

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 *Helicobacter pylori* による B リンパ球の NF- κ B alternative pathway 活性化
に関する検討

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14年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏 名 大前 知也

[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、胃十二指腸潰瘍や胃 MALT リンパ腫の原因となるグラム陰性桿菌である。現在 *H. pylori* は WHO/IARC により definite carcinogen に定義づけられ、特に染色体転座を伴わない胃 MALT リンパ腫に対しては *H. pylori* 除菌により約 60-80%の症例が寛解することから、除菌治療が第一選択の治療法となっている。

胃 MALT リンパ腫は *H. pylori* が原因のもの、染色体転座が原因のもの、それ以外、の大きく3つに分類される。*H. pylori* が引き起こす胃 MALT リンパ腫の発症メカニズムについてはこれまでに胃粘膜に浸潤する T 細胞の関与や、浸潤する炎症細胞が産生するケモカインの関与などが報告されている。一方染色体転座を伴う胃 MALT リンパ腫では、転座により過剰産生されたタンパクが転写因子 NF- κ B の classical pathway を持続的に活性化することが報告されており、腫瘍発生に重要であると考えられている。

NF- κ B は炎症、細胞増殖、細胞生存などに重要な役割をする転写因子であり、NF- κ B 活性化は B 細胞において抗アポトーシス作用をもたらすことが報告されている。NF- κ B 活性化経路において近年 alternative pathway と呼ばれる経路が主として B 細胞の抗アポトーシス、生存、増殖等に関与していることが明らかとなった。この経路では刺激が加わると NF- κ B を構成する5つの subunit のうちの NF- κ B2 (p100) が process され p52 となって核内に移行し転写因子として働く。この経路の活性化を引き起こす刺激としては B-cell activating factor belonging to the TNF family (BAFF), CD40L, lipopolysaccharide (LPS) 等が知られている。この経路の持続的活性化を起こす knock-in mouse では胃粘膜への高度のリンパ球浸潤を来すことが報告されている。また、胃 MALT リンパ腫細胞での発現

亢進が報告されている BCA-1 はこの経路の標的遺伝子であることも報告されている。

今回 *H. pylori* が NF- κ B alternative pathway を活性化することが胃 MALT リンパ腫の発症の契機となる可能性を考え、*H. pylori* がこの経路を活性化するか、またこの経路の活性化が B 細胞のアポトーシスに影響を及ぼすかについて検討した。またこの経路の活性化に関与する菌側因子について、*H. pylori* 特有の病原因子である Cag (cytotoxin associated gene) A タンパクおよび *cag* pathogenicity island(*cag*PAI) と、死菌あるいは粗 LPS に分けて検討を行った。一方、ヒト生検検体を用いて、*H. pylori* 感染胃粘膜におけるこの経路の活性化の有無を検討した。

[方法]

H. pylori は TN2 株 を用いた。細胞は IM-9 (ヒト B 細胞株), AGS (ヒト胃癌細胞株), ヒト末梢血 B 細胞、およびマウス脾臓 B 細胞を用いた。これらの細胞に *H. pylori* を感染させ、NF- κ B alternative pathway の活性化の有無をウエスタンブロット、EMSA で検討し、標的遺伝子の発現を real-time PCR で確認した。この経路の活性化に関与する因子について NIK の変異マウスである *aly/aly* マウスの脾臓 B 細胞、及び IKK α の siRNA を IM-9 に作用させて検討した。この経路に関与のする *H. pylori* 側因子については、CagA タンパクおよび *cag* PAI の関与については *cagA*, *cagE* の isogenic mutant 株をそれぞれ用い、菌体成分については加熱処理した死菌あるいは粗 LPS を抽出して検討した。この経路の活性化がアポトーシスに与える影響については TUNEL 法で検討した。また、ヒト胃生検検体を用いてこの経路の活性化の有無を免疫染色で検討し、さらに標的遺伝子発現について RT-PCR で検討を行った。

[結果]

IM-9 細胞、ヒト末梢血 B 細胞において *H. pylori* は NF- κ B alternative pathway を活性化することがウエスタンブロット、EMSA で確認された。また標的遺伝子である *bcl*, *elc*, *sdf-1- α* は 5.4 ± 1.0 倍、 6.8 ± 0.4 倍、 23.1 ± 3.4 倍にそれぞれ発現上昇が認められた。

