



# The CagA protein of *Helicobacter pylori* suppresses the functions of dendritic cell in mice

田中， 擴址

---

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2010-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5041

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005041>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	田中 擴址
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第 5041 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	平成 22 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

The CagA protein of *Helicobacter pylori* suppresses the functions of dendritic cell in mice(*Helicobacter pylori* の病原因子 CagA はマウス樹状細胞の機能を抑制している)

審 査 委 員

主 査	教 授	堀田 博
	教 授	平田 健一
	教 授	具 英成

(課程博士関係)

## 学位論文の内容要旨

The CagA protein of *Helicobacter pylori* suppresses

the functions of dendritic cell in mice

*Helicobacter pylori* の病原因子 CagA は

マウス樹状細胞の機能を抑制している

神戸大学大学院医学系研究科内科学講座消化器内科学分野専攻

消化器内科学

(指導教員：東 健 教授)

田中 擴址

はじめに

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) はらせん状のグラム陰性桿菌で、世界人口の約半分に感染していると考えられている。これまでの疫学的な事実から、ヒト胃内に持続感染し、慢性胃炎、消化性潰瘍、胃 MALT リンパ腫、胃癌など様々な疾患を引き起こすことが知られている。これらの疾患多様性は、免疫応答を中心とした宿主側因子、病原因子を中心とした菌側因子および食生活などの環境因子が相互作用することにより形成されているものと推測されている。

*H. pylori* 感染症において重要な点は、免疫応答が誘導されるにも関わらず菌が排除されない点と、胃発癌が誘導される点である。宿主免疫応答においては、近年、パイエル板欠損マウスでは、*H. pylori* 感染により胃炎が誘導されないことが報告され、パイエル板が *H. pylori* の抗原認識およびその後の免疫応答に重要な役割を果たしていると考えられている。パイエル板の樹状細胞により *H. pylori* は抗原として認識され、活性化された CD4 陽性 T 細胞が胃粘膜に移行し、胃炎が誘導されるという機序である。胃発癌においては、*H. pylori* の病原因子 CagA が重要な役割を果たしている事が、基礎的および分子疫学的な研究から明らかにされている。胃上皮細胞に *H. pylori* が接着すると CagA が 4 型分泌機構を介して上皮細胞内へ注入され、膜移行を介して CagA はリン酸化される。リン酸化された CagA は細胞内の SHP-2 と結合する事により、SHP-2 を脱制御し、その結果上皮細胞障害が誘導されるという機序である。近年、CagA 過剰発現マウスが作成され、胃上皮細胞障害および胃発癌が確認された事から、CagA と胃上皮細胞障害、胃発癌との関連性はさらに強固なものとなっている。

*H. pylori* 感染が、胃発癌を誘導するには、病原因子 CagA の上皮細胞内への持続的な移行が必要であると考えられる。これらは、何らかの形で宿主免疫応答が抑制され、高菌量で感染が持続する事によりさらに効率化される。*cagA* 陽性 *H. pylori* 感染において、胃発癌がより高率である疫学的事実は、CagA による宿主免疫応答抑制が一因となっている可能性が考えられる。そこで、今回本論文では、*H. pylori* の病原因子 CagA が宿主免疫応答へ如何に影響するかを解明する事を目的として、免疫系において中心的な役割を果たす樹状細胞を用いた検討を行った。

### 1. CagA は *H. pylori* 感染樹状細胞内においてリン酸化される

本論文では、マウス骨髄由来樹状細胞を用いて実験を行った。樹状細胞に *H. pylori* 各株 (*cagA* 陽性株、*cagA* 陰性株) をそれぞれ感染させ、CagA の樹状細胞内への取り込みおよびリン酸化の有無を Western blot にて検討した。*cagA* 陽性株感染群においてのみ、CagA の取り込みおよびリン酸化が確認され

た。

## 2. *H. pylori* 感染樹状細胞におけるサイトカイン産生および成熟度の検討

樹状細胞に、*H. pylori* 各株 (*cagA* 陽性株、*cagA* 陰性株) を感染させ、サイトカイン産生能 (TNF $\alpha$ 、IL12p40、IL10) を RealTime PCR 法および ELISA 法にて比較検討した。*cagA* 陽性株感染群において、TNF $\alpha$  および IL12p40 の産生が抑制され、IL10 の産生が増強していた。*H. pylori* 感染 48 時間後の樹状細胞の成熟度を CD86 発現の程度により FACS にて解析を行ったが、*cagA* 陽性株感染群において成熟度が抑制されていた。これらの結果から、CagA が *H. pylori* 感染に対する樹状細胞の応答を抑制する可能性が考えられた。

## 3. CagA 発現樹状細胞の作成

*H. pylori* 感染実験では、CagA 以外にも雑多な因子が影響する可能性が考えられたため、CagA 過剰発現マウス骨髄を採取し、樹状細胞を作成した。RT-PCR 法にて CagA 発現を確認した。

