

学 位 論 文 題 名

*Helicobacter pylori* の CagA チロシンリン酸化モチーフ  
構造と SHP-2結合能の胃癌株と十二指腸潰瘍株による検討

学位論文内容の要旨

[目的と背景]

欧米では *H. pylori* 感染者の約 60 %が CagA 陽性株であり, CagA 陰性 *H. pylori* 感染者より胃癌発生率が約 6 倍高いと言われているが, 日本では胃癌や十二指腸潰瘍患者から分離される *H. pylori* はほぼ 100 % CagA 陽性である. 発癌に関連する病原因子としての CagA 蛋白, 特にチロシンリン酸化モチーフの個数と構造および SHP-2 結合能の関連が分子生物学的研究から示唆されているが, 臨床的に発癌との関連は明らかになっていない.

申請者は CagA 陽性で胃癌発症の低リスク疾患である十二指腸潰瘍 *H. pylori* の CagA 蛋白と胃癌 *H. pylori* の CagA 蛋白の発現, チロシンリン酸化モチーフ数と構造, SHP-2 結合能との関連を検討することによって CagA 蛋白と胃癌の関連を臨床的に明らかにしようと試みた.

[対象と方法]

1) 患者と菌株

十二指腸潰瘍 *H. pylori* 8 株, 胃癌 *H. pylori* 8 株を対象とし, 患者の胃粘膜生検組織の組織学的特徴は Updated Sydney System により評価した.

2) 培養, DNA 抽出, PCR, DNA シークエンス

菌株を 37°C の培養器内で一晩振動培養した後, 3000rpm で遠心して沈渣となった細菌を試料とした. DNA 抽出は核酸抽出剤によって行った. PCR は (94°C-30 秒, 55°C-30 秒, 72°C-30 秒) 35 サイクル, 条件下で行った. QIAquick Gel Extraction kit で DNA を精製し, 反応プロトコールによってシークエンスを行った.

3) *H. pylori* の蛋白抽出, *H. pylori* と胃癌培養細胞株 AGS の共培養

グリシンバッファー法で蛋白を抽出した. *H. pylori* 菌を AGS 細胞と 100:1 の比率で 5 時間共培養した.

4) 免疫沈降, ウェスタンブロット法

免疫沈降 kit を用いて免疫沈降を行った. ウェスタンブロット後の陽性バンドを HRP 発色キットで発色させ, density score はコンピューター上で測定した.

[結果]

1) 背景胃粘膜

炎症スコア (炎症細胞浸潤) および活動性スコア (好中球浸潤) は十二指腸潰瘍群の前庭部で有意に高かった ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ). 体部腸上皮化生スコアは胃癌群で有意に高かった ( $P < 0.01$ ).

2) 臨床分離株のチロシンリン酸化モチーフ数

十二指腸潰瘍株と胃癌株 16 株全てが PCR 法で CagA が陽性であった. 十二指腸潰瘍では 8 株全てが C 端に 3 個の tyrosine phosphorylation motifs (TPMs) を有していた. 胃癌株では 8 株中 7 株が C 端に TPMs を 3 個有していて, 1 株が 4 個の TPMs を有していた.

#### 4) 臨床分離株のチロシンリン酸化モチーフ構造

十二指腸潰瘍 8 株と胃癌 8 株中 15 株が TPMs Y-894, Y-913, Y-967 を有し, 1 株が TPMs-Y-894, Y-913, Y-949, Y-1003 を有していた. すなわち, チロシンリン酸化モチーフとその周辺遺伝子シーケンスでは十二指腸潰瘍株(8 株)と胃癌株(7 株)の TPMs 構造は完全に一致しており, 両株の間で差異は全く見られなかった.

#### 5) AGS 細胞との共培養後の細胞内 CagA 蛋白および SHP-2 の解析

胃癌株 CagA 蛋白の density スコアは平均値  $136.08 \pm 30.75$  (SD) で, 十二指腸潰瘍株は平均値  $133.29 \pm 35.16$  (SD) であり, 両群間に有意差は認められなかった.

胃癌株 SHP-2 の density スコアは平均値  $73.00 \pm 10.06$  (SD) で, 十二指腸潰瘍株は平均値  $80.18 \pm 13.30$  (SD) で, 両群間に CagA 蛋白結合 SHP-2 量に有意差はなかった.

#### [考察]

本研究では AGS 細胞と CagA 陽性の胃癌株および十二指腸潰瘍株を共培養し, 細胞内へ挿入される CagA 蛋白および結合する SHP-2 を比較検討した. 免疫沈降後の AGS 細胞内に挿入された CagA 蛋白は胃癌株間あるいは十二指腸潰瘍株間で著しい差異があり, 疾患の差異よりも株間での差異が著しかった. 挿入 CagA 蛋白量の平均値でも十二指腸潰瘍株と胃癌株の間で有意差はなかった. この結果は結合する SHP-2 量の比較でも同様であり, 胃癌株間あるいは十二指腸潰瘍株間で著しい差異があり, 疾患の差異よりも株間での差異が著しかった. これらの結果から, 胃癌株および十二指腸潰瘍株 *H. pylori* の CagA 遺伝子および胃上皮細胞内に挿入される CagA 蛋白および結合する SHP-2 は差異は認められず, 疾患の差異ではなく個々の株間での多様性に依存することが明らかとなった. この菌株間での CagA 蛋白産生の差異の生じる機序は明らかでなく, 今後の研究が必要である. 臨床分離株における本研究から単に胃上皮細胞内に挿入される CagA 蛋白および結合する SHP-2 の差異から胃発癌を考察することは困難であり, 感染から胃発癌に関わる機序の解明には CagA 蛋白以外の菌側要因, 宿主要因(炎症性サイトカインの遺伝子多型など), 環境要因(塩分など)を加味した総合的な検討が必要であると考えられる.

