

論文の内容の要旨

論文題目 *Helicobacter pylori* による胃炎における Interleukin-32 の発現に関する検討

崎谷康佑

<背景>

胃癌は全世界で部位別がん死亡者数第2位を占める重要な疾患である。胃癌の克服を目指して、胃癌の成因はよく研究されてきた。*H.pylori* の感染を契機とする胃癌発癌経路のモデル、いわゆる Correa の cancer pathway が知られている。*H.pylori* 感染によって炎症が惹起され、表層性胃炎、ついで萎縮性胃炎をきたし、腸上皮化生、dysplasia を経て、分化型胃癌に至る、という経路である。胃炎や腸上皮化生は胃癌の高危険群を示す病態と考えられ、広く研究されている。我々も臨床的見地から、病理学的に胃炎や腸上皮化生が存在する患者群は、胃癌のハイリスク群であることを報告した。東京大学医学部附属病院にて上部消化管内視鏡を施行され、胃の前庭部と体部からそれぞれ粘膜組織を生検した 1395 人（54 人の胃癌患者が含まれる）を対象とし、病理学的な腸上皮化生、胃炎（ここでは好中球浸潤によって診断）の存在と胃癌の関係につき検討したところ、胃の前庭部に病理学的に腸上皮化生を認める患者は、腸上皮化生のない患者と比較して、分化型胃癌の odds ratio が 2.34（95% confidence interval: 1.08-4.96）、体部に腸上皮化生を認める患者では odds ratio が 5.84（95% confidence interval: 2.92-11.8）であった。一方、未分化型胃癌については、体部の胃炎が odds ratio 3.66（95% confidence interval: 1.02-12.2）のリスクファクターであった。

Interleukin-32 (IL-32) は 1992 年に、NK cell において、IL-2 によって誘導される転写産物、

NK4 として発見されたが、その機能は知られていなかった。2005 年に、肺癌の cell line である A549 において、IL-18 の刺激によって NK4 が誘導され、NK4 は TNF- α や IL-8 の誘導能を持つこと、転写因子 NF- κ B の活性化能を持つこと、といった炎症性サイトカインの性質を備えていることが明らかとなった。そこで、NK4 は IL-32 と再命名された。IL-32 は 8 つのエキソンを持ち、IL-32 α 、IL-32 β 、IL-32 γ 、IL-32 δ 、IL-32 ϵ 、IL-32 ζ の 6 つの isoform を持つことがこれまでに知られている。

胃炎を惹起する微生物である *H.pylori* と炎症性サイトカインである IL-32 の関係についてはこれまでのところ言及されておらず、これを検討することを、本研究の目的とした。

<結果>

1 ヒト胃組織からの IL-32 の検出

最初に、*H.pylori* 感染陽性のヒト胃組織における、IL-32 の発現について検討した。ヒト胃粘膜より抽出したタンパクを用いたウェスタンブロットを行った。正常胃粘膜 2 例と、胃炎患者の胃粘膜 2 例と、胃癌患者の胃癌組織 1 例を比較した。*H.pylori* 陽性の胃炎患者の胃粘膜組織、胃癌患者の胃癌組織で、*H.pylori* 感染のない正常な胃粘膜組織と比較して、IL-32 の高発現を認められた。ヒト胃組織を用いて IL-32 の免疫組織染色を行った。*H.pylori* 陽性の胃炎患者の胃上皮細胞の細胞質が IL-32 で染色され、全例 (4/4) IL-32 陽性となった。*H.pylori* 陰性で胃炎のない対照群では 50% (2/4) で陽性であった。ヒト胃検体から抽出したタンパクを用いた ELISA を行った。正常胃粘膜 12 例では平均 207.6pg/mg、*H.pylori* 陽性の胃炎患者 13 例の胃粘膜組織では平均 642.5pg/mg、胃癌患者 5 例では平均 1651.0pg/mg の IL-32 の発現を認めた。正常胃粘膜から、胃炎、胃癌へと病態が進展するに従い、IL-32 の発現が増加していると考えられた。