## 4. CagA 発現樹状細胞を用いたサイトカイン産生能および成熟度の検討

野生型樹状細胞および CagA 発現樹状細胞を LPS で刺激し、サイトカイン産生能 (TNF $\alpha$ 、IL12p40、IL10) を RealTime PCR 法および ELISA 法にて比較検討した。CagA 発現樹状細胞において、TNF $\alpha$  および IL12p40 の産生が抑制され、IL10 の産生が増強していた。FACS にて、CD86 発現の程度により、LPS 刺激 48 時間後の樹状細胞の成熟度を解析したが、CagA 発現樹状細胞において成熟度が抑制されていた。これらの結果から、CagA が樹状細胞の刺激に対する応答を抑制する事が示唆された。

## 5. CagA 発現樹状細胞による CD4 陽性 T 細胞活性化の検討

以上の結果から、CagA が先天免疫系としての樹状細胞機能を抑制する事が示唆された。次に CagA が、樹状細胞による獲得免疫系の活性化に如何なる影響を与えるかについて検討した。OT-II マウス (特異的 CD4 陽性 T 細胞受容体過剰発現マウス) より採取した CD4 陽性 T 細胞を、OVA peptide を取り込ませた樹状細胞 (野生型樹状細胞、CagA 発現樹状細胞) と 48 時間共培養し、CD4 陽性 T 細胞のサイトカイン産生能 (IFN $\gamma$ 、IL10、IL4) を Real Time PCR 法にて比較検討した。CagA 発現樹状細胞群において、IFN $\gamma$  産生能が抑制され、IL10 産生能が増強していた。IL4 産生能に関しては差が見られなかった。さらに T-bet および GATA3 発現について比較検討を行ったが、CagA 発現樹状細胞群において T-bet の発現が抑制されていた。*H. pylori* 感染症においては、Th1 優位な免疫応答が誘導される事が分かっているが、CagA は CD4 陽性 T 細胞の Th1 型 T 細胞への分化を抑制する事が示唆された。

## 6. CagA 発現による樹状細胞機能抑制メカニズムの検討

これまでの結果から、CagA 発現により先天免疫系および獲得免疫系における樹状細胞機能が抑制される事が分かった。次に、その機序についての検討を行った。CagA 発現樹状細胞を LPS で刺激した際に、その応答が抑制されることに着目し、TLR4 のシグナル伝達についての検討を行った。TLR4 の下流には Myd88 依存経路と非依存経路が存在する。Myd88 非依存経路では IRF3 が最終的にリン酸化され、核内移行しサイトカインが産生される事が分かっており、野生型樹状細胞および CagA 発現樹状細胞を LPS で刺激した後の IRF3 リン酸化を Western blot にて検討した。結果として、CagA 発現樹状細胞において IRF3 リン酸化が抑制されていた。SHP-2 が IRF3 をリン酸化する TBK1 というキナーゼを抑制する事が報告されており、CagA 発現樹状細胞では SHP-2 が活性化されているため、TBK1 の抑制が強くなり、結果として LPS 刺激に対する応答が抑制されていることが示唆された。

## おわりに

CagA は、樹状細胞の機能を抑制する事が示唆された。*H. pylori* 感染症において、*cagA* 陽性株は免疫系を抑制することにより、高菌量での持続感染を可能にし、より効率的に胃発癌を誘導している可能性が考えられた。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2122 号	氏 名	田 中 擴 址
論文題目 Title of Dissertation	<p>The CagA protein of <i>Helicobacter pylori</i> suppresses the functions of dendritic cell in mice</p> <p><i>Helicobacter pylori</i> の病原因子CagA はマウス樹状細胞の機能を抑制している</p>		
審査委員 Examiner	<p>主 査 堀 田 博 Chief Examiner</p> <p>副 査 平 岡 健一 Vice-examiner</p> <p>副 査 具 英之 Vice-examiner</p>		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

*Helicobacter pylori* はらせん状のグラム陰性桿菌で、ヒト胃内に持続感染し、慢性胃炎、消化性潰瘍、胃MALT リンパ腫、胃癌など様々な疾患を引き起こす。これらの疾患多様性は、免疫応答を中心とした宿主側因子、菌の病原因子および食生活などの環境因子の相互作用により形成されると推測されている。

