

論文の内容の要旨

論文題目 ヘリコバクター・ピロリ菌の感染における付着因子 BabA の
重要性に関する研究
氏名 石嶋 希

[要旨]

ヘリコバクター・ピロリ菌（ピロリ菌）は、全世界人口の約半数が感染していると推定される病原細菌であり、胃・十二指腸潰瘍、胃癌等の原因となる主要な危険因子である。幼少期に感染が成立すると、ピロリ菌は胃粘膜上皮細胞に長期に亘り定着し、その結果、胃粘膜では慢性的な炎症反応が惹起される。一方、胃粘膜の脱落と共に小腸内へ脱落した菌はパイエル板や孤立リンパ小節内部に取り込まれた後、内部の樹上細胞による補足に伴う抗原提示によって炎症を誘導する。すなわち、ピロリ菌による胃炎惹起には、胃上皮細胞における持続感染の確立による炎症促進および小腸パイエル板での免疫担当細胞への菌体の感作成立という双方からの炎症促進が重要と考えられ、このことはピロリ菌の胃粘膜への付着、長期定着こそが慢性胃炎の原因の根幹であり、菌の上皮細胞への付着の重要性を裏付けている。

ピロリ菌感染に最も重要な付着因子であると考えられている BabA は、胃粘膜上皮細胞に発現するフコシルオリゴ糖 Lewis b (Le^b) と結合する。Le^b は、 β -1,3 ガラクトース転移酵素 (β 3Gal-Ts) により合成されるタイプ 1 鎖が基となり、哺乳動物においては、 β -1,3-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素 4 (β 3Gn-T4)、B3GALT5 にコードされる β -1,3 型ガラクトース転移酵素 (β 3Gal-T5)、FUT1 あるいは FUT2 にコードされる α -1,2 型フコース転移酵素 I あるいは II (FucT-I あるいは II)、および FUT3 にコードされる β -1,3/4 型フコース転移酵素 III (FucT-III) cDNA がその合成に関与する。BabA と Le^b との結合は、合成 Le^b 糖鎖や、ヒトおよび Le^b 発現マウス由来の胃組織切片を用いた実験によって報告されているが、ピロリ菌の病原性における BabA-Le^b 相互作用の生物学的意義は不明のままであった。

胃癌の発生過程は、主にピロリ菌の持続的な定着とそれに続く慢性炎症、組

織損傷および組織再生と関連している。胃粘膜表面へのピロリ菌の付着は機能的な菌-宿主相互作用を生じ、好中球浸潤を伴う顕著な炎症反応を誘導し、結果としてTおよびBリンパ球、形質細胞およびマクロファージの活性化が起きる。この際、ピロリ菌感染により誘導されるケモカイン遺伝子ファミリー、特に CXC ケモカインや CC ケモカインの産生がこれらの炎症性細胞を胃粘膜にリクルートすると考えられている。増殖過程の間に正常な胃分化経路から逸脱して前癌状態と考えられる腸上皮化生を呈し、腸型胃癌へと進行する。CDX2 転写因子は、早期に腸上皮細胞への分化と維持を誘導することで胃の腸上皮化生の誘導に関与していると考えられており、MUC2 のような腸特異的なタンパク質の転写を活性化する。

ピロリ菌顕性感染患者からの分離株は一般に、*cag*-PAI と呼ばれる、ピロリ菌の疾患重篤度と相関を有する重要な病原遺伝子群を有している。この *cag*-PAI 領域中に、IV 型分泌装置 (TFSS) 構成因子および主要病原因子 (エフェクター) である CagA がコードされており、ピロリ菌が胃上皮細胞に付着すると、TFSS より CagA、菌体細胞壁構成成分ペプチドグリカン、さらに未知の因子を宿主細胞内に注入し、宿主細胞のシグナル経路に影響を及ぼす。CagA は、上皮細胞増殖刺激、細胞間接着破壊、炎症性応答誘導といった、多様な活性を有している。BabA 陽性ピロリ菌がヒトで胃潰瘍や胃癌のリスクを上昇させ、深刻な胃炎と関連していることが明らかになっているが、ピロリ菌と胃上皮との機能的相互作用における BabA の明確な役割や、ピロリ菌の病原性における BabA の影響にはまだ不明瞭な部分がある。

これまで、ピロリ菌の病原性における BabA の影響を Le^b 陽性細胞および Le^b 陰性細胞株を用いて系統的に調べた報告はなかったことから、本研究では初めに、*in vitro* での簡便な BabA-Le^b 相互作用機能評価系の構築を試みた。胃上皮細胞株 AGS 細胞はピロリ菌感染により誘導されるシグナル伝達経路の研究に一般的に用いられる細胞株である。しかしながら、検討の結果、AGS 細胞は細胞表面に Le^b 発現が認められるものの、ピロリ菌-AGS 細胞間の付着には BabA-Le^b 結合以外の付着機構が主要であると考えられ、本研究で目的とする BabA 依存的なピロリ菌付着の検討に AGS 細胞は適当でないことが示された。そこで、遺伝子操作により Le^b 発現陰性細胞から Le^b 発現細胞を樹立することを試みた。種々の培養細胞株を用いたピロリ菌感染実験により、MDCK 細胞、CHO 細胞、NIH3T3 細胞および MEF 細胞は、AGS 細胞に比べて菌付着効率が

