

## *Helicobacter pylori* 感染胃粘膜における胃ムチン生合成の変化 ——UDP-ガラクトース転移酵素活性測定による検討——

田 中 彰 一

キーワード: *Helicobacter pylori*, 胃粘膜, ムチン生合成, ガラクトース転移酵素

### 緒 言

*Helicobacter pylori* (以下 *H. pylori*) の胃への感染は消化性潰瘍を引き起こすことが明らかとなり<sup>1)</sup>, *H. pylori* の除菌療法が潰瘍再発の防止に有効であることが示されてきた<sup>2-5)</sup>. ところで, *H. pylori* の感染によって引き起こされる胃粘膜障害の機序の中で, 胃ムチンの変化は重要であると考えられている<sup>6-9)</sup>. 胃上皮細胞で合成され, 分泌される胃ムチンはその粘稠性とゲル形成能により, 塩酸やペプシンといった刺激から胃粘膜を保護するという重要な役割を演じている<sup>10,11)</sup>. 最近, 胃上皮細胞の培養系において, *H. pylori* の感染が, 胃ムチンの中の MUC 5 AC と MUC 1 の合成を阻害することが報告された<sup>12)</sup>.

ムチンはペプチドに糖鎖が O-グリコシド結合することにより合成される. UDP-ガラクトース転移酵素(以下 UDP-Gal-T) はそのペプチドに結合する糖鎖が延長・完成する過程において働く重要な酵素の1つである<sup>13)</sup>. 既に我々は, 内視鏡的生検によって得られたヒト胃粘膜の UDP-Gal-T 活性を測定するために, PNA レクチンを用いた測定系を開発し, 報告した<sup>14)</sup>. 今回我々は, *H. pylori* により胃ムチンの生合成が障害される機序を明らかにするため, この測定系を用いて, *H. pylori* 感染胃粘膜の UDP-Gal-T 活性を測定し, 検討した.

### 対 象 と 方 法

#### 1. 対 象

何らかの腹部症状あるいは胃疾患のスクリーニング目的で上部消化管内視鏡検査をうけた37例(女性17例, 男性20例, 年齢は26~82歳, 平均年齢54歳)を対象とした. 疾患の内訳は胃炎28例, 胃潰瘍2例, 十二指腸潰瘍2例, 十二指腸炎3例, 正常2例であった. プロトンポンプ阻害剤, H<sub>2</sub>ブロッカー, 他の抗潰瘍剤, ステロイド剤, NSAID を内服している症例は除外した. 内視鏡時, 胃前庭部と胃体上部の大弯から3個ずつ生検を行った. 3個のうち1個は *H. pylori* 培養用に用い, 残る2個は UDP-Gal-T 活性測定用に凍結保存された. *H. pylori* の培養は, 7%馬血液, ポリミキシン B 2.5 IU/ml, バンコマイシン 10 µg/ml, トリメトプリム 5 µg/ml を加えたブルセラ寒天培地に, 生検組織を直接塗抹し, 微好気条件(O<sub>2</sub> 5%, CO<sub>2</sub> 15%, N<sub>2</sub> 80%) 下で5-7日培養した. また23例においては細胞内ムチン量の解析のために, さらに胃前庭部より1個生検を行った. 研究はヘルシンキ宣言のガイドラインに沿って行われた. またそれぞれの患者から研究参加の同意を得た.

#### 2. PNA レクチンを用いた UDP-Gal-T 測定系

UDP-Gal-T 活性の測定は既報の如くである<sup>14)</sup>. 簡単に説明すると, 生検標本を0.3Mのショ糖300 µl でホモジナイズし, 10分間500 g で遠心分離した. その上清を UDP-Gal-T 活性測定用検体として用いた. ウシ顎下腺ムチンからシアル酸とガラクトースをはずしたムチン(アシアロアガラクトムチン)をアクセプターとして使用した. ELISA 用プレートのウェルをアシアロアガラクトムチンでコートし, 5 mmol/L の 2-mercaptoethanol, 5 mmol/L の MnCl<sub>2</sub>, 4.8 mg/ml の Triton-X を含む50 mM/L の Tris-HCl (pH 7.5) に UDP-galactose と上清を

(平成14年1月11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: 国立岩国病院内科 山口県岩国市黒磯町2-5-1

