


医研第308号

(別紙様式第3号)

論 文 要 旨

論 文 題 目

Helicobacter pylori Induces CCL20 Expression
(ヘリコバクター・ピロリは CCL20 の発現を誘導する)

氏名 高 盛 宏 

論 文 要 旨

【 背 景 と 目 的 】

CCL20 は未熟樹状細胞の抗原部位への動員や腸管指向性メモリーT細胞の遊走を誘導し、腸管の感染防御や炎症に関わるケモカインである。一方、胃におけるCCL20の発現や役割については十分な解析は行われていない。そこで、*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 感染胃粘膜におけるCCL20発現やその誘導機構について解析した。

【 方 法 】

H. pylori 感染慢性胃炎例および非感染者の胃粘膜組織におけるCCL20発現を免疫染色で調べた。*H. pylori* は ATCC49503 株、26695 株 (野生株および *cag* PAI 欠損株)、臨床分離株 OHPC0001、0002 (*cag* PAI 欠損株)、0003 を使用した。胃上皮細胞株として MKN45 および MKN28 を用いた。CCL20 mRNA 発現は RT-PCR にて検討した。培養上清中への CCL20 分泌は ELISA にて検討した。CCL20 遺伝子転写調節領域 - 874/ + 58bp を含むルシフェラーゼ (LUC) 発現プラスミド (pGL2-CCL20) を MKN45 細胞に導入し、*H.*

pylori 感染による LUC 活性の誘導を指標として転写調節機構を解析した。転写因子の DNA 結合能は EMSA で解析した。種々の NF- κ B シグナル関連分子や Hsp90 の発現変化はウェスタンブロット法で検討した。

【 結 果 】

H. pylori 感染慢性胃炎症例の胃粘膜に CCL20 mRNA の発現を認め、免疫染色にて胃上皮細胞に CCL20 の発現を認めた。*H. pylori* 感染 1 時間後より MKN45 および MKN28 細胞で CCL20 mRNA の発現誘導が観察されたが、*cag* PAI 欠損株では誘導はみられなかった。また、*Vac A* の有無と CCL20 発現誘導の間に関連はなかった。*H. pylori* と MKN45 および MKN28 細胞との 24 時間共培養において CCL20 の分泌が認められた。*H. pylori* は pGL2-CCL20 の LUC 活性を増強したが、- 92/ - 83bp に存在する NF- κ B 結合部位に点突然変異を含んだレポータープラスミドの LUC 活性は増強しなかった。NF- κ B シグナル伝達に関わる I κ B α 、I κ B β 、IKK α 、IKK β 、IKK γ 、NIK の優性抑制変異体の導入は *H.*

pylori 誘導性 CCL20 遺伝子転写活性化を抑制した。さらに、NF- κ B 阻害剤や IKK α および IKK β と結合して蛋白質の安定化に関与する Hsp90 の阻害剤で細胞を前処理すると、CCL20 発現の誘導が阻害された。EMSA にて、*H. pylori* 感染細胞の核蛋白質から p50 と p65 から成る NF- κ B 複合体が検出され、NF- κ B 阻害剤や Hsp90 阻害剤は *H. pylori* 誘導性の NF- κ B 複合体の DNA 結合を抑制した。また、Hsp90 阻害剤は IKK α と IKK β 蛋白質の発現を抑制したが、プロテアソーム阻害剤はその抑制を解除した。

【 結 論 】

H. pylori は *cag* PAI 依存的に NIK、IKK や Hsp90 を介し、胃上皮細胞の NF- κ B を活性化する。その結果、CCL20 発現を誘導する。CCL20 は未熟樹状細胞やメモリー T 細胞を胃粘膜に誘導することで、*H. pylori* 起因性の慢性胃炎発症においても重要な役割を担っていることが示唆された。

(別紙様式第7号)

