

# ヘリコバクター・ピロリ感染による動脈硬化促進検討モデルとしての *apoe*<sup>+/-</sup> *ldlr*<sup>+/-</sup> マウスの有用性

崔 錦花

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 病原細菌学  
(指導：小熊恵二教授)

## *Apoe*<sup>+/-</sup> *ldlr*<sup>+/-</sup> mice as a useful model to evaluate accelerated atherogenesis by *Helicobacter pylori* infection

Jinhua Cui

Department of Bacteriology, Okayama University Graduate School of Medicine,  
Dentistry, and Pharmaceutical Sciences, Okayama 700-8558, Japan  
(Director : Prof. K. Oguma)

Atherosclerosis is closely related to chronic infection. In the present study, we evaluated atherogenesis by gastric infection with *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) in atherosclerosis-prone *apoe*<sup>+/-</sup> *ldlr*<sup>+/-</sup> mice. Six-week-old male *apoe*<sup>+/-</sup> *ldlr*<sup>+/-</sup> mice infected by *H. pylori* and *apoe*<sup>+/-</sup> *ldlr*<sup>+/-</sup> control mice were fed with a high cholesterol diet (1%). Eight weeks after the confirmation of infection, the extent of atherosclerosis, anti heat shock protein 60 of *H. pylori* (Hp-HSP60) serum titers, and the cellular immune responses against Hp-HSP60 were evaluated. Atherosclerosis was promoted by a Th1-mediated reaction against Hp-HSP60, accompanied by production of IFN- $\gamma$  and IL-12, and mRNA expression of T-bet in the *H. pylori*-infected *apoe*<sup>+/-</sup> *ldlr*<sup>+/-</sup> mice. The over-expressed of HSP60 in stressed endothelial cells could be cross-recognized by T cells against Hp-HSP60 and contributed to the atherosclerosis. This mouse model would be useful for analyzing immunological mechanisms of atherogenesis.

キーワード：動脈硬化 (atherosclerosis), ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*), 熱ストレスタンパク60 (heat shock protein 60), Tリンパ球 (T-lymphocytes), *apoe*<sup>+/-</sup> *ldlr*<sup>+/-</sup> ヘテロダブルノックアウトマウス (*apoe*<sup>+/-</sup> *ldlr*<sup>+/-</sup> mice)

### 緒 言

動脈硬化は様々な免疫炎症細胞が関与する慢性炎症病態である<sup>1-3</sup>。また慢性感染が、動脈硬化に起因する虚血性心疾患や脳血栓症のリスクファクターになることも疫学的に明らかになっている<sup>4-6</sup>。特に慢性感染病原体である *Chlamydia pneumoniae* や *Porphyromonas gingivalis* の熱ショックタンパク60 (HSP60), あるいは *cytomegalovirus* 由来の HSP60類似タンパクに対する免疫反応が、動脈硬化進展に関与すると考えられている<sup>7-9</sup>。HSP60は、原核生物、真核生物を問わず全ての生物種において共通に存在する分子シャペロンである。その一次アミノ酸配列や立体構造は、生物種を超えて高度に保存されているため<sup>10</sup>、しばしば自

己免疫疾患のターゲット分子となることがある<sup>11,12</sup>。つまり、動脈硬化形成過程においても、慢性感染病原体により惹起され、宿主(ヒト)のHSP60に対し誤って発動された「自己免疫反応」が関与していると考えられている<sup>13-15</sup>。そのため、慢性感染病原体の動脈硬化形成の関与を検討するには、血清中の抗HSP60抗体価や循環血液中のHSP60特異的T細胞の有無を測定することが重要と考えられる。

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) は慢性胃炎、消化性潰瘍、胃癌、MALTリンパ腫など消化器関連疾患の原因菌としてよく知られているが<sup>16</sup>、近年は特発性血小板減少性紫斑病、蕁麻疹のような消化器以外の疾患への関与も指摘されている<sup>17-19</sup>。更にここ数年の臨床疫学調査により *H. pylori* 感染と動脈硬化の関連性も指摘されているが、未だ賛否両論がある<sup>20-23</sup>。*H. pylori* はヒトの幼少期に感染し<sup>24</sup>、胃内の粘液層に定着し続け、近傍の胃粘膜局所のみならず、全身の炎症免疫細胞に影響を及ぼす<sup>25,26</sup>。特に *H. pylori* 由来のHSP60 (Hp-HSP60) は周囲の環境ストレスに応じて

平成19年6月8日受理  
〒700-8558 岡山市鹿田町2-5-1  
電話：086-235-7158 FAX：086-235-7162  
E-mail：cuijinhuatl@hotmail.com

発現され<sup>27)</sup>、免疫原性タンパクとして病原性を発揮する。我々は、*H. pylori* 感染による MALT リンパ腫の患者において、胃のリンパ組織胚中心の抗原提示細胞に抗ヒト HSP60抗体に認識される Hp-HSP60抗原が提示され、これをエピトープとする抗 Hp-HSP60抗体が産生されることを明らかにした<sup>28,29)</sup>。つまり、他の慢性感染病原体が惹起する動脈硬化促進機序と同様の「自己免疫反応」が *H. pylori* 感染により引き起こされる可能性がある。

そこで、本研究では *H. pylori* 感染が動脈硬化に関与する直接的なエビデンスを検証するための動物モデルを確立し、さらに HSP60特異的免疫反応と動脈硬化促進との関連を検討した。

