

論文の内容の要旨

論文題目： *Helicobacter pylori* が産生誘導するインターロイキン8の
ヒト胃癌細胞株における遺伝子転写調節

氏名： 相原美紀

Helicobacter pylori (*H. pylori*) が Warren と Marshall によって慢性胃炎の患者の胃粘膜組織より 1982 年に分離培養されて以来、この細菌感染と種々の消化性疾患の関連が明らかにされてきた。*H. pylori* の病原性に関しては多くの因子が報告されているが、*H. pylori* 感染の大きな特徴として宿主の免疫反応が病態を修飾していることがあげられる。*H. pylori* 感染胃粘膜は著しい炎症細胞(多形核白血球、好酸球、マクロファージなど)、リンパ球、形質細胞の浸潤があり、それら細胞による種々のサイトカイン産生が病態と深く関わっていることが指摘されている。実際に IL-8 は、*H. pylori* 感染胃粘膜上皮細胞や十二指腸球部粘膜上皮細胞の粘膜表相で多く産生されることが報告されている。さらに、*H. pylori* 感染胃粘膜組織における IL-8 産生量と病態との相関性も報告されている。

そこで、*H. pylori* 感染によって胃粘膜局所で引き起こされる炎症反応に重要な役割を果たしている IL-8 (Interleukin-8)の産生誘導について検討を行った。

種々の胃癌細胞株を用いて、*H. pylori* 生菌と co-culture した時に産生誘導される IL-8 の産生

量を調べたところ、ほとんどの細胞株が *H. pylori* によってその産生が惹起され、またその産生は細胞と *H. pylori* 生菌を接着させた場合のみ誘導される事がわかった。さらに、その産生誘導は mRNA の発現増強をともなうことより、遺伝子転写レベルで起こる事がわかった。

次に *H. pylori* による IL-8 産生誘導の細胞内シグナル伝達に関して遺伝子転写制御を含めて検討を行った。MKN45 細胞を各種 protein kinase 阻害剤で前処理後、*H. pylori* 生菌で 24 時間刺激したときの培養上清中に含まれる IL-8 産生量を調べた。Protein kinase A 阻害剤である H89 および protein kinase C 阻害剤である staurosporine で前処理した場合は *H. pylori* による IL-8 産生誘導に影響を与えなかった。しかし、protein tyrosine kinase (PTK) 阻害剤である herbimycin は 0~1 μ M の濃度で用量依存的にその産生量を抑制した。この作用は同細胞を IL-1 β で刺激したときに誘導される IL-8 産生に対する抑制作用に比して、より感受性が高く特異的であると示唆された。もちろんこれら阻害剤を用いた試験では、阻害剤の特異性ならびに intact な細胞を用いることによる細胞への透過性の問題が考えられる。しかし、一般的な阻害剤の濃度で herbimycin が特異的に *H. pylori* による IL-8 の産生を抑制したことは、この産生誘導に PTK が重要な関与をしていると考えられる。

幅広い種類の細胞が LPS, IL-1 などの炎症性の刺激を受け、IL-8 mRNA を発現する。その発現はシクロヘキシミドで抑制されないことから、新たな蛋白合成を必要としない。IL-8 遺伝子 5' 領域はいくつかの既知の転写因子の結合可能なシス・エレメントが存在している。種々の細胞における IL-8 遺伝子転写活性化機構については既に報告されており、転写活性化に重要な領域は NF- κ B (-80~-70bp), NF-IL-6 (-94~-81bp), AP-1 (-126~-120 bp) 結合部位であることが明らかとなっている。*H. pylori* も例外ではなく、細胞を刺激後 1 時間以内に IL-8 mRNA の発現が誘導される。この *H. pylori* による IL-8 遺伝子転写調節機構を解析するために、上記転写調節領域を含んだルシフェラーゼ発現プラスミドを用いて本実験を進めた。上記プラスミドを MKN45 細胞に導入し、*H. pylori* および IL-1 β で刺激した時の転写に重要なプロモーター領域を、ルシフェラーゼ活性の誘導を指標として検討した。その結果、intact な 5' 領域を含むプラスミドを導入した細

胞では、*H. pylori* 刺激によって顕著なリンフェラーゼ活性の誘導が示されたが、NF- κ B 結合部位に点突然変異を含むプラスミドを導入した細胞では、その活性がほとんど消失した。また AP-1 結合部位に点突然変異を含むプラスミドではその活性の 70~80% が阻害された。この系においては NF-IL-6 結合部位は影響を与えなかった。これらのことより MKN45 細胞における *H. pylori* による IL-8 転写領域の活性化には NF- κ B、AP-1 の結合部位が重要であり、両者が協調して転写を惹起するのではないかと示唆された。

さらに *H. pylori* で刺激した MKN45 細胞の核内蛋白を抽出し、NF- κ B の oligonucleotide をプローブとして EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) を行ったところ、未刺激の細胞から抽出した核蛋白からはバンドは検出されず、*H. pylori* で刺激した細胞の核蛋白からは 2 つの複合体が検出された。これは cold の NF- κ B を過剰に加えるとバンドは消失し、さらに他の転写因子である SPI 等を加えても変化がないことから、この本体は NF- κ B であることが示唆された。

これらを特異抗体 (p65, p50, p52, c-Rel) で処理した結果、これらは p65-p50 からなる複合体を形成していることが判明した。通常 NF- κ B は外部からの刺激が無い状態では抑制性蛋白質 I κ B- α と結合して不活性の状態で細胞質内に存在するが、刺激により蛋白質リン酸化酵素の活性化、さらに I κ B- α 蛋白質分解酵素の活性化による I κ B の分解により、活性化型 NF- κ B が遊離して核内に移行して DNA の特異結合部位に結合し遺伝子発現の誘導を行う。*H. pylori* が感染した胃粘膜細胞核内には活性化型の NF- κ B が存在することより、*H. pylori* による IL-8 遺伝子転写活性にも NF- κ B の活性化が必須であると考えられた。

以上の結果より、*H. pylori* による胃癌細胞株からの IL-8 産生誘導に関して、シグナル伝達機序、遺伝子転写制御の面から検討したところ、IL-8 産生には PTK が重要な役割を果たすこと、また IL-8 転写領域では NF- κ B の活性化が遺伝子の発現調節に必須であることが示唆された。