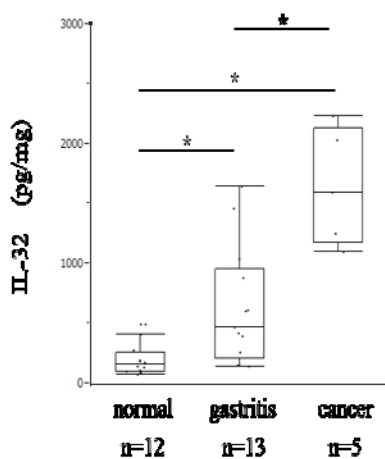


図 1 ヒト胃検体の ELISA
病態の進展に伴う IL-32 の発現増加

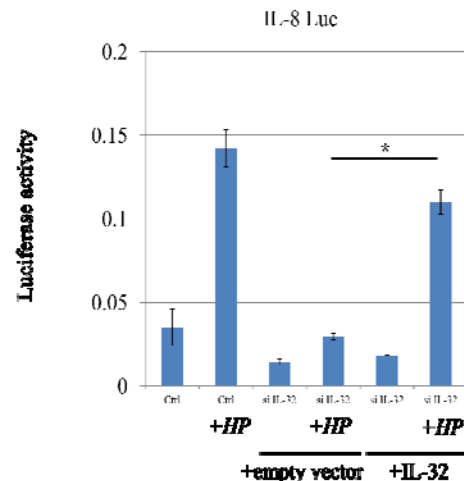


図 2 AGS IL-32 安定ノックダウン
IL-32 を過剰発現すると IL-8 が rescue された

IL-32 α 、IL-32 β 、IL-32 γ 、IL-32 δ 、IL-32 ϵ 、IL-32 ζ の 6 つの IL-32 のアイソフォームのうち、ヒト胃組織で多く発現しているアイソフォームの同定を行った。*H.pylori* 陽性の胃炎患者の胃組織

から得た PCR 産物を用いて、IL-32 の 20 クローンについて sequence を行ったところ、IL-32 β が 90% (18/20) を占め、IL-32 ϵ が 10% (2/20) であった。その他のアイソフォームは検出されなかった。

2 胃上皮細胞からの IL-32 の検出

Real time RT-PCR にて、*H.pylori* と共培養した AGS の cell lysate で、IL-32 と IL-8 の mRNA の発現上昇を確認した。*H.pylori* と共培養した AGS の cell lysate と上清での IL-32 の発現をウェスタンブロットにて検討した。上清中の IL-32 はウェスタンブロットでは確認できなかった。IL-32 の発現の局在を確認するために、AGS において IL-32 の免疫細胞染色を行った。細胞質で IL-32 陽性となった。

次に、*H.pylori* と 24 時間共培養した AGS の cell lysate と上清での IL-32 の発現を ELISA にて検討した。cell lysate の ELISA では、*H.pylori* の刺激がない場合には 877pg/ml の IL-32 の発現を認め、*H.pylori* で刺激した場合には 1484 pg/ml と IL-32 の発現上昇を認めた。一方で、上清の ELISA では IL-32 の発現量は測定感度以下であった。freeze-thaw を 5 回施行した、*H.pylori* と 24 時間共培養した AGS の上清からは IL-32 が ELISA にて検出された。

recombinant IL-32 10ng/ml を AGS 細胞の培養液中に添加し、細胞内シグナルの誘導を検討した。0.5 時間から 4 時間まで経時的に検討した範囲では、IL-32 の刺激による AGS 細胞における pI κ B α 、pJNK、pP38、pERK の変化は認めなかった。

3 IL-32 を誘導するシグナル

NF-kB の活性化能が低い、遺伝子改変を行った *H.pylori* (Δ cagPAI、 Δ cagE) と共培養した AGS においては、wild type の *H.pylori* と比較して IL-32 の発現が低下していることがウェスタンブロットにて示された。