## 材料と方法

### 1. 動物および実験プロトコール

動物は6週齢オスの *apoe*<sup>+/-</sup> *ldlr*<sup>+/-</sup> ヘテロダブルノックアウトマウスを用いた。本マウスは The Jackson Laboratory, USA より購入した *apoe*<sup>-/-</sup>, *ldlr*<sup>-/-</sup> マウスを交配することにより作製した。作出された全てのマウスの尾部を採取しその組織から DNA を抽出し、The Jackson Laboratory が推奨する PCR 法により *apoe*<sup>+/-</sup>, *ldlr*<sup>+/-</sup> の遺伝子型であることを確認した。これらマウスをコントロール (n = 8), *H. pylori* 感染 (n = 8) の2群に分け、*H. pylori* 感染群は6週齢時より7日間毎日、*H. pylori* SS1 生菌の生理食塩水懸濁液 1 ml をゾンデにて直接胃内へ注入して感染させた。全てのマウスに6週齢よりコレステロールを1%含有した高脂肪食を与えた。8週齢時に抗 Hp-lysate 抗体価を測定し<sup>30)</sup>、感染の成立を確認できたマウスだけを以後の実験に用いた。16週齢時に全てのマウスを屠殺し、血液、胃、脾臓、大動脈を採取した(図1A)。さらに *ldlr*<sup>-/-</sup> マウスについても同様の方法で実験を行った。本実験は岡山大学動物実験指針に則り、岡山大学動物実験管理委員会の承認を得て行った。

### 2. 動脈硬化の定量

胸部大動脈に対し4%ホルマリン PBS にて血管内灌流を行った後、ゆっくりと20%ホルマリン PBS にて固定した。その後、(図1B)に示したように腕頭動脈分岐部、左鎖骨下動脈分岐部、胸部下行大動脈の中央と下端の計4カ所の横断病理組織切片を作製した。組織切片はヘマトキシリンエオジン染色を行い、顕微鏡下(×40)で観察後、画像デジタルライザーで採画した。Scion Image ソフトウェア(Scion Corp., Frederick, ML, USA)にて大動脈の内腔、プラーク、動脈壁のそれぞれの面積を測定し狭窄率を(図1C)の如く計算した。4切片の狭窄率の平均値を動脈硬化の指標とした。

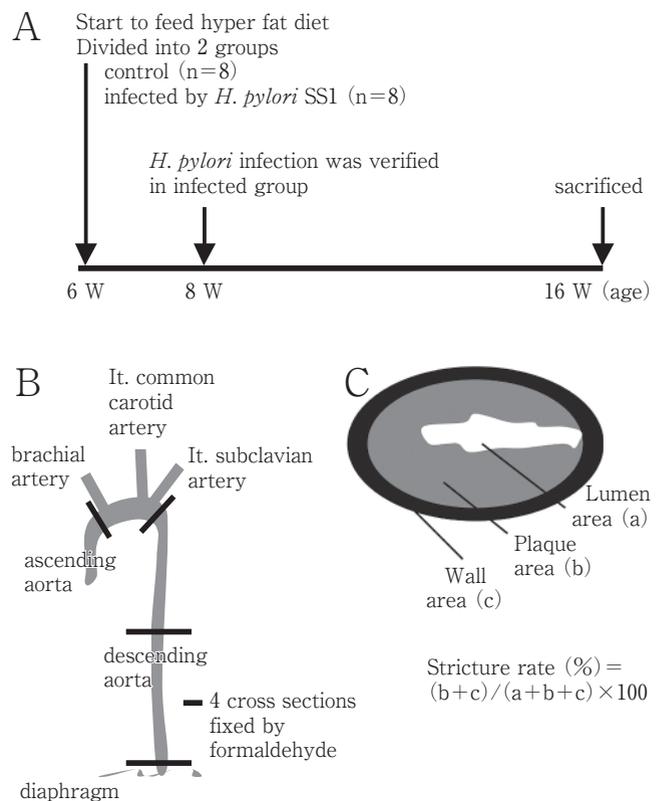


図1 本実験のデザインおよび動脈硬化の評価方法  
A; 本実験のプロトコールを示した。全てのマウスに6週齢より高脂肪食を与えた。コントロール群 (n = 8) と感染群 (n = 8) に分け、感染群には *H. pylori* SS1 を感染させた。8週齢時に全ての感染群マウスの感染を確認した。16週齢時に屠殺し、検体を解析した。B; 大動脈切片作製部位を実線で示した。C; 動脈狭窄率の計算法を示した。プラークおよび動脈壁領域が全断面積に占めるパーセンテージを狭窄率とした。

### 3. 動脈内皮細胞における HSP60の発現

腹部大動脈は Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetechnical Co., Ltd., Tokyo, Japan) に包埋後、迅速に凍結し以後の免疫染色に用いた。クリオスタットにて薄切組織切片を作製し風乾後できるだけ迅速にアセトン固定をした。非特異的反応を阻止するためヒツジ血清にてブロッキングした後、一次抗体を反応させた。一次抗体には、抗 Hp-HSP60ポリクローナル IgG 抗体<sup>28)</sup> と抗マウス HSP60モノクローナル抗体 (Stressgen Biotechnologies Corp., Victoria, Canada) を用い、HRP 付加二次抗体および DAB にて免疫染色を行った。

### 4. 胃組織の評価

摘出胃ホルマリン固定標本に、噴門と幽門を通る縦軸方向で割を入れ病理組織標本を作製した。既報の如く、ヘマトキシリンエオジン染色にて胃炎の評価、抗 *H. pylori* ウレアーゼ抗体を用いた免疫染色により *H. pylori* の胃内への定着の確認を行った<sup>31)</sup>。

