

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 *Helicobacter pylori* が活性化する上皮細胞増殖シグナルの解析

指導教官 小俣政男 教授
東京大学大学院医学系研究科
平成10年4月入学
医学博士課程
内科学専攻
氏名 平田 喜裕

[研究の背景および目的]

Helicobacter pylori は胃炎の原因菌であり、炎症惹起のメカニズムは明らかになりつつある。一方 *H.pylori* 感染により胃粘膜の細胞増殖がおこるという報告も散見されるが、その機序はまだ不明である。

臨床的な解析から *cagPAI* 遺伝子を有する *H.pylori* は、胃潰瘍や胃癌などの疾患と関連が強く病原性が高い菌株と考えられていたが、近年このタイプの *H.pylori* が、胃粘膜で NF- κ B や AP-1 などの転写因子を活性化することが分かってきた。この宿主側の反応が炎症惹起に関与すると考えられているが、細胞増殖にたいする影響についての検討はほとんどない。

細胞の増殖反応は、細胞周期で厳密に制御されている。その制御分子のひとつであるサイクリン D1 は、Cdk4, Cdk6 を活性化して細胞周期を G1 期から S 期へ移行させ細胞周期を正に制御している。サイクリン D1 の過剰発現により細胞増殖が促進することが知られており、また各種の癌でサイクリン D1 の高発現が認められている。さらにサイクリン D1 の発現調節に、MAPK カスケードや、NF- κ B などの細胞内シグナルが関与していることも明らかになっている。

本研究では、*H.pylori* 感染による細胞増殖の機序の解明のため、まず *H.pylori* 感染がサイクリン D1 発現に与える影響を検討した。

また近年 *cagPAI* が形成する IV 型分泌機構をもちいて CagA 蛋白が上皮細胞内に注入されることが報告されたが、その細胞内での機能は不明である。そこで CagA 蛋白が細

胞内で活性化するシグナルに関しても検討を加えた。

[方法]

1. サイクリン D1 発現にたいする *H. pylori* 感染の影響

AGS 細胞と MKN28 細胞をもちいて、*H. pylori* 感染の影響を検討した。*H. pylori* としては、*cagPAI* および *vacA* 遺伝子を持つ TN2 株と、そのノックアウト株(TN2 Δ *cagE*, TN2 Δ *vacA*, TN2 Δ *cagPAI*)を用いた。*H. pylori* 感染がサイクリン D1 遺伝子発現に与える影響は、ノーザンブロットとレポーターアッセイで検討した。

レポーターアッセイには、サイクリン D1 のプロモーター領域の 1226 塩基を含む pD1 luc と NF- κ B 結合配列に変異をもつ、pD1-kB1M, pD1-kB2M, pD1-kB1/2M を用いた。これらを AGS 細胞にトランスフェクトし、24 時間後に *H. pylori* を一定濃度で感染させルシフェラーゼ活性を比較した。また MAPK カスケードの阻害のため MEK1/2 阻害薬を用い、NF- κ B 経路の抑制には I κ B α の dominant negative 変異体をトランスフェクトした。

2. CagA 蛋白の細胞内機能解析

ATCC26695 株から *cagA* 遺伝子をクローニングし、CagA 蛋白発現ベクター(pTX-CagA)を作成した。このベクターと種々の細胞内シグナルの活性化を検討するためのレポーター(pSRE-Luc, pNF- κ B-Luc, pAP1-Luc, pSRF-Luc, pCre-Luc)を HeLa 細胞にトランスフェクトし、CagA 蛋白発現による影響を検討した。また CagA 蛋白のシグナル活性化責任領域を明らかにするため *cagA* の truncation をおこない、CagA 蛋白のリン酸化の影響を検討するため site-directed mutagenesis でチロシン残基に変異を挿入し、レポーターアッセイをおこなった。

活性化が認められた SRE に関しては、EMSA とウエスタンブロットで活性化機序を検討した。MEK1/2、Ras の関与については MEK1/2 阻害薬と dominant negative Ras を用いレポーターで検討した。

最後に CagA 蛋白がサイクリン D1 発現に与える影響をレポーターで検討した。

[結果]

1. サイクリン D1 発現にたいする *H. pylori* 感染の影響

AGS および MKN28 細胞に *H. pylori* を感染させると 90 分後に最大となるサイクリン D1 mRNA の発現の増加を認めた。AGS 細胞で *H. pylori* 感染濃度を変化させると、細菌細胞比の増加に従い mRNA の発現が増加した。またレポーターアッセイでも、*H. pylori*

感染は時間、菌量依存性にサイクリン D1 プロモーターを活性化した。細菌細胞比が 100 となる濃度で野生株を感染させると、プロモーターを 6.4 倍活性化した。菌体抽出成分や死菌にはプロモーターの活性化能がなかった。

