

[別紙1]

論文の内容の要旨

論文題目 *Helicobacter pylori* 感染による抗アポトーシス機構の解析

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12年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 柳内 綾子

[研究の背景および目的]

Helicobacter pylori (*H. pylori*) は慢性活動性胃炎や、胃十二指腸潰瘍の原因となる病原因子である。また胃 MALT リンパ腫や、胃癌との関係も報告され、WHO/IARC により Definite carcinogen に定義づけられている。しかし、*H. pylori* 感染による発癌メカニズムについては、いまだに解明されていない。これまで、胃発癌機構に関与する因子として、*H. pylori* 感染による炎症の持続や、過剰な細胞増殖などが考えられており、これらのメカニズムについては徐々に解明されつつある。例えば、持続する炎症については NF- κ B 活性化に続く炎症性サイトカイン産生、過剰な細胞増殖については ERK/MAPK カスケードを介した cyclin D1、Elk-1、*c-fos* の活性化などが報告されている。

一方、発癌メカニズムの一つとして、抗アポトーシス作用が知られている。アポトーシス機構の破綻による過剰な細胞増殖、DNA ダメージをうけた異常細胞の残存が、種々の発癌に関与するであろうという理論である。一般に抗アポトーシス作用は抗アポトーシス遺伝子の発現によって調節されていると言われ、実際、一部の悪性腫瘍において抗アポトーシス遺伝子の過剰発現が報告されていることは、抗アポトーシス作用が発癌メカニズムの一端を担うことを示唆する現象と考えられる。そして今回検討した cellular inhibitor of apoptosis protein 2 (c-IAP2) は、Caspase-3、-7、-8、-9 を阻害することによって、抗アポトーシス作用をもたらすと考えられている。

これまでに、*H. pylori* による抗アポトーシスの報告はほとんどない。そこで今回の

検討では、発癌の一因と考えられている抗アポトーシス作用に着目し、*H. pylori* による抗アポトーシス作用のメカニズムについて、その機序を含めた検討を行なった。さらに、当院においてインフォームドコンセントのもと、上部消化管内視鏡検査を施行された症例の胃生検検体を用い、*H. pylori* 除菌前・後における c-IAP2 遺伝子の発現を比較した。

[方法]

細胞は、胃癌細胞株 MKN45 を、*H. pylori* は *cagPAI* 陽性の TN2 株と、そのノックアウト株 (TN2- Δ *cagPAI*、TN2- Δ *cagE*) を用いた。*H. pylori* 感染で発現が増加する遺伝子は、96 種類のアポトーシス関連遺伝子のアポトーシスアレイを用いて網羅的に検討し、c-IAP1、2 について RT-PCR、リアルタイム PCR で発現を確認・比較した。

H. pylori による c-IAP2 プロモーター領域への影響は、c-IAP2 プロモーターを含むレポータープラスミド (-247Luc) および -247Luc の 5'側欠失プラスミド (-200Luc、-93Luc)、プロモーター領域の 3 つの NF- κ B 結合配列に変異を挿入した変異プラスミド (κ Bm1-Luc、 κ Bm2-Luc、 κ Bm3-Luc)を用いて検討した。これらを MKN45 細胞へトランスフェクションし、24 時間後より *H. pylori* を共培養し、8 時間後のルシフェラーゼ活性を測定した。NF- κ B 経路の阻害には、ドミナントネガティブ型 I κ B α のトランスフェクション、もしくは NF- κ B 核内移行阻害剤 caffeic acid phenethyl ester (CAPE) を用いた。

アポトーシスの検討は、TUNEL 法を用いた。*H. pylori* によるアポトーシスに対する c-IAP2 の影響は、アンチセンス法と c-IAP2 の細胞内強制発現(免疫染色)で検討した。

生検検体は、胃前庭部大彎から 3 点生検により採取した。RNA 抽出後、RT-PCR により c-IAP2 の発現を検討した。

[結果]

アポトーシスアレイを用いた検討では、抗アポトーシス遺伝子である c-IAP1、c-IAP2 の発現が 9 倍と、最も増加していた。RT-PCR、リアルタイム PCR を用いた両遺伝子の発現量の比較では、c-IAP1 の発現が 2 倍であったのに対し、c-IAP2 の発現は 14 倍と著明に増加していた。そこでアンチセンス法を用いて c-IAP2 を特異的に抑制したところ、*H. pylori* 共培養による MKN45 細胞のアポトーシスは、4.4%から 8.9%へ増加した。

c-IAP2 プロモーター活性についてレポーターアッセイで検討したところ、*H.*

pylori 共培養により -247Luc は約 10 倍に活性化した。しかし *cagPAI* ノックアウト株の共培養では、活性化は約 50%に抑制された。欠失プラスミド-200Luc、-93Luc を用いた検討では、プロモーター活性は-247Luc の 66%、31%に抑制され、NF- κ B 結合配列変異プラスミドを用いた検討では、プロモーター活性は-247Luc の 24% (κ Bm1)、58%(κ Bm2)、41%(κ Bm3)に抑制された。さらにドミナントネガティブ型 I κ B α のトランスフェクションおよび CAPE の添加では、*H. pylori* によるプロモーター活性化は、いずれも-247Luc の 10%以下に抑制された。

