

Helicobacter pylori の *cagPAI* 内 *cagG* 遺伝子の機能

学位論文内容の要旨

【 緒 言 】

1982 年 Warren と Marshall により初めて慢性胃炎患者の胃粘膜よりグラム陰性らせん桿菌を分離することに成功し、のちに *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) と命名された。現在、*H.pylori* は我が国において約 6000 万人以上が感染していると推定され、感染者はすべて炎症細胞浸潤を伴う組織学的胃炎を伴い、その一部から胃潰瘍、十二指腸潰瘍、胃癌、胃 MALT リンパ腫などの疾患が発症する。大部分の感染者は無症状のまま経過するが、疾患多様性は菌側の病原因子、感染宿主側の因子、感染時期の相違、環境に関わる因子などから生じると推測される。菌側の病原因子として *cagPAI* (pathogenicity island) が古くから研究されており、*cagPAI* 内の 6 種の蛋白が IV 型分泌機構形成蛋白を形成し、IV 型分泌機構を介して様々な因子を感染細胞内に転送していると考えられている。しかし *H.pylori* の IV 型分泌機構の形成、そして、引き続き IL-8 産生誘導には *H.pylori* の胃上皮細胞への接着が第一ステップとして必須である。

我々のグループは臨床分離株における検討から、*cagPAI* 内の *cagG* 欠損株において胃上皮細胞への接着能が低下し、IL-8 産生も低下していることを報告した。今回、*H.pylori* 標準株より *cagG* 遺伝子及び *cagE* 遺伝子のノックアウト株を作成し、胃上皮細胞への接着能を比較し、IL-8 mRNA 発現を定量的に測定し比較検討した。

【 方法と材料 】

1. 培養細胞株

ヒト胃癌細胞株 MKN-28 細胞及び AGS 細胞を使用し、37°C、5%CO₂ 条件下で培養した。細胞数を数えた後、ELISA による接着能の比較検討においては 96-well tissue culture plate に MKN-28 細胞が単層に接着するまで、同様の環境下で培養した。

2. 遺伝子ノックアウト株の作成

H.pylori 標準株 ATCC43504 の *cagG* ノックアウト株及び *cagE* ノックアウト株を作成し、37°C 微好気性条件のもと培養し、それぞれの菌株から DNA を抽出した。遺伝子確認のため、*cagG* 及び *cagE* の特異的 primer を作成し、抽出した DNA に対し PCR を施行した。

3. *H.pylori* と培養細胞の共培養

MKN-28 細胞及び AGS 細胞に対し、1:25、1:50 になる様に *H.pylori* を加え、それぞれの細胞から RNA を抽出し定量的 PCR に用いた。

4. *H.pylori* 接着能

MKN-28 細胞と *H.pylori* が 1:25, 1:50 になる様に加え, 37°C で 1 時間, 共培養し ELISA にて測定した。

5. 定量的 PCR

MKN-28 細胞及び AGS 細胞と *H.pylori* 標準株, *cagG* ノックアウト株, *cagE* ノックアウト株をそれぞれ共培養し, それぞれの細胞から抽出した RNA から cDNA を作成し, Real time PCR にて IL-8 発現を定量的に測定した。

【結果】

1. *H.pylori* 病原遺伝子のノックアウト

primer *cagG* による増幅では標準株及び *cagE* ノックアウト株より *cagG* ノックアウト株はクロラムフェニコール耐性遺伝子挿入の分, サイズが大きくなっていた。primer *cagE* による増幅では標準株及び *cagG* ノックアウト株より *cagE* ノックアウト株はサイズが大きくなっていた。

2. ELISA による各ノックアウト株における *H.pylori* 接着能

cagG ノックアウト株は標準株に比べ 1:25 及び 1:50 の条件下で共に有意な接着の低下を認めた ($p < 0.05$)。 *cagE* ノックアウト株においても標準株に比べ 1:25 及び 1:50 の条件下で共に有意な接着の低下を認めた ($p < 0.05$)。そして *cagG* ノックアウト株と *cagE* ノックアウト株の比較では 1:25 及び 1:50 共に *cagG* ノックアウト株の有意な接着の低下を認めた ($p < 0.05$)。