田中彰一

電話: 0827-31-7121 FAX: 0827-31-7059

E-mail: tanaka@iwakuni-nh.go.jp

混合し、その混合液をウェルに入れた。インキュベーション後、horseradish peroxidase (HRP) で標識された PNA レクチンを各ウェルに入れた。HRP-PNA レクチンは上清に含まれている UDP-Gal-T により UDP-galactose からアシアロアガラクトムチン (アクセプター) へ galactose が転移することにより形成される galactose- $\beta$ -(1-3)-N-acetylgalactosamine を認識し、結合する。結合した HRP に、基質として 2,2'-azino-bis (3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid) を加えて発色し、波長 415nm の吸光度 (OD) を測定した。検体に含まれる蛋白量は Bio-Rad protein kit (Bio-Rad Labs., Inc, Hercules, CA, USA) 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、基準として用いた体重約 200 g の SD 系雄性ラットの胃体部粘膜より既報<sup>15)</sup>のごとく調整した標準酵素検体との比として表わした。

### 3. 胃上皮細胞内ムチンの定量化

胃上皮細胞内ムチン量の解析のため、細胞内 periodic acid-Schiff-alcian blue (PAS-AB) 陽性物質量を既報の画像解析の手法で測定した<sup>7,14)</sup>。すなわち、胃前庭部からの内視鏡的生検標本を 10% ホルマリン液で固定し、パラフィン包埋し、その切片を PAS-AB 染色した。胃上皮細胞内ムチンの定量化は画像解析装置 (Nexus-600) を用いて解析領域を設定し、その中の表層粘液細胞の面積に対する PAS-AB 陽性物質の面積の比 (PAS-AB index) を計算することにより行った。解析領域は 3~4 ヶ所を任意に設定し、その平均値を結果として用いた。

### 4. 統計学的処理

*H. pylori* 陽性と陰性症例における UDP-Gal-T の比較は t 検定で行った。また、UDP-Gal-T 活性と上皮細胞内ムチンの量との相関はピアソンの積率相関係数にて評価した。

## 結 果

### 1. 胃粘膜 UDP-Gal-T 活性

37 症例のうち、20 例が *H. pylori* 陽性、17 例が *H. pylori* 陰性であった。*H. pylori* 陽性例において、UDP-Gal-T 活性は胃前庭部では  $0.362 \pm 0.103$ 、胃体上部では  $0.360 \pm 0.137$  であった。*H. pylori* 陰性例においては UDP-Gal-T 活性は胃前庭部では  $0.454 \pm 0.154$ 、胃体上部では  $0.435 \pm 0.124$  であった。胃前庭部における UDP-Gal-T 活性は、*H. pylori* 陽性例で *H. pylori* 陰性例に比し有意に低下していた ( $P < 0.05$ ) (図 1)。一方、胃体部では、

UDP-Gal-T 活性の低下が *H. pylori* 陽性粘膜においてみられるものの、統計学的な有意差は認められなかった。

### 2. 胃上皮細胞内ムチン

23 例 (*H. pylori* 陽性; 11 例, *H. pylori* 陰性; 12 例) の胃前庭部からの生検組織を PAS-AB 染色し、胃上皮細胞内ムチンを評価した。*H. pylori* 陽性症例の PAS-AB index は  $22.4 \pm 9.4\%$  と *H. pylori* 陰性症例の PAS-AB index =  $36.9 \pm 10.3\%$  に比し有意に低値を示した ( $P < 0.01$ )。また胃上皮細胞内ムチン量は胃粘膜 UDP-Gal-T 活性と相関係数 0.592 をもって有意な正の相関を示した ( $P < 0.01$ ) (図 2)。

## 考 察

本研究では、生体内における胃ムチン生合成に及ぼす *H. pylori* 感染の影響を解析した。そして、細胞内ムチン量とムチン生合成における重要な酵素である UDP-Gal-T 活性が胃前庭部の *H. pylori* 感染胃粘膜において減少していることが明らかとなった。今までに *H. pylori* 感染により胃粘膜の表層粘液細胞内のムチン量が減少するという幾つかの報告がある<sup>7,12,16)</sup>。我々の結果と同様に、Kawano ら<sup>7)</sup>は、*H. pylori* が感染した胃前庭部粘膜では、PAS-AB 染色での細胞内ムチン量は減少することを報告している。Byrd ら<sup>12)</sup>は、免疫組織学的検討と *in situ* hybridization において、*H. pylori* 陽性患者の胃前庭部

