

学位論文題名

Upregulated Smad5 mediates apoptosis of gastric epithelial cells induced by *Helicobacter pylori* infection

(Smad5 の発現増強は *Helicobacter pylori* によって誘導される胃上皮細胞のアポトーシスを介在する)

学位論文内容の要旨

[緒言] *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) は、感染胃組織において様々なシグナル伝達経路を活性化し、その結果として種々の病態が引き起こされる事が明らかになってきた。*H.pylori* の有する重要な病原因子として **cag pathogenicity island (cagPAI)** が報告されているが、我が国においては *H.pylori* の 90% 以上が cagPAI を有するにも関わらず大多数の感染者は無症候のまま経過する。よって *H.pylori* による病態形成機序を解析する上で病原因子—宿主細胞間の相互作用を検討する事が非常に重要と思われる。

本研究において、*H.pylori* 標準株がヒト胃上皮細胞において誘導する遺伝子発現の変化を検討した。一方で宿主細胞における遺伝子発現の変化と *H.pylori* によるアポトーシス誘導との関連についても検討した。その結果、cagPAI 陽性 *H.pylori* 株によるアポトーシス誘導に不可欠な、宿主胃上皮細胞における遺伝子発現の変化が明らかになったので報告する。

[方法および結果] *H.pylori* が誘導する遺伝子発現の変化を検討するために、ヒト胃癌細胞株である AGS 細胞と、cagPAI 遺伝子群を欠損なく保持している菌株として ATCC43504 株及び 4 種類の臨床分離株を、cagPAI の欠損を認めた菌株として 2 種類の臨床分離株をそれぞれ co-culture し、cDNA microarray, RT-PCR, Northern blot 法により検討した。その結果、cagPAI を有する菌株が cagPAI を欠損する菌株と比較し Smad5 mRNA の発現を著明に増強した。同様の結果が他の胃癌細胞株 (KATOIII, MKN28, MKN45) においても確認された。次に *H.pylori* によるアポトーシス誘導における cagPAI の役割を検証するため、cagPAI 陽性株、cagPAI 部分欠損株 それぞれを AGS 細胞と co-culture 後、オリゴヌクレオソーム単位の DNA 断片化の有無を検討した。また terminal deoxynucleotidyl triphosphate-mediated deoxyuridine triphosphate nick end labelling (TUNEL) assay を利用した方法により、アポトーシスの定量的分析を行った。その結果 cagPAI 陽性株が、cagPAI 部分欠損株と比較して有意にアポトーシスを誘導する事が確認された。更に RNA interference を用い、Smad5 の発現増強と *H.pylori* によるアポトーシス誘導との相関関係を検討した。その結果 Smad5 mRNA の発現を特異的に抑制する事により、cagPAI 陽性臨床分離株により誘導されたアポトーシスは有意に抑制を受けた。

[考察] *H.pylori* は胃上皮細胞に接着後、種々の因子を宿主細胞に転送する。その結果菌—上皮細胞間で相互作用が起こり種々の病態が形成される。1999 年、*H.pylori* から胃上皮細胞へ様々な分子を転送する機構として TypeIV secretion machinery の存在が報告された。TypeIV secretion machinery は *H.pylori* 感染胃組織に

おける, NF $\kappa$ B活性化を介したIL8の誘導に不可欠であると同時に, 最近この機構を介して宿主細胞へ注入されたCagA蛋白がリン酸化をうけた後, Src homology2 domain-containing tyrosine phosphatase, SHP-2と複合体を形成し, 胃上皮細胞の形態変化が誘導される過程が証明された. これらを考慮すると, 同機構を介する何らかのタンパクもしくは遺伝子の移動は*H.pylori*感染によって引き起こされる宿主細胞の変化を検討する上で非常に重要であると思われる. TypeIV secretion machineryは, cagPAIに含まれる6個の遺伝子から構成されている事が報告されており, cagPAIの有無が*H.pylori*が誘導する遺伝子発現レベルの変化において重要な因子であると考え, cagPAI陽性, 陰性菌株が胃上皮細胞において誘導するSmad5の発現レベルをNorthern blot法によりそれぞれ比較した. その結果cagPAI陽性菌株のみが, Smad5 mRNAの発現を増強する事が確認された. 現在までのところtype IV secretion systemを介して*H.pylori*より注入されるタンパクとしてはCagAのみが知られているが, *H.pylori*によるSmad5の発現増強の機序として, この装置を介しての未知の遺伝子またはタンパクの移行が関与している可能性が示唆される.

Smad familyはtransforming growth factor beta (TGF-beta)を介するシグナル伝達経路における転写因子として分類され, 現在までには乳類でSmad1-Smad8までが同定されている. その後造血幹細胞において増殖阻害作用を有する事が解明され, Yamamotoらにより筋原細胞の分化を阻害する作用を有する事が証明された. 加えてSmad5のligandであるBMPが, embryonic limbのアポトーシスを仲介している事, ヒト骨髄腫細胞においてアポトーシスを誘導している事も報告されている. しかし我々が検索し得た限りでは, 消化管領域におけるSmad5に関する報告はなくその役割も不明である.

一方*H.pylori*感染が胃上皮細胞のアポトーシスを誘導するとの多くの報告がある. これらの事実より, *H.pylori*が宿主細胞において誘導するSmad5の発現上昇とアポトーシスの間になんらかの因果関係がある可能性を考え, RNA interferenceを行い, Smad5 mRNAの発現抑制前後で*H.pylori*により誘導されるアポトーシス反応を定量的に比較検討した. その結果, Smad5はシグナル伝達因子としてcagPAI陽性*H.pylori*が胃上皮細胞においてアポトーシスを誘導する経路において非常に重要な役割を担っていると考えられた. 本研究で, *H.pylori*が感染胃上皮細胞においてSmad5 mRNAの発現を増強する事, Smad5 mRNAの発現増強が胃上皮細胞におけるアポトーシス誘導に不可欠である事を明らかにした. 更にSmad5発現増強を介するアポトーシスの誘導機序に, cagPAIの存在が重要である事が示唆された.