## 5. 血清学的評価

採取した血液の血清中のコレステロール値を血清酵素法 (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) により、また既報のように、抗 Hp-lysate 抗体価、抗 Hp-HSP60 IgG, IgG1, IgG2a 抗体価を ELISA 法により測定した<sup>30)</sup>。

## 6. Hp-HSP60特異的細胞性免疫の評価

既報のごとく Hp-HSP60特異的細胞性免疫の評価を行った<sup>32)</sup>。簡単にその方法を述べると、まず摘出脾臓より脾臓細胞を取り出し、10%仔牛血清を含む RPMI 1640培地に懸濁し、24-well 細胞培養プレートに播種した ( $1 \times 10^6$  per well)。これらに Hp-HSP60 (5  $\mu$ g/ml) を添加して48時間培養した。その後、培養上清中の IFN- $\gamma$ , IL-12 (p40), IL-10を ELISA 法 (Biosource International, Inc., Camarillo, CA, USA) にて測定した。また、培養細胞から RNA を抽出し、定量的リアルタイム PCR 法により T-bet, GATA3 および G3PDH の mRNA の発現量を定量した。プライマー配列を以下に示す。T-bet forward primer, 5'-ACCA GAACGCAGAGATCACT-3'; T-bet reverse primer, 5'-AGGGGACACTCGTATCAACA-3'。GATA-3 forward primer, 5'-GTCAAGGCAACCACGTCC-3'; GATA-3 reverse primer, 5'-CAGAGATCCGTGCAGCAGAG-3'。CXCR3 forward primer, 5'-TCATGGATGTGGGAGT TTT-3'; CXCR3 reverse primer, 5'-TCCACATTTGCT CTCTGAAC-3'。DEC205 forward primer, 5'-TGAAAC CTGGAGAAAAGTC-3'; DEC205 reverse primer, 5'-TGCAAGAGGAACCAAATC-3'。G3PDH forward primer, 5'-TGAACGGGAAGCTCACTGG-3'; G3PDH reverse primer, 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'。PCR 反応は TaKaRa Ex Taq HS (TakaraBio Inc., Otsu, Japan) を用い95°C 15秒, 60°C 20秒, 72°C 30秒の50サイクルで行った。定量された T-bet, GATA3 のコピー数を G3PDH のコピー数で除した値を発現量とした。

## 7. 統計学的解析

統計学的解析はすべて Kaleida Graph ソフトウェア (Synergy Software, Reading, PA, USA) を用いて行った。有意差検定は Wilcoxon-Mann-Whitney test によって行い、 $P < 0.05$ を有意とした。

## 結 果

### 1. 遺伝子型, 高脂血症, *H. pylori* 感染の確認

すべてのマウスの遺伝子型検索において、*apoe* 遺伝子を検出する PCR では155bp と245bp のバンドを、*ldlr* 遺伝子を検出する PCR では167bp と350bp のバンドをそれぞれ認め、*apoe*<sup>+/-</sup> *ldlr*<sup>+/-</sup> マウスであることを確認した (図

2 A)。血清中のコレステロール値および抗 Hp-lysate 抗体価を (表1) に示した。全てのマウスにおいて高度の高脂血症がみられた。しかし、コントロール群と感染群ではそれぞれの群間で有意差は認めなかった。つまり、感染によって血清中コレステロール値は影響を受けなかった。また、抗 Hp-lysate 抗体価は、コントロール群に比べ感染群において有意に上昇していた。さらに胃組織の *H. pylori* ウレアーゼに対する免疫組織染色では、全ての感染群のマウスの粘液層のみが陽性に染色され、強拡大で菌体も確認できた。典型的なコントロール群の胃免疫組織染色像 (図2 B) と、感染群のもの (図2 C) とその一部拡大像 (図2 D) を示した。これらの結果から感染群における *H. pylori* の胃内への定着とそれに起因する免疫反応が惹起されていることが確認できた。胃炎の程度は3段階で評価したが、両群間で有意差を認めなかった (データ非提示)。

### 2. *H. pylori* 感染による動脈硬化の促進

典型的なコントロール群の動脈組織像 (図3 A), *H. pylori* 感染群の典型的に高度な動脈硬化を認める動脈組織像 (図3 B) を示した。さらに、各群別の狭窄率を *apoe*<sup>+/-</sup> *ldlr*<sup>+/-</sup> マウス, *ldlr*<sup>-/-</sup> マウスについて (表2) に示した。*apoe*<sup>+/-</sup> *ldlr*<sup>+/-</sup> マウスの *H. pylori* 感染群の動脈硬化による狭窄率は、コントロール群に比べ有意に上昇していた。つまり *H. pylori* 感染による動脈硬化の促進効果を認めた。しかし、*ldlr*<sup>-/-</sup> マウスにおいては感染による動脈硬化促進を認めなかった。そこで以後の検討結果は *apoe*<sup>+/-</sup> *ldlr*<sup>+/-</sup> マウスについてのみ示すこととする。

### 3. 動脈硬化病変部における HSP60の発現

*apoe*<sup>+/-</sup> *ldlr*<sup>+/-</sup> マウスの感染群マウスの腹部大動脈組織に対する免疫染色の結果、動脈硬化病変部の内皮細胞が存在する内腔側は抗 Hp-HSP60抗体 (図3 C), 抗マウス HSP60抗体 (図3 D) いずれによっても陽性に染色された。つまり、感染群の動脈硬化病巣では内皮細胞を中心に HSP60が発現していることが確認できた。

