

Helicobacter pylori とヒト胃癌細胞株 MKN45 の接着様式

学位論文内容の要旨

[緒言] *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 感染によって慢性的な胃粘膜炎症が惹起される。経口的に胃に到達した*H. pylori*が胃粘液層で増殖し、粘液層を通過して上皮細胞へ接着することにより感染が成立する。その後、菌-上皮細胞の相互作用が起こり病態が形成されていく。*H. pylori*の接着は感染成立の第一段階として重要なステップであり、*H. pylori*は種々の分子を介して胃上皮細胞へ接着することが報告されている。最近、*H. pylori*から胃粘膜上皮へ様々な分子を転送する機構としてType IV secretion machineryが報告されている。*H. pylori*が接着した後、上皮細胞から炎症性サイトカインであるInterleukin-8 (IL-8) が分泌され、好中球が遊走し、活性化され、胃粘膜傷害の一因となっている。以上のような*H. pylori*の接着、その後の上皮細胞との相互作用により種々の病態が形成される。したがって、*H. pylori*の接着を解析することは非常に重要と思われる。*H. pylori*の接着様式について、現在までに電子顕微鏡を使用した超微形態学的報告があるが、*H. pylori*菌株の差違による接着様式の変化については検討されていない。本研究において、標準株(ATCC43504株)あるいは*cag*PAIを部分的に欠損した臨床分離株を胃上皮細胞とco-cultureし、接着の超微形態的な差違とIL-8の産生量の差違を電子顕微鏡、およびEnzyme linked immunosorbent assay (ELISA) を用いて検討した。

[方法および結果] *H. pylori*の胃上皮細胞への接着を解析するために、ヒト胃癌細胞株であるMKN-45細胞と*H. pylori*標準株ATCC43504株と*cag*PAIの欠損を認めた4種類の臨床分離株を4時間co-cultureし、接着させた。PCR法とSouthern blot法により、*cagA*, *cagE*, *cagG*, *cagI*, *cagM*遺伝子の有無について検討した結果、ATCC43504株は各遺伝子を全て保持していたが、Strain #1は*cagG*, *cagI*遺伝子を、Strain #6は*cagA*, *cagG*遺伝子を、Strain #42は*cagA*, *cagE*, *cagG*遺伝子を、Strain #273は*cagA*, *cagE*, *cagG*遺伝子を欠損していた。IL-8の産生量をELISAを用いて測定した結果、ATCC43504株の接着においてIL-8分泌は亢進し、他の*cag*PAI構成遺伝子の欠損株に比べて有意に高値を示した。co-culture後のMKN-45細胞を電子顕微鏡で観察し、接着様式をAdhesive pedestal, Indentation, Fibrillae-like filamentを介した接着の3種類に分類した。ATCC43504株はAdhesive pedestalの隆起、Indentationの陥凹共に高度であった。Strain#1, Strain #6は中等度の隆起、陥凹を、Strain #42, Strain #273は軽度の隆起、陥凹を認めるのみであった。また、ATCC43504株にのみ、Fibrillae-like filamentを介した接着様式を認めた。

[考察] *H. pylori*が胃上皮細胞へ接着した後、菌-上皮細胞の相互作用が起こり、種々の因子が*H. pylori*から上皮細胞へ転送されて、上皮細胞の細胞膜の構造の変化やサイトカインの産生が起こり、その結果として様々な病態が形成される。いくつかの細菌には接着の際に、針状のシリンジを形成し、宿主細胞の細胞質内へ直接に細菌成分を転送するType III secretion machinery, Type IV secretion machineryと呼ばれるシステムが存在し

ている。最近、*H. pylori*が胃上皮細胞へ接着する場合には、Type IV secretion machineryを介在することが報告された。*H. pylori*には、菌体外より挿入されたと推定されている *cag* PAIと呼ばれる約40kbの計41個の open reading frame (ORF) を持つ遺伝子群が存在するが、*cag* PAIにおける6個の蛋白 (*cagE*, *cagT*, HP0524, 0525, 0527, 0528) が Type IV secretion machineryの形成に関係すると報告されている。

*H. pylori*が胃上皮細胞に接着してType IV secretion machineryが形成された後、細胞内情報伝達に関わる、少なくとも2つの経路の存在が推定されている。CagA蛋白が挿入されて、宿主細胞のリン酸化酵素によりCagA上のチロシン残基がリン酸化され、引き続き、細胞骨格蛋白の重合が起こり、上皮細胞の構造が変化する。二つめとして、I kappa-B(IκB)がIκB-kinase(IKK)によりリン酸化されて、転写因子Nuclear factor-κB(NF-κB)が活性化され、核内へ移動し、その結果、IL-8が誘導される経路がある。

*H. pylori*と胃上皮細胞との接着について、超微形態は現在までに電子顕微鏡を使用した様々な報告がされている。Adhesive pedestalは細胞骨格蛋白の重合が起こり、上皮細胞の構造が変化するにより形成される。また、細胞膜がカップ状に周囲より陥凹している接着Indentationを認める。Fibrillae-like filamentの構造は*H. pylori*により産生された物質であるということが報告されている。

本研究の結果、ATCC43504株の接着様式はAdhesive pedestal, Indentation共に他の*cag* PAI部分欠損株と比べて、接着部分における細胞膜の隆起および陥凹の程度が強いことが明らかになった。また、ATCC43504株が繊維状の構造物 (Fibrillae-like filament) のネットワークを介して細胞膜とmicrovilliに接着する形態が観察された。しかし、この構造物は他の*cag* PAI部分欠損株においては観察されなかった。*cagG*遺伝子の欠損が*cag* PAI部分欠損株に共通し、ATCC43504株のみにFibrillae-like filamentを認めた結果より、Fibrillae-like filamentの形成と*cagG*遺伝子が何らかの関係を有していると考えられた。

