

学位論文題名

Effects of *Helicobacter pylori* CagA Protein
on the growth and survival of B lymphocytes,
the origin of MALT lymphoma

(ヘリコバクター・ピロリ菌 CagA 蛋白がBリンパ系細胞の増殖と
生存に与える影響, MALT リンパ腫発症との関連性についての考察)

学位論文内容の要旨

【背景】

上部消化管におけるヘリコバクター・ピロリ菌の慢性感染は萎縮性胃炎、胃・十二指腸潰瘍、胃癌、胃 MALT リンパ腫(mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma)の一因と考えられている。ヘリコバクター・ピロリ菌には大別すると *cagA* 遺伝子陽性株と陰性株が存在し、*cagA* 陽性のヘリコバクター・ピロリ菌は陰性株と比較してより重症の胃炎をひき起こすとされ、また、*cagA* 陽性株と胃・十二指腸潰瘍、胃癌との強い関連性も指摘されている。

胃上皮細胞において、*cagA* 遺伝子産物である CagA 蛋白はピロリ菌菌体から接触した胃上皮細胞内へ IV 型注入装置を介して注入されることが示されている。注入された CagA は Src ファミリーキナーゼによりチロシンリン酸化を受け、チロシンリン酸化依存的に SHP-2 と結合する。この結合により SHP-2 が活性化され、細胞に hummingbird 表現型とよばれる形態変化をひき起こすことが報告されている。hummingbird 表現型は HGF などの増殖因子によって誘導される形態変化と類似することから、胃上皮細胞に対して CagA は細胞増殖促進的に働き、それが癌化に至るひとつの要因となる可能性が示唆されている。

ところで、胃 MALT リンパ腫患者においてヘリコバクター・ピロリ菌の感染率が高いことは以前から指摘されており、特に *cagA* 陽性率が非常に高いことも報告されている。本研究で申請者は MALT リンパ腫と *cagA* 陽性ヘリコバクター・ピロリ菌の関連性に注目し、MALT リンパ腫の起源とされる B リンパ系細胞に *cagA* 遺伝子を導入することにより、CagA が B 細胞の増殖、生存に与える影響について検討した。

【方法】

実験にはヘリコバクター・ピロリ菌 NCTC 11637 株由来の野生型 CagA(WT-CagA)、カルボキシ末端側の 5 ヶ所のチロシンリン酸化部位が保存されアミノ末端側の 57 から 587 番までのアミノ酸配列を欠損したミュータント(CagA Δ N)、WT-CagA のカルボキシ末端側の 5 ヶ所のチロシンリン酸化部位をアラニンに置換したチロシンリン酸化耐性ミュータント(PR-CagA)を用いた。

これらの野生型ならびに変異 CagA をコードする遺伝子をインターロイキン-3 依存性のマウスプロ B 細胞株 BaF3 由来 BaF/6-1 細胞に遺伝子導入し、CagA の生物学的活性について解析した。

【結果と考察】

まず、WT-CagA、CagA Δ N 発現細胞株を作成するため BaF/6-1 細胞へ発現ベクター (pSP65SR α) 導入を試み、WT-CagA 発現細胞株は得られなかったが、CagA Δ N 発現細胞株を 2 クローン得た。一方、胃上皮細胞由来株 (AGS) に CagA Δ N、WT-CagA を遺伝子導入したところ、CagA Δ N は WT-CagA と同程度の hummingbird 表現型をひき起こすことが示されたことから、BaF/6-1 由来 CagA Δ N 発現細胞株の解析を行った。

抗リン酸化チロシンウエスタンブロットにて CagA Δ N 発現株における CagA のチロシンリン酸化を認め、B 細胞においても胃上皮細胞内の CagA と同様、細胞内の CagA がチロシンリン酸化を受けることが示された。また、BaF/6-1 細胞親株と比較して CagA Δ N 発現細胞株では細胞増殖の遅延を認め、これら細胞株のフローサイトメトリー解析を行ったところ細胞周期の G1 期から S 期への移行遅延を認めた。