### 4. HSP60特異的細胞性免疫反応

*apoe*<sup>+/-</sup> *ldlr*<sup>+/-</sup> マウスより採取した脾臓細胞の培養上清中のサイトカイン濃度および脾臓細胞より抽出した mRNA 定量の結果を (表3) に示した。Th1リンパ球が分泌するサイトカインである IFN- $\gamma$  や、Th1分化を促進するサイトカインである IL-12の濃度が、コントロール群に比べ感染群で有意に上昇していた。これに対し、Th2リンパ球が主に産生するサイトカインである IL-10の濃度は、コントロール群に比べ感染群で有意に低下していた。以上のサイトカイン分析の結果から感染群ではリンパ球の Th1 優位の分化が進んでいることがわかった。また、Th1分化を促す転写因子である T-bet の mRNA もコントロ

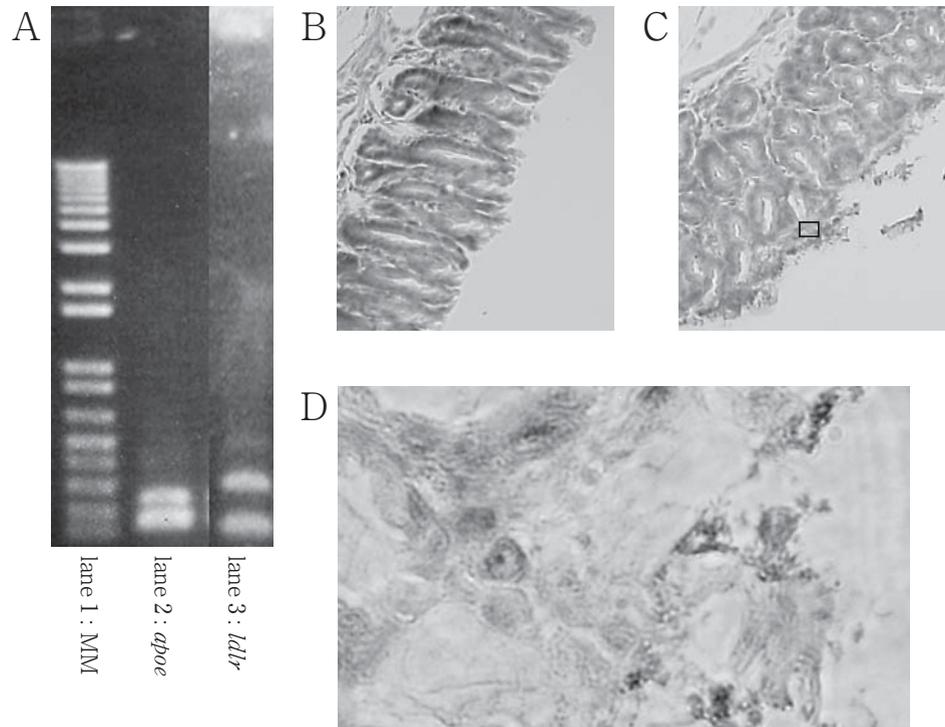


図2 マウスの遺伝子型および *H. pylori* 感染の確認

A ; *apoe* および *ldlr* 遺伝子解析の結果を示した. lane 1 は分子マーカー, lane 2 は *apoe*, lane 3 は *ldlr* の PCR 産物の電気泳動の結果である. いずれの遺伝子においても 2 種類のバンドが認められ, *apoe*<sup>+/-</sup> *ldlr*<sup>+/-</sup>ヘテロダブルノックアウトマウスであることが確認された. B, C ; コントロール群マウスの胃の典型的な抗 *H. pylori* ウレアーゼ免疫組織染色像(B)と感染群マウスのもの(C)とその一部の強拡大像を示した(D). 感染群マウスのみで, 胃の粘液層が陽性に染色され, *H. pylori* 菌体も確認された.

表1 Assessments of total cholesterol in serum and anti-Hp-lysate antibody titer

	Control (n=8)	Infection (n=8)
Cholesterol (mg/dl)	2580 +/- 557	2328 +/- 849
Anti-Hp lysate antibody titer	0.041 +/- 0.013	1.090 +/- 0.566*

Data are shown as the mean +/- SD. Mann-Whitney's U-test : against control group

\* : P < 0.01

ール群に比べ感染群で有意に上昇していた. これに対し, Th 2 分化を促進する転写因子である GATA3 の mRNA もコントロール群に比べ感染群で有意に低下していた. つまり, 転写因子の mRNA においてもサイトカインと同様にリンパ球の Th 1 優位の分化を示す結果が得られた.

### 5. 抗 Hp-HSP60抗体価の詳細

抗 Hp-HSP60 抗体価の詳細を(表 4)に示した. 抗 Hp-HSP60 全抗体価, 抗 Hp-HSP60 IgG 1 抗体価は, コントロール群と感染群間に有意差を認めなかった. しかし, Th 1 分化に従って認められる免疫グロブリンのサブクラスである抗 Hp-HSP60 IgG2a 抗体価はコントロール群に

比べ感染群で有意に上昇していた. 更に, IgG2a/IgG 1 比もコントロール群に比べ感染群で有意に上昇していた. つまり, 抗 Hp-HSP60 抗体価の検討においても, HSP60 特異的 Th 1 優位の免疫反応が *H. pylori* 感染により惹起されている結果が得られた.