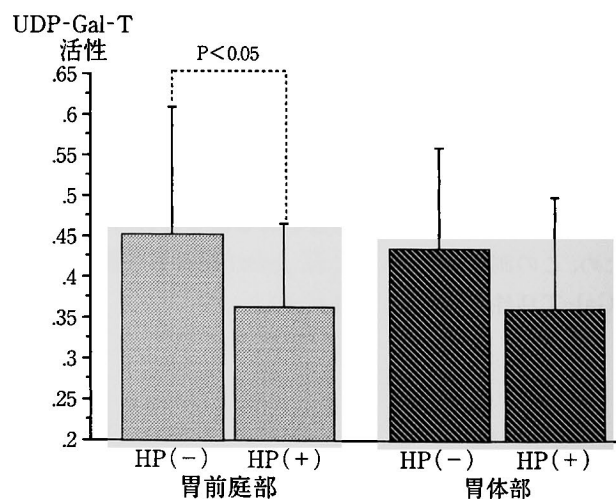


図 1 *H. pylori* 感染胃粘膜と非感染胃粘膜における UDP-Gal-T 活性  
胃粘膜内視鏡下生検組織の UDP-Gal-T 活性を、PNA レクチン法により測定した。胃前庭部においては、UDP-Gal-T 活性は、*H. pylori* 陰性粘膜に比し *H. pylori* 陽性粘膜において有意に低下している ( $P < 0.05$ )。一方、胃体部では、UDP-Gal-T 活性に統計学的な有意差は認められない。HP: *H. pylori*。

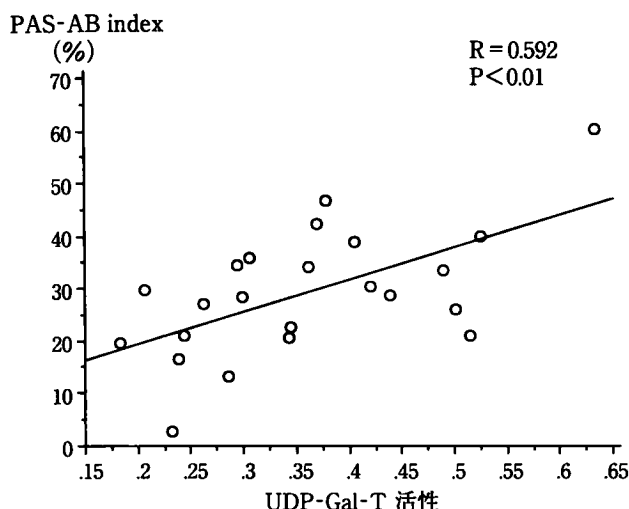


図2 胃前庭部における UDP-Gal-T 活性と上皮細胞内ムチンとの関係  
胃前庭部生検組織の UDP-Gal-T 活性と、PAS-AB 染色による粘膜内胃粘液量の相関を検討した。PAS-AB index として表した上皮細胞内ムチン量は PNA レクチン法により測定した UDP-Gal-T 活性と相関係数 0.592 で正の相関を示している ( $P < 0.01$ )。

の表層粘液細胞において MUC 5 AC の表出が減少することを報告した。最近の *in vitro* の研究では、Byrd ら<sup>17)</sup>は、培養胃上皮細胞を用いて、*H. pylori* が MUC 5 AC ムチン蛋白の合成を減少させることを報告した。このように、*H. pylori* 感染胃粘膜のムチン減少の機序の 1 つは、ムチンの骨格にあたるペプチド鎖の合成低下である。一方、この研究の我々の結果からは、UDP-Gal-T 活性の阻害によるペプチド鎖への糖鎖延長（ガラクトース転移）の低下が細胞内ムチンの減少のもう 1 つの機序であるといえる。

UDP-Gal-T はムチン合成の律速酵素であり、胃上皮細胞のゴルジ装置において、ムチンの糖鎖へガラクトースを転移する<sup>13)</sup>。この研究で用いた我々の新しい UDP-Gal-T 測定系は、ヒト胃粘膜から内視鏡的に得られた生検組織の酵素活性を解析することを可能にした。そして、*H. pylori* 感染胃粘膜では、この酵素の阻害が、ムチン生合成の低下を引き起こす可能性を示した。ムチンの様々な性格や機能はムチンの骨格であるペプチド鎖に結合する豊富な糖鎖に多く起因する。したがって、*H. pylori* 感染の UDP-Gal-T 阻害による糖鎖の変化は幾つかの重大な環境の変化を引き起こすものと考えられる。第一に、糖鎖の存在により生じるムチンの粘稠性かつゲル形成能<sup>18)</sup>は塩酸やペプシンといった刺激物から胃粘膜を防御するのに重要であるため<sup>10,11)</sup>、表層ムチンの減少とこれらムチンの性質の変化は、粘膜防御としてのムチンの機能を障害する。実際、粘液バリアーのゲル構造の部分的な崩壊が、