H.pylori の病原因子について検討したところ、TN2 Δ cagE, TN2 Δ cagPAI 株ではサイクリン D1 mRNA 発現の増強が見られなかった。またプロモーターの活性化能でも野生株の 6.4 倍にくらべ、TN2 Δ cagE で 4.5 倍、TN2 Δ cagPAI で 3.7 倍と低値であった。

MEK1/2 阻害薬を用いて *H.pylori* によるプロモーターの活性化を調べると、濃度依存性に活性化が減弱した。10mM の U0126 および 100mM の PD98059 の添加で *H.pylori* 感染によるプロモーターの活性化は 3.8 倍から 1.3 倍へ減弱した。ノーザンブロットでもこれらの阻害薬によりサイクリン D1 mRNA の発現は減弱した。

一方変異レポーターを用いた NF- κ B の影響の検討では、pD1-kB1M, pD1-kB2M, pD1-kB1/2M のいずれも 5-6 倍の活性化が認められ、pD1 luc と有意差を認めなかった。また dominant negative I κ B α の発現も *H.pylori* によるサイクリン D1 のプロモーターの活性化を減弱させなかった。

2. CagA 蛋白の細胞内機能解析

pTX-CagA のトランスフェクトにより HeLa 細胞で CagA 蛋白の発現を認めた。レポーターアッセイでは CagA 蛋白の発現により pSRE-Luc が 40 倍、pSRF-Luc は 3.3 倍活性化された。pNF- κ B-Luc、pAP1-Luc、pCRE-Luc の活性化は認めなかった。EMSA では CagA 発現細胞で DNA/ SRF/ Elk1 複合体の増強を認め、ウエスタンブロットで CagA 発現による Elk1 のリン酸化が見られた。

種々の truncate/ mutant ベクターを用いたレポーターアッセイでは CagA の C 端側 (872-950aa) が SRE の活性化に必要であったが、この部分に存在するチロシン残基のリン酸化は SRE の活性化に影響を与えていなかった。

CagA 発現による SRE の活性化は、MEK1/2 阻害薬、dominant negative Ras により減弱した。

また pTX-CagA のトランスフェクトにより pD1 luc が 2.3 倍活性化された。

[考案]

多数の研究で *H.pylori* 感染が胃粘膜の細胞増殖を促進することが報告されているが、その細胞内メカニズムは明らかにされていない。今回の検討で、*Helicobacter pylori* 感染が細胞周期を正に調節するサイクリン D1 遺伝子の発現を増強すること、また *H.pylori* の cagPAI 遺伝子がこの遺伝子発現に関与していることが明らかになった。当研究室の

スナネズミ長期感染モデルでも、*cagPAI* 遺伝子は胃粘膜肥厚を惹起するのに必要であり、胃潰瘍、腸上皮化生、胃癌などの病態の発生に関与していた。胃粘膜でのサイトカインの産生やアポトーシスなどとともに、サイクリン D1 発現により亢進する細胞増殖反応も、*cagPAI* 陽性の *H.pylori* 感染患者で胃癌の発症率が高いことの原因である可能性がある。

また *H.pylori* 感染によるサイクリン D1 遺伝子発現の増強に寄与する細胞内シグナルについては、MAPK の活性化が関与していると考えられた。*H.pylori* が *cagPAI* 依存性に活性化する NF- κ B は、AGS 細胞におけるサイクリン D1 発現に関与していなかった。実際の生体内でもおもに NF- κ B の活性化で制御される炎症反応とは独立して、胃粘膜増殖反応がおこっている可能性も示唆された。

次に *cagPAI* のシステムが上皮にあたえる影響を検討するため CagA 蛋白を HeLa 細胞に発現させると、容量依存性に serum response element (SRE) と serum response factor (SRF) の活性化が認められた。さらに CagA 発現による Elk1 のリン酸化と DNA 結合能の増強を認めた。SRE は CArG box と Ets モチーフから成る転写因子結合配列であるが、CagA の発現による SRF の活性化が CArG box に働き、Elk1 のリン酸化が Ets モチーフへの結合を増強し協調して SRE を活性化すると考えられた。この SRE は *c-fos* などの初期応答遺伝子のプロモーター領域に存在し、MAPK により活性化され細胞増殖や分化を調節する。このことから細胞内に注入された CagA 蛋白は、SRE の活性化を介し細胞増殖をうながす可能性が示唆された。

そして SRE の活性化には CagA の C 端が重要であった。この部位には EPEC の Tir 類似配列があり、CagA のチロシン残基のリン酸により細胞側のアダプター蛋白と結合し SRE を活性化するモデルを考えた。しかし mutagenesis による検討からは CagA はチロシンのリン酸化非依存性に SRE を活性化していると考えられた。また CagA 蛋白はサイクリン D1 プロモーターを活性化した。

本研究から *H.pylori* は *cagPAI* のシステムを用いて上皮細胞の遺伝子発現を調節し、細胞増殖などの反応を惹起しうると考えられた。癌細胞株を用いた実験系が細胞増殖メカニズムの研究として一定の限界があることも事実であるが、臨床検体などを用い今後このメカニズムをさらに明らかにしたい。