

学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第 383 号	氏名	二宮 遼
審査委員会委員	主査氏名	花田 俊勝	
	副査氏名	緒方 正男	
	副査氏名	上田 貴威	
論文題目			
Inhibition of low-density lipoprotein uptake by <i>Helicobacter pylori</i> virulence factor CagA (ピロリ菌病原因子 CagA による低密度リポ蛋白質取り込みの阻害)			
論文掲載雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications			
論文要旨			
<p><i>Helicobacter pylori</i> (ピロリ菌) 感染、特に菌体から宿主細胞に注入される CagA 蛋白質をもつピロリ菌感染は胃炎、胃潰瘍、さらに胃癌を引き起こすばかりでなく、胃以外の全身性疾患の発症に関連することが知られている。最近、胃以外の組織においてピロリ菌が検出されること、CagA 蛋白質がエクソソームと呼ばれる細胞由来の小胞に乗って血液を介して全身へ運ばれることなどが報告されてきたが、ピロリ菌感染が全身性疾患を引き起こす機序は明らかになっていない。</p> <p>我々は、ハエの複眼で CagA を発現する系統 (ヒト胃粘膜上皮細胞で CagA を発現させた際と同様に上皮構造の構築が損なわれ rough eye 表現型を示す) を用いた遺伝学的スクリーニングを実施し、複数の CagA 標的候補分子の同定に成功した。これらのうち LpR2 遺伝子 (ヒトでは細胞内への LDL 取り込みに働く LDL 受容体をコードする) の共発現により CagA による rough eye が改善したことから、CagA が LDL 受容体の機能を阻害することにより高 LDL-C 血症を引き起こす可能性が示唆された。次に、細胞内で LDLR と CagA を発現させ共沈実験を実施し、両者が物理的に直接結合することを証明した。免疫染色によって細胞内で共局在することも示した。CagA の LDL 受容体 結合領域を明らかにするため、変異型 CagA を作製し共沈実験を行った結果、CagA の C-terminal を欠失した変異型 CagA は LDL 受容体と結合できないことが明らかとなった。さらに、CagA を LDL 受容体高発現のヒト肝癌細胞株である HepG2 細胞へ発現させ、LDL の取り込みを観察したところ、細胞内に取り込まれる LDL が顕著に減少した。一方で、LDLR に結合できない変異型 CagA を発現させた細胞では、CagA による LDL の取り込みが阻害されないことも確認した。以上の結果から、ピロリ菌 CagA 蛋白質の C-terminal 領域と LDL 受容体が直接結合することで、細胞内への LDL 取り込みが阻害されることが証明された。</p> <p>本研究は、ピロリ菌の CagA 蛋白質が LDL 受容体に直接結合して LDL の取り込みを阻害することを分子レベルで初めて明らかにしたものであり、ピロリ菌感染と高コレステロール血症およびそれに合併する虚血性心疾患の発症メカニズムの一端を示した。このため、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

~~最終試験~~

の結果の要旨

学力の確認

審査区分 課・ 	第383号	氏名	二宮 遼
審査委員会委員	主査氏名	花田 俊勝	
	副査氏名	緒方 正男	
	副査氏名	上田 貴成	

学位申請者は本論文の公开发表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。

1. CagA遺伝子の強制発現や、細胞へのCagAトランスフェクションを行なっているが生体内では胃以外にピロリ菌の菌体はほとんど存在しないため、生体内ではこのようなことは起きないのではないか。疑問に答えるモデルとなっているか。
2. ピロリ菌が胃以外の臓器にどのようにして感染するのか。
3. 眼特異的GAL4ドライバーのGMRは何のプロモーターか。
4. ショウジョウバエのrough eyeの客観的評価法はどのように行なったか。
5. Rough eyeの病理学的所見は調べたか。
6. LpR2過剰発現モデルにおいて、各個体間における発現量のばらつきが非常に小さいがどのような方法で測定したのか。
7. 細胞へのトランスフェクションでサル腎臓細胞株を使用したのはなぜか。
8. COS-7とHepG2以外の細胞は使用していないか。
9. LDLRの強制発現がRough Eyeを改善したことは両者が結合したことによるのか。
10. CagAとLDLRの結合とは分子学的にどのような状態が考えられるか。
11. LDLRにはprecursorとmatureのタイプが細胞内に存在しているが、その成熟化機構を説明できるか。
12. CagAは、LDLRのどの位置に結合するのか。
13. CagAとLDLRの結合がヒトの生体内でも起きていることは将来証明可能か。
14. ピロリ菌を除菌したらコレステロールが低下したとの報告は存在するか。
15. エクソソーム内のCagAは、他の因子からの修飾はないのか。
16. 本研究で使用したCagAのtype (ABC) は、何型に分類されるのか。
17. 7000系統の標的候補gene全てを網羅できたのか。
18. CagAのC-terminalは構造多型が最も多いのではないか。
19. 本実験の統計処理はt検定より多重比較解析を用いるべきではないか。
20. 本研究結果から、胃癌治療への応用は考えられないか。

これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

学 位 論 文 要 旨

氏名 二 宮 遼

論 文 題 目

Inhibition of low-density lipoprotein uptake by *Helicobacter pylori* virulence factor CagA

(ピロリ菌病原因子 CagA による低密度リポ蛋白質取り込みの阻害)

要 旨

Helicobacter pylori (ピロリ菌) 感染、特に菌体から宿主細胞に注入される CagA 蛋白質をもつピロリ菌感染は胃炎、胃潰瘍、さらに胃癌を引き起こすばかりでなく、胃以外の全身性疾患の発症に関連することが知られている。最近、胃以外の組織においてピロリ菌が検出されること、CagA 蛋白質がエクソソームと呼ばれる細胞由来の小胞に乗って血液を介して全身へ運ばれることなどが報告されてきたが、ピロリ菌感染が全身性疾患を引き起こす機序は明らかになっていない。

我々は、ハエの複眼で CagA を発現する系統 (ヒト胃粘膜上皮細胞で CagA を発現させた際と同様に上皮構造の構築が損なわれ rough eye 表現型を示す) を用いたゲノム規模の遺伝学的スクリーニングを実施し、複数の CagA 標的候補分子の同定に成功した。これらのうち LpR2 遺伝子 (ヒトでは細胞内への LDL 取り込みに働く LDL 受容体をコードする) の共発現により CagA による rough eye が改善したことから、CagA が LDLR の機能を阻害することにより高 LDL-C 血症を引き起こす可能性が示唆された。

次に、細胞内で LDLR と CagA を発現させ共沈実験を実施し、両者が物理的に直接結合することを証明した。免疫染色によって細胞内で共局在することも示した。CagA の LDLR 結合領域を明らかにするため、変異型 CagA をいくつか作製し同様に共沈実験を行った結果、CagA の C-terminal を欠失した変異型 CagA は LDLR と結合できないことが明らかとなった。

さらに、CagA を LDLR 高発現のヒト肝癌細胞株である HepG2 細胞へ発現させ、LDL の取り込みを観察した。その結果、蛍光顕微鏡観察下において、細胞内に取り込まれる LDL が顕著に減少した。蛍光プレートリーダーによる定量においても、LDL の取り込みが優位に低下した。先述の結合実験より得られた LDLR に結合できない変異型 CagA を発現させた細胞では、CagA による LDL の取り込みが阻害されないことも確認した。

以上の結果から、CagA の C-terminal 領域と LDLR が直接結合することで、細胞内への LDL 取り込みが阻害されることが証明された。

これまで、CagA の標的分子として、SHP-2 や PAR1 など、胃粘膜における細胞増殖の促進や細胞極性の構造破綻を引き起こす分子が報告されてきた。近年になって CagA 陽性ピロリ菌感染と高 LDL-C 血症をはじめとする全身性疾患との関連が報告されてきているが、これらは主に統計解析などの臨床の症例研究が中心であり、因果関係を分子レベルから解明した報告は見当たらない。本研究によって、CagA が LDLR との物理的結合を介して LDLR の機能を阻害することが明らかとなり、ピロリ菌感染が高コレステロール血症から虚血性心疾患を引き起こすメカニズムの一端が解明された。この成果は、ピロリ菌によって全身性疾患が発症するメカニズムの最初の報告となり、今後新たな治療法の開発が期待される。