IKK β の阻害薬 SC-514 を添加した場合に、*H.pylori* と共培養した AGS の IL-32 の発現に影響を与えるか検討した。SC-514 を添加すると、IL-32 の mRNA の発現が抑えられることを、real-time RT-PCR で確認した。さらに、IKK β siRNA を AGS にトランスフェクションした場合に、*H.pylori* と共培養した AGS の IL-32 の発現が減少した。

4 胃上皮細胞における IL-32 の役割

AGS IL-32 安定ノックダウン株における、IL-8 の発現を検討した。real time RT-PCR にて、AGS IL-32 安定ノックダウン株と *H.pylori* を共培養した場合の cell lysate では、コントロールの cell line と比較して、IL-8 の mRNA の発現が低下した。

続いて、IL-8 の発現が低下した AGS IL-32 安定ノックダウン株 (AGS siIL-32-7) に、同株を樹立する際に用いた psiRNA IL-32-7 の IL-32 標的部分に mutation を挿入したプラスミドを用いて IL-32 を過剰発現させ、IL-8 誘導の回復が得られるか検討した。ルシフェラーゼアッセイにて、IL-8 の発現が rescue された。

5 AGS IL-32 安定ノックダウン株における細胞内シグナル

AGS IL-32 安定ノックダウン株では、細胞内シグナルがコントロールと比較してどのように変化しているかウェスタンブロットにて検討した。AGS IL-32 安定ノックダウン株では *H.pylori* による刺激を行っても、pIkBa の発現がコントロールと比較して少なく、NF-κB の活性が低下していた。また、ルシフェラーゼアッセイにて、AGS IL-32 安定ノックダウン株 (AGS siIL-32-7) では NF-κB の活性が低下していた。

<結論>

今回の検討において、まず、ヒトの胃炎で IL-32 が発現していることを発見した。続いて *in vitro* のモデルで、IL-32 が誘導されるメカニズムを検討した。*H.pylori* の病原因子別の解析、シグナルの阻害薬や siRNA を用い、IL-32 の誘導は NF-κB を介していることを示した。さらに、IL-32 安定ノックダウン株の検討で、IL-32 が NF-κB を介して、IL-8 を誘導している可能性を示した。

ヒトの胃での IL-32 の発現は、正常胃、胃炎、胃癌の組織の免疫染色で確認され、組織の ELISA で定量的な検討を行うと正常胃 (平均 207.6pg/ml, n=12)、胃炎 (642.5 pg/ml, n=13)、胃癌 (1651.0 pg/ml, n=5) の順にその発現が増強することが分かった。正常、炎症、癌と病態が進行するにつれ、IL-32 の発現も上昇している。IL-32 の発現は病態の進行の指標として考えることができる。その一方で、マーカーとしての意味合いにとどまらず、IL-32 が病態の進行に寄与しているとも考えられる。NF-κB の活性化が *H.pylori* による胃炎、胃癌発癌に重要であることは広く知られている。今回の検討で *H.pylori* による IL-32 の誘導は転写因子 NF-κB の活性化を介することを示した。また、IL-32 が NF-κB の活性化を誘導する可能性についても示した。すなわち、IL-32 の発現が、NF-κB の活性化を増強するループを形成し、病態の進行に寄与している可能性も考えられる。

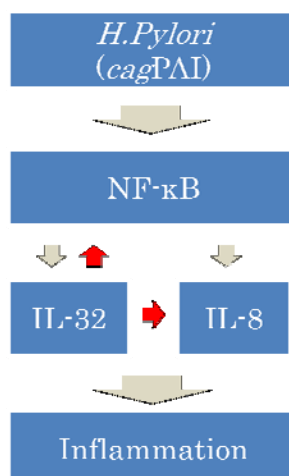


図3 *H.pylori* による IL-32 の誘導は NF-κB の活性化を介する。IL-32 のノックダウンによって NF-κB や IL-8 の発現が低下することから、炎症を亢進させるループの存在が考えられる