

[別紙1]

論文の内容の要旨

論文題目 *Helicobacter pylori* が活性化する細胞内シグナルにおける
cag PAI の役割

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13年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏 名 芝田 渉

[研究の背景および目的]

Helicobacter pylori (*H. pylori*) はヒトの胃に持続感染し慢性胃炎や、胃十二指腸潰瘍の原因となるグラム陰性桿菌である。WHO/IARCにより Definite carcinogen に定義づけられ、胃癌や胃 MALT リンパ腫との関連も示唆されている。*H. pylori* 感染によるこれら炎症や発癌のメカニズムは明らかになりつつあるが、種々の細胞内シグナルの活性化がどの程度病態に関わりを持っているのか、また *H. pylori* 側の病原因子と細胞内シグナルの活性化の関わりについて、詳細な報告はない。臨床分離株などの検討から *cagPAI* 遺伝子を有する *H. pylori* は、胃潰瘍や胃癌などとの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、代表的な炎症、発癌に関わる細胞内シグナル伝達系である NF- κ B や MAPK を活性化することが分かってきた。これらの転写因子の活性化や下流遺伝子の発現が、*H. pylori* の惹起する宿主反応にどの程度関わっているのか、網羅的検討をした報告はない。

近年、こうした宿主の遺伝子発現をより網羅的に解析する方法として、cDNA マイクロアレイ法が知られている。現在では、数万遺伝子の種々の条件下における発現状態を同時に解析することができ、宿主反応の類似点や相違点を検出できる。消化器病領域においても、胃や大腸癌組織を用いて、実際に変化を来した機能遺伝子の一群をもとにその発生から予後予測に至る機序の解明するうえで必要不可欠のツールとなっている。癌研究の分野に限らず、感染症の分野においても、宿主遺伝子発現を検出する上で、マイクロアレイ法は広く用いられている。これまでも *in vitro* および *in vivo* において *H. pylori* 感染により惹起される遺伝子発現解析がなされている。しかしながら、NF- κ B や MAPK などの細胞内シグナル活性化の遺伝子発現への関与や、病原因子 *cagPAI* との遺伝子発現への関わりについて、いまだ網羅的

検討をされた報告はない。

そこで今回私は、培養細胞およびヒト胃生検検体を用いて、*H. pylori* 感染が惹起する遺伝子発現について、cDNA マイクロアレイを用いて網羅的に検討した。また主要病原因子 *cagPAI* に着目し、*cag* が機能しない株と野生株との間で惹起する遺伝子発現の違いについて検討した。さらに、細胞内シグナル活性化については、*in vitro* においては阻害剤添加により遺伝子発現への影響を検討し、*in vivo* においてはスナネズミ感染モデルにおける免疫染色を用いて、病原因子の違いによる、シグナル活性化に差異に関して検討した。

[方法]

1) *In vitro* における網羅的遺伝子発現解析

細胞は胃癌細胞株 AGS を、*H. pylori* は *cagPAI* 陽性の TN2 株と、その *cagE* 遺伝子ノックアウト株 ($\Delta cagE$) を用いた。*H. pylori* を 1.5、3、6 および 12 時間、経時的に共培養し RNA を抽出しマイクロアレイにハイブリダイゼーションした。マイクロアレイは消化器臓器(胃、肝臓)ライブラリー由来の 4600 種類の cDNA を収載したものを用い、結果はクラスター解析などの統計学的手法を用いて検討した。有意に発現上昇した遺伝子を抽出、RT-PCR で発現を確認・比較した。細胞内シグナルの関与の検討は NF- κ B および ERK に関してその阻害剤 (APDC および PD98059)を用い、これらを *H. pylori* を共培養する 1 時間前に細胞に添加した。*H.pylori* 感染ヒト胃粘膜における検討は、胃前庭部大彎から 3 点生検により組織を採取し、同様にマイクロアレイを用いて遺伝子発現を測定し、*H.pylori* 感染者と非感染者における遺伝子発現を比較検討した。

2) *In vivo* でのシグナル活性化における *cagPAI* の役割

病原因子 *cagPAI* およびそれにより宿主に注入される CagA タンパクについて、その宿主反応への影響をスナネズミ感染モデルを用いて検討した。TN2 $\Delta cagA$ を用いることにより CagA 蛋白の重要性を、また TN2 $\Delta cagE$ を用いることにより *cagPAI* の重要性すなわち 4 型分泌機構を介した effector protein 注入の可否による宿主反応の違いを検討した。胃炎は新シドニーシステムを用いてスコア化し、細胞内シグナル活性化についてはリン酸化 I κ B α およびリン酸化 Erk 抗体を用いて免疫組織染色にて評価した。また *H. pylori* の惹起するアポトーシス、細胞増殖についても、TUNEL 染色と PCNA 免疫染色で検討した。動物への接種前後の *H. pylori* 株の細胞内シグナル活性化能を検討するため、レポーター(pNF- κ B-Luc)を AGS 細胞にトランスフェクトし、ルシフェラーゼアッセイにて検討した。NF- κ B 活性化への影響をみた。

[結果]

