

Helicobacter pylori の胃粘膜防御機構に与える影響

吉 永 文 哉

キーワード：*Helicobacter pylori*, UDP-galactosyltransferase, ammonia, ethanol, adaptive cytoprotection

緒 言

胃酸などの傷害から胃粘膜を保護する防御機構として、胃粘膜表層は被蓋上皮細胞から合成・分泌される粘液により被われている¹⁾。胃粘液の主たる成分は胃粘液糖蛋白質で、胃粘膜防御因子のひとつとして重要な役割を果たしている²⁾。この胃粘液糖蛋白質は、その合成過程の最終段階で、胃粘膜上皮細胞のゴルジ装置に存在する一連の糖転移酵素群により、前駆体であるポリペプチドに糖を付加され完成する³⁾。UDP-galactosyltransferase (UDP-Gal-T)は、この粘液糖蛋白合成の最終段階における律速酵素の一つである³⁾。我々はこれまでに、この糖転移酵素活性を指標に、肝硬変など様々な病態における胃粘膜傷害の機序を胃粘膜防御因子の面から検討してきた⁴⁾。

近年、消化性潰瘍の主な病因として、*Helicobacter pylori* (HP)の感染が注目され、我が国でも最近になり消化性潰瘍患者におけるHP除菌療法が保険診療として認められるようになった。しかし、HP感染は、ヒトの胃粘膜に持続的な組織学的胃炎を引き起こすものの、その胃粘膜傷害機序についてはいまだ不明の点が多い。そこで、本研究では、HP感染における胃粘膜傷害機序を解明するため、ムチン産生性胃癌細胞株におけるUDP-Gal-T活性を指標にHPの胃粘膜防御機構に及ぼす影響を検討した。

材 料 と 方 法

1. HGC-27 (ムチン産生性胃癌細胞株)におけるUDP-Gal-T活性に及ぼすHPの影響

ムチン産生性胃癌培養細胞株 HGC-27⁵⁾を径15cm dishにて10%ウシ胎児血清加 DMEM 培養液で confluent な状態に培養し、以下の種々のHP関連物質を添加した培養液に交換後、6時間反応させた。

使用したHP関連物質：(1) 液体培地で培養したHP菌体1gを10mlの蒸留水に懸濁し超音波破碎し作成したHP超音波破碎物、(2) HPを液体培養した上清を50%硫酸で沈殿させ、20mMリン酸緩衝液で透析し作成したHP培養上清(蛋白濃度 10.9mg/ml)、(3) 培地プレートより直接擦過採取して培養液に懸濁したHP生菌、(4) HP超音波破碎物と尿素、(5) アンモニア、(6) HP生菌と尿素。HPは基準株(ATCC 43504)を用いた。

これらのHP関連物質と反応後、培養細胞を0.3M sucroseで洗浄し、用手的にはがして回収し、0.3M sucrose 500 μ lを加えてhomogenizeし、10分間3000rpmで遠心後、その上清をUDP-Gal-T活性測定用検体として用いた。

UDP-Gal-T活性は既報のPNAレクチン法を用いて行った⁴⁾。すなわち、asialoagalactomucinを固相化したプレートにUDP-galactose、塩化マンガン、2メルカプトエタノールと混合した酵素測定用検体を加え反応させ、本酵素により形成されたgalactose- β -(1-3)-N-acetylgalactosamineを、ペルオキシダーゼ標識PNAレクチンを用いて検出した。基質として、2, 2'-azino-bis(3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid)を加え発色し、波長415nmの吸光度(OD)を測定した。検体に含まれる蛋白量はLowryらの方法を用いて測定し、UDP-Gal-T活性はOD/mg proteinで表わした。検体の酵素活性は、各サンプルのOD/mg proteinと、基準として用いた

(平成13年12月20日受理)

指導：辻 孝夫教授 (岡山大学大学院医歯学総合研究科 消化器・肝臓・感染症内科学)