#### [結語]

- 1) *H. pylori* 陽性胃癌 8 株中 8 株が, 十二指腸潰瘍 8 株中 8 株が CagA 陽性であった(100%).
- 2) 十二指腸潰瘍 8 株中 8 株, 胃癌 8 株中 7 株は 3 個のチロシンリン酸化モチーフがあり, その周辺遺伝子のシーケンスにも全く差異は見られなかった.
- 3) AGS 細胞内に挿入された CagA 蛋白量および, それに結合する SHP-2 結合量の比較では胃癌株と十二指腸潰瘍株間の差異が認められなかった.

したがってこれらの差異から胃発癌の意義を考察することは困難であると推定された.

# 学位論文審査の要旨

主査 教授 浅香 正博  
副査 教授 田中 一馬  
副査 教授 武蔵 学

学位論文題名

## *Helicobacter pylori* の CagA チロシンリン酸化モチーフ

### 構造と SHP-2結合能の胃癌株と十二指腸潰瘍株による検討

欧米では *H. pylori* 感染者の約 60 % が CagA 陽性株であり, CagA 陰性 *H. pylori* 感染者より胃癌発生率が約 6 倍高いと言われているが, 日本では胃癌や十二指腸潰瘍患者から分離される *H. pylori* はほぼ 100 % CagA 陽性である. 発癌に関連する病原因子としての CagA 蛋白, 特にチロシンリン酸化モチーフの個数と構造および SHP-2 結合能の関連が分子生物学的研究から示唆されているが, 臨床的に発癌との関連は明らかになっていない. 以上に基づいて申請者は CagA 陽性で胃癌発症の低リスク疾患である十二指腸潰瘍 *H. pylori* と胃癌 *H. pylori* における CagA 蛋白の発現, チロシンリン酸化モチーフ数と構造, SHP-2 結合能との関連を PCR, DNA シークエンスをして, チロシンリン酸化モチーフ数と構造を臨床的に検討し, *H. pylori* と AGS 細胞共培養後の AGS 細胞内に挿入される CagA 蛋白および CagA 結合 SHP-2 の量を免疫沈降後, 抗 CagA 抗体と抗 SHP-2 抗体を用いてウエスタンブロット法で検討した. 次に全ての臨床株を免疫沈降せずに分子量から推定して AGS 細胞内に挿入される CagA 蛋白量及び CagA 結合 SHP-2 の量をウエスタンブロット法で検討した. 臨床分離株のチロシンリン酸化モチーフ数と構造は十二指腸潰瘍群と胃癌群で差異は全く見られなかった. AGS 細胞との共培養後の細胞内に挿入される CagA 蛋白量および SHP-2 の量も両群間に有意差はなかった. これらの結果より, 日本人臨床株による検討では, *H. pylori* の CagA 遺伝子 C 端の構造と SHP-2 の結合能は胃発癌に関連はないことが示唆された.

口頭発表に際し, 副査の田中教授より胃癌株と十二指腸潰瘍株でリン酸化結合部位を含めて CagA の構造が全く同じパターンの株があったか否かについて, また接着因子やほかの遺伝子について質問があった. これに対して申請者は, 十二指腸潰瘍株と胃癌株でほとんどの株で CagA の構造が全く同じパターンを示し, 接着因子やほかの遺伝子の関与については今後検討予定であると回答した. 副査の武蔵教授より胃癌株と十二指腸潰瘍株の採集時期, SHP-2 の量には差がなくてもリン酸

化の違いに差が認められるか、正常に近い細胞ではどうなるか、SHP-2 すぐ下流の分子として何が考えられるかについて質問があった。これに対して申請者は、臨床株は内視鏡中胃癌と十二指腸潰瘍と診断された時に生検組織から菌を培養し実験に使用したこと、SHP-2 の量には差がなくても、外のリン酸化の違い例えばセリン、リシンなどのリン酸化の違いが充分考えられると回答した。正常に近い細胞ではどうなるかについては癌細胞以外の正常に近い細胞で今後検討してみたいと回答し、SHP-2 すぐ下流の分子として何が考えられるかについて申請者は、GAP 蛋白を今後検討してみたいと回答した。さらに主査の浅香教授より CagA と SHP-2 のチロシンリン酸化系の以外の実験系にはどのようなものが考えられるか、*H. pylori* 感染から胃発癌に至る系の解明にはどのような研究をしていけばよいかなどについて質問があった。これに対して申請者は、非リン酸化経路が考えられると回答した。*H. pylori* 感染から胃癌に至る系の解明にはどのようなものが考えられるかについて申請者は、CagA のほかの遺伝子を今後検討すべきだと回答した。

本研究は *H. pylori* における CagA 蛋白の発現、チロシンリン酸化モチーフ数と構造および SHP-2 結合能が胃癌株と十二指腸潰瘍株間で差が認められないことを初めて明らかにしたことで高く評価された。

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。