

[別紙2]

審査の結果の要旨

氏名 芝田 渉

Helicobacter pylori (以下 *H. pylori*) 感染は胃炎や消化性潰瘍、胃癌の発生に関与すると報告されている。本研究は、*H. pylori* 感染が及ぼす宿主細胞内シグナル活性化における病原因子 *cag pathogenicity island (cag PAI)* の役割を明らかにするために、マイクロアレイ及びスナネズミ感染モデルを用いて宿主遺伝子発現や細胞内シグナルの活性化を解析し、下記の結果を得ている。

- 1 *H. pylori*を培養細胞に感染させ、宿主の遺伝子発現に与える影響をマイクロアレイを用いた経時的検討によって明らかにした。全体の2割に有意な発現変化がみられ、発現亢進は感染後3時間、発現低下は6時間にピークを迎えた。
- 2 クラスタ解析により遺伝子は4群の発現パターンに分かれた。持続的に発現する遺伝子群には転写制御活性やシグナル伝達に関わる遺伝子が含まれていた。さらにRT-PCR法を用い遺伝子発現パターンを確認した。
- 3 宿主遺伝子発現におけるIV型分泌機構(*cagPAI*)の関与を野生株、*cagE*欠損株を用いて明らかにした。全体の8割以上の遺伝子発現がIV型分泌機構の有無に依存していた。
- 4 代表的なシグナル活性化経路であるNF- κ BとMAPKの関与を阻害剤を用いて明らかにした。*H. pylori*感染により発現亢進した遺伝子の約63%にNF- κ B経路の、約73%にMAPK経路の関与が示唆され、両者をあわせ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経路が関与していた。
- 5 *H. pylori*感染ヒト胃生検検体における遺伝子発現変化を明らかにした。*In vitro*で恒常的発現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ことから *in vivo*でも同様の遺伝子発現がおきていることが示唆された。

- 6 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遺伝子あり、それらの約8割は今回検討した細胞内シグナルの活性化を介して発現しているとされた遺伝子であり、また7割は病原因子*cagPAI*依存性であった。
- 7 細胞内シグナル活性化における*cagPAI*の役割をスナネズミ感染モデルを用いて明らかにした。胃炎スコアでは野生株感染胃が有意に高く、続いて $\Delta cagA$ 、 $\Delta cagE$ の順に炎症は軽度となり、IV型分泌機構およびCagAタンパクの炎症への関与が示唆された(多核球浸潤値:3.0対1.0対0、リンパ球浸潤値: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): $\Delta cagA$: $\Delta cagE$ の順で値は平均 \pm 標準偏差)。
- 9 粘膜肥厚に及ぼす*cagPAI*の役割を明らかにした。胃前庭部においてのみ有意に粘膜肥厚が認められ、IV型分泌機構およびCagAタンパクが粘膜肥厚に関与していた。PCNA免疫染色による細胞増殖反応の検討では、菌株間での差は認められなかった。胃体部では粘膜の厚さに差は見られなかった。
- 10 *In vivo*における細胞内シグナル活性化をスナネズミ感染胃の免疫染色により明らかにした。NF- κ Bの活性化は、野生株、 $\Delta cagA$ 株感染群に認められたが $\Delta cagA$ 株感染群では弱く、CagAタンパクの関与が示唆された。MAPKの活性化は、野生株感染群のみに強く認められ、IV型分泌機構およびCagAタンパクの重要性が示唆された。炎症性サイトカインの発現も、野生株感染群でのみ認められ、IV型分泌機構およびCagAタンパクの重要性が示唆された。
- 11 レポーターアッセイにより、*H. pylori*によるNF- κ Bプロモーター活性化を検討した結果、活性化にはIV型分泌機構が必要不可欠であるが、CagAタンパクがなくても活性化は認められた。

以上、本論文は *H. pylori* による宿主の遺伝子発現や細胞内シグナル活性化における病原因子 *cagPAI* の役割を、マイクロアレイおよびスナネズミ感染モデルを用いて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。