

令和 3 年 5 月 12 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07379

研究課題名（和文）ヘリコバクターピロリ菌の慢性感染からみた慢性炎症性神経疾患の発症機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the pathogenesis of chronic inflammatory neurological diseases from the perspective of chronic infection with Helicobacter pylori

研究代表者

朴 雅美（Park, Ah-Mee）

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：70469245

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ピロリ菌感染率がアルツハイマー型認知症患者で有意に高い、という疫学調査結果が報告されている。環境因子などに影響されない動物実験で両者の関連を示した報告はこれまでほとんどなかった。本研究で、ピロリ菌長期感染マウスでは非感染マウスに比べ有意に中枢神経炎症が起きていることが確認された。そのメカニズムは現時点では明らかでないが、本菌が産生する外膜小胞が関与している可能性を示唆するデータが得られている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ピロリ菌がその生息場所から離れた脳の炎症に関与していることを動物実験で示すことができたことは非常に意義深い。このメカニズムを明らかにすることは喫緊の課題といえる。ピロリ菌感染は胃がんのリスク因子であることから日本ではその除菌は保険適用となっており推奨されている。アルツハイマー型認知症発症には加齢、遺伝や生活習慣など多くの因子が関係している。本研究結果からピロリ菌感染もその因子の一つであると考えることが出来、積極的に除菌すべきであると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Epidemiological studies have reported that the infection rate of H. pylori is significantly higher in Alzheimer's disease. However, there have been few reports that have shown a relationship between them in animal experiments that are not affected by environmental factors. In this study, we found that H. pylori chronic infected mice showed significantly increase of central nervous system inflammation than non-infected mice. Although the mechanism of this increase is not clear at present, we found that the outer membrane vesicles produced by H. pylori may be involved.

研究分野：微生物学

キーワード：アルツハイマー病 ピロリ菌 外膜小胞 神経炎症 多発性硬化症

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ピロリ菌 (HP) は胃に持続感染するグラム陰性らせん状桿菌で、消化性潰瘍や胃がんなどの消化管疾患との関わりが明らかにされてきた。また、花粉症アレルギーの抑制や動脈硬化促進などいくつかの胃外疾患にも関連していることが示されており、実際に HP 陽性の特発性血小板減少性紫斑症患者では除菌によって半数以上で血小板が増加することから、治療法として HP の除菌療法が正式に保険適用となっている。さらに、近年の国内外の疫学調査により中枢神経系の疾患に本菌の感染が関連していることが報告されている。アルツハイマー病 (AD) は中枢のマクロファージであるミクログリアの活性化を伴う中枢神経炎症 (Neuroinflammation) 疾患であるが、同年代の正常グループに比べて HP 感染率が高いことが明らかにされた。ところが、同様に中枢神経炎症疾患の代表疾患である多発性硬化症 (MS) では逆に HP 感染率は低いという結果が出ている。このことは HP 感染が脳とクロストークし神経炎症に影響しており、それによる結果が一様ではないことを示唆している。このように、HP 感染が神経炎症に関連しているとの臨床疫学的報告がある一方で、HP 感染が神経炎症にどのような影響を持っているかは実験的には殆ど明らかにされていない。本研究では HP 感染がどのようなメカニズムで神経炎症に作用し二つの代表的神経炎症疾患に相反する影響を与え得るのか? という問いにチャレンジする。

2. 研究の目的

本研究では HP 感染がどのようなメカニズムで中枢神経炎症と関連しているのか? という問いを解明するため、2 つのことを明らかにすることを目的としている。1 つ目は HP 感染によって起こる中枢神経炎症がどのようなメカニズムかを明らかにすることである。2 つ目は AD、MS 各々のモデルマウスを用いて、HP 感染が発病や病勢にどう影響するのかを明らかにすることである。

これまで AD 動物モデルへの HP の影響は報告がなく、本研究が世界初の研究となる。MS マウスモデルでは一つの報告があるが (Cook et al., 2015)、これは HP 感染の急性期に脳脊髄炎を誘導するという実験デザインであり、ヒトでの病態を反映出来ていない。HP はヒトでは主に幼少期に感染が成立し、慢性持続感染となる。炎症反応は急性と慢性で後述するように大きく異なるため、長期感染モデルを用いることでよりヒトに近い状況になる。本研究では、MS 様症状を緩徐に自然発症するマウスモデル (2D2 マウス) を用いることで、HP 持続感染の影響を検証できる先駆的な試みである。