論文請求先：三原赤十字病院 広島県三原市東町4220

吉永文哉

電話：0848-64-8111 FAX：0848-64-1803

E-mail：masataku@lime.ocn.ne.jp

体重約200 gのSD系雄性ラットの胃体部粘膜より既報⁶⁾のごとく調整した標準酵素検体との比として表わした。

2. エタノールのHGC-27細胞に対する細胞傷害性及びアンモニア、HPの影響。

HGC-27細胞を既述のごとく培養後、(1) 培養液のみ、(2) 0.03%アンモニア添加培養液、または(3) HP生菌 10^6 個/mlと尿素15mg/dl添加培養液と交換して6時間反応させた。その後、緩衝液(PBS)で段階希釈したエタノールを加えて30分間incubation後PBSを回収し、3分間1000rpmで遠心した上清を用いて細胞内から遊離したLDHの量を測定し、LDH-releasing assay⁷⁾により細胞傷害性を検討した。各サンプルの細胞傷害性はすべての細胞が傷害された場合のLDH放出量に対する比として表わした。

3. 統計学的解析

すべての結果は平均値±標準偏差で表わした。データの解析はt検定またはFisherのPLSD法を用いて行った。

結 果

1. 種々のHP関連物質のUDP-Gal-T活性に及ぼす影響

HGC-27細胞にHP超音波破砕物を $10\mu\text{g/ml}$ 、 $100\mu\text{g/ml}$ 、 $1000\mu\text{g/ml}$ の濃度で加えたが、いずれもUDP-Gal-T

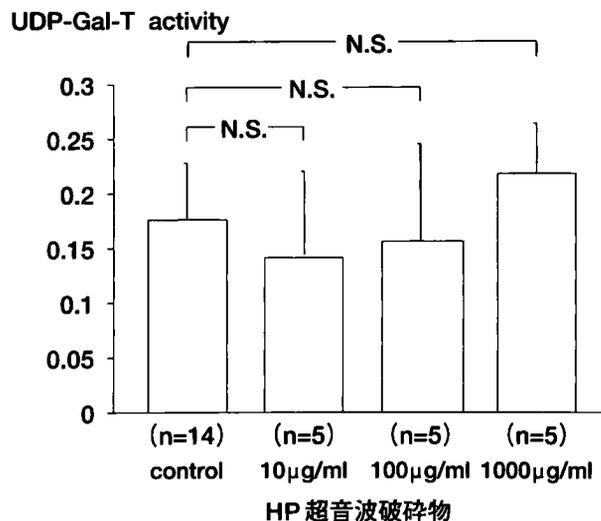


図1 HP超音波破砕物のUDP-Gal-T活性に及ぼす影響
HGC-27細胞に $10\mu\text{g/ml}$ 、 $100\mu\text{g/ml}$ 、 $1000\mu\text{g/ml}$ の濃度のHP超音波破砕物を加え、UDP-Gal-T活性を測定した。UDP-Gal-T活性は、基準として用いたラット胃粘膜より調整した標準酵素検体との比とし、平均+標準偏差で表示。N.S., not significant.

活性に有意な変化は認められなかった(図1)。HP培養上清(5倍希釈)を加えた場合、HGC-27は空胞化を起したが、UDP-Gal-T活性には有意な変化は認められなかった(図2)。次に、HP生菌を 10^4 個/ml、 10^6 個/mlの濃度で加えたが、いずれもUDP-Gal-T活性に有意な変化は認められなかった(図3)。

