


研第330号

(別紙様式第3号)

論 文 要 旨

論 文 題 目

Helicobacter pylori-Induced Interleukin-12 p40 Expression
(*Helicobacter pylori* 誘導性のInterleukin-12 p40発現)

氏名 武嶋 恵理子 

論 文 要 旨

【 背 景 と 目 的 】

インターロイキン 12 (IL-12) は抗原提示細胞から分泌されるヘテロ 2 量体のサイトカインで、ヘルパー T リンパ球 (Th) 1 型免疫反応を促進する。また *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 感染による慢性胃炎は Th1 型免疫反応が優位である。IL-12 の発現量は非感染患者と比べ *H. pylori* 感染患者のほうが多い。しかし IL-12 の産生細胞はまだあまり調べられていない。また *H. pylori* 感染慢性胃炎症例胃粘膜の IL-12 免疫染色において上皮細胞、リンパ球、マクロファージが染色された。そこで我々は胃上皮細胞と T リンパ球において *H. pylori* 感染による IL-12 p40 の発現を検討した。

【 結 果 】 RT-PCR で *H. pylori* 感染慢性胃炎組織 2 例において IL-12 p40 の発現を認めた。*H. pylori* 感染慢性胃炎症例 5 例の胃粘膜上皮細胞、リンパ球においてマクロファージと

同様に IL-12 の発現が免疫染色で認められた。一方、正常胃粘膜上皮には IL-12 はわずかに染色されるのみだった。胃上皮細胞株 MKN45、MKN28 と AGS に *H. pylori* を感染させたところ RT-PCR で IL-12p40 が誘導された。また ELISA にて MKN45 と AGS において IL-12p40 の発現を認めた。また *H. pylori* が IL-12p40 を誘導する際に、炎症性サイトカインである IL-1 α 、TNF α の関連を調べたところ、MKN45 に IL-1 α 、TNF α を前処理することで *H. pylori* による IL-12p40 の誘導がさらに強くなった。また *H. pylori* の病原因子である *cag* pathogenicity island (PAI) が IL-12p40 の誘導に必要なかを検討するため *cag* PAI を有する *H. pylori* の野生株と *cag* PAI を欠失させた *H. pylori* 変異株を MKN45 と MKN28 に感染させ、RT-PCR を行った。野生株では IL-12p40 は誘導され、*cag* PAI 欠失株では誘導されなかった。次にレポーターアッセイを行い *H. pylori* 感染による

IL-12p40 のプロモーター活性を調べたところ野生株ではプロモーター活性を認め、*cag* PAI 欠失株では認めなかった。NF- κ B 結合配列に変異を有するレポーターを用いてレポーターアッセイを行ったが *cag* PAI 陽性 *H. pylori* 株による活性化は起こらなかった。さらにゲルシフトアッセイで MKN45、MKN28 と AGS に *H. pylori* 感染により NF- κ B の DNA 結合が誘導され、その構成成分は p50 と p65 のヘテロダイマーであることがわかった。また *cag* PAI 欠失株では NF- κ B の結合は誘導されなかった。さらに *H. pylori* 感染により NF- κ B 活性化シグナル伝達経路の構成因子である I κ B α 、I κ B β 、IKK α 、IKK β 、NIK の優性抑制変異体を導入して IL-12p40 のレポーターアッセイを行ったところ *H. pylori* によるプロモーター活性は抑制された。また NF- κ B の阻害剤で細胞を前処理したところ IL-12p40 の mRNA の発現や NF- κ B の DNA 結合が著明に阻害された。

また炎症や NF- κ B の活性化に重要である Hsp90 の関連を調べるため Hsp90 の阻害剤である 17-AAG を前処理した細胞に *H. pylori* を感染させたところ IL-12p40 mRNA の発現を阻害し、ゲルシフトアッセイで NF- κ B の DNA 結合を阻害した。

また次に Jurkat T 細胞, ヒト末梢血 CD4+T 細胞に *H. pylori* を感染させたところ IL-12p40 mRNA の誘導を認めた。また *H. pylori* の培養上清は T 細胞に IL-12p40 mRNA の誘導したが、上皮細胞には誘導しなかった。T 細胞に *H. pylori* の *cagPAI* 欠失株、*vacA* 欠失株どちらも IL-12p40 mRNA を誘導しなかったが、上皮細胞では *vacA* 欠失株でも IL-12p40 mRNA の誘導が認められた。




そこで精製 VacA を Jurkat T 細胞に作用させたところ IL-12p40 mRNA が誘導された。上皮細胞では誘導を認めなかったため VacA はある一定の細胞に作用すると思われた。また VacA による IL-12p40 mRNA の誘導に p38MAPK