## 考 察

これまでに *H. pylori* 感染と動脈硬化の関係についての臨床疫学的検討は多数行われているが, *H. pylori* 感染が動脈硬化に促進的に働くとするコンセンサスは必ずしも得られていない<sup>20-23)</sup>. その最大の理由の 1 つとして, *C. pneumoniae*, *P. gingivalis*, cytomegalovirus は血中に移行し, その一部は血管組織内に存在し続けることができるため, 動脈硬化を促進する炎症免疫反応を直接惹起することができるのに対し, *H. pylori* は胃内に限局して存在するため, 動脈硬化形成には関与できないと考えられているからである<sup>20)</sup>. しかし, 近年 *H. pylori* 感染は消化管以外の疾患(特発性血小板減少性紫斑病, 蕁麻疹など)に関与していることが明らかとなっている<sup>17,18)</sup>. また我々の検討では, 特に特発性血小板減少性紫斑病患者において, *H. pylori* 除菌治療後数週間で血小板数が回復し病態が改善することを

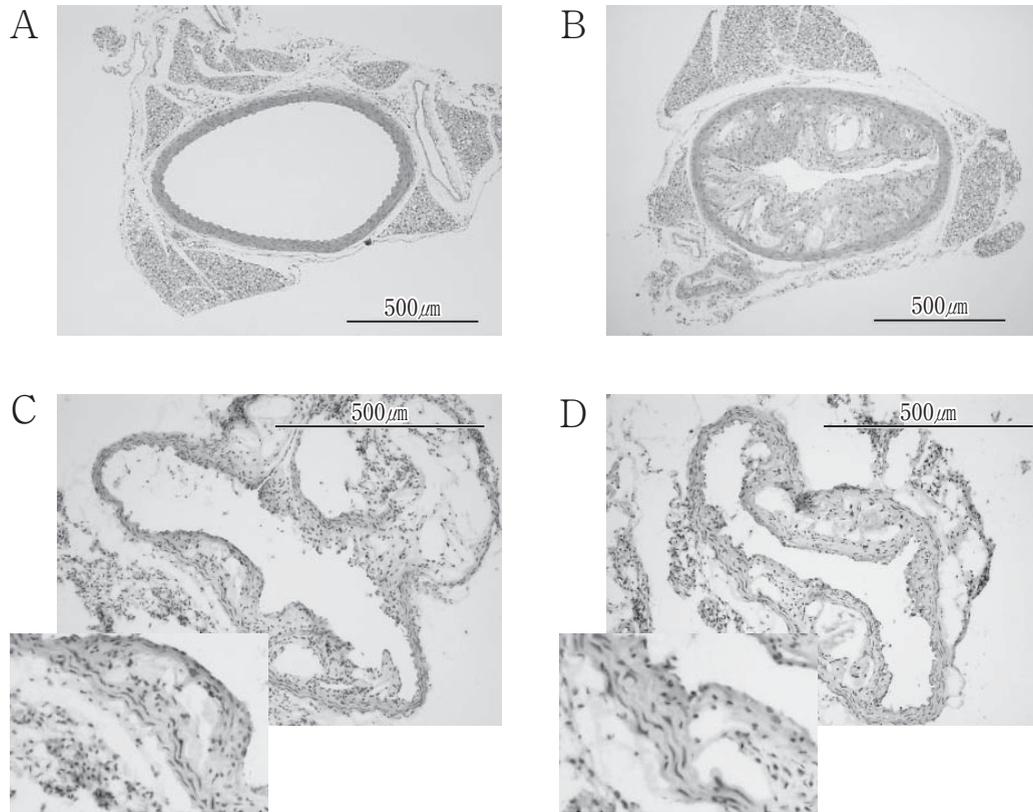


図3 マウス大動脈における動脈硬化像

A, B；コントロール群マウスの胸部大動脈の典型的なヘマトキシリンエオジン染色像(A)と感染群マウスで典型的に高度な内腔狭窄が認められたものを(B)を示した。感染群でプラークや中膜の肥厚を認め動脈硬化の進展が観察された。C, D：感染群マウスの腹部大動脈の典型的な抗 HSP60免疫組織染色像を示した。抗 Hp-HSP60免疫組織染色(C)と抗マウス HSP60免疫組織染色(D)いずれによっても動脈硬化病巣部で内皮細胞を中心とした内腔側が陽性に染色され、動脈硬化病巣部での HSP60の発現が確認された。

表2 The comparison in stricture rates (%) between control and infection group

	Control (n=8)	Infection (n=8)
<i>apo</i> <sup>+/-</sup> <i>ldlr</i> <sup>+/-</sup>	28.7±2.0	66.9±12.0*
<i>ldlr</i> <sup>-/-</sup>	31.3±4.3	33.1±6.4

Data are shown as the mean±SD. Mann-Whitney's U-test : against control group

\* : P<0.001

表3 Cytokine profiling and quantification of mRNA for transcription factors

	Control (n=8)	Infection (n=8)
IFN-γ (ng/ml)	0.17±0.22	1.07±0.58***
IL-12 (ng/ml)	0.033±0.007	0.096±0.034**
IL-10 (ng/ml)	0.069±0.014	0.026±0.012*
T-bet (×10 <sup>-5</sup> )	1.22±0.88	96.93±81.51**
GATA-3	0.34±0.28	0.10±0.31**

Data are shown as the mean±SD. Mann-Whitney's U-test : against control group

\* : P<0.05, \*\* : P<0.01, \*\*\* : P<0.001

表4 Humoral immunity against Hp-HSP60

	Control (n=8)	Infection (n=8)
Anti-HSP60 total Ig antibody titer	0.018±0.037	0.004±0.012
Anti-HSP60 IgG1 antibody titer	0.021±0.011	0.052±0.046
Anti-HSP60 IgG2a antibody titer	0.006±0.002	0.075±0.040*
Anti-HSP60 IgG2a/IgG1 ratio	0.33±0.15	1.89±0.81*