次にこの経路の活性化に関与するとされる、NIK および IKK α について検討した。*aly/aly* マウスの B 細胞を用いた検討では *H. pylori* による p52 産生がウエスタンブロットでほとんど認められなかった。また IKK α siRNA を IM-9 細胞に作用させ、ウエスタンブロットで検討を行うと p52 産生は抑えられた。以上より、*H. pylori* による NF- κ B alternative pathway の活性化には NIK および IKK α が関与していると考えられた。

この経路の活性化に関与する菌側の因子については、TN2 Δ *cagA* および TN2 Δ *cagE* いずれにおいても野生株と同様に p52 産生がウエスタンブロットで認められた。また死菌や粗 LPS を用いて刺激を加えると p52 の産生がウエスタンブロットで確認され、CagA や *cag*PAI 以外の菌体成分がこの経路を活性化する因子の1つであると考えられた。

この経路に関与する IKK α および p100/p52 の siRNA を IM-9 に作用させ *H. pylori* を 48 時間感染させると、non silencing siRNA の TUNEL 陽性細胞が $3.0 \pm 0.3\%$ であったのに対し、IKK α あるいは p100/p52 siRNA 群では $7.4 \pm 1.3\%$ 、 $8.6 \pm 0.6\%$ とそれぞれ有意に増加していた ($p < 0.05$)。すなわち *H. pylori* による NF- κ B alternative pathway の活性化は B 細胞の抗アポトーシスと関連していることが示唆された。

ヒト胃生検検体を用い免疫染色を行うと、*H. pylori* 陽性者では上皮間に浸潤する炎症細胞に p100/p52 陽性細胞を多数認め、これらの炎症細胞は CD20 陽性であった。さらに *blc*, *elc*, *sdf-1- α* の各遺伝子の発現を RT-PCR で検討すると、*H. pylori* 陽性者ではこれらの遺伝子の発現上昇が著明であった。以上より *H. pylori* 胃炎の胃粘膜に浸潤した B 細胞において、NF- κ B alternative pathway の活性化が起きていることが示唆された。

[考察]

本研究は主に *H. pylori* による B 細胞の NF- κ B alternative pathway 活性化について検討し、この経路の活性化によるケモカイン産生や抗アポトーシス作用について解析を行った。

NF- κ B alternative pathway 活性化により、炎症細胞の遊走にかかわる *blc*, *elc*, *sdf-1- α* などのケモカイン遺伝子が制御を受けていることが知られており、今回の検討でもこれらの遺伝子が *H. pylori* 刺激により発現上昇していた。このことはこの経路が autocrine あるいは paracrine の機序を介して炎症の惹起や持続、ひいては増悪に関わっている可能性が考えられる。また *H. pylori* によるこの経路の活性化が B 細胞の抗アポトーシスに関与していることも示された。こうした *H. pylori* による NF- κ B alternative pathway の活性化を介したケモカイン産生あるいは抗アポトーシス作用が B 細胞の生存を促し、腫瘍化の契機となっている可能性が示唆された。

一般に胃粘膜に浸潤した炎症細胞が管腔内の細菌と直接接する機会はずっと少ないと考えられるが、*H. pylori* の場合胃粘膜に感染するとびらん、潰瘍を引き起こし、粘膜に浸潤する炎症細胞と直接接する機会は存在すると思われる。特に alternative pathway 活性化が *H. pylori* 特有の病原因子である CagA タンパクや IV 型分泌機構などによらず何らかの菌体成分でおきる事が今回の検討で明らかとなっており、菌体成分と B 細胞の物理的接触で NF- κ B を活性化することは十分に考えられる。

一方で *H. pylori* が B 細胞において NF- κ B classical pathway の活性化も惹起することが今回の検討で明らかになっており、胃 MALT リンパ腫の発症の過程で alternative pathway とどちらが重要であるかについては今後の検討が必要である。

[結語]

ヒト B 細胞において *H. pylori* が NF- κ B の alternative pathway を活性化することを示した。この経路の活性化を通してケモカインの産生および抗アポトーシスに関与していることが明らかになった。

*H. pylori*特有の病原因子であるCagAタンパクやIV型分泌機構はこの経路の活性化に関与していなかった。また *H. pylori* 感染ヒト胃粘膜においてもこの経路が活性化していることが示された。NF- κ B alternative pathway 活性化が胃 MALT リンパ腫の発症の契機となっている可能性が示唆された。