HPは高いウレアーゼ活性を持っているのが特徴であ

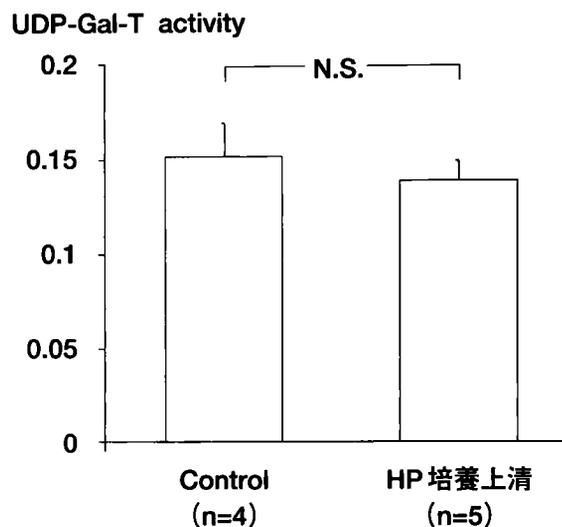


図2 HP培養上清のUDP-Gal-T活性に及ぼす影響
HGC-27細胞にHP培養上清(5倍希釈)を加え、UDP-Gal-T活性を測定した。UDP-Gal-T活性は、基準として用いたラット胃粘膜より調整した標準酵素検体との比とし、平均+標準偏差で表示。N.S., not significant.

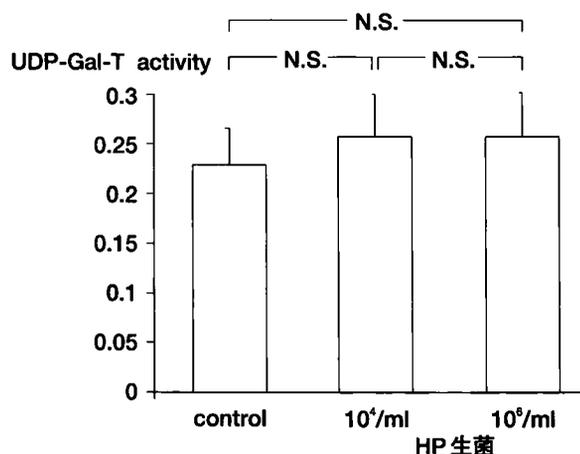


図3 HP生菌のUDP-Gal-T活性に及ぼす影響
HGC-27細胞にHP生菌を 10^4 個/ml、 10^6 個/mlの濃度で加え、UDP-Gal-T活性を測定した。UDP-Gal-T活性は、基準として用いたラット胃粘膜より調整した標準酵素検体との比とし、平均+標準偏差で表示(各群、n=5)。N.S., not significant.

り、それによって産生されるアンモニアが胃粘膜細胞に傷害的に作用する可能性が指摘されている⁸⁾。このことから HP により発生するアンモニアの胃粘膜に及ぼす影響を明らかにするため、HGC-27細胞に HP 超音波破碎物 (100 μ g/ml) と尿素 (15mg/dl) を同時に加え、UDP-Gal-T 活性を測定した。培養液中には、HP 感染者の胃液内のアンモニア濃度とほぼ同じ程度のアンモニア (約10mg/dl) の発生が観察され、この時 UDP-Gal-T 活性はコントロールや HP 超音波破碎物単独で加えた場合と比較して、むしろ有意な上昇を認めた ($P < 0.01$) (図4)。このことは、発生したアンモニア刺激に対する適応性の細胞保護反応 (adaptive cytoprotection)⁹⁾が誘導されたものと推測される。

そこで、アンモニアの直接作用を検討するため、低濃度アンモニアを直接培養液に加えたところ、0.03% (= 10mg/dl) の濃度では UDP-Gal-T 活性は上昇傾向を示し、0.06% (= 20mg/dl) の濃度では有意な上昇を認めた ($P < 0.05$) (図5)。

次に、生体内でのアンモニア発生状態に近い状態にするため、HP 生菌 10^6 個/ml と尿素15mg/dl を同時に加えると、培養液中にアンモニアが約10mg/dl発生した。しかしながら、HP 超音波破碎物と尿素的同時添加やアンモニアを加えたときに観察されたような UDP-Gal-T 活性の上昇は認められなくなった (図6)。

2. エタノールによる細胞傷害性に及ぼすアンモニア、HP の影響

HP 生菌と尿素的の添加では、発生するアンモニアにより誘導が期待される UDP-Gal-T 活性の上昇が認められなかったため、実際に細胞保護作用にも相違があるかどうかにつき、エタノール傷害モデルで検討した。HGC-27細胞にエタノールを0%、5%、10%、15%の段階的な