3. IL-8 mRNA 発現の定量的 PCR

MKN-28 細胞及び AGS 細胞単独群をコントロールとし, 標準株と共培養した細胞群と比較検討した。コントロールを 1.0 とすると MKN-28 細胞と共培養した標準株は 3.05 倍上昇し, AGS 細胞と共培養した標準株は 22.5 倍上昇した。

4. ノックアウト株の IL-8 mRNA 発現

cagG ノックアウト株及び *cagE* ノックアウト株における定量測定では, MKN-28 細胞ではコントロールを 1.0 とすると, 標準株の 3.05 倍の上昇に比べ, *cagG* ノックアウト株は 1.65 倍, *cagE* ノックアウト株は 1.23 倍であり, 標準株より有意に低下していた ($P < 0.05$)。AGS 細胞においても標準株 22.5 倍に対し, *cagG* ノックアウト株は 6.39 倍, *cagE* ノックアウト株は 2.17 倍であり, 標準株より有意に低下していた ($P < 0.05$)。

【考察】

H.pylori 感染において *cagPAI* は上皮細胞内情報伝達の鍵を担う遺伝子群と考えられるが, 胃上皮細胞への菌体の接着が第一ステップとして必須であり, 重要であると考えた。今回, *cagPAI* 内に存在し flagellar motor switch protein と相同性を持つと推定される *cagG* 遺伝子に着目し, *cagG* ノックアウト株を作成し比較検討した。接着能における検討では標準株と比較し *cagG* ノックアウト株は有意な低下を認めた。IL-8 mRNA 発現においても標準株と比較し *cagG* ノックアウト株は有意に低下していた。これらの結果より *cagG* 遺伝子は胃上皮細胞に対する *H.pylori* の接着能に関与する事で IL-8 誘導に影響を及ぼすと推測された。

我々のグループでは臨床分離株を用いて *H.pylori* 菌株の差違による接着様式の変化を電子顕微鏡を用いて検討したが, Fibrillae-like filament のネットワークを介して細胞膜と microvilli に接着する形態が全ての *cagPAI* 部分欠損株には観察されず, *cagPAI* 部分欠損株における共通点は *cagG* 遺伝子欠損であった。これらの結果は *cagG* 欠損株における接着能の低下を示しており, 今回の *cagG* 遺伝子単独ノックアウト株

による検討結果と一致し, Fibrillae-like filament の接着様式と *cagG* 遺伝子が何らかの関係を持っていると推測される.

【 結語 】

- 1, MKN-28 細胞及び AGS 細胞において *cagG* ノックアウト株及び *cagE* ノックアウト株は *H.pylori* 標準株と比べ接着能は低下していた. *cagG* ノックアウト株は *cagE* ノックアウト株より接着能は低下していた.
- 2, MKN-28 細胞及び AGS 細胞における IL-8 mRNA 発現は *cagG* ノックアウト株及び *cagE* ノックアウト株では標準株と比べると著明に抑制されていた.
- 3, *cagG* 遺伝子は胃上皮細胞に対する *H.pylori* の接着能に関与する事で IL-8 mRNA 発現に影響することが示唆された.