論文審査結果の要旨

報告番号	* <u>課程博</u> 論文博	第 号	氏 名	富盛 宏
論文審査委員	審査日	平成 20年 1月 17日		
	主査教授	西 巻 正		
	副査教授	荻谷 研一		
	副査教授	鈴木 敏彦		
(論 文 題 目)				
<i>Helicobacter pylori</i> Induces CCL20 Expression				
(論文審査結果の要旨)				
<p>上記論文に関して、研究にいたる背景と目的、研究内容、および研究成果の意義と学術的水準について慎重かつ公正に検討し、以下のような審査結果を得た。</p>				
<p>1. 研究の背景と目的</p> <p>CCL20 は未熟樹状細胞の抗原部位への動員や腸管指向性メモリーT細胞の遊走を誘導し、腸管の感染防御や炎症に関わるケモカインである。一方、胃における CCL20 の発現や役割については十分な解析は行われていない。そこで、<i>Helicobacter pylori</i> (<i>H. pylori</i>) 感染胃粘膜における CCL20 の発現やその誘導機構を明らかにする目的で、以下の研究が行われた。</p>				
<p>2. 研究内容</p> <p>今回の研究では、まず <i>H. pylori</i> 感染慢性胃炎症例および非感染者の胃粘膜組織における CCL20 発現を RT-PCR と免疫染色で調べた。その結果、<i>H. pylori</i> 感染慢性胃炎症例の胃粘膜に CCL20 mRNA の発現を認め、免疫染色にて胃上皮細胞に CCL20 の発現を認めた。</p> <p>次に、in vitro での <i>H. pylori</i> 感染による CCL20 発現誘導機構を菌側の病原因子と宿主側の細胞因子の2つの観点から解析した。<i>H. pylori</i> は ATCC49503 株、26695 株(野生株および <i>cag</i> PAI 欠損株)、臨床分離株 OHPC0001、0002 (<i>cag</i> PAI 欠損株)、0003 を使用した。胃上皮細胞株として MKN45 および MKN28 を用いた。<i>H. pylori</i> 感染1時間後より両細胞株で CCL20 mRNA の発現誘導が観察されたが、病原因子 <i>cag</i> PAI の欠損株では誘導はみられなかった。また、もう一つの病原因子 Vac A の有無と CCL20 発現誘導の間に関連はなかった。なお、培養上清中への CCL20</p>				

の分泌も ELISA で確認された。

さらに、CCL20 遺伝子転写調節領域-874/+58bp を含むルシフェラーゼ (LUC) 発現プラスミド (pGL2-CCL20) を MKN45 細胞に導入し、*H. pylori* 感染による LUC 活性の誘導を指標として転写調節機構を解析した。*H. pylori* は pGL2-CCL20 の LUC 活性を増強したが、-92/-83bp に存在する NF- κ B 結合部位に点突然変異を含んだレポータープラスミドの LUC 活性は増強しなかった。NF- κ B シグナル伝達に関わる I κ B α 、I κ B β 、IKK α 、IKK β 、IKK γ 、NIK の優性抑制変異体の導入は *H. pylori* 誘導性 CCL20 遺伝子転写活性化を抑制し、NF- κ B 阻害剤で細胞を前処理すると、CCL20 発現の誘導が阻害された。ウェスタンブロットにて、*H. pylori* 感染による I κ B α のリン酸化と分解も観察された。また、EMSA にて *H. pylori* 感染細胞の核蛋白質から p50 と p65 から成る NF- κ B 複合体が検出されたが、*cag* PAI 欠損株感染細胞ではこの複合体は検出されなかった。さらに、IKK α および IKK β と結合して蛋白質の安定化に関与する Hsp90 の阻害剤で細胞を前処理すると、NF- κ B 複合体の DNA 結合と CCL20 発現の誘導がともに阻害された。

以上の結果より、*H. pylori* は *cag* PAI 依存的に NIK、IKK や Hsp90 を介し、I κ B α をリン酸化することで、胃上皮細胞の NF- κ B を活性化し、CCL20 発現を誘導することが明らかとなった。CCL20 は未熟樹状細胞やメモリー T 細胞を胃粘膜に誘導することで、*H. pylori* 起因性の慢性胃炎発症においても重要な役割を担っていることが示唆された。

3. 研究成果の意義と学術的水準

本研究では in vitro、in vivo にて *H. pylori* 感染胃上皮細胞における CCL20 発現を確認し、その発現誘導における菌側の病原因子としては、*cag* PAI が重要であり、宿主側の細胞因子としては、NF- κ B シグナル伝達経路が不可欠であることを示したものである。本論文発表の2ヶ月前には、*H. pylori* 感染慢性胃炎症例の胃粘膜には CCL20 のレセプターである CCR6 陽性の T 細胞の遊走がみられるという報告が *Infection and Immunity* 誌に報告され、*H. pylori* 感染慢性胃炎における CCL20-CCR6 の重要性は広く認識されたと考えられる。

したがって、本研究は *H. pylori* 起因性の慢性胃炎発症の解明の上で重要な研究であり、かつ、その研究成果は国際的にも認められた高水準のものであると評価された。

以上により、本論文は学位授与に十分値するものであると判断した。

- 備考
- 1 用紙の規格は、A4とし縦にして左横書きとすること。
 - 2 要旨は800字～1200字以内にまとめること。
 - 3 *印は記入しないこと。