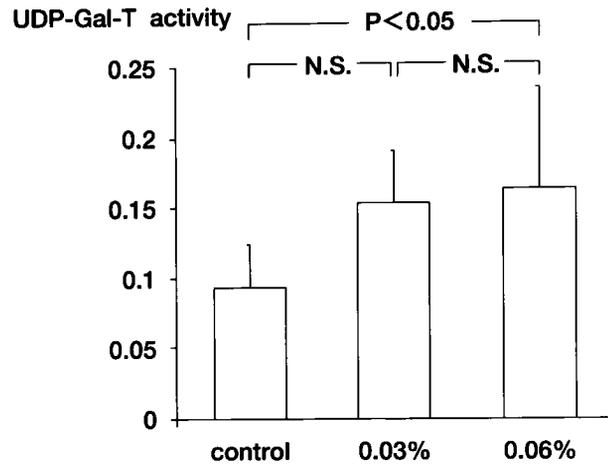


図5 アンモニアの UDP-Gal-T 活性に及ぼす直接作用
HGC-27細胞に低濃度アンモニア (0.03%, 0.06%) を直接培養液に加え、UDP-Gal-T 活性を測定した。UDP-Gal-T 活性は、基準として用いたラット胃粘膜より調整した標準酵素検体との比とし、平均+標準偏差で表示 (各群, $n = 5$)。N. S., not significant.

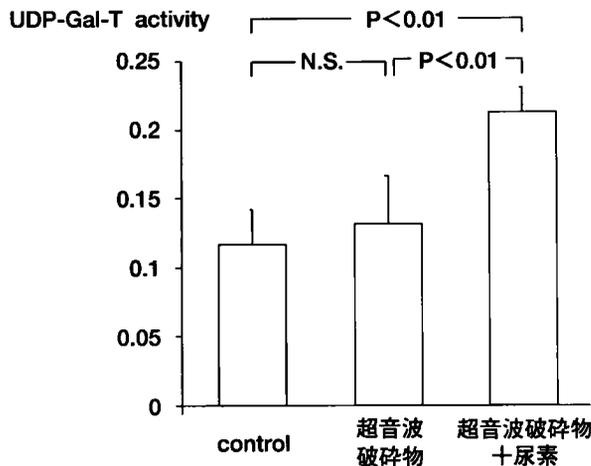


図4 HP 超音波破碎物と尿素同時添加の UDP-Gal-T 活性に及ぼす影響
HGC-27細胞に HP 超音波破碎物 (100 μ g/ml) と尿素 (15mg/dl) を同時に加え、UDP-Gal-T 活性を測定した。UDP-Gal-T 活性は、基準として用いたラット胃粘膜より調整した標準酵素検体との比とし、平均+標準偏差で表示 (各群, $n = 5$)。N. S., not significant.

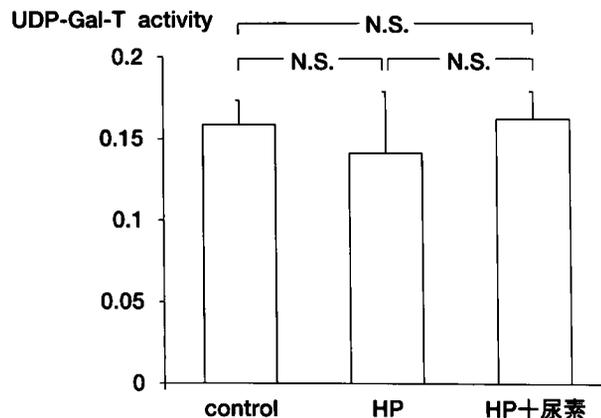


図6 HP 生菌と尿素同時添加の UDP-Gal-T 活性に及ぼす影響
HGC-27細胞に HP 生菌 10^6 個/ml と尿素15mg/dl を同時に加え、UDP-Gal-T 活性を測定した。UDP-Gal-T 活性は、基準として用いたラット胃粘膜より調整した標準酵素検体との比とし、平均+標準偏差で表示 (各群, $n = 5$)。N. S., not significant.

