

学位論文題名

*Helicobacter pylori* 感染胃粘膜の  
Smad5 mRNA 発現の臨床的検討

学位論文内容の要旨

緒言

*Helicobacter pylori* (以下 *H.pylori*) 感染は我が国においては 6000 万人以上が罹患していると推測される, 病原性を有する細菌では感染頻度の高い細菌の一つである。

*H.pylori* 感染から発癌に至るまでの胃上皮細胞の細胞動態についてのこれまでの報告では, *H.pylori* 感染初期には増殖, アポトーシスは共に亢進しているが充分制御されている状態であり, 感染後ある時点からそのバランスが崩れ, 脱制御が起こる。この脱制御こそが胃発癌において重要な過程であると考えられる。したがって, *H.pylori* 感染の持続による胃上皮細胞の増殖およびアポトーシスに關与する細胞内情報伝達経路, さらにその相互作用を明らかにすることによって発癌への脱制御の分子機構が明らかになると推測される。

我々は *H.pylori* が Smad5 mRNA の発現増強を介して AGS などの胃癌細胞株のアポトーシスを誘導していることを示した。今回 *H.pylori* 陽性者及び陰性者の生検胃粘膜での Smad5 mRNA 発現を real-time PCR で測定し, その発現と組織学的特徴の關連を検討した。

対象と方法

1) 培養細胞と *H.pylori* の co-culture

co-culture には *H.pylori* ATCC 43504 株と胃癌細胞株 AGS 細胞を用いた。AGS : *H.pylori* を 1 : 100 となるよう co-culture を行い, その後, *H.pylori* を除去し, AGS 細胞から RNA を抽出した。

2) Northern blot analysis

ヒト Smad5 cDNA から作成したビオチン標識プローブを用いて Total RNA と Northern blot analysis を行った。陽性コントロールとしてビオチン標識ヒト  $\beta$ -actin プローブを用いた。

3) 生検組織と組織学的検討

2002 年 12 月から 2003 年 10 月までに北海道大学病院にて上部消化管内視鏡検査を受けた者のうち, 生検および Smad5 mRNA の測定について同意の得られた 38 名を対象とした。

*H.pylori* 感染の有無は, 迅速ウレアーゼ試験, 尿素呼気試験, 生検組織の検鏡で確認し, いずれか 1 法でも陽性のものは *H.pylori* 感染陽性とし, 3 法とも陰性のものを *H.pylori* 感染陰性とした。 *H.pylori* 陰性者 5 名と陽性者 33 名であった。この 38 名に対し, 内視鏡下に非病変部の胃体部大弯よりなるべく近くの部分より 5 カ所生検を行い, 3 材から RNA を抽出した。1 材は *H.pylori* の培養に用い, 残りの 1 材は組織学的検討に用いた。この組織学的評価から RNA を抽出した検体の組織学的評価を推察した。組織学的検討は Up-dated Sydney System に従って行った。

4) RT-PCR, Real-time PCR

Smad5 mRNA 発現の定量的測定には real-time PCR にて行った。コントロールにおける Smad5/ $\beta$ -actin mRNA の測定値を基準とし、各サンプルの測定値を算出した。

## 結果

### 1) 胃癌細胞株 AGS における Smad5 mRNA 発現

Northern blot analysis では *H.pylori* と co-culture した AGS における Smad5 mRNA は発現し始め、12 時間以降で発現亢進が明らかとなり、24 時間でもっとも強く発現を認めた。Real-time PCR による測定では *H.pylori* と 24 時間 co-culture した AGS 細胞における Smad5 mRNA 発現は 2.40 倍と有意に亢進していた ( $p < 0.01$ )。本法を用いることにより、Smad5 mRNA 発現を定量的に評価できることが明らかとなった。

### 2) 生検組織での Smad5 mRNA 発現

*H.pylori* 陰性者 5 名と陽性者 33 名の胃生検粘膜での Smad5 mRNA 発現について real-time PCR で検討したところ、*H.pylori* 陽性者の Smad5 mRNA 発現は 1.78 倍と有意に亢進していた ( $p < 0.05$ )。

### 3) *H.pylori* 陽性胃粘膜における Smad5 mRNA 発現と疾患

*H.pylori* 陽性者 33 名（胃潰瘍患者 4 名、十二指腸潰瘍患者 7 名、胃癌患者 6 名、慢性胃炎患者 16 名）における各疾患群間での Smad5 mRNA 発現には有意差は認めなかった。

