HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Helicobacter pyloriの病原因子CagAによるIL-1β産生機構に関する研究
Author(s)	亀岡, 章一郎
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第12233号
Issue Date	2016-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12233
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61681
Type	doctoral thesis
File Information	Shoichiro_Kameoka.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文

Helicobacter pylori の病原因子 CagA による IL-1β 産生機構に関する研究

2015 年度

北海道大学 理学院 化学専攻

遺伝子病制御研究所 病因研究部門 分子生体防御分野

亀岡 章一郎

目次

目次 1

要旨 7

略語 9

序章 – 研究の背景 10

Helicobacter pylori 10
CagA 10
ピロリ菌と IL-1β 11
IL-1β の産生機構 12
CagA と IL-1β 14

第 1 章 – ヒトではピロリ菌感染による IL-1β は CagA 依存的にマクロファージから産生される 15

1.1 序論 15
1.2 材料と方法 16
細胞 16
阻害剤 16
抗体 16
THP-1 のマクロファージへの誘導 17
PBMC のマクロファージへの誘導 17
ピロリ菌の培養および感染 17
ELISA 18
SDS-PAGE および immunoblot 法 18
定量的 RT-PCR 18
乳酸脱水素酵素（LDH）の定量 19
統計学的解析 19
表 1: 定量的 PCR に用いたプライマー 19
1.3 結果 20
1.3.1 ピロリ菌感染時の IL-1β 産生細胞の同定 20
1.3.2 マクロファージ細胞内への CagA 分泌の確認 20

1.3.3 IL-1β 産生への CagA の依存性の確認 20
1.3.4 CagA が *IL1B* の mRNA の転写に及ぼす影響 21
1.3.5 Caspase-1 の活性化に対する CagA の関与の検討 21
1.3.6 CagA が pyroptosis に及ぼす影響の検討 22
図 1-1 23
図 1-2 24
図 1-3 25
図 1-4 26
図 1-5 27
図 1-6 28
1.4 小括 29
第 2 章 – CagA は NLRP3 inflammasome を活性化し、IL-1β を産生する 30
2.1 序論 30
2.2 材料と方法 31
細胞 31
抗体 31
THP-1 のマクロファージへの誘導 31
ピロリ菌の培養および感染 31
siRNA による遺伝子抑制 31
定量的 RT-PCR 32
発現ベクターおよび遺伝子導入 32
免疫沈降法 32
SDS-PAGE および immunoblot 法 33
HEK293T 細胞を使用した NLRP3 inflammasome 再構築系法 33
ELISA 33
統計学的解析 33
表 2: siRNA のターゲット配列 34

表 3: 定量的 PCR に用いたプライマー 34
2.3 結果 35
2.3.1 ピロリ菌感染活性化する NLR の同定 35
2.3.2 ピロリ菌感染において CagA 依存的に NLRP3 inflammasome が活性化するかどうかの検討 35
2.3.3 HEK293T 細胞に NLRP3 inflammasome を再構築し、ピロリ菌感染おける CagA が IL-1β 産生に関与するかどうかを検討する 36
2.3.4 CagA 単独で NLRP3 inflammasome が活性化するかどうかの検討 36
2.3.5 CagA の NLRP3 inflammasome 活性化に対する影響の検討 36
図 2-1 38
図 2-2 39
図 2-3 40
図 2-4 41
図 2-5 42
2.4 小括 43
第 3 章 – CagA による細胞質内 Ca^{2+} の増加により、NLRP3 inflammasome が活性化する 44
3.1 序論 44
3.2 材料と方法 45
細胞 45
阻害剤 45
THP-1 のマクロファージへの誘導 45
ピロリ菌の培養および感染 45
発現ベクターおよび遺伝子導入 45
HEK293T 細胞を使用した NLRP3 inflammasome 再構築系法 45
ELISA 46
統計学的解析 46
3.3 結果 47
3.3.1 ピロリ菌感染時の IL-1β 産生に及ぼす細胞外 ATP および細胞外への K^+ 流出の影

