

論文の内容の要旨

論文題目 DSS 大腸炎における *Helicobacter pylori* CagA の役割に関する実験的検討

氏名 鈴木伸三

[背景]ヘリコバクター・ピロリ菌（ピロリ菌）は、1983年に Marshall と Warren によって胃炎患者の胃内より単離された微好気性のグラム陰性桿菌であり、世界人口の約 50%が感染していると推察される。これまでの研究によりピロリ菌の慢性感染が、萎縮性胃炎および胃潰瘍といった胃粘膜病変を引き起こし、さらに胃癌、mucosaassociated lymphoid tissue(MALT)リンパ腫などの悪性新生物とも深く関与していることが示されている。1994年世界保健機構/国際癌研究機関(WHO/IRAC)は、ピロリ菌をタバコと同様にもっとも危険度の高いグループ I の発癌因子に指定した。

ピロリ菌にはさまざまな遺伝子多型がみられ、臨床的に単離されたピロリ菌は CagA 陽性株と陰性株に大別される。胃癌の発症率が極めて高いことで知られる日本、韓国、中国などの東アジア諸国で分離されるピロリ菌は、90~95%が CagA 陽性株であるのに対して、胃癌発症率が比較的低いとされる欧米諸国で分離されたピロリ菌では、CagA 陽性株が占める割合は60%程である。疫学的調査においても、CagA 陽性ピロリ菌は陰性ピロリ菌に比べて胃癌発症の危険率が有意に高めることが示されている。

CagA 遺伝子は分子量約 130kDa の CagA タンパク質をコードしており、その *cagA* 遺伝子は、ピロリ菌のゲノム配列内の、*cagPAI*(*cag* pathogenicity island)と呼ばれる領域に存在する。*cagPAI* は水平伝播により外来性に持ち込まれた起源不明の DNA 断片であり、約 40kb に及ぶ DNA 配列の中には、*cagA* 遺伝子のほかに約 30 種の遺伝子が含まれている。菌体内で産生された CagA は、胃粘膜上皮に接着したピロリ菌からIV型分泌装置を介して胃上皮細胞に侵入する。そして細胞内に侵入した CagA には分子レベルでの様々な発癌活性が報告された

2008年になり、全身性に CagA を恒常的に発現する *cagA* トランスジェニックマウスが作成ならびに解析された。*cagA* トランスジェニックマウスでは、生後 12 週までに約半数の個体において胃上皮の過増殖による胃粘膜上皮の肥厚が観察された。さらに 72 週令まで観察を続けると一部の個体から胃癌、小腸癌、血液腫瘍が発症した。

炎症と発癌との関連は、19世紀すでにドイツの病理学者 Virchow が提唱しており、具体例として、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルスによる肝細胞癌の発症、IBD患者における大腸癌の発症などが示されている。ピロリ菌感染が、引き起こす胃炎についても胃発癌に重要な役割を果たしているものと考えられている。

ピロリ菌が引き起こす胃炎について疫学的に *cagPAI* 陽性株のピロリ菌は陰性株に比べ強い胃炎を引き起こしことがわかっており、代表的な炎症シグナルである NF- κ B 経路を活性化している。また CagA タンパクにも NF κ B 経路の活性化するとの報告がある。ただし、前述の CagA トランスジェニックマウスにおいては、各臓器にて強い炎症反応の誘導が見られていない。また、上皮癌（胃癌、小腸癌）の発症率は 72 週齢においても 3%(4/152)と高いものではなかった。そこで CagA と炎症の関連を *cagA* トランスジェニックマウスを使用して検討することとした。ピロリ菌は胃に感染し胃炎を引き起こすことから胃炎モデルにて検討することが望ましかったが、代表的な胃炎モデルである *Helicobacter felis* や *Helicobacter pylori* SS1 株の感染モデルでは、個体間の差が大きく長期観察に適さないと考えた。細胞レベルにおいて CagA は極性化上皮細胞で特徴的な機能を発揮する報告がある。また、疫学的にはピロリ菌感染と大腸ポリープの関連が指摘されている。炎症性大腸ポリポーシスの一つである CAP polyposis や大腸 MALT lymphoma ではピロリ菌除菌療法が有効との報告もある。このように大腸疾患においてもピロリ菌との関連が指摘されていることから、今回代表的な大腸炎モデルである DSS 大腸炎モデルにて検討することとした。

[方法]*cagA* トランスジェニックマウスと同腹仔(WT)に DSS を飲水させることで大腸炎を惹起し大腸において CagA と炎症刺激との関連性を検討した。それぞれ DSS を投与しない群、投与する群を作成し 4 群にて比較検討した。6 週齢のマウスに 2%DSS を自由飲水にて 4 日間投与しその後 17 日は滅菌水を飲水させた。この 21 日間を 1 サイクルとし 14 回繰り返した後 48 週齢にて安楽死させ解析した。DSS 大腸炎の重傷度を体重変化、生存曲線、大腸長の短縮、HE 染色像における病理学的スコアリングにて解析した。DSS 大腸炎にて発生した隆起性病変および dysplasia を HE 染色にて病理学的検討を行った。また得られた組織をそれぞれ Ki67 抗体、 β -catenin 抗体、p53 抗体にて免疫染色した。NF κ B シグナルを解析するために大腸組織から抽出したタンパク液を使用して I κ B α および phospho-I κ B α をウェスタンブロットにて解析した。また、phospho-Ikk 及び p65 の免疫染色を行い解析した。炎症性サイトカインについて、大腸組織より抽出した mRNA を使用し RT-qPCR にて IL-1 β と TNF α について解析した。また、*cagA* トランスジェニックマウスでは血球でも CagA が発現していることを考慮し、脾臓内より白血球を分離し血球分画を T 細胞/B 細胞、CD4/CD8 について解析した。