*H. pylori* 感染胃粘膜において示されている<sup>19)</sup>。このように、胃粘膜防御機構の障害は *H. pylori* 感染によって引き起こされる粘膜障害の重要な機序の 1 つである。

第二に、*H. pylori* のムチンへの糖鎖依存性結合が報告され<sup>20,21)</sup>、ムチンは *H. pylori* の上皮への結合を阻害することが示されている<sup>22,23)</sup>。胃ムチンの変化は、*H. pylori* の上皮への接着と増殖を容易にし、引き続き引き起こされる炎症細胞や免疫細胞の誘導といった宿主反応に影響を与える可能性が考えられる。

UDP-Gal-T 活性低下の機序は不明のままである。空胞化毒素<sup>24)</sup>や膜結合蛋白やリポ多糖類<sup>25)</sup>といった *H. pylori* から直接分泌される物質が阻害しているのかもしれない。*H. pylori* のウレアーゼにより生じるアンモニアにより引き起こされる pH 上昇といった環境の変化が、UDP-Gal-T 活性を低下させる可能性もある。また、アンモニアの直接作用も十分考えられる。アンモニアの直接的な影響は胃前庭部では UDP-Gal-T 活性は有意に減少するが、胃体部では有意に減少しないという結果から示唆される。なぜなら、アンモニアは酸分泌領域である胃体部では中和されるため、胃体部より胃前庭部の方が、その毒性はより強く発揮されるからである<sup>26)</sup>。しかしながら、培養細胞を用いて行った *in vitro* 実験では、今のところ *H. pylori* 関連物質に UDP-Gal-T 活性を直接低下させる成分は見いだせず(論文投稿中)、*H. pylori* 感染患者の生体内における UDP-Gal-T 活性の低下は、菌の感染による炎症反応などの二次的な生体反応の結果引き起こされている可能性も考えられる。いずれにせよ、今後 UDP-Gal-T 活性の阻害の機序を明らかにしていく必要があるものと思われる。

## 結 論

*H. pylori* 感染は、UDP-Gal-T 活性の低下により胃ムチン生合成を阻害し、胃粘膜防御機構を障害する。このことが、*H. pylori* 感染により引き起こされる胃粘膜障害の重要な機序の一つと考えられる。

