

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	佐 藤 智 信
-------	-----	-----	---------

学 位 論 文 題 目

ヒト胃に異所性発生するパネート細胞分泌反応の機能解析

未公表

研究目的

Helicobacter pylori (*H. pylori*)感染は胃炎、胃潰瘍、十二指腸潰瘍の主要な病原因子であり、胃癌の病因にも関与していることが世界的に認知されている。*H. pylori*感染は、胃粘膜に萎縮と腸上皮化生を起こすことが証明されている。一方、臨床的に腸上皮化生を生じた胃粘膜には*H. pylori*が生息しないことが知られている。

胃粘膜の腸上皮化生では、胃クリプト基底部にパネート細胞が異所性に出現する。パネート細胞は、小腸粘膜クリプト基底部の顆粒を有する細胞であり、正常では小腸にのみ存在する。パネート細胞顆粒中にはlysozymeや3~4 kDaの塩基性ペプチドの α -defensinなどの内因性抗菌ペプチドが含まれる。Ayabeらは、マウス小腸パネート細胞が*ex vivo*細菌感染に反応して抗菌ペプチドを含む顆粒を分泌し、その殺菌活性によって自然免疫による粘膜感染防御機構を形成することを証明した。しかし、異所性発生したパネート細胞の機能については不明である。本研究の目的はヒト腸上皮化生胃粘膜に見られる胃パネート細胞の機能を明らかにすることである。

材料・方法

1. 細菌株

Salmonella typhimurium phoP- (*S. typhimurium*)及びヒト消化性潰瘍患者より分離された2種類の*H. pylori* *cagA*+株、OHPC-016とTN2GF4を用いた。

2. ヒト胃クリプトの単離

旭川医科大学附属病院および旭川厚生病院で、インフォームド・コンセントの元に、内視鏡的生検材料(2例)または胃癌で切除された胃の幽門部非癌部粘膜の新鮮材料(21例)から胃粘膜萎縮部粘膜を得た。全例の採取材料で*H. pylori*は陰性であった。EDTA分離法を用いて、1, 5または10個の胃クリプトを単離、および100個以上の胃クリプトを得た。

3. Nest PCR法を組み合わせたRT-PCR法

単離した1個の胃クリプトから既報に準じてtotal RNAを抽出した。パネート細胞 α -defensinであるHD (Human Defensin)-5とHD-6のcDNAを検出するprimerを作製しRT-PCRを行った後、nest primerで二次PCRを施行した。最終産物を2% agar gelで電気泳動しエチジウムブロマイドで染色した。

4. in situ hybridization (ISH)法

HD-5のリボプローブを作製して、凍結萎縮胃粘膜連続切片を用いてISHを行った。プレパートをプロテイナーゼKで処理し、DIG標識センス及びアンチセンス・リボプローブと反応させた後、NBT-BCIPで発色した。

5. 胃パネート細胞分泌誘導と殺菌アッセイ系

1, 5, 10または100個の単離胃クリプトを*S. typhimurium*に曝露してパネート細胞分泌を刺激した群及び曝露しないコントロール群を培養後、反応物をプレート培地で培養した。生存CFUから殺菌率を求めた。また、*H. pylori*に対して、10または100個の単離胃クリプトを曝露してパネート細胞分泌を刺激した群、曝露しないコントロール群及び100 µg/ml lysozymeを培養後、ヘリコバクター寒天培地に塗布し、結果を同様に示した。さらに、~2,000個の胃クリプトを*S. typhimurium*と共に培養した分泌物を回収し生化学的解析に用いた。

6. 顆粒蛋白抽出法

~4,000個の胃クリプトをNitrogen 処理し、パネート細胞顆粒蛋白を抽出した。

7. 電気泳動法

Tris-Tricine SDS-PAGE及び5M urea含有Acid-urea (AU)-PAGEで分泌物を解析した。

8. gelからの殺菌活性検出法

Tris-Tricine gelからバンドを切り出して蛋白を抽出し、*S. typhimurium*に対する殺菌アッセイを行った。

成 績

1. 単離胃クリプトにおけるα-defensin遺伝子発現

全例のクリプト基底部に、顆粒の存在によって容易に識別できるパネート細胞が含まれる胃クリプト (P+クリプト) と含まれない胃クリプト (P-クリプト) が存在した。P+クリプトでは単一の単離クリプトレベルでRT-PCR法でHD-5及びHD-6 mRNA発現が認められた。さらに、ISH法でHD-5 mRNAの発現が腸上皮化生部の胃クリプトの基底部にのみ認められた。異所性発生した胃パネート細胞は、パネート細胞 α-defensin遺伝子を発現した。