3. 研究の方法

In vivo study: 野生型 (WT)、及び AD モデルマウス [ヒト型変異 APP と変異型プレセニリン 1 のダブルトランスジェニック (Tg) マウス] それぞれ若齢 (生後 5 週齢) 及び老齢 (約 40 週齢) に HP を感染させた後、3~6 ヶ月飼育した。飼育終了前に記憶力、行動量を Y-迷路試験にて調べた。その後、採血し、パラホルムアルデヒドにて灌流固定後脳、胃、脾臓を回収した。血液から血清を調整し、IgG サブクラスの ELISA 測定による免疫バランスの同定、LPS 濃度測定、抗 HP 抗体の ELISA 測定、PCR・イムノブロットによる HP 由来成分の検出を実施した。

胃と脳はパラフィンブロック作成後組織切片を作成した。胃では HP、免疫細胞などの組織免疫染色を、脳ではミクログリア、アストロサイトの活性化、HP などを調べた。

In vitro study: HP と大腸菌 (EC, コントロール) をそれぞれブルセラ培地にて培養し、それぞれの培地から濾過/超遠心法にて外膜小胞 (OMV) を回収した。ブルセラ培地単独からも同一の方法を行い、得られたペレットを negative control とし、計 3 種を以下の実験に用いた。

マウス脳由来細胞株を4種準備した(表)。

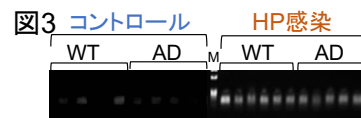
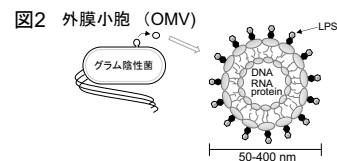
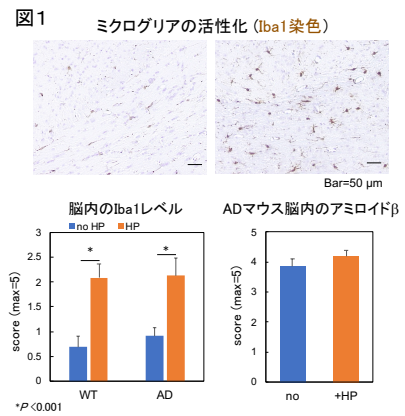
それぞれの細胞に OMV を処理し、その後の増殖能や遺伝子、タンパク質発現量の変化を調べた。

Name	cell	mouse strain
Neuro2a(N2a)	neuroblastoma	strain A albino mouse
astrocyte	astrocyte	SJL/J mouse
MG6	microglia	B6 mouse
OS3	oligodendrocyte	C3H/HeN

4. 研究成果

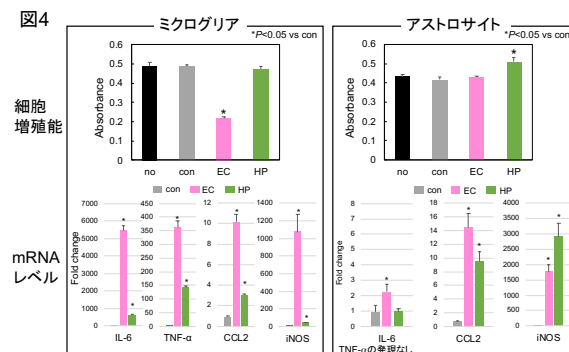
(1)HP 感染がマウス脳に与える影響：血中の抗 HP 抗体を調べ全マウスが感染成立していた。感染6ヶ月後の記憶力、行動量を調べた結果、若齢マウスに比べ老齢ではいずれも低下していた。しかし、WT と AD マウスでは感染の有無も含め差がなかった。屠殺後、胃、脳を抗 HP 抗体で染色したところ、胃は全ての検体で HP が検出されたが、脳では検出されなかった。次に、脳の炎症レベルを調べるためにマイクログリアとアストロサイトの活性化マーカーである Iba1 と GFAP の抗体を用いて免疫染色した結果、非感染マウスに比べ感染マウスではいずれも増加していることが分かった

(図1)。HP 感染させた WT と AD マウスでの差はなかった。この変化は老齢マウスでのみ起こっており、若齢マウスでは HP 感染有無に関わらずそれらのレベルは低かった。このため、以降の実験では老齢マウスのみを用いた比較検討を実施した。AD マウスのアミロイドβ蓄積量も感染の有無で差がなかった(図1右下)。HP 感染で脳炎が増加したメカニズムを明らかにするため、感染によるマウス個体の免疫バランスの変化を血液中の IgG サブタイプ測定にて調べたが、感染前後で免疫バランスに変化なかった。次に、HP が産生する成分が血流などを介して影響を及ぼしている可能性を考え、外膜小胞(OMV)の存在に着目した(図2)。OMV はグラム陰性菌が分泌する小胞で、DNA, RNA, proteinなどを内包している。マウス血清を遠心分離し、OMV 含有粗画分を HP 特異的なプライマーにて PCR したところ、半数以上の感染マウスで陽性であったことから、OMV が含まれている可能性が考えられた(図3)。以上の結果から、HP 産生 OMV が脳炎に影響を与えている可能性を考え、in vitro 実験を行った。