Data are shown as the mean±SD. Mann-Whitney's U-test : against control group

\* : P<0.001

経験している<sup>19)</sup>。つまり、*H. pylori* 感染は、全身性の免疫炎症反応を介し、消化管以外の病態である動脈硬化に関与する可能性があり、その免疫反応は感染および除菌によって出現および消退する可逆的な反応と考えられた。そこで、今回 *H. pylori* 感染が動脈硬化に促進的に働くとする直接的なエビデンスを得るための動物実験モデルを確立しようと試みた。

Mach らは、*ldlr*<sup>-/-</sup> マウスを用い高脂肪食を負荷した短期の観察期間での実験モデルの場合、*H. pylori* 感染と動脈硬化の進展には関連がないと報告している<sup>33)</sup>。今回の我々の検討においても *ldlr*<sup>-/-</sup> マウスでは *H. pylori* 感染による動脈硬化促進効果を認めていない (表 2)。そこで本検討のような短期間の評価モデルを確立するには、高脂血症をより高度に発症する *apoe*<sup>-/-</sup> マウスを用いた検討を考慮した。しかし、*apoe*<sup>-/-</sup> マウスでは高脂肪食負荷のみで高度の動脈硬化が認められることから<sup>34)</sup>、今回高脂血症が中等度に持続する *apoe*<sup>+/-</sup> *ldlr*<sup>+/-</sup> ヘテロダブルノックアウトマウスを用いた。

また、ヒトにおける *H. pylori* 感染および定着は幼少期におこることが知られており<sup>24)</sup>、さらに血中の HSP60 特異的 T リンパ球は若年男性において独立した動脈硬化のリスクファクターとされている<sup>35)</sup>。従って本検討においては *H. pylori* 感染をマウスの幼少期にあたる 6 週齢で完了させ、若年期の 8 週齢で感染による全身性免疫反応が惹起される (Hp-lysate 抗体価が上昇する) 実験モデルとした。また、*H. pylori* 感染に起因する消化器疾患を観察する標準的な実験マウスモデル<sup>36)</sup>に比べると、本モデルでは *H. pylori* の定着期間が短いので十分な胃炎を認めなかったが、*H. pylori* 感染に伴う全身性の HSP60 特異的免疫反応は確認できたので (表 3, 4)、本反応と動脈硬化の関係を評価しうる動物実験モデルと考えられた。

動脈硬化の進展に関わる重要な因子の一つである血中コレステロール値はコントロール群と感染群の間に有意差を認めなかった (表 1)。従って今回の *apoe*<sup>+/-</sup> *ldlr*<sup>+/-</sup> ヘテロダブルノックアウトマウスを用いた検討において *H. pylori* 感染群でコントロール群に比べ有意な動脈硬化の進展を認めたことにより、我々は *H. pylori* 感染に伴う免疫反応が動脈硬化を進展させることを初めて明らかにしたことになる。さらに、本動物実験モデルが *H. pylori* 感染に伴う HSP60 特異的免疫反応により引き起こされる動脈硬化病態解析に大変好適であることがわかった。

HSP60 を介した免疫反応が動脈硬化を促進する機序は複雑で未解明な点が多い<sup>3, 37, 38)</sup>。今回の我々の検討では、感染群において Hp-HSP60 刺激に対し Th 1 分化に必須のサイトカインである IFN- $\gamma$ 、IL-12 や転写因子である T-bet の

産生および発現の亢進や、Th 1 分化に伴い産生される抗 Hp-HSP60 IgG2a 抗体の抗体価上昇を認めた。一方これとは反対に、Th 2 サイトカインや転写因子である IL-10 や GATA3 の発現の低下も認めた (表 3, 4)。つまり、*H. pylori* 感染によって胃内で惹起された Hp-HSP60 特異的な Th 1 優位の免疫反応 (Hp-HSP60 特異的細胞性免疫反応) が動脈硬化を促進したと考えられる。本知見は Th 1 優位の免疫反応が動脈硬化の進展に深く関わるとする今までの報告にも一致する<sup>39)</sup>。なお、今回データを示していないが、マウス HSP60 と相同性の高いヒト HSP60 による刺激でも同様の免疫反応を認めており、マウス HSP60 によっても HSP60 特異的 Th 1 リンパ球が活性化される可能性が示唆された。

これら HSP60 特異的細胞性免疫反応により分化し産生された HSP60 特異的 Th 1 リンパ球は、血管内皮細胞との相互反応により内皮細胞に接着し、血管中膜へ進入した後、マクロファージの活性化を促し動脈硬化の病態の本体である泡沫細胞を蓄積させるとされているが<sup>2, 3)</sup>、これら全ての段階での詳細な機序は未だ明らかではない。今回の検討では、動脈硬化巣の内皮細胞中に高度に HSP60 の発現を認めた (図 3)。さらに、最近 Pfister らにより内皮細胞内に過剰発現した HSP60 が細胞表面にも発現していることが示された<sup>40)</sup>。従って、内皮細胞表面に発現したマウス HSP60 を分子相同性により誤認識した Hp-HSP60 特異的 Th 1 リンパ球が、内皮細胞と何らかの相互作用を及ぼし動脈硬化を促進したと考えられるが、引き続き詳細な検討が必要と思われる。

## 結 論

*apoe*<sup>+/-</sup> *ldlr*<sup>+/-</sup> ヘテロダブルノックアウトマウスを用い、*H. pylori* 感染が動脈硬化に関与する動物実験モデルを確立した。本動物実験モデルにおいて *H. pylori* 感染に伴う HSP60 特異的細胞性免疫反応が、動脈硬化を促進する可能性を示した。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御高閣を賜った岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病原細菌学教室の小熊恵二教授に深謝致します。

