

[課程—2]

審査の結果の要旨

氏名 石嶋 希

本研究は、*Helicobacter pylori* (ピロリ菌)感染における、ピロリ菌の付着因子 BabAと胃上皮細胞表面に発現しているフコシルオリゴ糖Lewis^b (Le^b)の相互作用の重要性を明らかにするため、*in vitro*でのBabA-Le^b結合評価系の構築と検討および実験動物への感染実験を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. Le^b発現細胞の作製

ピロリ菌の付着因子BabAと宿主細胞のLe^bの結合は、これまでに合成糖鎖やヒトあるいはヒトLe^b発現トランスジェニックマウスの胃組織切片を用いた実験系で明らかにされている。しかしながら、合成糖鎖はその基部の構造などが本来の胃粘膜上皮での天然型糖鎖構造を反映していない可能性が憂慮され、また、合成糖鎖、組織切片の実験系は共に、結合の結果誘導される宿主応答を調べることができない。そこで、*in vitro*での簡便なBabA-Le^b結合評価系構築のため、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。これらの細胞にLe^bを発現させるために必要な糖転移酵素遺伝子を探索し、MDCK細胞ではFUT3、FUT1の2遺伝子、CHO、NIH3T3およびMEF細胞ではFUT3、FUT1、B3GALT5の3遺伝子であることを見出した。マウスレトロウイルスを用いてこれら種々の糖転移酵素cDNAを導入し、Le^b発現細胞を作製した。

2. ピロリ菌のBabAタンパク質はLe^b発現細胞に結合する

MDCK細胞は単層極性シート構造を形成することから、細菌の付着試験に適している。そこで、MDCK細胞にFUT3およびFUT1遺伝子を導入したLe^b安定発現細胞とコントロール細胞を作製した。ピロリ菌感染時のLe^b+/-MDCK細胞、NIH3T3細胞およびCHO細胞を顕微鏡観察し、付着菌数を調べた結果、Le^b-細胞に比べLe^b+細胞の方が顕著に多いことが確認された。また、Le^b+/-MDCK細胞への付着ピロリ菌量を*in vitro*付着試験による検出し、Le^b-細胞に比べLe^b+細胞の方が多いことが明らかになった。次に、Le^b+/-MDCK細胞と*babA*遺伝子欠損株 ($\Delta babA$)を用いた感染実験を行い、感染細胞から調製したトータルRNAをリアルタイムRT-PCRに供して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、BabAとLe^bの直接的な結合を確認するため、Le^b+/-MDCK細胞とBabA組換えタンパク質を用いた*in vitro*付着試験を行った。その結果、BabA組換えタンパク質は、タンパク質量依存的にLe^b+MDCK細胞への結合が認められたのに対しLe^b-MDCK細胞への結合は認められなかった。

これらの結果より、ピロリ菌はBabA-Le^b結合を利用して宿主細胞に付着することが示された。

3. BabA-Le^b結合は、ピロリ菌感染細胞においてIV型分泌装置 (TFSS)依存的な転写活性を亢進させる

ピロリ菌感染による自然免疫誘導やシグナル伝達因子活性化といった宿主応答の多くは、TFSSのエフェクタータンパク質CagAにより引き起こされることが報告されている。そこで、BabA-Le^b結合がTFSS依存的な活性に影響を及ぼすか否かを調べるため、ピロリ菌感染Le^b+/-MDCK細胞について、①CagAタンパク質の細胞内移行、②ピロリ菌感染による胃炎の原因である炎症性サイトカインIL-8、CCL5のmRNA発現レベルおよび③腸分化型胃癌の前段階である腸上皮化生の形成に関与する因子CDX2、MUC2のmRNA発現レベル、を検討した。その結果、①～③のいずれも、BabA-Le^b結合に依存した活性上昇が確認された。

以上の結果より、BabA-Le^b結合によるピロリ菌付着促進がピロリ菌感染時のTFSS依存的な活性において重要な役割を果たしていることが明らかになった。

4. BabA-Le^b結合は*in vivo*での炎症性サイトカイン産生に寄与している

スナネズミへのピロリ菌経口投与8週後に、炎症の形態学的指標として胃における糜爛形成個体数を算定し、胃から調整したトータルRNAを用いて炎症性サイトカインCXCL1 mRNAの発現レベルを測定した。その結果、糜爛形成個体は野生株感染動物のみで認められ、 $\Delta babA$ 株感染動物では認められなかった。また、CXCL1 mRNA発現レベルは、 $\Delta babA$ 株と比較して野生株感染動物で著しく高い値を示した。

この結果より、BabAによるピロリ菌菌体の付着能亢進は、*in vivo*でも、ピロリ菌TFSSに依存した炎症性サイトカイン産生を増大させ、悪性胃疾患を誘導することが示唆された。

以上、本論文は、初めて、TFSS 依存的な宿主細胞応答の促進における BabA-Le^b結合の重要性を *in vitro* および *in vivo* で証明した。本研究で構築した Le^b+/-細胞株を用いた付着評価系は、改良の余地はあるものの、多様な宿主細胞付着

機構を有するピロリ菌感染事象の中でも、**BabA-Le^b** 結合のみに特化した付着機能を評価する上で有用な測定系となり得ると期待される。**BabA-Le^b** 結合は、菌体の宿主細胞表面への付着を促進することで、**TFSS** を介した宿主応答亢進に重要な役割を担っており、悪性胃疾患のリスクを上昇させることを示した。本研究は、付着因子を介したピロリ菌の感染成立と病原性発揮機序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。