



Title	Influences of Helicobacter pylori-urease on Angiogenesis In Vitro : Implications for the Bacterium in the Delay of Ulcer Healing
Author(s)	Edhi, Sudjono Gunawan
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41771">https://hdl.handle.net/11094/41771</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	エディ スジヨ ノ グ ナ フ ィ ャ Edhi Sudjono Gunawan
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 5 2 6 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平成12年 3 月 24 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科内科系専攻
学 位 論 文 名	Influences of <i>Helicobacter pylori</i> -urease on Angiogenesis <i>In Vitro</i> : Implications for the Bacterium in the Delay of Ulcer Healing ( <i>Helicobacter pylori</i> ウレアーゼが血管新生に与える影響の検討)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 堀 正二  (副査) 教 授 林 紀夫 教 授 倉智 嘉久

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 【目的】

*Helicobacter pylori* (*H.pylori*) の発見以来、本菌の感染と消化性潰瘍の治癒に与える影響が注目されている。*H.pylori* 感染を伴う消化性潰瘍患者ではしばしば病変が難治性である。*H.pylori* 感染を治療すると高率に難治性潰瘍が治癒する事から本菌は潰瘍の治癒には遷延性に作用すると考えられるが、*H.pylori* 感染者の潰瘍難治化の機序には不明な点が多い。*H.pylori* 感染に伴い胃粘膜上皮には萎縮、細胞呼吸の抑制、胃粘膜シクロオキシゲナーゼの誘導 (Prostaglandin Leukotriene Synthase 1999) など種々の影響が生じる。しかし潰瘍底部は上皮細胞に被覆されておらず、上皮細胞以外の細胞に対する *H.pylori* 感染の影響が注目される。一方、血管新生は各種組織の微小循環に重大な影響を有している。臓器反射スペクトル法その他の知見から潰瘍の治癒にも血管新生に伴う微小循環の変化が重要であると考えられる。そこで *H.pylori* が有する urease 活性に注目し、*H.pylori* urease が血管新生に与える影響を検討した。

### 【方法】

#### *H.pylori* の培養と菌体破砕物の調製

*H.pylori* 感染には American Type Culture Collection から ATCC-49503 と ATCC-51110 を入手した。前者は urease 陽性の標準株であり、後者は前者から樹立された urease 欠損株である。いずれの菌も Brucella broth 中で好気条件下で培養したものを超音波破砕装置で破砕し、実験に供した。

#### *in vitro* 血管新生能に対する *H.pylori* 菌体破砕物の影響の評価

内皮細胞には Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) を EGF、牛脳抽出液、牛胎児血清より成る増殖カクテルを添加した内皮細胞用培地で培養し、継代培養が 5 代目以内のものをを用いた。96穴のプレートに HUVECs を播種し、1%牛胎児血清のみで24時間培養し、次いで増殖カクテルと上述の *H.pylori* 破砕物ならびに尿素 (0、 $10^{-4}$ ～ $10^{-2}$ ) を添加した内皮細胞用培地内で24時間培養した。 $^3\text{H}$ -thymidine を添加し、4 時間後に 3 回 phosphate buffered saline により洗浄し、内皮細胞の  $^3\text{H}$ -thymidine 取り込みをシンチレーションカウンターにより測定した。また *H.pylori* 菌体破砕物の urease 活性の有無を尿素の存在下で産生されるアンモニア濃度で確認した。

#### *in vitro* 血管新生能に対するアンモニアの影響の評価

HUVECs を実験 2 と同様に調製し、増殖カクテルとアンモニア (0、 $10^{-5}$ ～ $10^{-1}$  M) を添加した培地内で24時間

培養した。その後、内皮細胞の  $^3\text{H}$ -thymidine 取り込みをシンチレーションカウンターにより測定した。

#### 【成績】

##### in vitro 血管新生能に対する *H.pylori* 菌体破砕物の影響の評価

HUVECs を 10mM の尿素と共に培養しても HUVECs の  $^3\text{H}$ -thymidine 取り込みには有意の影響はみられなかった。一方、ATCC-49503 の破砕物と尿素と共に培養したところ、破砕物の添加量と尿素の濃度に依存して、HUVECs の  $^3\text{H}$ -thymidine 取り込みは低下した。20 倍に希釈した *H.pylori* 菌体破砕物のうち ATCC-49503 由来の破砕物は 10mM の尿素と 24 時間インキュベートすると 7.78mM のアンモニアを産生し、本破砕物に強い urease 活性があることが確認された。urease 陰性の ATCC-51110 の破砕物と尿素を HUVECs と培養してもその  $^3\text{H}$ -thymidine 取り込みには有意の影響がみられなかった。

##### in vitro 血管新生能に対するアンモニアの影響の評価

HUVECs をアンモニア ( $0$ 、 $10^{-5}$ ~ $10^{-1}\text{M}$ ) を添加した培地内で培養したところ、 $10^{-5}\text{M}$  以上のアンモニアは本細胞の  $^3\text{H}$ -thymidine 取り込みを濃度依存性に抑制した。なお  $10^{-1}\text{M}$  未満の濃度のアンモニアは HUVECs の細胞生存率に有意の影響を与えなかったが、 $10^{-1}\text{M}$  のアンモニアは HUVECs の細胞生存率を 16.3% に低下させた。

#### 【総括】

*H.pylori* 感染者の胃内には約 5-10mM のアンモニアが存在するとされている。本実験から *H.pylori* またはその urease に原因するアンモニアが *in vitro* 血管新生を抑制することが示された。実際、マウス酢酸潰瘍を用いた検討から *H.pylori* 感染またはアンモニア負荷により潰瘍底の血管新生が抑制されること、潰瘍治癒が遅延することを見出している。またアンモニア負荷により血管内皮細胞の phosphodiesterase の活性低下、adenylate cyclase の活性上昇、細胞内 cAMP の増加が起こることも見出している（未発表データ）。*H.pylori* の持つ urease は本菌が感染を起こす上で必須の因子であることが報告されているが、本結果から *H.pylori* 感染者の潰瘍治癒遅延に *H.pylori* urease が重要であることが示された。

### 論文審査の結果の要旨

本研究はヘリコバクターが有するウレアーゼに着目し、組織血管新生ならびに潰瘍治癒に対する本因子の重要性を検討したものである。遺伝子操作によりウレアーゼを欠損した株では親株で見られる血管新生抑制作用が見られない点、血管新生抑制作用が基質である尿素に依存する点等から、ウレアーゼにより尿素から産生されるアンモニアが血管新生の強力な阻害物質であることを明らかにし、さらに血管新生抑制機序をマウス酢酸潰瘍モデルを用いた追加実験でヘリコバクター感染やアンモニアの負荷により潰瘍底部の血管新生が実際に抑制されることを確認した。さらに血管内皮細胞内の情報伝達機構にも着目し、血管新生抑制が PKA の活性化を介することを示した。わが国のみならず世界的にもヘリコバクターの感染率は高く、胃癌、胃・十二指腸潰瘍ならびに胃炎の成因として本菌は重要であるとされるが、本研究の成果はヘリコバクター感染に伴う潰瘍症の成因にせまるものであり、博士号授与に値すると考えられる。