

[別紙2]

審査の結果の要旨

氏名 光野 雄三

近年 *Helicobacter pylori* (以下 *H. pylori*) 感染と胃癌および MALT リンパ腫の発生との関連が注目されている。本研究は *H. pylori* 感染と、これらの疾患の発生に深く関わりと考えられる分子生物学的メカニズムを明らかにする目的で、細胞増殖のシグナル伝達系として知られている MAPK(mitogen-activated protein kinase) シグナル伝達経路と *H. pylori* との関連を、*H. pylori* の病原因子の解析を含めて検討を行い、下記の結果を得ている。

- 1 *H. pylori*の病原因子として知られている *cag* pathogenicity island (PAI) のノックアウト株(TN2 Δ PAI)を作製した。
- 2 MAPKシグナル伝達経路によって活性化される *c-fos* のプロモーター領域-456から+47の下流にルシフェラーゼを結合したレポータープラスミド HF456(*c-fos*-Luc)を元に、プロモーターに存在する signal transducer and activator of transcription (STAT) の結合配列である sis-inducible element (SIE)、SRE (serum response element)、ternary complex factor (TCF) の結合配列、serum response factor (SRF) の結合配列、activator protein-1 (AP-1) の結合配列、cAMP response element (CRE)を順に削除したレポータープラスミドと、SREに変異を挿入

した変異プラスミドを作製した。

3 *H. pylori* 共培養による培養細胞での ERK(extracellular signal-regulated kinase)から Elk-1、SREを介し *c-fos* に至る経路の *cag* PAI 依存性の活性化を以下の検討により明らかにした。

(1) イムノブロットにて ERK1/2 のリン酸化を検討したところ、TN2、TN2 Δ *vacA* の共培養ではリン酸化を認めたが、TN2 Δ *cagE*、TN2 Δ PAI ではリン酸化は認められず、*cag* PAI の有無に依存した ERK1/2 のリン酸化が明らかとなった。

(2) Elk-1 の転写活性化をレポーターアッセイにて検討したところ、TN2 の共培養にて Elk-1 の転写活性化が誘導された。

(3) SRE の活性化をレポーターアッセイにて検討したところ、SRE の活性化は TN2、TN2 Δ *vacA* にて認められたが、TN2 Δ *cagE*、*cag* PAI の完全欠損株(T247)では活性化は低下し、更に TN2 の死菌を用いた実験や、フィルターにて TN2 の培養細胞への直接接触を阻害した実験では、活性化は認められなかった。16 株の臨床分離株を *cag* PAI 陽性群と陰性群の 2 群に分類し比較検討した結果でも、同様に *cag* PAI 陰性群では陽性群に比較し、SRE の活性化の有意な低下を認め、SRE の活性化には *cag* PAI を有する生きて菌の培養細胞への直接接触が重要であることが明らかとなった。また SRE の活性化は MEK1/2 インヒビターにて抑制され、*H. pylori* による SRE の活性化が ERK1/2 の活性化を介していることが確認された。

(4) *c-fos* プロモーターの活性化をノックアウト株、16 株の臨床分離株を用い、レポーターアッセイにて検討したところ、SRE と同様に、*cag*

PAI依存性に活性化を認めた。MEK1/2インヒビターにより活性化は抑制され、ERK1/2の活性化を介することが確認された。ノザンプロットを用いた検討では*c-fos*の転写はTN2の共培養30分後より認められた。変異レポーターを用いた*c-fos*のプロモーター領域の解析では、SREが*c-fos*のプロモーターの活性化に最も重要であることが明らかとなった。

- 4 SAPK/ JNKから*c-jun*を介する経路の活性化を以下の検討により明らかにした。

(1) イムノプロットにて培養細胞のSAPK/ JNKのリン酸化を検討したところ、TN2、TN2 Δ *vacA*の共培養ではリン酸化されたが、TN2 Δ *cagE*、TN2 Δ PAI ではリン酸化は認められず、*cag* PAI依存性にリン酸化を認めた。

(2) イムノプロットにてTN2の共培養による培養細胞のc-Junのリン酸化が明らかとなった。

- 5 *H. pylori*共培養による培養細胞でのAP-1の活性化をレポーターアッセイにて検討した。ノックアウト株、16株の臨床分離株にて検討を行ったが、SREと同様に、*cag* PAI依存性に活性化を認めた。MEK1/2インヒビターにより活性化は抑制され、ERK1/2の活性化を介することが明らかとなった

- 6 *H. pylori*共培養による培養細胞のインターロイキン-8 (IL-8) 分泌能に対するERK1/2の活性化の関与をEIA法にて測定した。*H. pylori*によるIL-8の分泌はMEK1/2インヒビターにて抑制され、ERK1/2の活性化を介したIL-8の分泌が明らかとなった。

以上、本論文は *H. pylori* 感染と関連があるとされている胃癌や MALT リン

パ腫などの増殖性疾患の発生に関与する細胞増殖シグナルの活性化機序を *H. pylori* の病原因子を含め詳細に検討した初めての論文であり、学位の授与に値すると考えられる。