BaF/6-1 細胞の増殖因子であるインターロイキン-3 の増殖シグナルは JAK/STAT 系を介して *c-fos*、*c-myc* 遺伝子発現へ至るとされており、CagA Δ N 発現細胞株における *c-fos*、*c-myc* 遺伝子のプロモーター活性をルシフェラーゼアッセイにて測定したところ、これら遺伝子のプロモーター活性の低下を認めた。同様に CagA Δ N 発現細胞株において STAT 依存性の *β -casein* 遺伝子プロモーター活性の低下も認めた。また、BaF/6-1 細胞親株に WT-CagA、CagA Δ N、PR-CagA をそれぞれ transient transfection 法にて導入したところ、*c-fos*、*c-myc*、 *β -casein* 遺伝子プロモーター活性の低下を認めた。したがって B 細胞における細胞増殖抑制効果は CagA Δ N ミュータント固有の活性ではなく、WT-CagA にも同様に認められる活性であると考えられた。さらに、チロシンリン酸化耐性の PR-CagA 導入によっても WT-CagA と同等のプロモーター抑制効果を認めたことから、B 細胞における CagA の増殖シグナル抑制活性はそのチロシンリン酸化に非依存的であると考えられた。以上より、B 細胞では CagA が JAK/STAT 系を抑制することで細胞増殖抑制活性を示すと考えられた。

一方、CagA Δ N 発現細胞株では p53 蛋白の発現低下を認め、これらの細胞株でヒドロキシウレアによる p53 依存性アポトーシスの誘導が抑制された。また、CagA Δ N 発現細胞株において p53 依存性の *MDM2*、*pRGC* 遺伝子プロモーター活性の低下を認め、BaF/6-1 細胞親株に WT-CagA、CagA Δ N、PR-CagA を transient transfection 法にて導入した場合にもやはり *MDM2*、*pRGC* 遺伝子プロモーター活性の低下を認めた。さらに、CagA Δ N 発現細胞株における p53 mRNA 発現をリアルタイム PCR 法にて解析したところ、その発現低下を認めたことから、CagA により p53 の発現がその転写レベルで抑制されていると考えられた。

B リンパ球系細胞に対する CagA の細胞増殖抑制と p53 発現抑制活性はこれまで胃上皮細胞においては報告されていない生物活性であり、また、胃上皮細胞における CagA のチロシンリン酸化依存的な活性とは対照的に、B 細胞における CagA の生物活性はチロシンリン酸化に非依存的であった。したがって、CagA はチロシンリン酸化依存的ならびに非依存的な活性を有し、CagA の生物活性は細胞種によって異なってくるものと考えられた。

【結語】

CagA による B リンパ系細胞の増殖抑制は、ヘリコバクター・ピロリ菌に対する生体の免疫担当細胞の反応を抑制し、ヘリコバクター・ピロリ菌の慢性感染にとって有利に働く可能性が考えられた。また、CagA は B リンパ系細胞の p53 依存性アポトーシスを抑制することにより、本来は排除されるべき異常 B 細胞の生存を可能にし、その残存異常細胞の中から MALT リンパ腫が発症する可能性が考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 今 村 雅 寛
副 査 教 授 浅 香 正 博
副 査 教 授 武 藤 学
副 査 教 授 畠 山 昌 則

学 位 論 文 題 名

Effects of *Helicobacter pylori* CagA Protein on the growth and survival of B lymphocytes, the origin of MALT lymphoma

(ヘリコバクター・ピロリ菌 CagA 蛋白が B リンパ系細胞の増殖と
生存に与える影響, MALT リンパ腫発症との関連性についての考察)