## 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) Blaser MJ: The bacteria behind ulcers. Sci Am (1996)

- 274, 104—107.
- 2) Rauws EA and Tytgat GN : Cure of duodenal ulcer associated with eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* (1990) **335**, 1233—1235.
- 3) Graham DY, Lew GM, Klein PD, Evans DG, Evans DJ, Jr., Saeed ZA and Malaty HM : Effect of treatment of *Helicobacter pylori* infection on the long-term recurrence of gastric or duodenal ulcer. A randomized, controlled study. *Ann Intern Med* (1992) **116**, 705—708.
- 4) Labenz J and Borsch G : Highly significant change of the clinical course of relapsing and complicated peptic ulcer disease after cure of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol* (1994) **89**, 1785—1788.
- 5) Van der Hulst RW, Rauws EA, Koycu B, Keller JJ, Bruno MJ, Tijssen JG and Tytgat GN : Prevention of ulcer recurrence after eradication of *Helicobacter pylori*: a prospective long-term follow-up study. *Gastroenterology* (1997) **113**, 1082—1086.
- 6) Slomiany BL, Bilski J, Sarosiek J, Murty VL, Dworkin B, VanHorn K, Zielinski J and Slomiany A : *Campylobacter pyloridis* degrades mucin and undermines gastric mucosal integrity. *Biochem Biophys Res Commun* (1987) **144**, 307—314.
- 7) Kawano S, Tsujii M, Nagano K, Ogihara T, Tanimura H, Hayashi N, Ito T, Sato N, Kamada T, Tamura K and et al. : Different effect of *Helicobacter pylori* on the human gastric antral and body mucosal intracellular mucin. *Scand J Gastroenterol* (1990) **25**, 997—1003.
- 8) Sarosiek J, Marshall BJ, Peura DA, Hoffman S, Feng T and McCallum RW : Gastroduodenal mucus gel thickness in patients with *Helicobacter pylori*: a method for assessment of biopsy specimens. *Am J Gastroenterol* (1991) **86**, 729—734.
- 9) Sidebotham RL, Batten JJ, Karim QN, Spencer J and Baron JH : Breakdown of gastric mucus in presence of *Helicobacter pylori*. *J Clin Pathol* (1991) **44**, 52—57.
- 10) Allen A and Garner A : Mucus and bicarbonate secretion in the stomach and their possible role in mucosal protection. *Gut* (1980) **21**, 249—262.
- 11) Pearson J, Allen A and Venables C : Gastric mucus: isolation and polymeric structure of the undegraded glycoprotein: its breakdown by pepsin. *Gastroenterology* (1980) **78**, 709—715.
- 12) Byrd JC, Yan P, Sternberg L, Yunker CK, Scheiman JM and Bresalier RS : Aberrant expression of gland-type gastric mucin in the surface epithelium of *Helicobacter pylori*-infected patients. *Gastroenterology* (1997) **113**, 455—464.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) Marshall BJ, McGeachie DB, Rogers PA and Glancy RJ : Pyloric *Campylobacter* infection and gastroduodenal disease. *Med J Aust* (1985) **142**, 439—444.
- 17) Byrd JC, Yunker CK, Xu QS, Sternberg LR and Bresalier RS : Inhibition of gastric mucin synthesis by *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* (2000) **118**, 1072—1079.
- 18) Strous GJ and Dekker J : Mucin-type glycoproteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* (1992) **27**, 57—92.
- 19) Newton JL, Jordan N, Oliver L, Strugala V, Pearson J, James OF and Allen A : *Helicobacter pylori* in vivo causes structural changes in the adherent gastric mucus layer but barrier thickness is not compromised. *Gut* (1998) **43**, 470—475.
- 20) Tzouvelekis LS, Mentis AF, Makris AM, Spiliadis C, Blackwell C and Weir DM : In vitro binding of *Helicobacter pylori* to human gastric mucin. *Infect Immun* (1991) **59**, 4252—4254.
- 21) Piotrowski J, Slomiany A, Murty VL, Fekete Z and Slomiany BL : Inhibition of *Helicobacter pylori* colonization by sulfated gastric mucin. *Biochem Int* (1991) **24**, 749—756.
- 22) Kamisago S, Iwamori M, Tai T, Mitamura K, Yazaki Y and Sugano K : Role of sulfatides in adhesion of *Helicobacter pylori* to gastric cancer cells. *Infect Immun* (1996) **64**, 624—628.
- 23) Simon PM, Goode PL, Mobasseri A and Zopf D : Inhibition of *Helicobacter pylori* binding to gastrointestinal epithelial cells by sialic acid-containing oligosaccharides. *Infect Immun* (1997) **65**, 750—757.
- 24) Cover TL and Blaser MJ : Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* (1992) **267**, 10570—10575.
- 25) Slomiany BL, Liao YH, Lopez RA, Piotrowski J, Czajkowski A and Slomiany A : Effect of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide on the synthesis of sulfated gastric mucin. *Biochem Int* (1992) **27**, 687—697.
- 26) Kawano S, Tsujii M, Fusamoto H, Sato N and Kamada T : Chronic effect of intragastric ammonia on gastric mucosal structures in rats. *Dig Dis Sci* (1991) **36**, 33—38.

***Helicobacter pylori* decreases mucin synthesis in human gastric mucosa via inhibition of UDP-galactosyltransferase**

Shoichi TANAKA

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

**Background/aims:** Alterations of gastric mucin have been postulated as important pathogenic properties of *Helicobacter pylori*. In this study, we investigated gastric mucin synthesis in *H. pylori*-infected gastric mucosa by measuring UDP-galactosyltransferase (UDP-Gal-T) activity, a key enzyme for the synthesis of mucin, and the amount of intracellular mucin in the gastric mucosa.

**Methods:** Gastric biopsy specimens were obtained from thirty-seven patients (20 *H. pylori*-positive and 17 *H. pylori*-negative). UDP-Gal-T activity of the biopsy specimens was measured by an assay system we had developed, using a peanut agglutinin lectin. The amount of intracellular mucin in the gastric epithelial cells was analyzed by measuring the cells' periodic acid-Schiff-alcian blue staining-positive substances.

**Results:** UDP-Gal-T activities in the antral mucosa of *H. pylori*-positive patients were significantly lower than that of *H. pylori*-negative patients ( $p < 0.05$ ). The amount of intracellular mucin in the antral epithelial cells of *H. pylori*-positive patients was significantly lower than that of *H. pylori*-negative patients ( $p < 0.01$ ).

**Conclusions:** *H. pylori* infection decreases gastric mucin synthesis by the inhibition of UDP-Gal-T activity. This effect may impair the gastric mucosal barrier and contribute to the mucosal injury induced by *H. pylori* infection.