### 4) *H.pylori* 陽性胃粘膜における Smad5 mRNA 発現と組織学的評価

*H.pylori* 陽性者 33 名から得た胃生検粘膜での Smad5 mRNA 発現を real-time PCR で測定し、Up-dated Sydney System による単核球浸潤による慢性炎症、多核球浸潤による炎症活動度、腺萎縮の 3 項目についての組織学的評価との関係について検討したところ、慢性炎症および炎症の活動度と Smad5 mRNA 発現に相関は認めなかったが、腺萎縮と Smad5 mRNA 発現の検討では、萎縮が進行すると Smad5 mRNA 発現が亢進することが明らかになった ( $p < 0.05$ )。

## 考察

今回、生体内においても *H.pylori* 感染が胃上皮細胞の Smad5 mRNA 発現を亢進させ、また、Smad5 mRNA 発現亢進と胃粘膜の萎縮に相関があることを示した。これまでの報告から、*H.pylori* 感染初期にはアポトーシスの亢進によって上皮細胞増殖の亢進が生じ、上皮の組織構築が保たれていると考えられているが、過剰なアポトーシスや萎縮の発生につながるのではないかと考えられている。萎縮胃粘膜が胃発癌の高危険母地であることはよく知られており、胃粘膜萎縮に関わる細胞内情報伝達系の検討は *H.pylori* 感染による発癌の予防戦略を構築する上で重要な知見を提供する。*H.pylori* 感染により発癌に至る機序として 1)アポトーシスの亢進により、細胞回転を亢進させ、細胞増殖の調節を攪乱し、細胞に変異が生じるリスクを増加させること、2)多形核白血球などの炎症細胞から産生されるラジカルの影響、3)抗酸化作用物質の胃内分泌の抑制、4)胃粘膜萎縮により酸分泌低下が生じ、それにより増殖した嫌気性菌などによるニトロソ化合物の生成などが考えられている。*H.pylori* 持続感染では Smad5 発現亢進を介して胃上皮細胞のアポトーシスが亢進し、このアポトーシスの亢進が胃粘膜萎縮の進展に関与している可能性が高いと考えられる。

## 結語

- 1) *H.pylori*、特に CagPAI 陽性 *H.pylori* が Smad5 mRNA の発現亢進を介して AGS などの胃癌細胞株のアポトーシスを誘導していた。
- 2) 生体内においても *H.pylori* 感染により胃上皮細胞の Smad5 mRNA の発現が亢進していた。
- 3) Smad5 mRNA 発現亢進と胃粘膜の萎縮に相関があることを示した。

4) *H.pylori* 持続感染では Smad5 発現亢進を介して胃上皮細胞のアポトーシスを誘導し、胃粘膜萎縮の進展に関与する可能性が示唆され、その直接証明が今後の検討課題である。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 今 村 雅 寛