*H. pylori* 感染症において重要な点は、免疫応答が誘導されるにも関わらず菌が排除されない点と、胃発癌が誘導される点である。宿主免疫応答においては、近年、パイエル板欠損マウスでは、*H. pylori* 感染により胃炎が誘導されないことが報告され、パイエル板が*H. pylori* の抗原認識およびその後の免疫応答に重要な役割を果たしていると考えられている。パイエル板の樹状細胞により*H. pylori* は抗原として認識され、活性化されたCD4 陽性T 細胞が胃粘膜に移行し、胃炎が誘導されるという機序である。胃発癌においては、*H. pylori* の病原因子CagA が重要な役割を果たしていることが、基礎的および分子疫学的研究から明らかにされている。胃上皮細胞に*H. pylori* が接着すると、4型分泌機構を介してCagA が上皮細胞内へ注入され、リン酸化される。リン酸化されたCagA は細胞内のSHP-2と結合することによりSHP-2 を脱制御し、その結果上皮細胞障害が誘導されると考えられている。近年、CagA 過剰発現トランスジェニックマウスが作成され、胃上皮細胞障害および胃発癌が確認されたことから、CagA と胃上皮細胞障害、胃発癌との関連性はさらに強固なものとなっている。

*H. pylori* 感染が胃発癌を誘導するには、CagA の上皮細胞内への持続的な移行が必要であると考えられる。これらは、何らかの形で宿主免疫応答が抑制され、高菌量で感染が持続することによりさらに効率化される。cagA陽性*H. pylori* 感染において、胃発癌がより高率である疫学的事実は、CagAによる宿主免疫応答抑制が一因となっている可能性を示唆している。そこで、本申請者らは、*H. pylori* の病原因子CagA が宿主免疫応答に及ぼす影響を解明することを目的として、免疫系において中心的な役割を果たす樹状細胞を用いた検討を行い、以下の成績を得た。

1. マウス骨髄由来樹状細胞に*H. pylori* のcagA 陽性株、cagA 陰性株をそれぞれ感染させ、CagA の樹状細胞内への取り込みおよびリン酸化の有無を検討し、CagA は*H. pylori* 感染樹状細胞内においてリン酸化されることを明らかにした。そして、それらの*H. pylori* 感染樹状細胞におけるサイトカイン産生および成熟度について検討し、cagA 陽性株感染樹状細胞において、TNF- $\alpha$ およびIL12p40 の産生が抑制され、IL10 の産生が増強していることを明らかにした。また、FACS法を用いてCD86 発現の解析を行い、cagA 陽性株感染により樹状細胞の成熟が抑制されることを明らかにした。

2. *H. pylori* 感染実験ではCagA 以外にも様々な因子が影響する可能性が考えられたため、CagA 過剰発現マウス骨髄から得た樹状細胞を用いてさらに解析を行った。野生型樹状細胞およびCagA 発現樹状細胞をLPS で刺激し、サイトカイン産生能について比較検討し、CagA 発現樹状細胞ではTNF- $\alpha$ およびIL12p40 の産生が抑制され、IL10 の産生が増強していることを明らかにした。また、CD86 発現のFACS により、CagA 発現樹状細胞では成熟度が抑制されていることを明らかにした。以上の結果より、CagA は樹状細胞機能を抑制することを示した。

3. 次に、樹状細胞による獲得免疫系の活性化に及ぼすCagA の影響について検討した。特異的CD4 陽性T 細胞受容体過剰発現マウスより採取したCD4 陽性T 細胞を、OVA peptide を取り込ませた樹状細胞（野生型樹状細胞、CagA 発現樹状細胞）と共培養し、CD 4 陽性T 細胞のサイトカイン産生能を比較検討し、CagA 発現樹状細胞群においてIFN- $\gamma$  産生能が抑制され、IL10 産生能が増強していることを明らかにした。また、CagA 発現樹状細胞群ではT-bet の発現も抑制されていた。一方、IL4 産生能に関しては差が見られなかった。以上の結果より、CagA はCD4陽性T 細胞のTh1 型T 細胞への分化を抑制することを示した。

4. さらに、CagA 発現による樹状細胞機能抑制メカニズムについても検討を行った。CagA 発現樹状細胞をLPS で刺激するとその応答が抑制されることに着目し、TLR4 のシグナル伝達について検討を行った。TLR4 の下流にはMyd88 依存経路と非依存経路が存在する。Myd88 非依存経路ではIRF3 がリン酸化され、核内移行しサイトカインが産生されることが分かっている。そこで、野生型樹状細胞およびCagA 発現樹状細胞をLPS で刺激した後のIRF3 リン酸化をについて検討した。その結果、CagA 発現樹状細胞ではIRF3 リン酸化が抑制されていることを明らかにした。SHP-2 がIRF3 をリン酸化するTBK1 キナーゼを抑制することが報告されており、CagA 発現樹状細胞ではSHP-2 が活性化されているため、TBK1 の抑制が強くなり、結果としてLPS 刺激に対する応答が抑制されている可能性を示唆した。

5. 以上の成績より、*H. pylori* 感染症において、CagA は樹状細胞機能の抑制を介して宿主の免疫系を抑制することにより高菌量での持続感染を可能にし、より効率的に胃発癌を誘導している可能性を提唱した。

以上、本研究は、*H. pylori* 感染症の慢性化に関わる宿主免疫応答の異常について、その発症機序を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった *H. pylori* による樹状細胞機能に及ぼす影響について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。