subflava* LPS による IL-8 mRNA 発現の抑制が確認された。

LPS による MKN45 細胞刺激後 mRNA 網羅的解析によって *N. subflava* 由来 LPS により IL-1 β を始めとする炎症性サイトカインの mRNA 発現の変化が確認された。RT-PCR で TNF- α 、IL-1 β 、IL-8 mRNA 発現の上昇が認められ MKN45 細胞において培養上清内の TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ は検出困難であったが細胞質内からは TNF- α が検出され *N. subflava* 由来 LPS 刺激により TNF- α 濃度は上昇する傾向をみせた。

4 考察

MKN45 細胞を用いた実験からは *H. pylori* 由来 LPS の活性に対し Non-*H. pylori* 細菌、特に *N. subflava* 由来 LPS が強い活性を有していることが判明した。またそのシグナル伝達経路は NF- κ B 依存性であった。

5 結論

Non-*H. pylori* 細菌、特に *N. subflava* は *H. pylori* 感染中の胃粘膜における炎症病変の形成において重要な役割を有していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

H.pylori の胃粘膜への感染が慢性胃炎・消化性潰瘍・胃癌などの発生と深く関わっていることは周知のことである。近年 *H.pylori* 感染による胃酸分泌低下に伴って胃内に非 *H.pylori* 細菌が存在することが報告され、その臨床的な意義が注目されている。

宮田氏は *H.pylori* 陽性者の胃粘膜から分離された非 *H.Pylori* 細菌の中で特に *Neisseria*

subflava (*N.subflava*) に注目し、グラム陰性菌の重要な病原因子とされている Lipopolysaccharide (LPS) を抽出した。次いで胃癌株化細胞 MKN45、MKN28 を標的細胞として、強力な生理活性を持つサイトカイン interleukin-8 (IL-8) の産生誘導能を、*N.subflava* 由来 LLP と *H.pylori* 由来 LPS で比較した。

その結果 *N.subflava* 由来 LPS は *H.pylori* 由来 LPS に比較して約 6 倍の IL-8 誘導能をもつことが判明した。またこの *N.subflava* 由来 LPS による IL-8 誘導能は時間依存性、濃度依存性に増加することも示された。さらにこの LPS による IL-8 産生には NF- κ B 活性が関与していることも確認した。これらの研究結果は従来の報告にはない新しい知見である。

H.pylori の除菌により、確かに胃がんの発生は抑制される。しかし萎縮性胃炎の進行した胃では、除菌後も長期間にわたり、ある一定の頻度で胃がんが発生することが指摘されている。本論文で示された非 *H.pylori* 菌由来 LPS が強い IL-8 誘導能をもつという新しい知見は、*H.pylori* 除菌後に、萎縮性胃炎により胃酸分泌の低下した胃に *N.subflava* など非 *H.pylori* 菌が生息し、それによって起こる持続的な炎症が発癌リスクの一つとなる可能性を示すものとして興味深い。また宮田氏は胃の生検組織を用いた免疫染色で、*H.pylori* と *N.subflava* の同時感染を確認している。この手法を用いて *H.pylori* 除菌後、どのような胃に *N.subflava* の感染が起きうるかの検討が今後の課題の一つであるとしているが、背景胃粘膜の萎縮の程度によって差があることが明らかになれば、これも臨床的に極めて興味深い。

以上、本論文は免疫染色にて *H.pylori* と *N.subflava* の胃粘膜への同時感染を確認し、また *N.subflava* をはじめとする非 *H.pylori* 細菌由来の LPS が *H.pylori* 由来の LPS より強い IL-8 誘導能をもつことを示し、今後の非 *H.pylori* 細菌と胃病変の関連に関する研究に寄与するところが大きいと考え、学位論文に値すると全員一致で判断した。

最終試験の結果の要旨

宮田氏から「胃内から検出される非 *H.pylori* 細菌の Lipopolysaccharide (LPS) による胃上皮細胞での interleukin-8 (IL-8) 産生の誘導」に関して約 30 分間にわたってプレゼンテーションがなされた。プレゼンテーションは簡潔明瞭で分かりやすく、新しい知見を含む興味深いものであった。

その後、審査委員から発表の内容について試問が行われた。主な内容は以下のとおりである。

- (1) 今回の研究で得られた結果で、どのような所が新しい知見なのか。

これに対し宮田氏は、完全に新しい知見としては、胃内に生息する非 *H.pylori* 細菌由来の LPS を抽出し、*H.pylori* 由来の LPS と IL-8 の産生誘導能を比較したこと。また *H.pylori* 由来 LPS と *N.subflava* 由来 LPS の二重刺激実験を行い、単独刺激時の IL-8 産生誘導能と比較検討したことであること。そしてこれにより *N.subflava* 由来の LPS が *H.pylori* 由来の LPS に比べて有意に高い IL-8 誘導能をもつことが示され、また二重刺激試験では IL-8 誘導能に相乗・相加効果が認められなかったことが判明したことを説明した。

- (2) 従来の報告と異なり、TLR4 の発現が低いにもかかわらず *N.subflava* 由来の LPS により高い IL-8 誘導能が得られることについてどのように考察するのか。

これに対して宮田氏は、*N.suflava* 由来の LPS は従来の LPS とは異なる経路で刺激を行っている可能性があるのではないか、また *N.suflava* から抽出した LPS に LPS 以外の外膜成分の contamination がないか、などについての検討が今後の課題であると答えた。

その他いくつかの質問があったが、申請者は誠実に分かりやすく答えた。数か所、論文中の表記、表現に修正すべき点があること、考察の内容に変更すべき点があることが指摘され、申請者はこれを理解し修正した。審査委員は論文が適切に修正されたことを確認し、全員一致で合格と判定した。