2. 細菌曝露により誘導されるP+クリプトからの抗菌活性分泌

*S. typhimurium*曝露によりP+クリプトは殺菌活性を放出したが、P-クリプトは放出しなかった。異所性発生したパネート細胞を含む胃クリプトは細菌刺激により抗菌活性を分泌し、その抗菌活性はパネート細胞由来であった。

3. Ex vivo *H. pylori*感染による胃パネート細胞分泌反応

*H. pylori*とP+クリプトとの反応上清は*H. pylori*殺菌能を有していた。この殺菌活性は検討した*H. pylori* 2株ともに認められ、クリプトの数依存性に増強した。腸上皮化生胃粘膜に存在するパネート細胞はex vivo *H. pylori*刺激によって抗菌活性を放出し、その分泌物は*H. pylori*殺菌能を有することが明らかになった。*H. pylori*殺菌活性は本実験条件下でパネート細胞顆粒蛋白にもみられたが、lysozymeには認めなかった。

4. 胃パネート細胞分泌物の生化学的解析及びgel抽出蛋白の抗菌活性

分泌物には、AU-PAGEでlysozymeよりも塩基性を示す蛋白のバンドを認めた。SDS-PAGEで分泌物中の主要な蛋白の分子量は3 kDaと5 kDaであった。このうち3 kDaのバンドから抽出した蛋白に抗菌活性が認められた。

考 案

ヒトの腸上皮化生胃粘膜のクリプト基底部に存在する異所性発生した胃パネート細胞は、パネート細胞に特異的な α -defensin遺伝子を発現し、*ex vivo*で*H. pylori*や他の細菌感染に反応して殺菌活性を持つ顆粒を分泌した。このことは、ヒトの異所性胃パネート細胞が、マウスの小腸パネート細胞と同様に、消化管の自然免疫機構に貢献できることを示している。

*H. pylori*は胃のどの部位にも生息しているが、腸上皮化生部には存在しないことが知られていた。しかし、その理由は不明であった。本研究により、パネート細胞を含む胃クリプトからのみ*H. pylori*殺菌活性を検出したことから、腸上皮化生部の異所性発生したパネート細胞が*H. pylori*殺菌に貢献していることが証明された。

パネート細胞分泌物はいくつかの抗菌物質の混合物である。マウス小腸パネート細胞分泌物中の抗菌活性の由来を検討した報告で、cryptdinが放出された抗菌活性の70%に貢献していることが示されている。本研究において、胃パネート細胞分泌物の生化学的解析及び3 kDaのバンドから抽出した蛋白の抗菌活性を検討した結果から、胃パネート細胞の分泌物中には α -defensinを含む可能性が示唆された。

結 論

パネート細胞 α -defensin遺伝子を発現する異所性発生した胃パネート細胞は、*H. pylori*をはじめとする*ex vivo*細菌感染に反応して顆粒を分泌した。分泌物は*H. pylori*を殺菌した。胃において、異所性パネート細胞を発生させる腸上皮化生への変化は、胃クリプトを*H. pylori*感染から守ろうとする生体防御機構の一環であることが示唆された。

引用文献

- 1) Ayabe T, Satchell DP, Wilson CL, Parks WC, Selsted M, Ouellette AJ (2000) : Secretion of microbicidal α -defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. Nat Immunol 1 : 113-118
- 2) Kuipers EJ, Uytendaele AM, Pena AS, Roosendaal R, Pals G, Nelis GF, Festen HP, Meuwissen SG (1995) : Long-term sequelae of Helicobacter pylori gastritis. Lancet 345 : 1525-1528
- 3) Selsted ME, Miller SI, Henschen AH, Ouellette AJ (1992) : Enteric defensins: antibiotic peptide components of intestinal host defense. J Cell Biol 118 : 929-936