副 査 教 授 長 嶋 敏 郎

学 位 論 文 題 名

## *Helicobacter pylori* 感染胃粘膜の

## Smad5 mRNA 発現の臨床的検討

*Helicobacter pylori* 持続感染においては胃粘膜萎縮が進行し、その過程で胃上皮細胞の増殖とアポトーシスの均衡が破綻し発癌母地となると推定されている。胃上皮細胞の増殖とアポトーシスを介在する細胞内情報分子を明らかにし、その接点を明らかにすることは感染胃粘膜発癌過程の検討に重要であると考えられる。*H.pylori* によるアポトーシスの誘導についての細胞内情報伝達経路は十分には明らかにされていない。これまでの当教室での研究では*H.pylori* がTGF- $\beta$  familyの転写因子であるSmad5 mRNAの発現亢進を介してAGSなどの胃癌細胞株のアポトーシスを誘導していることを報告した。本研究では胃生検粘膜におけるSmad5 mRNA発現量測定法を確立し、その発現量と組織学的特徴の関連を比較検討することを目的とした。最初に胃癌細胞株AGSを*H.pylori* 標準株と24時間co-cultureを行いSmad5 mRNA発現量を測定したところAGS単独に比べ2.40倍と有意に亢進していた ( $p < 0.01$ )。先に行っていたNorthern blot法での検討とほぼ同様結果であり、より少量のサンプルを用いてreal-time PCRによるSmad5 mRNA発現の定量的測定法が確立され、胃生検粘膜におけるSmad5 mRNA発現の検討が可能となった。次に生検胃粘膜におけるSmad5 mRNA発現量をreal-time PCRにて検討した。*H.pylori* 陰性者胃粘膜のSmad5 mRNA発現を対照とし、*H.pylori* 陽性者胃粘膜のSmad5 mRNA発現量は1.78倍と有意に亢進していった ( $p < 0.05$ )。次に各疾患群間でのSmad5 mRNA発現量について検討した。*H.pylori* 陰性者のsmad5 mRNA発現量を対照とし、慢性胃炎患者の胃生検粘膜でのSmad5 mRNA発現は1.62倍、胃潰瘍患者では1.46倍、胃癌患者では2.09倍、十二指腸潰瘍患者では1.80倍と*H.pylori* 陰性者に比較し高値を示す傾向があったが、統計学的な有意差は認めなかった。次に*H.pylori* 陽性胃粘膜におけるSmad5 mRNA発現とUp-dated Sydney Systemによる単核球浸潤による慢性炎症、多核球浸潤による炎症活動度、腺萎縮の組織学的評価の関

連性について検討した。*H.pylori* 陰性者のsmad5 mRNA発現量を対照とし、慢性炎症スコア1点群(8名)のsmad5 mRNA発現は1.61倍、2点群(13名)では1.70倍、3点群(12名)では1.98倍とスコアが増加するとSmad5 mRNA発現が亢進する傾向があったが、有意差は認めなかった。炎症活動度スコア1点群(13名)のsmad5 mRNA発現は1.69倍、2点群(16名)では1.71倍、3群(4名)では2.37倍と活動度が高いとSmad5 mRNA発現が亢進する傾向があったが、有意差は認めなかった。腺萎縮スコア0点群(6名)のsmad5 mRNA発現は1.25倍、1点群(13名)では1.58倍、2点群(11名)では2.10倍、3点群(3名)では2.53倍で、0点群と2点群、0点群と3点群間にSmad5 mRNA発現の有意差を認め(p<0.05)、萎縮が進行するとsmad5 mRNA発現が亢進することが示された。

口頭発表に際し、副査の長嶋教授より、Smad5蛋白発現とアポトーシスの関係についての質問があった。申請者は、Smad5の良い抗体がなく免疫染色など蛋白の検討は行っていないが、*H.pylori* 感染によって亢進したSmad5 mRNA発現をsiRNAにより抑制すると、誘導されていたアポトーシスが抑制されることから、直接証明はできていないがSmad5蛋白がアポトーシスを誘導すると推察していると回答した。次に副査の今村教授より、*H.pylori* 感染においてSmad5発現と発癌の関係、Smad5の臨床的意義についての質問があった。申請者は、今回の検討では*H.pylori* 感染によりアポトーシスが亢進し、萎縮に至ると推測される。また、有意ではなかったが炎症によってもSmad5 mRNA発現が亢進した。*H.pylori* 感染により発癌に至る機序として、アポトーシスの亢進により細胞回転が亢進し細胞増殖の調節を攪乱し細胞に変異が生じるリスクを増加させることや、炎症細胞の産生するラジカルの影響等が考えられると回答した。また、萎縮粘膜では胃上皮細胞の増殖とアポトーシスのバランスがある程度保たれているが、ある時点でSmad5発現亢進が停止し、アポトーシスと増殖の脱制御が起こり発癌にいたることが推測され、この脱制御の時点が*H.pylori*除菌により胃発癌を予防する時期と推察すると回答した。最後に主査の浅香教授より、今後検討すべき課題についての質問があった。申請者は、今後、*in situ* hybridizationやknock outマウスの作成やSmad5の上流・下流の細胞内情報分子の解明など検討が課題であると回答した。

本研究は、*H.pylori* 持続感染ではSmad5 mRNA発現量亢進を介して胃上皮細胞にアポトーシスを誘導し、胃粘膜萎縮の進展に関与する可能性を示唆したものであり、*H.pylori* 持続感染による胃上皮細胞の増殖およびアポトーシスに関与する細胞内情報伝達経路やその相互作用、さらには発癌の分子機構解明の出発点となることから高く評価された。

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単位取得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。