経路、PI3K/Akt 経路の関連を検討したところそれぞれの阻害剤で VacA による I κ B- α のリン酸化や IL-12p40 の発現が阻害された。

【結論】 *H. pylori* は胃上皮細胞と T 細胞に IL-12p40 の発現を誘導する。上皮細胞においては *cag* PAI 依存性の NF- κ B 経路が重要であり、T 細胞においては *cag* PAI に加え VacA 依存性に NF- κ B 活性化を介して IL-12p40 の発現を誘導する。*H. pylori* による Th1 免疫反応には *cag* PAI に加え VacA も重要であ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	課程博 * 第 号 論文博	氏名	武嶋 恵理子
論文審査委員	審査日	平成 21年 2月 23日	
	主査教授	鈴木敏彦 	
	副査教授	西巻正 	
	副査教授	荻谷研一 	
(論文題目) <i>Helicobacter pylori</i> -Induced Interleukin-12 p40 Expression			
(論文審査結果の要旨) 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に検討し、以下のような審査結果を得た。			
1. 研究の背景と目的 インターロイキン12(IL-12)は抗原提示細胞から分泌されるp40とp35のヘテロ二量体(p70)からなり、ヘルパーTリンパ球(Th)1型免疫反応を促進するサイトカインである。また <i>Helicobacter pylori</i> (Hp)感染による慢性胃炎ではTh1型免疫反応が優位で、IL-12の発現量も亢進しているが、IL-12の産生細胞は不明である。Hp感染慢性胃炎症例から得られた胃粘膜のIL-12免疫染色において、マクロファージに加え上皮細胞やリンパ球が染色されたことから、胃上皮細胞とTリンパ球におけるIL-12産生機構、特に感染によって誘導されるIL-12p40の発現機構を明らかにする目的で、以下の研究が行われた。			
2. 研究内容 Hp感染胃炎組織においてRT-PCRでIL-12p40の発現を認めた。また、Hp感染胃炎症例の胃上皮細胞、リンパ球においてIL-12p70の発現を免疫染色で認めた。胃上皮細胞株にHpを感染させたところ、RT-PCRでIL-12p40が誘導された。ELISAにてIL-12p40やp70の産生も認めた。Hpの病原因子であるcag pathogenicity island (PAI)の関与を検討するためcag PAIを欠失させた変異株(Δ cag PAI)を胃上皮細胞に感染させたが、IL-12p40の発現誘導は認められず、cag PAIが病原因子であると判明した。p40遺伝子のプロモーター領域を含むレポータープラスミドを用いたレポーターアッセイ等種々の解析によって、Hpによる			

p40 遺伝子の活性化には NF- κ B、および下流の NIK-IKK 経路、さらに Hsp90 が重要であることが示唆された。

次に、Jurkat T 細胞株やヒト末梢血 CD4⁺T 細胞に *Hp* を感染させ、T 細胞における IL-12p40 の発現制御機構を解析した。両細胞において IL-12p40 mRNA の発現と IL-12p70 の産生誘導を認めた。各種遺伝子欠損株を用いた解析の結果、これらリンパ球による IL-12 産生には *cag* PAI 以外に細胞空胞化毒素 VacA が関与することが示された。実際に、精製 VacA は T 細胞株にのみ p40 mRNA 発現を誘導することが認められた。さらに、VacA は T 細胞株の Akt や p38 MAPK のリン酸化を誘導し、またそれらの阻害剤によって VacA による IL-12p40 の発現誘導が阻害された。

以上の結果により、*Hp* は胃上皮細胞では *cag* PAI 依存性に、T 細胞では *cag* PAI に加えて VacA 依存性に IL-12p40 の発現を誘導することが明らかとなった。上皮細胞における p40 の発現誘導には、NIK-IKK 経路や Hsp90 が重要であり、T 細胞においては、VacA も NF- κ B、PI3K-Akt、p38 MAPK 経路の活性化を介して、p40 の発現を誘導することが示された。

3. 研究成果の意義と学術的水準

Hp による慢性胃炎では Th1 型免疫反応が誘導されており、本研究は、その成立に重要なサイトカインである IL-12 の発現が、抗原提示細胞以外の上皮細胞や T 細胞においても誘導されていることを見出し、さらにこれらの細胞において、IL-12 発現に関与する *Hp* の病原因子がそれぞれ異なることを示した興味深い報告である。*Hp* 起因性の慢性胃炎発症機構の解明は重要な研究であり、かつ、その研究成果は国際的にも認められた米国微生物学会発行雑誌 *Infection and Immunity* 誌に受理された高水準のものであると評価された。さらに研究を展開し、上皮細胞における *Hp* 誘導性の PI3K-Akt 経路活性化による p65 のリン酸化の意義については *BMC Microbiology* 誌に、また T 細胞における VacA の NF- κ B 活性化機構についても *Helicobacter* 誌に掲載が決定されており、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。