参考文献

- 1)横田 欽一, 渡 二郎, 小松英樹, 佐藤智信, 高後 裕: 早期胃癌EMR症例の経過観察成績 - 高齢者と非高齢者の比較 - : 日本高齢消化器医学会議会誌 Vol.1 No.2 1999: 115-119
- 2)齊藤裕輔, 野村昌史, 藤谷幹浩, 渡 二郎, 泉 信一, 柴田直美, 三好恭子, 藤谷佳織, 佐藤智信, 前本篤男, 綾部時芳, 蘆田知史, 高後 裕: 小腸の良性腫瘍および腫瘍様病変: 胃と腸 第36巻 第7号 2001:959-966
- 3)田邊裕貴, 渡 二郎, 柴田直美, 佐藤智信, 横田 欽一, 高後 裕: PPI新3剤併用療法の有用性: 日本臨床 Vol 59 No 2 2001:314-318

学位論文の審査結果の要旨

報 告 番 号	第 号		
学位の種類	博士（医学）	氏 名	佐藤智信
審査委員長 高 後 裕 ㊞ 審査委員 小 川 勝 洋 ㊞ 審査委員 伊 藤 亮 ㊞			
学 位 論 文 題 目 ヒト胃に異所発生するパネート細胞分泌反応の機能解析			
<i>Helicobacter</i> (<i>H. pylori</i>)感染は、胃炎・胃潰瘍・十二指腸潰瘍の主要な病原因子であり、胃癌の病因にも深く関与している。<i>H. pylori</i> 感染は、胃粘膜に萎縮と腸上皮化生をおこすが、臨床的に腸上皮化生を生じた胃粘膜には、<i>H. pylori</i> は生息しない。一方、胃粘膜の腸上皮化生では、胃クリプト基底部にパネート細胞が異所性にパネート細胞が出現する。本来、パネート細胞は、小腸粘膜にのみ出現し、その殺菌活性によって小腸粘膜の自然免疫による粘膜感染防御機構を形成する。本研究では、ヒト胃粘膜萎縮部にみられる腸上皮化生に異所性発生したパネート細胞の機能を明らかにすることを目的とした。			

旭川医科大学付属病院および旭川厚生病院で、インフォームド コンセントのもとにえられた胃粘膜材料から、EDTA 分離法を用いて、胃クリプトを単離した。単離した胃クリプトを用いて、ヒト defensin mRNA を検出する RT-PCR を行うとともに、単離クリプトを *Salmonella typhimurium*(*S. typhimurium*)に暴露、パネート細胞の分泌による殺菌率を CFU から求めた。同時に *H.pylori* に対する単離クリプトの抗菌活性を求めた。パネート細胞を Nitrogen で破碎し、顆粒蛋白を得たのち、acid urea gel 電気泳動をおこない、切り出したバンドから蛋白を抽出し、その抗菌活性を測定した。本研究により、下記の点が明らかにされた。

- (1) 単離胃クリプトの基底部に、顆粒の存在で識別されるパネート細胞が含まれ、単一のクリプト レベルでヒト defensin mRNA の存在が確認された。
- (2) *S. typhimurium* 暴露により、パネート細胞を含む胃クリプトは、殺菌活性を放出し、異所発生したパネート細胞にも抗菌活性が存在した。
- (3) *H.pylori* とパネート細胞を含む胃クリプトの反応上清は *H.pylori* に対する殺菌能を有していた。本殺菌能は、パネート細胞顆粒蛋白にみられた。
- (4) 胃パネート細胞分泌物には、acid urea gel 電気泳動で、lysozyme よりも塩基性を示す蛋白のバンドが複数みられ、そのうち 3kDa のバンドから抽出した蛋白に抗菌活性が認められた。

これらの所見から、胃において、異所性パネート細胞を発生させる腸上皮化生への変化は、胃クリプトを *H.pylori* 感染から守ろうとする、生体防御機構の一環であることが示唆された。本研究は、胃 *H.pylori* 感染と異所性発生する腸上皮化生の関連を機能的に明らかにした論文で、高く評価されるべき研究である。

論文審査後、同人に対して諮問審査を行い、その結果、本論文の内容は学位（博士）論文として価値あるものと認め、諮問審査の内容からも審査に合格と判定した。