申請者は胃 MALT リンパ腫と *cagA* 陽性ヘリコバクター・ピロリ菌慢性感染との関連性に注目し、MALT リンパ腫の起源とされる B リンパ系細胞に *cagA* 遺伝子を導入することにより、CagA 蛋白が B 細胞の増殖、生存に与える影響について検討した。CagA 発現によって増殖シグナル伝達系における JAK/STAT 系の標的遺伝子のプロモーター活性の低下を認め、細胞増殖の遅延を認めた。一方、CagA 発現細胞株では *p53* mRNA の発現低下、*p53* 蛋白の発現低下を認め、ヒドロキシウレアによるアポトーシスの誘導が抑制された。B リンパ系細胞に対する CagA の細胞増殖抑制と *p53* 発現抑制活性は、胃上皮細胞における CagA のチロシンリン酸化依存的な活性とは異なり、チロシンリン酸化に非依存的であった。これら CagA の生物活性が MALT リンパ腫発症に関わる可能性が考えられた。

口頭発表後、副査の武蔵教授より CagA 導入によりリンパ系細胞において形態変化を認めたかどうか、CagA 発現細胞は長期培養中にアポトーシスを起こしてくるのか、*p53* の発現低下は細胞内セラミドの活性との関連性が考えられるのかについての質問があった。申請者は B 細胞では形態変化を認めず、培養中に親株と比較してアポトーシスの増加は認められなかったと回答した。セラミドとの関連については今回の実験では検討していないため関連性の否定はできないと回答した。副査の畠山教授よりなぜ野生型 CagA の stable clone が得られなかったのか、また、CagA が免疫担当細胞の JAK/STAT 系を抑制して増殖抑制を引き起こすこと以外に、胃上皮細胞の JAK/STAT 系抑制によるインターフェロンシグナル抑制によりピロリ菌の慢性感染にとって有利に働いている可能性は考えられないかとの質問があった。申請者は野生型 CagA の stable clone が得られなかった原因として野生型 CagA が細胞に対して毒性を持っている可能性、あるいは DNA に ATTTA 配列が多く含まれているため mRNA の不安定性が関係している可能性が考えられること、また、文献的に報告はないものの、JAK/STAT 系の抑制によるインターフェロンシグナル伝達抑制がピロリ菌の慢性感染にとって有利に働く可能性も考えられ得ると回答した。副査の浅香教授より野生型 CagA とアミノ末端側欠失変異 CagA の機能的な差異はあるのか、B 細胞にピロリ菌から CagA が注入されることを示す証拠はあるのか、今回の実験で示されたことは実際に体内で起きている現象かどうかを明らかにするには今後どのような実験が必要かとの質問があった。

申請者は、今回の B 細胞に関する実験では野生型と変異型の明らかな機能的な差異は認めず、また、CagA のアミノ末端側が既知の蛋白の機能ドメインとの相同性は認めていないが、例えば、ピロリ菌から細胞内へ注入される際に必要であるなど何らかの機能を有している可能性は考えられる。B 細胞への CagA の注入に関しては感染実験など、実験的に示されたとの報告はないが、胃炎、胃潰瘍など上皮が障害を受けた状態ではピロリ菌と B 細胞が接触する可能性はあると考えて実験を行った。しかし、今後感染実験などにより実際に B 細胞へ CagA が注入されることを示すことは非常に重要であると回答した。主査の今村教授より MALT リンパ腫発症のメカニズムと今回の実験結果との関係、免疫担当細胞の反応の抑制とは具体的にどういうことなのか、MALT リンパ腫細胞が産生する抗体は CagA に対する抗体であるのか、また抗体の量と病態との関連性はあるのかどうか、本来は排除されるべき異常 B 細胞の残存が MALT リンパ腫発症と関連するとのことだが、それはアポトーシス抑制によるものかとの質問があった。申請者は MALT リンパ腫発症において p53 の発現抑制によるアポトーシス抑制が重要であると考えられ、また、免疫担当細胞の増殖抑制による免疫反応の抑制がピロリ菌の慢性感染に有利に働くと考えられると回答した。MALT リンパ腫の産生する抗体については文献的には CagA を認識するものではなく、また、抗体量と病態の明らかな関連性を示す報告はないと回答した。

本研究は B 細胞に対して CagA 蛋白が増殖抑制、アポトーシス抑制活性をもち、MALT リンパ腫発症のうえで重要に働く可能性を持つことを示したことで高く評価され、今後のさらなる研究と将来の臨床応用が期待された。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断した。