IL-8産生においても*cag* PAI部分欠損株は低値であり、ATCC43504株のみ、有意に高値を示していることより、*cagG*遺伝子はIL-8産生にも関係していると考えられた。全菌株にAdhesive pedestal, Indentationの接着が認められたが、ATCC43504株と比べて*cag* PAI部分欠損株は隆起、陥凹の程度が弱かった。このことより、Fibrillae-like filamentの存在が重要な役割を果たし、そして、細胞骨格蛋白の重合による上皮細胞の構造の著明な変化をおこす可能性が推定された。以上より、*cag* PAIに何らかの欠損がある場合には、異常な接着様式を示し、IL-8産生が低下することが推定された。

[結語]

1. ATCC43504株および*cag* PAI部分欠損株によるヒト胃癌細胞 (MKN45) への接着様式の違いについて電子顕微鏡を用いて検討した。
2. *cag* PAIの欠損株はAdhesive pedestal, Indentationの程度が弱く、さらにFibrillae-like filamentの形成が認められなかった。加えてIL-8産生能が弱かった。
3. *cagG*遺伝子が存在するATCC43504株のみに、細菌-細胞間にFibrillae-like filamentを認めた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博
副 査 教 授 皆 川 知 紀
副 査 教 授 阿 部 和 厚

学 位 論 文 題 名

Helicobacter pylori とヒト胃癌細胞株 MKN45 の接着様式

*H. pylori*の接着は感染成立の第一段階として重要なステップである。*H. pylori*の接着様式について、現在までに電子顕微鏡を使用した超微形態学的報告があるが、*H. pylori*菌株の差違による接着様式の変化については検討されていない。本研究においてATCC43504株あるいは*cag* pathogenicity island (PAI) 部分欠損株をヒト胃癌培養細胞とco-cultureし、接着の超微形態的な差違とIL-8の産生量の差違を電子顕微鏡、およびELISAを用いて検討した。ヒト胃癌細胞株であるMKN-45細胞と*H. pylori*標準株ATCC43504株と*cag* PAIの欠損を認めた4種類の臨床分離株を4時間co-cultureし、接着させた。PCR法とSouthern blot法により、*cagA*, *cagE*, *cagG*, *cagI*, *cagM*遺伝子の有無について検討した結果、ATCC43504株は各遺伝子を全て保持していたが、Strain #1は*cagG*, *cagI*遺伝子を、Strain #6は*cagA*, *cagG*遺伝子を、Strain #42は*cagA*, *cagE*, *cagG*遺伝子を、Strain #273は*cagA*, *cagE*, *cagG*遺伝子を欠損していた。IL-8の産生量をELISAを用いて測定した結果、*cag* PAI部分欠損株は、ATCC43504株に比べてIL-8産生能が低下していた。電子顕微鏡で観察した結果、ATCC43504株は細胞膜の隆起、陥凹共に高度であった。Strain#1, Strain #6は中等度の隆起、陥凹を、Strain #42, Strain #273は軽度の隆起、陥凹を認めるのみであった。また、ATCC43504株にのみ、Fibrillae-like filamentを介した接着様式を認めた。以上より*cag* PAI部分欠損株の接着はATCC43504株と比べて細胞膜の隆起および陥凹の程度が弱く、また、*cag* PAI部分欠損株はFibrillae-like filamentの形成を認めなかった。加えてIL-8産生能

が弱かった。以上より、Fibrillae-like filamentの存在がIL-8産生に関係し、さらに間接的に細胞骨格蛋白の重合による上皮細胞の構造の著明な変化にも役割を果たす可能性が推定された。口頭発表に際し、副査の阿部教授より、十分に評価しうる電子顕微鏡写真であるとのコメントの後、細胞表面の一部に*H.pylori*が偏って接着している理由、Fibrillae-like filamentはType IV secretion machineryと同一か、Fibrillae-like filamentの長さは一定であるかについて質問があったが、申請者は細胞がシャーレにシート状に増殖するため接着面が限定すること、Type IV secretion machineryと同一と考えられ、その場合には長さに規定はなく、Fibrillae-like filamentの長さが一定ではないことに矛盾しないが、今後は免疫透過電子顕微鏡によりFibrillae-like filamentがType IV secretion machineryであることを確認する必要があることを回答した。次に、副査の皆川教授より、co-cultureの時間について、細胞に接着していない*H.pylori*は排除できているか、Fibrillae-like filamentはin vitroでの培養時に認められるのかについての質問があり、申請者は文献によると接着後の細胞膜構造の変化は3時間以上たたないと起こらないため本研究では4時間にしたこと、遠心分離により接着していない*H.pylori*を除いていること、接着前の*H.pylori*にはFibrillae-like filamentを認めないことを回答した。また、主査の浅香教授より、*H.pylori*における*cag* PAI欠損の頻度および疾患特異性について、胃癌細胞を用いている理由、*cagG*の欠損がIL-8産生と関係しているのかについての質問があり、申請者は、本研究では*cag* PAIを3%が欠損し、本邦において文献上6%が欠損し、疾患特異性を認めないこと、基礎的研究にて胃癌培養細胞のIL-8産生能について確認しているため胃癌細胞を代用したこと、何らかの関連性が考えられることを回答した。

本研究は、*cag*PAIと接着形態の関連について科学的に報告したという点で高く評価され、今後は免疫透過電子顕微鏡による*H.pylori*接着とType IV secretion machineryの関わりの検討が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。