## 文 献

- 1) Ross R: Atherosclerosis — an inflammatory disease. *N Engl J Med* (1999) **340**(2), 115-126.
- 2) Libby P: Inflammation in atherosclerosis. *Nature* (2002) **420**(6917), 868-874.
- 3) Wick G, Knoflach M, Xu Q: Autoimmune and inflammatory mechanisms in atherosclerosis. *Annu Rev Immunol* (2004) **22**,

- 361-403.
- 4) Saikku P, Leinonen M, Mattila K, Ekman MR, Nieminen MS, Makela PH, Huttunen JK, Valtonen V : Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Lancet* (1988) **2** (8618), 983-986.
  - 5) Taniguchi A, Nishimura F, Murayama Y, Nagasaka S, Fukushima M, Sakai M, Yoshii S, Kuroe A, Suzuki H, Iwamoto Y, Soga Y, Okumura T, Ogura M, Yamada Y, Seino Y, Nakai Y : Porphyromonas gingivalis infection is associated with carotid atherosclerosis in non-obese Japanese type 2 diabetic patients. *Metabolism* (2003) **52**(2), 142-145.
  - 6) Blum A, Peleg A, Weinberg M : Anti-cytomegalovirus (CMV) IgG antibody titer in patients with risk factors to atherosclerosis. *Clin Exp Med* (2003) **3** (3), 157-160.
  - 7) Anzini A, Cassone A, Rasura M, Ciervo A, Beccia M, Di Lisi F, Fieschi C : Chlamydia pneumoniae infection in young stroke patients : a case - control study. *Eur J Neurol* (2004) **11**(5), 321-327.
  - 8) Bason C, Corrocher R, Lunardi C, Puccetti P, Olivieri O, Girelli D, Navone R, Beri R, Millo E, Margonato A, Martinelli N, Puccetti A : Interaction of antibodies against cytomegalovirus with heat-shock protein 60 in pathogenesis of atherosclerosis. *Lancet* (2003) **362**(9400), 1971-1977.
  - 9) Chung SW, Kang HS, Park HR, Kim SJ, Kim SJ, Choi JI : Immune responses to heat shock protein in Porphyromonas gingivalis-infected periodontitis and atherosclerosis patients. *J Periodontal Res* (2003) **38**(4), 388-393.
  - 10) Jindal S, Dudani AK, Singh B, Harley CB, Gupta RS : Primary structure of a human mitochondrial protein homologous to the bacterial and plant chaperonins and to the 65-kilodalton mycobacterial antigen. *Mol Cell Biol* (1989) **9** (5), 2279-2283.
  - 11) Feige U, van Eden W : Infection, autoimmunity and autoimmune disease. *Exs* (1996) **77**, 359-373.
  - 12) van Eden W, Koets A, van Kooten P, Prakken B, van der Zee R : Immunopotentiating heat shock proteins : negotiators between innate danger and control of autoimmunity. *Vaccine* (2003) **21** (9-10), 897-901.
  - 13) Ford P, Gemmell E, Walker P, West M, Cullinan M, Seymour G : Characterization of heat shock protein-specific T cells in atherosclerosis. *Clin Diagn Lab Immunol* (2005) **12**(2), 259-267.
  - 14) Xu Q, Schett G, Seitz CS, Hu Y, Gupta RS, Wick G : Surface staining and cytotoxic activity of heat-shock protein 60 antibody in stressed aortic endothelial cells. *Circ Res* (1994) **75**(6), 1078-1085.
  - 15) Schett G, Xu Q, Amberger A, Van der Zee R, Recheis H, Willeit J, Wick G : Autoantibodies against heat shock protein 60 mediate endothelial cytotoxicity. *J Clin Invest* (1995) **96**(6), 2569-2577.
  - 16) Marshall BJ, Warren JR : Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* (1984) **1** (8390), 1311-1315.
  - 17) Gasbarrini A, Franceschi F, Does H : Pylori infection play a role in idiopathic thrombocytopenic purpura and in other autoimmune diseases? *Am J Gastroenterol* (2005) **100**(6), 1271-1273.
  - 18) Farkas H, Fust G, Fekete B, Karadi I, Varga L : Eradication of Helicobacter pylori and improvement of hereditary angioneurotic oedema. *Lancet* (2001) **358**(9294), 1695-1696.
  - 19) Inaba T, Mizuno M, Take S, Suwaki K, Honda T, Kawai K, Fujita M, Tamura T, Yokota K, Oguma K, Okada H, Shiratori Y : Eradication of Helicobacter pylori increases platelet count in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura in Japan. *Eur J Clin Invest* (2005) **35**(3), 214-219.
  - 20) Zhu J, Katz RJ, Quyyumi AA, Canos DA, Rott D, Csako G, Zalles-Ganley A, Ogunmakinwa J, Wasserman AG, Epstein SE : Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with coronary calcification levels : suggestion of pathogen-triggered autoimmunity in early atherosclerosis. *Circulation* (2004) **109**(1), 36-41.
  - 21) Sawayama Y, Ariyama I, Hamada M, Otaguro S, Machi T, Taira Y, Hayashi J : Association between chronic Helicobacter pylori infection and acute ischemic stroke : Fukuoka Harasanshin Atherosclerosis Trial (FHAT). *Atherosclerosis* (2005) **178**(2), 303-309.
  - 22) Shmueli H, Passaro DJ, Vaturi M, Sagie A, Pitlik S, Samra Z, Niv Y, Koren R, Harell D, Yahav J : Association of CagA+ Helicobacter pylori infection with aortic atheroma. *Atherosclerosis* (2005) **179**(1), 127-132.
  - 23) Heuschmann PU, Neureiter D, Gesslein M, Craiovan B, Maass M, Faller G, Beck G, Neundoerfer B, Kolominsky-Rabas PL : Association between infection with Helicobacter pylori and Chlamydia pneumoniae and risk of ischemic stroke subtypes : Results from a population-based case-control study. *Stroke* (2001) **32**(10), 2253-2258.
  - 24) Rowland M, Daly L, Vaughan M, Higgins A, Bourke B, Drumm B : Age-specific incidence of Helicobacter pylori. *Gastroenterology* (2006) **130**(1), 65-72.
  - 25) Bamford KB, Fan X, Crowe SE, Leary JF, Gourley WK, Luthra GK, Brooks EG, Graham DY, Reyes VE, Ernst PB : Lymphocytes in the human gastric mucosa during Helicobacter pylori have a T helper cell 1 phenotype. *Gastroenterology* (1998) **114**(3), 482-492.
  - 26) Sugiyama T, Imai K, Yoshida H, Takayama Y, Yabana T, Yokota K, Oguma K, Yachi A : A novel enzyme immunoassay for serodiagnosis of Helicobacter pylori infection. *Gastroenterology* (1991) **101**(1), 77-83.
  - 27) Yokota K, Hirai Y, Haque M, Hayashi S, Isogai H, Sugiyama T, Nagamachi E, Tsukada Y, Fujii N, Oguma K : Heat shock protein produced by Helicobacter pylori. *Microbiol Immunol* (1994) **38**(5), 403-405.
  - 28) Kobayashi K, Yokota K, Yoshino T, Kawahara Y, Dey A, Hirai Y, Oguma K, Akagi T : Detection of Helicobacter pylori associated antigen and heat shock protein 60 on follicular