1) *In vitro* における網羅的遺伝子発現解析

マイクロアレイを用いた検討では、有意に発現変化が見られた遺伝子は解析対象遺伝子の約 2 割に認めた。クラスター解析により、遺伝子発現の経時的変化は 4 群(早期、恒常発現、早期抑制、晩期抑制)に分けられた。恒常的発現群では炎症性サイトカイン IL-8 や VCL、TRAF4 などが発現上昇を示した。Onto-Express を用いた、機能的特徴付けでは、早期群には転写因子、シャペロン活性、恒常発現群ではアポトーシス、シグナル伝達および細胞骨格・接着などに関連する遺伝子の発現亢進を認めた。RT-PCR でも 6 遺伝子(*c-fos*, *DSS1*, *IL-8*, *DUSP1*, *NDRG1*, *VCL*)についてはアレイと同様の発現パターンを確認した。

遺伝子発現におけるシグナル活性化の関与を、発現上昇した遺伝子が最も多かった感染後 3 時間(566 個)において検討した。その結果、発現亢進した遺伝子の約 63%に NF- κ B 経路の関与を、約 73%に MAPK 経路の関与が示唆され、両者をあわせ約 8 割以上の遺伝子発現にいずれかの細胞内シグナル活性化が関与していた。

ヒト胃生検検体における遺伝子発現変化を *H. pylori* 感染の有無で比較検討した結果、*in vivo* においても、*in vitro* で恒常的発現群とした群に分類される遺伝子の発現量が高く遺伝子数も多かった。また、胃癌細胞株とヒト胃生検検体に共通して発現上昇を認めた遺伝子は 97 遺伝子で、それらの約 8 割は検討した細胞内シグナルの活性化を介しており、また 7 割は病原因子 *cagPAI* 依存性であった。

2) *In vivo* でのシグナル活性化における *cagPAI* の役割

TN2 野生株(WT)、*cagA* ノックアウト株(Δ *cagA*)、および *cagE* ノックアウト株(Δ *cagE*)を 5 週令雄スナネズミに経口的に接種し、25 週後における胃炎および、NF- κ B, ERK シグナル活性化の程度を組織学的に免疫染色で評価した。各群 *H. pylori* の定着菌量に差異は認めなかったが、胃炎炎症スコアでは、野生株が有意に高く、続いて Δ *cagA*, Δ *cagE* の順に炎症は軽度となった(急性炎症値:3.0 対 1.0 対 0、慢性炎症値:3.0 対 1.0 対 1.0、リンパ濾胞数:26.33 \pm 6.9 対 6.0 \pm 1.63 対 3.0 \pm 0.82。いずれも野生株(WT): Δ *cagA*: Δ *cagE* で値は平均 \pm 標準偏差)。*In vivo* における細胞内シグナル活性化の検討では、NF- κ B 活性化については、野生株感染群では強く、 Δ *cagA* 感染群では軽度に、その上皮およびリンパ球において活性化を示す陽性細胞を認めたが、 Δ *cagE* 群および非感染群では殆ど活性化を認めなかった。ERK 活性化は、野生株感染群の表層粘液上皮に強い染色を認めたが、その他の群及びリンパ球では殆ど陽性細胞を認めなかった。

[考察]

H. pylori 感染が胃粘膜の炎症シグナルを活性化することは、これまでも多数の報告がある。今回は網羅的遺伝子解析手法を用いることで、*H. pylori* 感染が惹起する遺伝子発現の約 9 割が *cagPAI* 遺伝子存在下におこり、また約 8 割の遺伝子発現が NF- κ B や MAPK シグナルの活性化を介して起きていることを示した。またスナネズミ感染モデルでも、*cagPAI* 遺伝子依存性に上皮炎症シグナルが活性化されていることを示した。これらはすでに当研究室が報告した CagA タンパクによる SRE などの細胞内シグナルの活性化や、スナネズミ長期感染モデルでの、胃潰瘍、腸上皮化生、胃癌発生への *cagPAI* 遺伝子の関与を裏付ける結果といえる。また当研究室が *in vitro* で示した *H. pylori* の c-IAP2 を介した抗アポトーシス作用の亢進も、スナネズミ胃粘膜の肥厚という表現型で得られた。これらの胃粘膜での *cagPAI* 依存性のシグナルの活性化とそれに続くサイトカイン産生や炎症の惹起、抗アポトーシス作用などが、*cagPAI* 陽性 *H. pylori* 感染患者で胃癌の発症率が高いことの一因である可能性が示唆された。*H. pylori* 感染ヒト胃粘膜を用いた検討でも、遺伝子発現における *cagPAI* の重要性と細胞内シグナル活性化の関与が示された。今回 *in vivo* における検討でその活性化が 4 型分泌機構をコードする *cagPAI* 依存性におき、さらに CagA タンパクも細胞内シグナル活性化への関与が示唆された。この結果は CagA タンパクに代わる effector protein の存在と、CagA タンパクの *in vivo* における新たな病原性の存在をも示唆した。

[結語]

今回私は *H. pylori* 感染による胃癌細胞株、スナネズミ胃粘膜およびヒト胃粘膜におけるシグナルの活性化を検討し、その活性化には病原因子 *cagPAI* のコードする IV 型分泌機構および CagA の存在が重要な位置を占めていることを明らかにした。この結果から、長期間の *H. pylori* 感染にもとづく多様な胃十二指腸疾患の惹起には、菌-宿主の相互反応が必要であり、その表現型が胃炎を母地とした胃発癌機構の一員をなしている可能性が示唆された。胃癌細胞株を用いた実験系が炎症を母地とする種々の胃十二指腸疾患の病態の解明に一定の限界があることを考慮し、今後は更に癌臨床検体や動物発癌モデルを用いた検討を加えることにより発癌のメカニズムを明らかにし、今後の癌治療のターゲットとなりうる分子の解明や薬剤の開発などにも役立てたいと考えている。