### 結語

1. cagPAI陽性*H.pylori*はヒト胃上皮細胞において, Smad5 mRNAの発現を増強した.
2. cagPAI陽性*H.pylori*のみが, ヒト胃上皮細胞においてアポトーシスを誘導した.
3. Smad5 mRNAの発現抑制により, *H.pylori*感染胃上皮細胞において誘導されるアポトーシスが抑制された.

以上よりcagPAI陽性*H.pylori*が, Smad5の発現増強を介して感染胃上皮細胞において, アポトーシスを誘導していると推察された.

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 嶋 和 郎

副 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 小 池 隆 夫

学 位 論 文 題 名

## Upregulated Smad5 mediates apoptosis of gastric epithelial cells induced by *Helicobacter pylori* infection

(Smad5 の発現増強は *Helicobacter pylori* によって誘導される胃上皮細胞のアポトーシスを介在する)

*Helicobacter pylori*(*H.pylori*)は感染胃組織において様々なシグナル伝達経路を活性化し、その結果として種々の病態が引き起こされる事が明らかになってきた。*H.pylori* による病態形成機序を解析する上では病原因子—宿主細胞間の相互作用を検討する事が非常に重要と思われる。本研究において、*H.pylori* 標準株がヒト胃上皮細胞において誘導する遺伝子発現の変化を検討した。一方で宿主細胞における遺伝子発現の変化と *H.pylori* によるアポトーシス誘導との関連についても検討した。

*H.pylori* が誘導する遺伝子発現の変化を検討するために、ヒト胃癌細胞株と、cag pathogenicity island(cagPAI)陽性菌株として ATCC43504 及び 4 種類の臨床分離株を、cagPAI 陰性菌株として 2 種類の臨床分離株をそれぞれ co-culture し、cDNA microarray、RT-PCR、Northern blot 法により検討した。次に *H.pylori* によるアポトーシス誘導における cagPAI の役割を検証するため、cagPAI 陽性株、cagPAI 陰性株それぞれを AGS 細胞と co-culture 後、オリゴヌクレオソーム単位の DNA 断片化の有無を検討し、terminal deoxynucleotidyl triphosphate-mediated deoxyuridine triphosphate nick end labelling (TUNEL) assay を利用した方法によりアポトーシスの定量的分析を行った。更に RNA interference を用い、遺伝子発現の変化と *H.pylori* によるアポトーシス誘導との相関関係を検討した。その結果 *H.pylori* が感染胃上皮細胞において Smad5 mRNA の発現を増強する事、シグナル伝達因子としての Smad5 mRNA の発現増強が胃上皮細胞におけるアポトーシス誘導に不可欠である事を明らかにした。更に Smad5 発現増強を介するアポトーシスの誘導機序に cagPAI の存在が重要である事が示唆された。

口頭発表に当たり、副査の小池教授からは、cDNA microarrayにおいて *H.pylori* 感染により他の Smad family の遺伝子発現レベルの変化はどうであったか、Smad5 の発現増強における TGF $\beta$  の関与について質問があった。申請者は *H.pylori* 感染後の胃粘膜において、他の Smad family (Smad 1~8) の発現レベルはいずれも有意な変化を示さなかったこと、*H.pylori* 感染、非感染胃上皮細胞培

養上清中のELISAによるTGF $\beta$ の定量の結果、両者に有意な差を認めなかったこと、cDNA microarrayによる検討の結果、*H.pylori*感染胃上皮細胞においてTGF $\beta$ mRNAの発現増強が認められなかったことよりSmad5の発現増強においてTGF $\beta$ は関与していないと考えられることを述べた。副査の浅香教授からは、Smad5の発現増強の機序について、胃発癌機序を解明する上での今後の研究プランについての質問があった。申請者はSmad5の発現増強の機序として、IV型分泌機構を介する未知の遺伝子または蛋白の注入が考えられること、今後*H.pylori*感染が胃上皮細胞において誘導する増殖、アポトーシスそれぞれの細胞内情報伝達経路を解明し、胃上皮細胞内クロストークの分子基盤を解析後、最終的に胃発癌に至る分子制御を明らかにしていくことが目標であることを述べた。主査の長嶋教授からは、Smad5の発現増強においてcagPAIの中のどの蛋白の関与が考えられるのか、cagPAIの胃炎形成における役割、またRNAiにおけるoligonucleotideの塩基配列の決定について質問があった。申請者は、Smad5の発現増強においてcagPAI及びIV型分泌機構が重要な役割をはたしている事は明らかであるが、どの蛋白が関与しているかについては更なる検討が必要であること、胃組織においてcagPAI陰性*H.pylori*株と比較し、cagPAI陽性株がsevereな炎症を引き起こすこと、oligonucleotideの作製においては、interferenceする遺伝子に対してより特異性の高い塩基配列を選択することが重要であると考えられることを述べた。

本研究は、*H.pylori*感染が胃上皮細胞において誘導するアポトーシスの細胞内情報伝達経路において重要な役割を果たすシグナル伝達因子の一つを解明した点で高く評価される。また今後アポトーシスの細胞内情報伝達経路の更なる解明が期待される。

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。