[結果]DSS を投与した *cagA* トランスジェニックマウスは、同腹仔(WT)に対して有意に体重が減少し病理学的スコアリングにおいてもより重傷な大腸炎を起こした。また生存曲線による解析でも有意な差を認めた。炎症を引き起こしている血球分画を解析したが *cagA* トランスジェニックマウスと同腹仔の間に有意な差は見られなかった。ウェスタンブロットによる解析では I κ B α および phospho-I κ B α の変化をみとめ、免疫組織学的染色にて phospho-Ikk の発現増加と p65 の核内移行がみられ NF κ B 経路の関与が示唆された。*cagA* トランスジェニックマウスにおいては、

dysplasia の発生率が有意に上昇し CagA が炎症と作用することで発癌活性を高めることが確認された。また、発生する dysplasia の形状は同腹仔(WT)と *cagA* トランスジェニックマウスの間で特徴がことなり、同腹仔(WT)では今までの報告通りほとんどが隆起性であったに対して、*cagA* トランスジェニックマウスでは平坦型が多くを占めていた。この特徴は p53 ノックアウトマウスに DSS を投与した際の特徴と一致するものであった。炎症性サイトカインの解析においては、DSS を投与した同腹仔(WT)と *cagA* トランスジェニックマウス間に有意な差はなかったが、DS 投与によるサイトカインの上昇が非常に軽度であったため解析ポイントが適切でなかった可能性を考え再度解析ポイントを変更して解析する予定である。

[考察]DSS を投与した *cagA* トランスジェニックマウスでは、体重変化、生存曲線、病理学的検討から大腸炎の悪化が観察され隆起性病変、dysplasia の発生も有意に高かった。発生した dysplasia には形状に差があり、*cagA* トランスジェニックマウスで平坦型が増える特徴は、p53 ノックアウトマウスの性質と類似している。このことは遺伝子上の何らかの変化が起こることで dysplasia の発生率が上昇している可能性が考えられた。*cagPAI* 陽性ピロリ菌は陰性菌と異なり上皮細胞にて免疫グロブリンのクラススイッチに必要な脱アミノ酵素 AID(activation-induced cytidine deaminase)を誘導することができる。消化管で誘導された AID には p53 などの遺伝子変異を誘導し癌化に寄与しているとの報告がある。今回観察された *cagA* トランスジェニックマウスにおける dysplasia では AID が関与している可能性が考えられた。

今回の DSS 大腸炎モデルにおける検討では、*Helicobacter pylori* タンパク質 CagA が *in vivo* において炎症刺激に対する反応性を増強していることと、慢性炎症による発癌を促進していることを示した。ピロリ菌内の *cagPAI* の存在が炎症反応の程度と強く相関しており、*cagPAI* はピロリ菌の IV 型分泌装置をコードしているものと考えられている。CagA はこの IV 型分泌装置を介して胃粘膜上皮内に侵入する。このことから、CagA が炎症に影響を及ぼしているのだと考えられてきた。しかし、*cagPAI* には *cagA* 以外にも 30 以上の遺伝子群が存在し *cagA* 以外の人工的に作りだした mutant ピロリ菌を使用しても Δ CagA と同じように炎症の増悪が見られなくなる。多くの研究はこのような mutant ピロリ菌を使用し解析を行っておりピロリ菌自体が保有する CagA 以外の病原因子が与える炎症に対する影響を排除することが出来ていなかった。分子レベルにおいては CagA が炎症を代表する NF- κ B 経路や stat3 経路を亢進させているとの報告がされている。しかしながら、*cagA* トランスジェニックマウスでは強い炎症を引き起こしておらず、*in vivo* では CagA 分子単独で炎症の惹起を認めない。そこで、考えられたのが元々何らかの炎症刺激が加わっている状態において、CagA がその刺激反応に役割を果たしているのではないかと考えられた。本研究では、初めて *in vivo* において純粋な分子としての CagA が炎症刺激に果たす役割を解析することが出来た。また、慢性炎症が発癌リスクとなることは広く知られており、胃癌においても、*Helicobacter felis* の感染モデルや、スナネズミを用いたピロリ菌の持続感染モデルにおいて慢性炎症が発癌を導いていることが確認されている。DSS 大腸炎モデルでは、DNA 傷害剤である AOM(azoxymethane)を投与後の DSS 飲水でも大腸癌を高率に発生させることができ、大腸癌モデルおよび炎症発癌モデルとして有名であるが、発癌剤である AOM を投与せず DSS 大腸炎として長期観察した報告はこれまでになかった。本研究において有名な AOM+DSS 大腸炎のモ

デルではなく、DSS 単剤のモデルを選らんだ理由として実際の胃癌は数十年のという長い慢性炎症を経て発症することから、長期にわたる炎症を引き起こすことでより実際の発癌プロセスを模倣できるのではないかということと、発癌剤の使用自体が生理的な条件とは言えないことを考慮したためである。cagA トランスジェニックマウスの持つ発癌活性の炎症刺激を加えることで発癌活性が増強することが明らかになった。また、同腹仔(WT)にも発癌がみられていることから炎症刺激による発癌を CagA が促進しているとも言える。DSS という刺激により引き起こされた炎症が CagA 存在下で促進されていることを、病理学的に確認することができ NF- κ B 経路の活性化が関与していることがわかった。

胃癌は細菌感染およびそれがもたらす炎症の直接的な関与がはじめて示されたヒト癌であり、ピロリ菌タンパク質 CagA と炎症との関連の解明が進むことにより、その成果が臨床における胃癌治療に役立つことが期待されます。