低く、また、免疫蛍光染色により Le^b 発現量が検出感度以下であることが明らかになった。そこで、これらの細胞に種々の糖転移酵素 cDNA を導入して Le^b 発現細胞を作製した。マウスレトロウイルスを用いた形質導入を効率良く行うために、同種指向性レトロウイルスレセプターを安定発現する MDCK (MDCK/EcoR) および CHO (CHO/EcoR) 細胞を作製した。続いて、B3GALT5、FUT1 および FUT3 をコードするレトロウイルスを組み合わせた形質導入などにより Le^b 発現細胞を樹立した。これらの細胞における Le^b 発現を、抗 Le^b 抗体を用いた免疫染色・顕微鏡観察により調べたところ、FUT3 と FUT1 の両遺伝子を導入した MDCK/EcoR 細胞、および FUT3、FUT1、B3GALT5 の 3 遺伝子を導入した CHO/EcoR、NIH3T3、MEF 細胞の細胞表面に Le^b 発現を認めた。次に、Le^b 安定発現 MDCK 細胞 (MDCK/Le^b 細胞) およびコントロール細胞 (MDCK/pIRES 細胞) を作製し、これらの細胞と上記の Le^b 発現細胞を用いて、ピロリ菌の付着実験を行った。

ピロリ菌感染時の MDCK/Le^b および MDCK/pIRES 細胞への菌付着量を顕微鏡観察した結果、MDCK/pIRES 細胞に比べ MDCK/Le^b 細胞の方が顕著に多いことが確認された。同様の結果が、Le^b 発現 NIH3T3 および CHO 細胞においても確認された。さらに、MDCK/Le^b および MDCK/pIRES 細胞を用いてピロリ菌付着の定量的解析を行った。ピロリ菌を細胞に感染・固定後、*in vitro* 付着試験による蛍光強度測定した結果、細胞への付着菌量は、MDCK/pIRES 細胞よりも MDCK/Le^b 細胞の方が多くなることが明らかになった。また、MDCK/Le^b および MDCK/pIRES 細胞にピロリ菌野生株、BabA 発現欠失株および TFSS 構成因子発現欠失株を感染させ、感染細胞から調製したトータル RNA をリアルタイム RT-PCR に供し、ピロリ菌 16S rRNA の発現レベル解析により付着菌量を定量したところ、BabA および Le^b 依存的な付着が示唆された。さらに、タンパク付着試験では、MDCK/Le^b および MDCK/pIRES 細胞を組換えタンパク質と共に静置・洗浄後、*in vitro* 付着試験による蛍光強度測定に供し、付着したタンパク質量を検出した。その結果、FLAG タグ融合 BabA 組換えタンパク質は、タンパク質量依存的に MDCK/Le^b 細胞への結合が認められたのに対し MDCK/pIRES 細胞への結合は認められず、ピロリ菌は BabA-Le^b 結合依存的に細胞に付着することが示された。

BabA の TFSS 依存的な炎症性サイトカインおよび胃癌関連因子産生誘導への関与を検討するため、MDCK/Le^b および MDCK/pIRES 細胞を用いた感染実験

を行った。感染細胞より調製したトータル RNA を cDNA に逆転写し、リアルタイム PCR に供して検出・定量した。その結果、ピロリ菌は感染時に BabA-Le^b 相互作用を利用して TFSS 依存的に宿主細胞シグナルを上昇させ、炎症性サイトカイン (IL-8、CCL5) や癌化関連因子 (CDX2、MUC2) の産生を誘導していることを見出した。

これらの結果により、今回構築した機能評価系が Le^b の仲介により誘発されるピロリ菌の病原性に対する宿主細胞応答を *in vitro* で解析できる優れたモデルであることが実証された。本モデルは、今後、宿主細胞への細菌付着を制御する薬剤の同定や、ピロリ菌臨床分離株の病原性を調査する簡便なスクリーニングシステムの構築に有用であると考えられる。

次に、スナネズミを用いた動物モデル実験により、*in vivo* での BabA-Le^b 相互作用評価を行った。スナネズミにピロリ菌野生株、BabA 発現欠失株および TFSS 構成因子発現欠失株を経口的に接種し、8 週後に、胃における糜爛形成個体数および炎症性サイトカイン CXCL1 の mRNA 発現レベルを RT-PCR を用いて測定した。その結果、BabA 依存的および TFSS 依存的に有意に高い CXCL1 mRNA 発現レベルが示され、糜爛個体数はそれに相関する傾向がみられた。以上の結果は、BabA による付着能亢進がピロリ菌感染において TFSS 依存的な炎症性サイトカイン産生を増強し、悪性胃疾患へ導くという見解を裏付けるものである。

本研究では、ピロリ菌にとっての BabA-Le^b 相互作用が、胃表面に単に付着するためのみならず、宿主細胞表面に分泌装置を堅固に支持し病原因子を細胞質内へ効率的に送り込むために重要な結合であることを、初めて明らかにした。ピロリ菌の BabA と宿主細胞表面の Le^b との結合が TFSS を介した効率的な分泌に重要な役割を果たしており、その結果、*cag*-TFSS の最も顕著な特性である炎症および腸上皮化生への誘導が起きることを明白に示した。