

論文の内容の要旨

【論文題目】ヘリコバクターピロリの胃粘膜感染における

IL-1 α の役割に関する研究

【指導教員】 笹川 千尋 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月入学

医学博士課程

【専攻名】 病因・病理学専攻

【氏名】 永松 環奈

Helicobacter pylori(以下、ピロリ菌)は経口的にヒトの体内に侵入した後、胃粘液中および胃上皮細胞に定着することで感染を成立させる病原性細菌である。ピロリ菌はヒト胃粘膜で長期間感染すると考えられている為、ピロリ菌の持続感染と、慢性萎縮性胃炎、胃がんなどの様々な胃疾患の発病との関連が推測されている。

ヒトの症例において、慢性胃炎患者のうちピロリ菌感染者は、非感染者に比べると病状が重症化している傾向がみられる。この時、ピロリ菌感染者の胃粘膜病理組織における IL-1、IL-8 等のサイトカインの産生量は、非感染者と比較して有意に増加しており、感染部位にはマクロファージや好中球の浸潤が顕著に認められる。ピロリ菌を除菌すると、これらサイトカインの発現レベルは低下し、また病理組織学的所見の改善が見られることから、ピロリ菌の感染によるサイトカイン産生機構と胃疾患の病態には密接な関連が存在すると考えられる。

ピロリ菌は染色体上に、約 40 kb の病原遺伝子群、cag pathogenicity island (cag PAI) を有しており、近年は cag PAI および cag PAI にコードされている四型分泌装置 (Type Four Secretion System : TFSS) の感染における役割に焦点がおかれ、その解析が進んでいる。TFSS は病原性細菌がエフェクターとよばれる自身のタンパク質を直接宿主細胞内に注入する為に用いられ

るタンパク質分泌装置であり、多くの病原性細菌がこの機構を利用して宿主への感染を成立させている。培養胃上皮細胞を用いた実験では、ピロリ菌の感染により IL-8 の産生・分泌量が *cag* PAI 依存的に上昇することが報告されている。しかしながら、その分子機構および役割については不明な点が多い。

以上を背景に、本研究ではピロリ菌の感染機構を分子レベルで明らかにすることを目標に、菌とサイトカインの主要産生細胞であるマクロファージとの関係性に注目した。培養細胞の系とマウス感染実験を中心として、感染におけるIL-1 α とIL-8の役割に焦点をあて解析を行い、その結果、以下の興味深い知見を得た。すなわち(1)ピロリ菌の感染によりマクロファージが産生するIL-8/MIP-2は、TFSSおよびIL-1 α 依存的であり、(2)ピロリ菌はマクロファージに対して、IL-1 α を核内に移行させることでIL-8/MIP-2の産生を誘導していた。また、マウスを用いた感染実験の結果から、(3)ピロリ菌感染によるIL-8/MIP-2産生と炎症誘導は、TFSS依存的かつIL-1 α 依存的であり、菌の初期胃粘膜付着増大に関与していることが明らかとなった。

(1)前述したように、ピロリ菌の感染により IL-1 α 、IL-1 β 、および IL-8 の産生が誘導される事が報告されている。ピロリ菌とマクロファージの関係を研究するにあたり、これらサイトカインの産生に焦点をあて解析を行った。ピロリ菌感染における IL-8 の産生は上皮細胞が重要な役割を担っていると考えられているが、上皮細胞以外でも IL-8 を産生する細胞は知られている。従って、ピロリ菌の感染により、マクロファージもこれらサイトカインの産生を促していると推測される。実際、我々が、ピロリ菌 26695 株を、培養細胞に感染させると、IL-1 α 、IL-1 β 、および IL-8 の産生が上昇しているのがヒトマクロファージ細胞株 THP-1 細胞で確認された。興味深い事に、IL-1 β および IL-8 の産生量は、上皮胃細胞株よりも THP-1 細胞に感染させた場合が顕著であり、IL-1 α の産生は上皮細胞株では確認できなかった。以上より、ピロリ菌感染によってマクロファージが少なくとも、IL-1 α 、IL-1 β 、および IL-8 を産生していることが示された。

以上の結果は菌が細胞に積極的にサイトカインの産生をうながしている可能性を提示する。この仮説を検討するために、マウスマクロファージ細胞株 J774A.1 にピロリ菌 SS1 株野生型 (SS1-WT) および SS1 株由来 TFSS 変異株 (SS1- Δ TFSS) を感染させ、IL-1 α 、IL-1 β 、MIP-2 (ヒト IL-8 のホモログ) の産生量を測定した。その結果、予想通りに、これらサイトカインの産生は TFSS 依存的であることが明らかとなった。すなわち、ピロリ菌は TFSS を介して自身のタンパク質を注入することによって、マクロファージにサイトカインの産生を促していることが示された。