響の検討 47
3.3.2 ピロリ菌感染時の IL-1β 産生への ROS の関与の確認 47
3.3.3 ピロリ菌感染時の IL-1β 産生への PLC および Ca^{2+}の関与の検討 47
3.3.4 CagA による NLRP3 inflammasome 活性化への ROS の関与の検討 48
3.3.5 CagA による NLRP3 inflammasome 活性化への PLC の関与の検討 48
図 3-1 49
図 3-2 50
図 3-3 51
図 3-4 52
図 3-5 53
3.4 小括 54
第 4 章 – CagA は細胞質において NLRP3 と共局在し、NLRP3 の LRR ドメインを介して会合する 55
4.1 序論 55
4.2 材料と方法 56
細胞 56
THP-1 のマクロファージへの誘導 56
ピロリ菌の培養および感染 56
細胞染色および共焦点レーザー顕微鏡による解析 56
発現ベクターおよび遺伝子導入 57
HEK293T 細胞を使用した NLRP3 inflammasome 再構築系法 57
免疫沈降法 57
SDS-PAGE および immunoblot 法 57
統計学的解析 58
4.3 結果 59
4.3.1 CagA と NLRP3 inflammasome 複合体の会合性の検討 59
4.3.2 CagA と NLR との会合性の検討 59
4.3.3 マクロファージにおける NLRP3 と CagA の局在の検討 59

4.3.4 NLRP3 の各種ドメイン欠損変異体の作成および CagA との会合における NLRP3 の結合部位の同定 59
4.3.5 NLRP3 の LRR と CagA の結合が NLRP3 inflammasome の活性化に及ぼす影響の検討 60
図 4-1 61
図 4-2 62
図 4-3 63
図 4-4 64
図 4-5 65
4.4 小括 66
第 5 章 – CagA は NLRP3 と直接的に結合し、NLRP3 を活性化する 67
5.1 序論 67
5.2 材料と方法 68
細胞 68
発現ベクターおよび遺伝子導入 68
組み換えタンパク質の精製 69
in vitro pull-down assay 69
タンパク質架橋 70
SDS-PAGE および immunoblot 法 70
NLRP3 ATPase assay 70
HEK293T 細胞を使用した NLRP3 inflammasome 再構築系法 70
ELISA 71
統計学的解析 71
5.3 結果 72
5.3.1 CagA と NLRP3 の直接的な結合性の検討 72
5.3.2 CagA による NLRP3 活性化機構の解析 72
5.3.3 CagA 変異体作成と NLRP3 との結合部位の同定およびその機能解析 72
5.3.4 NLRP3 inflammasome の活性化に寄与する CagA の責任領域の同定 73

図 5-1 74
図 5-2 75
図 5-3 76
図 5-4 77
5.4 小括 78
終章 – 考察 79
参考文献 83
謝辞 90

要旨

Helicobacter pylori（ピロリ菌）感染は世界人口の約半数に感染するため、世界的に重要な健康問題として位置づけられている。ピロリ菌は胃酸を中和することで胃に定着し、その慢性感染によって胃癌をはじめとする様々な病態を引き起こすことが知られている。ピロリ菌の中でも病原因子 CagA 陽性株は重度の炎症や発癌性を示し、病原因子 CagA は胃癌発症を決定づける重要な細菌側の因子として注目されてきた。また、CagA 陽性株の感染患者では胃において IL-1β などの炎症性サイトカイン量が有意に増加する。ピロリ菌感染により増加した IL-1β は胃酸の分泌を強く抑制し、ピロリ菌の増殖促進に繋がることが報告されていることや、胃癌発症を促進することが疫学的および遺伝子改変マウスを用いて実験的に示されている。臨床的に、CagA 陽性株の感染患者では IL-1β が増加することから CagA が IL-1β 産生機構に関与している可能性が考えられるとともに、この CagA による IL-1β の産生機構はピロリ菌感染における炎症から発癌にむかうという病態の悪化に寄与することが考えられるが、その詳細な分子機構はこれまで不明であった。IL-1β 産生は proIL-1β の転写翻訳に加えて、NLRs や ALRs を受容体として、それらとともにアダプターASC および procaspase-1 の複合体である inflammasome の活性化による proIL-1β の成熟化が必要となる。そこで本研究ではピロリ菌感染、CagA による IL-1β 産生機構を明らかにすることを目的とした。