H. pylori 共培養 8 時間後では、アポトーシス細胞は、全体の約 4%であったが、CAPE で NF- κ B を阻害すると、アポトーシス細胞は 10%に増加した。*H. pylori* と CAPE によるアポトーシス増加が c-IAP2 に影響されるか検討するために、外来性に c-IAP2 を強制発現させたところ、コントロール細胞におけるアポトーシスが 23%であったのに対し、c-IAP2 を強制発現した細胞では、アポトーシスはわずか 2%であった。

胃生検検体における検討では、*H. pylori* 除菌治療をおこなった 10 例 7 例において、除菌後に c-IAP2 の発現低下を認めた。

[考察]

今回の検討では、*H. pylori* により、NF- κ B の活性化を介して c-IAP2 の発現が増加することが示された。さらに、*H. pylori* が c-IAP2 を介して抗アポトーシス作用を起こすことが明らかとなった。

アポトーシスアレイ、PCR を用いた検討では、*H. pylori* により c-IAP2 の発現が促進することが示され、アンチセンス法では、*H. pylori* による抗アポトーシス作用が c-IAP2 依存性であることが示された。また、c-IAP2 の欠失・変異プラスミドを用いた検討では、c-IAP2 プロモーター領域の-247 から-93 までの領域に存在する NF- κ B 結合配列が、*H. pylori* による c-IAP2 プロモーター活性化に必要であることが示唆され、NF- κ B 経路の阻害による検討では、*H. pylori* が NF- κ B の系を介して c-IAP2 を発現することが明らかとなった。CAPE 添加による検討では、*H. pylori* の抗アポトーシス作用が NF- κ B 依存性であることが示された。また c-IAP2 強制発現により、外来性の c-IAP2 も *H. pylori* によるアポトーシスを抑制することが示された。

これまでの報告では、*H. pylori* は、Fas-Fasリガンドシグナル伝達系や、Smad5 の発現を介する系、ミトコンドリア-シトクローム c を介する系など複数の系を介して胃上皮細胞にアポトーシスを誘導すると考えられている。ところが、*H. pylori* の抗アポトーシス作用についての報告はほとんどない。これまでの臨床的検討においては、種々の癌

で抗アポトーシス遺伝子の過剰発現が報告されており、急性骨髄性白血病においては XIAP、食道扁平上皮癌においては c-IAP1 が過剰に発現している。これに今回の実験結果を加えて考察すると、おそらく *H. pylori* はアポトーシスも抗アポトーシスも起こすことが可能であり、胃粘膜へ感染することによって、それまで維持されていたアポトーシスと抗アポトーシスのバランスを崩すと考えられる。そして抗アポトーシスが優位に立って、DNA ダメージを受けた異常細胞の淘汰ができなくなった時、癌へ進展する可能性がでてくるものと推測される。実際、今回の検討で、培養細胞のみならず *H. pylori* 感染者の胃生検検体においても抗アポトーシス遺伝子の発現増加を認めたことは、*H. pylori* の胃発癌機構への関与を示唆する現象と考えられた。

今回の検討では、*H. pylori* 感染による c-IAP2 の発現が NF- κ B 依存性であることを示したが、一方、c-IAP2 が NF- κ B を活性化するという報告もある。それをふまえると、ひとたび *H. pylori* に感染して c-IAP2 の発現が誘導されると、c-IAP2—NF- κ B 間の正のフィードバック機構が促進し、抗アポトーシス作用がさらに増強する可能性が示唆される。このような *H. pylori* の病原性を考慮すると、近年、消化性潰瘍のみに保険適応となった *H. pylori* 除菌療法も、潰瘍症例のみならず、全ての *H. pylori* 感染者に適応を拡大する必要があるかもしれない。

今回の検討で、*H. pylori* による、c-IAP2 の発現を介した抗アポトーシス作用が明らかとなった。NF- κ B 活性化を介したこのような抗アポトーシス作用の持続が、胃発癌をはじめとする *H. pylori* 関連疾患の一因となる可能性が示唆された。

[結語]

H. pylori による、胃癌細胞株における c-IAP2 発現を介した抗アポトーシス作用を明らかにした。c-IAP2 発現増加には、NF- κ B の活性化が不可欠であった。一方、胃生検検体を用いた検討では、*H. pylori* 陽性症例において c-IAP2 発現は増加し、除菌後に7割の症例で c-IAP2 の発現が低下した。これらの結果から、長期間の *H. pylori* 感染にもとづく抗アポトーシス作用の持続が、胃癌をはじめとする *H. pylori* 関連疾患の一因となりうる可能性が示唆された。