次に、ピロリ菌感染によって誘導される IL-1 α と IL-8 の関連性を調べた。野生型マウス、IL-1 α 欠損 (IL-1 $\alpha^{-/-}$) マウス、IL-1 β 欠損 (IL-1 $\beta^{-/-}$) マウスからそれぞれ骨髄細胞由来マクロファージ (以下 BMM ϕ と略す。) を調製し、SS1-WT および SS1- Δ TFSS を感染させ MIP-2 の産生量を測定した。その結果、野生型マウスと IL-1 $\beta^{-/-}$ マウス由来の BMM ϕ においては、TFSS 依存的に MIP-2 産生量の増加が確認されたが、IL-1 $\alpha^{-/-}$ マウス由来の BMM ϕ においては TFSS 依存的な変化は見られなかった。従って、ピロリ菌がマクロファージに感染して誘導される MIP-2 の産生は TFSS かつ

IL-1 α 依存的事であることが示された。

(2)近年、IL-1 α の核内移行が IL-8 の産生を制御する機構が示された。以上の結果は、ピロリ菌がマクロファージに感染した際にIL-1 α の核内移行機構を通じてIL-8/MIP-2の産生を誘導している可能性を示唆する。そこでピロリ菌をマクロファージに感染させた場合に、TFSS 依存的にIL-1 α の核内移行が観察されるかどうかを確認した。J774A.1 細胞に SS1-WT あるいは SS1- Δ TFSS を感染させた後に、IL-1 α , F-アクチンと DNA の蛍光染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて IL-1 α の局在を調べた。その結果、ピロリ菌の感染に伴う TFSS 依存的な IL-1 α の核内移行促進が認められた。

次に TFSS による MIP-2/IL-8 の産生量の増加が、IL-1 α の核移行に依存しているかを調べた。ヒト IL-1 α の野生型(IL-1 α -WT)あるいは、核内移行能を喪失した IL-1 α 変異体(IL-1 α -K82E)を強発現させた IL-1 α ^{-/-}-BMM ϕ に SS1-WT を5時間感染させて、IL-1 α の細胞内局在と MIP-2 の産生量を調べた。IL-1 α -WT 発現細胞に SS1-WT を感染させた場合、観察した細胞中およそ 16%の細胞においてIL-1 α のシグナルが核内に認められた一方で、IL-1 α -K82E 発現細胞に感染させた場合には IL-1 α の核移行は全く認められなかった。このとき、MIP-2 の産生量は、IL-1 α -WT 発現細胞においてはコントロールとして用いた細胞に比べて有意に上昇していたが、IL-1 α -K82E 発現細胞においてはコントロールと同程度であった。すなわち、ピロリ菌の感染による MIP-2 の産生促進は、IL-1 α の核内移行に伴って誘導される事が強く示唆された。

(3)これまでの結果より、ピロリ菌が TFSS を通じて IL-1 α の挙動を制御することで IL-8/MIP-2 の産生をマクロファージに促していることが細胞レベルで明らかになった。そこで次に、感染におけるこの機構の役割を解析するためにマウス実験を行った。野生型マウスもしくは IL-1 α ^{-/-}マウスに SS1-WT あるいは SS1- Δ TFSS を経口投与し、感染 1, 3, 7, 28 日後にそれぞれマウスの胃を摘出し、HE 染色を行って病理組織学的解析、サイトカイン産生量の測定、および、定着菌数の測定を行った。野生型マウスにおいて、HE 染色後の胃を調べたところ SS1-WT を感染させた場合はマクロファージや好中球の浸潤が7日目より顕著に確認された。一方 SS1- Δ TFSS を感染させた場合は、28 日目に炎症性細胞の浸潤が確認されたが、その程度は SS1-WT を感染させた場合よりも軽度であった。また、感染 28 日後の胃における IL-1 α および MIP-2 の mRNA 量を調べたところ、SS1-WT を感染させた場合、SS1- Δ TFSS を感染させたマウスに比べておよそ 2.6 倍 増大していた。一方、IL-1 α ^{-/-}マウスの場合、感染後 28 日目でも SS1-WT あるいは SS1- Δ TFSS を感染させたマウスの胃粘膜組織にはマクロファージ・好中球の浸潤がほとんど認められなかった。また感染 28 日後の胃における MIP-2 の mRNA 量を調べたところ、SS1-WT を感染させた場合と SS1- Δ TFSS を感染させた場合とで、MIP-2 の mRNA 量に違いは認められなかった。以上の結果は、菌が IL-1 α を通じて IL-8/MIP-2 の産生を制御しているのではないかという我々の仮説を支持する。このとき、菌の付着菌数を測定すると炎症の誘導と菌の付着との間に

相関性があることが示唆された。すなわち野生型マウス、IL-1 α ^{-/-}マウス間で定着菌数を比較すると、SS1-WT を野生型マウスに感染させた場合、定着菌数は SS1- Δ TFSS を感染させた場合よりも有意に増加していた。一方でIL-1 α ^{-/-}マウスの場合、SS1-WTとSS1- Δ TFSSとの間で定着菌数に有意な差は認められず、また野生型マウスにSS1-WTを感染させた場合よりも定着菌数は各感染日数において半分程度に低下していた。すなわち、炎症の誘導とピロリ菌の付着菌数の増加に相関性があることが示された。

以上の結果よりピロリ菌は、その感染戦略の一環としてマクロファージにIL-1 α 依存的にMIP-2/IL-8の産生を誘導し、その結果惹起される炎症反応は、菌の初期感染において有利な環境を作り出していることが本研究で示された。