濃度で加えると、15%で細胞傷害が観察された。エタノール添加前に0.03%アンモニアで細胞を処理した場合、細胞傷害の程度が抑制されたが、HP 生菌 10^6 個/mlと尿素15mg/dlを同時に添加した場合には、同程度の濃度のアンモニアが発生したものの、細胞傷害に変化はみられず、細胞保護作用の誘導は認められなかった(図7)。

考 察

本研究では、HP 感染における胃粘膜傷害機序を解明するため、ムチン産生性胃癌細胞株に種々の HP 関連物質を加え、胃防御因子の主要な構成成分である粘液糖蛋白質の合成に関わる UDP-Gal-T 活性の変化を検討した。HP 超音波破碎物、HP 培養上清、HP 生菌いずれを反応させても本酵素活性の変動は認められず、HP 関連物質の中に直接的に粘液糖蛋白質合成に影響を及ぼす物質を見いだすことはできなかった。

ところで HP は高いウレアーゼ活性を持っているのが特徴であり、それによって産生されるアンモニアには細胞傷害性が認められることが報告されている⁸⁾。そこで、アンモニアの UDP-Gal-T 活性に対する影響について検討したところ、HP 感染者の胃液内のアンモニア濃度と

ほぼ同じ程度のアンモニアを発生させる量の HP 超音波破碎物と尿素を加えたところ、予想に反し、UDP-Gal-T 活性は低下せず、むしろ逆に有意に上昇を認めた。アンモニアを直接加えた場合も同様の結果であった。この結果は、胃粘膜上皮細胞は mild irritant に対して adaptive cytoprotection 作用を示すことが言われており⁹⁾、低濃度のアンモニアも mild irritant として adaptive cytoprotection を誘導することが報告されている^{10,11)}ことと合致する所見と考えられた。すなわち、HP 感染者の胃内に存在する程度の比較的低濃度のアンモニアは、むしろ mild irritant として働き、UDP-Gal-T 活性を上昇させ粘液糖蛋白質合成を増加させることにより adaptive cytoprotection を誘導するものと思われる。

ところが、HP 生菌と尿素を同時に加え、アンモニアを発生させた場合には UDP-Gal-T 活性の上昇が認められなかった。この結果から、HP 生菌には、本来は低濃度アンモニアによって誘導されてくるとされる胃粘膜の adaptive cytoprotection を阻害する作用があることが推測される。そこで、実際に細胞傷害に対する細胞保護作用の変化につき、エタノールによる細胞傷害モデルを用いて検討を行ったところ、低濃度アンモニアで処理した場合には、予想されたようにエタノールによる細胞傷害性に対する adaptive cytoprotection によると思われる抑制効果が観察された。しかし、HP 生菌と尿素で処理した場合には、このアンモニアによる細胞傷害性の抑制効果は認められず、アンモニアによって誘導されるべき adaptive cytoprotection を HP 生菌が阻害している可能性が示唆された。

ところで、実際には HP 感染胃粘膜では、粘液量が減少している事が報告されており¹²⁾、HP 感染が粘液の合成・分泌に影響を与えていることが推測されてきた。しかし、今回の検討では、前述のごとく HP には直接的に粘液糖蛋白質合成に影響を及ぼす知見は得られなかった。一方、粘液の分泌に関しては HP が抑制効果を示したという報告^{13,14)}が見られることから、HP 感染胃粘膜における粘液量の減少は、分泌抑制効果による可能性が考えられる。しかし、今回の検討は胃癌培養細胞を用いた *in vitro* の検討であるため、実際の HP 感染胃粘膜での粘液量の減少機序の解明には、HP 感染患者胃粘膜を用いた *in vivo* での UDP-Gal-T 活性の変化の解明が必要と考えられ、現在検討を進めている。

