

本研究は、*Helicobacter pylori*(以下、ピロリ菌)の感染機構を分子レベルで明らかにするために、菌とマクロファージとの関係性に注目し、感染におけるIL-1 α とIL-8/MIP-2の役割に焦点をあて解析を行ったものであり、下記の結果を得ている。

(1)ピロリ菌とマクロファージの関係を研究するにあたり、胃上皮細胞およびマクロファージで産生が認められているIL-1 α 、IL-1 β 、およびIL-8の産生に焦点をあて解析を行った。ピロリ菌をヒトマクロファージ細胞株THP-1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確認された。興味深い事に、IL-1 β およびIL-8の産生量は、胃上皮細胞株よりもTHP-1細胞に感染させた場合が顕著であり、IL-1 α の産生は胃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。

(2)ピロリ菌の感染は、四型分泌装置(TFSS)を用いて、自身のタンパク質を宿主細胞に注入することで行われる。そこで、菌が細胞に積極的にサイトカインの産生を促している可能性を検討するために、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、これらサイトカインの産生はTFSS依存的事であることが明らかとなった。すなわち、ピロリ菌はTFSSを介して積極的にマクロファージに対してサイトカインの産生を促していることが示された。

(3)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髓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。

(4)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検証するために、まず始めに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依存的事な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 $\alpha^{-/-}$ -BMM ϕ に SS1-WT を感染させて、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 を感染させた場合は、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。

(5) 野生型マウスに SS1-WT あるいは SS1- Δ TFSS を経口投与した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を行った。HE 染色後の胃を調べたところ、TFSS 依存的に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。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。

(6) IL-1 $\alpha^{-/-}$ マウスにピロリ菌を感染させた場合、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。従って、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結果となった。

(7) 野生型マウス、IL-1 $\alpha^{-/-}$ 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 $\alpha^{-/-}$ 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、本論文は、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、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ることを明らかにした。また、マウスを用いた感染実験の結果から、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。

本研究はこれまで未知に等しかったピロリ菌の初期の感染戦略に関して初めて詳細に検討された研究であり、ピロリ菌の感染初期過程における分子機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。