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 *cagPAI* 内 *cagG* 遺伝子の機能

H.pylori が胃上皮細胞へ接着することにより感染が成立し、その後の細菌と上皮細胞の相互採用により様々な病態が形成される。病態におけるメカニズムは不明な点が多いが、*H.pylori* の胃上皮細胞への接着が感染成立の第一ステップとして必須であり、胃粘膜上皮への接着を解析することは重要である。申請者らの研究グループでは臨床分離株による検討から、*cagPAI* 内の *cagG* 欠損株において標準株に比べ胃上皮細胞への接着能が低下し、IL-8 産生誘導能も低下しているを見出した。今回、申請者は *H.pylori* 標準株より *cagG* 遺伝子および *cagE* 遺伝子の単独ノックアウト株を作成し、ヒト胃癌細胞への接着能を比較し、IL-8mRNA 発現量を測定した。それぞれの菌株から DNA を抽出し、ノックアウト遺伝子を PCR にて確認後、ヒト胃癌細胞の MKN-28 細胞と標準株、*cagG* ノックアウト株、*cagE* ノックアウト株をそれぞれ細胞細菌比が 1:25、1:50 になる様に 37°C 1 時間共培養し、ELISA にて接着能を比較検討した。次に MKN-28 細胞およびヒト胃癌細胞の AGS 細胞とそれぞれの菌株を細胞細菌比 1:25 になる様に 37°C 1 時間共培養し、十分な洗浄で非付着 *H.pylori* を完全に除去し、それぞれの細胞から RNA を抽出した。RNA より cDNA を作成し IL-8mRNA 発現を定量測定し比較検討した。接着能の比較検討では *cagG* ノックアウト株および *cagE* ノックアウト株は標準株に比べ 1:25、1:50 両方において有意な接着の低下を認めた。そして *cagG* ノックアウト株は *cagE* ノックアウト株に比べ有意な接着の低下を認めた。

IL-8mRNA 発現の比較検討では MKN-28 細胞において *cagG* ノックアウト株は標準株より 45.9%低下しており、*cagE* ノックアウト株は標準株より 59.7%低下していた。AGS 細胞では *cagG* ノックアウト株は標準株より 71.6%低下しており、*cagE* ノックアウト株は標準株より 90.4%低下していた。これらの結

果より、*cagG* 遺伝子は *H.pylori* の接着に重要な機能を有しており、胃上皮細胞の傷害発生機序に関与することが示唆された。

口頭発表に際し、副査の田中教授より *cagG* 遺伝子について他の細菌における見解、*cagG* 遺伝子の細菌における存在部位、接着のメカニズムについての質問があった。これに対して申請者は、*cagG*、*cagI*、*cagM* 遺伝子が他のグラム陰性桿菌において接着能もしくは運動能において相同性を持つ遺伝子であると推測されていることを回答した。*cagG* 遺伝子の細菌内での存在部位については *cagG* 遺伝子はまだ解明されておらず、接着のメカニズムも鞭毛の関与や他の接着能に関与する遺伝子もあり、*cagG* 遺伝子だけではなく、いろいろな相互作用が推測されると回答した。次いで副査の武蔵教授より *cagG* 遺伝子と IV 型分泌機構形成への関連性、IV 型分泌機構と接着能の関連についての質問があった。これに対して申請者は、IV 型分泌機構については *cagPAI* 内の 6 種の蛋白が他の細菌で同定されている IV 型分泌機構の形成蛋白と相同性があり、この事実から *cagPAI* は IV 型分泌機構と同じような機能を持っていると推測されている。しかし、その 6 種の蛋白には *cagG* は含まれていないため、IV 型分泌機構の形成には関係がないと推測されると回答した。そして、接着と IV 型分泌機構の関連性は IV 型分泌機構を介して病原遺伝子が胃上皮細胞内へ注入されるだろうと推測されているが、接着能の低下により憶測ではあるが、IV 型分泌機能の働きも弱くなる可能性があるかと回答した。次いで主査の浅香教授より *cagG* 遺伝子における菌側から宿主側への挿入の有無、*cagG* 遺伝子の IL-8 分泌への関連機序についての質問があった。これに対して申請者は、*cagA* 遺伝子に関しては IV 型分泌機構を介して感染宿主側に挿入され、その後の病態形成に関係することがある程度明らかになってきているが、*cagG* 遺伝子に関しては、まだ解明されていない点が多く不明であると回答した。また、IL-8 分泌への関連機序も、今回の研究においては *cagG* 遺伝子が IL-8 発現に影響していたが、機序としては不明であり今後の課題であると回答した。

この論文はノックアウト株を作成することにより *H.pylori* における *cagG* 遺伝子の機能を明らかにさせたことで高く評価され、今後の胃上皮細胞における *H.pylori* 感染へ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定した。