さて、adaptive cytoprotection の機序については、様々な因子の関与が言われているが、mild irritant に反応し

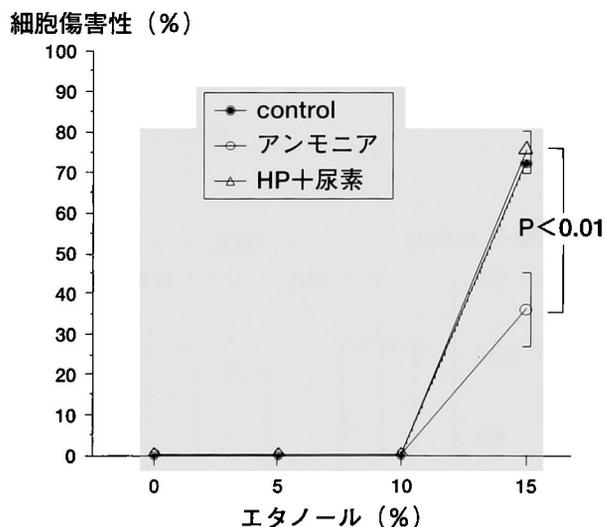


図7 エタノールによる細胞傷害性に及ぼすアンモニア、HP 生菌と尿素同時添加の影響
HGC-27細胞にエタノールを0%、5%、10%、15%の段階的な濃度で加え、LDH-releasing assayにより細胞傷害性を検討した(●)。次に、エタノール添加前に、HGC-27細胞を0.03%アンモニアで処理し、同様に細胞傷害性を検討した(○)。さらに、エタノール添加前に HGC-27細胞に HP 生菌 10^6 個/mlと尿素15mg/dlを同時に添加し、細胞傷害性を検討した(△)。各サンプルの細胞傷害性はすべての細胞が傷害された場合の LDH 放出量に対する比(%)とし、平均±標準偏差で表示(各群、n = 4)。

て胃粘液が増加することも機序の一つであることが報告されている¹⁵⁾。今回の検討でも、アンモニア処理によりエタノールの細胞傷害性が抑制され、この時 UDP-Gal-T 活性は上昇を示したことから、mild irritant に反応して胃粘液糖蛋白質合成が亢進することが、adaptive cytoprotection の機序の一つであることを支持する所見と考えられた。今回の検討ではさらに、HP 生菌は、このアンモニアによって誘導されるべき UDP-Gal-T 活性の上昇を抑制することにより、adaptive cytoprotection を阻害する作用があることが明らかとなった。この HP 生菌が有する adaptive cytoprotection 阻害に関わる因子の解明が今後の課題と考えられる。

結 論

HP が胃粘膜防御機構に与える影響について、培養胃癌細胞を用いて、胃粘液糖蛋白質合成に関わる UDP-Gal-T 活性の面から検討した。HP 関連物質の胃粘液糖蛋白質合成に直接的に及ぼす影響は明らかではなかったが、HP 生菌には、アンモニアによる UDP-Gal-T 活性増加に基づく adaptive cytoprotection を阻害する作用があることが明らかとなった。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご懇切な指導とご校閲を賜った恩師岡山大学大学院医歯学総合研究科 消化器・肝臓・感染症内科学教室 辻孝夫教授、水野元夫助教授、また、病原細菌学教室 小熊恵二教授、横田憲治講師、本研究の実施、検討にご援助頂いた教室員の方々に深謝いたします。