- dendritic cells in the germinal centres of low grade B cell lymphoma of gastric mucosa associated lymphoid tissue (MALT). *J Clin Pathol* (1998) **51**(5), 396-398.
- 29) Kawahara Y, Yokota K, Mizuno M, Yunoki N, Uesu T, Okada H, Kobayashi K, Hirai Y, Oguma K, Tsuji T : Antibodies to human gastric epithelial cells and heat shock protein 60 in *Helicobacter pylori* positive mucosa associated lymphoid tissue lymphoma. *Gut* (1999) **45**(1), 20-23.
  - 30) Ishii E, Yokota K, Sugiyama T, Fujinaga Y, Ayada K, Hokari I, Hayashi S, Hirai Y, Asaka M, Oguma K : Immunoglobulin G1 antibody response to *Helicobacter pylori* heat shock protein 60 is closely associated with low-grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Clin Diagn Lab Immunol* (2001) **8**(6), 1056-1059.
  - 31) Dey A, Yokota K, Kobayashi K, Oguma K, Hirai Y, Akagi T : Antibody and cytokine responses in *Helicobacter pylori*-infected various mouse strains. *Acta Med Okayama* (1998) **52**(1), 41-48.
  - 32) Yamasaki R, Yokota K, Okada H, Hayashi S, Mizuno M, Yoshino T, Hirai Y, Saitou D, Akagi T, Oguma K : Immune response in *Helicobacter pylori*-induced low-grade gastric-mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma. *J Med Microbiol* (2004) **53**(1), 21-29.
  - 33) Mach F, Sukhova GK, Michetti M, Libby P, Michetti P : Influence of *Helicobacter pylori* infection during atherogenesis in vivo in mice. *Circ Res* (2002) **90**(1), E 1 - 4 .
  - 34) Li L, Messas E, Batista EL Jr, Levine RA, Amar S : Porphyromonas gingivalis infection accelerates the progression of atherosclerosis in a heterozygous apolipoprotein E-deficient murine model. *Circulation* (2002) **105**(7), 861-867.
  - 35) Knoflach M, Kiechl S, Kind M, Said M, Sief R, Gisinger M, van der Zee R, Gaston H, Jarosch E, Willeit J, Wick G : Cardiovascular risk factors and atherosclerosis in young males : ARMY study (Atherosclerosis Risk-Factors in Male Youngsters). *Circulation* (2003) **108**(9), 1064-1069.
  - 36) Lee A, O'Rourke J, De Ungria MC, Robertson B, Daskalopoulos G, Dixon MF : A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection : introducing the Sydney strain. *Gastroenterology* (1997) **112**(4), 1386-1397.
  - 37) George J, Afek A, Gilburd B, Shoenfeld Y, Harats D : Cellular and humoral immune responses to heat shock protein 65 are both involved in promoting fatty-streak formation in LDL-receptor deficient mice. *J Am Coll Cardiol* (2001) **38**(3), 900-905.
  - 38) Foteinos G, Afzal AR, Mandal K, Jahangiri M, Xu Q : Anti-heat shock protein 60 autoantibodies induce atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice via endothelial damage. *Circulation* (2005) **112**(8), 1206-1213.
  - 39) Buono C, Binder CJ, Stavrakis G, Witztum JL, Glimcher LH, Lichtman AH : T-bet deficiency reduces atherosclerosis and alters plaque antigen-specific immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA* (2005) **102**(5), 1596-1601.
  - 40) Pfister G, Stroh CM, Perschinka H, Kind M, Knoflach M, Hinterdorfer P, Wick G : Detection of HSP60 on the membrane surface of stressed human endothelial cells by atomic force and confocal microscopy. *J Cell Sci* (2005) **118**(8), 1587-1594.