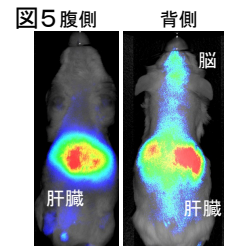
(2) 脳の培養細胞を用いた検討：表に示した4種の細胞にHP, EC から回収した OMV を加えて培養し、増殖能、サイトカイン産生などを調べた。4種の中で最も強く反応したのはマイクログリア(MG6)だった。MG6はHP-OMVで増殖は不変だったが炎症性サイトカインの有意な増加が起きた。

EC-OMV では増殖能が激減し、炎症性サイトカインも著増した(図4左)。アストロサイトではHP-OMVによって増殖能が増加し、炎症性サイトカインも増加した。EC-OMV では増殖は不変で炎症性サイトカインは増加した(図4右)。一方でオリゴデンドロサイトは増殖能、サイトカイン共に非添加と全く同じだった。N2a に対してはHP-OMV は増殖能を低下させ、アミロイドβ増加に関わる BACE や PS2 のタンパク質レベルの増加を起こした。これらの作用が



複合的に脳炎症に関わっていることが考えられた。

(3) ここまでの結果で HP 感染による脳炎症の増加に OMV が関与している可能性が考えられた。胃に感染している HP が OMV を分泌し、それが全身に循環しているかどうかを間接的な手法で検討した。培養 HP から回収した OMV を蛍光ラベルし、経口的にマウスに投与した。その結果、OMV は吸収されて血中に入り主に肝臓に集積するが、微量が脳へも移行していることがわかった (図 5)。



以上の結果から、HP 感染が脳炎症に関与していること、またそのメカニズムの 1 つとして HP が分泌する OMV が関わっている可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 朴雅美、角田郁生	4. 巻 46
2. 論文標題 胃粘膜ヘリコバクター・ピロリ菌感染によるCNS内神経炎症の誘導	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 632-633
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Seiichi Omura, Fumitaka Sato, Ah-Mee Park, Mitsugu Fujita, Sundar Khadka, Yumina Nakamura, Aoshi Katsuki, Kazuto Nishio, Felicity N E Gavins, Ikuo Tsunoda	4. 巻 11
2. 論文標題 Bioinformatics Analysis of Gut Microbiota and CNS Transcriptome in Virus-Induced Acute Myelitis and Chronic Inflammatory Demyelination; Potential Association of Distinct Bacteria With CNS IgA Upregulation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in immunology	6. 最初と最後の頁 1138
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2020.01138	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ah-Mee Park, Sundar Khadka, Fumitaka Sato, Seiichi Omura, Mitsugu Fujita, Daniel K Hsu, Fu-Tong Liu, Ikuo Tsunoda	4. 巻 11
2. 論文標題 Galectin-3 as a Therapeutic Target for NSAID-Induced Intestinal Ulcers.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in immunology	6. 最初と最後の頁 550366
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2020.550366	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Ah-Mee Park, Ikuo Tsunoda, Osamu Yoshie	4. 巻 293
2. 論文標題 Heat shock protein 27 promotes cell cycle progression by down-regulating E2F transcription factor 4 and retinoblastoma family protein p130.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of biological chemistry	6. 最初と最後の頁 15815
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA118.003310	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ah-Mee Park, Ikuo Tsunoda	4. 巻 65
2. 論文標題 Forensic luminol reaction for detecting fecal occult blood in experimental mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biotechniques	6. 最初と最後の頁 227-230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2144/btn-2018-0017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 朴雅美、佐藤文孝、中村優美和、角田郁生
2. 発表標題 胃粘膜ピロリ菌感染によるアルツハイマー病 モデルマウスの脳内グリア細胞活性化
3. 学会等名 第39回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 朴雅美
2. 発表標題 ピロリ菌が神経細胞・中枢神経系に及ぼす影響
3. 学会等名 日本分子生物学会 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

近畿大学医学部 微生物学 業績集
<https://www.med.kindai.ac.jp/microbio/nihongopublication.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐藤 文孝 (Sato Fumitaka) (30779327)	近畿大学・医学部・助教 (34419)	
研究分担者	萩原 智 (Hagiwara Satoru) (40460852)	近畿大学・医学部・講師 (34419)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関