文 献

- 1) Werther JL : The gastric mucosal barrier. *Mt Sinai J Med* (2000) **67**, 41–53.
- 2) Allen A and Garner A : Mucus and bicarbonate secretion in the stomach and their possible role in mucosal protection. *Gut* (1980) **21**, 249–262.
- 3) Strous GJ and Kramer MF : Glycoprotein synthesis in gastric epithelial cells of the rat. Properties of microsomal glycoprotein glycosyltransferases. *Biochim Biophys Acta* (1976) **451**, 201–211.
- 4) Maga T, Mizuno M, Tanaka S, Yoshinaga F, Mikami Y, Kihara Y, Kiso T, Tomoda J, Okada H and Tsuji T : Assessment of UDP-galactosyl-transferase activity in gastric mucosa of patients with chronic liver disease using an enzyme-linked peanut agglutinin binding assay. *Digestion* (1997) **58**, 389–395.
- 5) Akagi T and Kimoto T : Human cell line (HGC-27) derived from the metastatic lymph node of gastric cancer. *Acta Med Okayama* (1976) **30**, 215–219.
- 6) Hongo T, Tomoda J, Mizuno M, Maga T and Tsuji T : Analysis of galactosyltransferase activity in rat gastric mucosa using crude mucosal homogenate. *Acta Med Okayama* (1991) **45**, 301–308.
- 7) Nakamura K, Rokutan K, Marui N, Aoike A and Kawai K : Induction of heat shock proteins and their implication in protection against ethanol-induced damage in cultured guinea pig gastric mucosal cells. *Gastroenterology* (1991) **101**, 161–166.
- 8) Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Fusamoto H, Kamada T and Sato N : Mechanism of gastric mucosal damage induced by ammonia. *Gastroenterology* (1992) **102**, 1881–1888.
- 9) Chaudhury TK and Robert A : Prevention by mild irritants of gastric necrosis produced in rats by sodium taurocholate. *Dig Dis Sci* (1980) **25**, 830–836.
- 10) Takeuchi K, Ohuchi T, Harada H and Okabe S : Irritant and protective action of urea-urease ammonia in rat gastric mucosa. Different effects of ammonia and ammonium ion. *Dig Dis Sci* (1995) **40**, 274–281.
- 11) Brzozowski T, Konturek P, Sliwowski Z, Szlachcic A, Hahn EG and Konturek SJ : Adaptive cytoprotection by ammonia and urea-urease system in the rat gastric mucosa. *J Physiol Pharmacol* (1995) **46**, 471–488.
- 12) Marshall BJ, McGeachie DB, Rogers PA and Glancy RJ : Pyloric *Campylobacter* infection and gastroduodenal disease. *Med J Aust* (1985) **142**, 439–444.
- 13) Liao YH, Lopez RA, Slomiany A and Slomiany BL : Helicobacter pylori lipopolysaccharide effect on the synthesis and secretion of gastric sulfomucin. *Biochem Biophys Res Commun* (1992) **184**, 1411–1417.
- 14) Micots I, Augeron C, Laboisie CL, Muzeau F and Megraud F : Mucin exocytosis: a major target for Helicobacter pylori. *J Clin Pathol* (1993) **46**, 241–245.
- 15) Mutoh H, Ota S, Hiraishi H, Ivey KJ, Terano A and Sugimoto T : Adaptive cytoprotection in cultured rat gastric mucus-producing cells. Role of mucus and prostaglandin synthesis. *Dig Dis Sci* (1995) **40**, 872–878.

**A study on the effect of *Helicobacter pylori* to the
gastric mucosal defensive mechanism**

Fumiya YOSHINAGA

**Department of Medicine and Medical Science,
Okayama University Graduate School of Medicine and Dentistry
(Director : Prof. T. Tsuji)**

UDP-galactosyltransferase (UDP-Gal-T) is a key enzyme in the synthesis of mucus glycoproteins, which play an important role in gastric mucosal defensive mechanisms. *Helicobacter pylori* (HP) induces gastritis and peptic ulcers, but mechanisms of HP-induced mucosal injury are not fully understood. To elucidate the mechanism whereby (HP) infection induces gastric mucosal injury, we investigated the effects of HP on the gastric mucosal defensive mechanism by measuring UDP-Gal-T activities in HGC-27, a mucin-producing gastric cancer cell line, treated with various HP-related materials (sonicated HP, HP culture supernatants, live HP). HP-related materials induced no significant changes in UDP-Gal-T activity, but the enzyme increased when we generated a low concentration of ammonia by adding sonicated HP and urea simultaneously. In contrast, UDP-Gal-T activity did not increase when we added live HP instead of sonicated HP. Next, we investigated the effects of HP on ethanol-induced injury in HGC-27 cells. Pretreatment with ammonia of a low concentration significantly protected cells from ethanol-induced injury. In contrast, pretreatment with live HP and urea generated ammonia of the similar concentration but did not protect cells from the injury. Our findings suggest that HP has an inhibitory effect against adaptive cytoprotection induced by ammonia by inhibiting the induction of UDP-Gal-T.