第 1 章ではヒトマクロファージに、野生型ピロリ菌株、*cagA* 欠損株、そして CagA を分泌することが出来ない *cagE* 欠損株を用いた感染実験を行った結果、ヒトマクロファージでの IL-1β 産生は CagA に依存していることが示された。また IL-1β 産生に関わる *IL1B* の転写および caspase-1 の活性化の両経路に CagA が関与していることを示した。

第 2 章では CagA は NLRP3 inflammasome を活性化していることを明らかにした。ピロリ菌感染時の IL-1β 産生に寄与する NLR を調べるために、代表的な NLR である NLRP3 と NLRC4 をノックダウンし、感染実験を行った結果、NLRP3 の発現を低下させたときのみ、IL-1β 産生量が有意に低下した。さらに野生型株と CagA 欠損株を用いた感染実験や CagA 過剰発現系により、CagA は NLRP3 と ASC の会合を増強すること、また NLRP3 の

多量体化を促進すること、そしてNLRP3 inflammasomeを活性化することを明らかにした。

第 3 章ではピロリ菌感染時の IL-1β 産生には細胞外 ATP および細胞外への K^+の流出、加えて CagA による ROS や PLCγ1 を介した細胞内シグナルにより NLRP3 inflammasome を活性化していることを示した。

第4章では免疫沈降法によりCagAがNLRP3 inflammasome複合体と会合性を示すこと、CagA と NLRP3 は会合するが NLRC4 は会合しないことを示した。また共焦点レーザー顕微鏡を用いて、細胞内でCagA と NLRP3 が共局在することを示した。そしてCagA がNLRP3 の LRR ドメインに会合することが、NLRP3 inflammasome を介する IL-1β 産生に重要であることを示唆する結果が得られた。

第 5 章では CagA は組み換えタンパク質を用いて、CagA と NLRP3 は直接的に結合し、NLRP3 の ATPase 活性を増強させることを示した。加えて、CagA の C 末端領域にある CM motifs が NLRP3 inflammasome の活性化に重要であることを示した。

以上、本研究は CagA は NLRP3 に直接的に認識されていることを見出した。そして CagA と結合した NLRP3 は多量体形成し、ASC と procaspase-1 を含む NLRP3 inflammasome 複合体形成が生じることで IL-1β が産生されることを示唆された。これらの結果は炎症と胃癌発症に関連する、ピロリ菌の CagA による宿主の細胞内シグナルの異常調節メカニズムを示すものである。これにより、ピロリ菌感染特異的な IL-1β 産生を抑制することで、胃癌発症の新たな予防法の開発につなげていきたい。

略語

6xHis	hexahistidine
ASC	apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
ATP	adenosine triphosphate
ATPase	ATP hydrolase
BAPTA/AM	*O,O'*-Bis (2-aminophenyl)ethyleneglycol -*N,N,N',N'*-tetraacetic acid, tetraacetoxymethyl ester
***cag* PAI**	cytotoxin associated gene pathogenicity island
CagA	cytotoxin associated gene A antigen
cagA	cytotoxin associated gene A
CM	CagA-multimerization
DCs	dendritic cells
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DSS	disuccinimidyl suberate
DTT	dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EPIYA	glutamic acid-proline-isoleucine-tyrosine-alanine
FBS	fetal bovine serum
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GST	glutathione-*S*-transferase
H. pylori	*Helicobacter pylori*
HA	hemagglutinin
HEK	human embryonic kidney
HRP	horseradish peroxidase
IB	immunoblot
IgG	immunoglobulin G
IL-1β	interleukin-1β
IP	immunoprecipitation
IPTG	isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
LDH	lactate Dehydrogenase
LRR	leucine-rich repeat domain
MALT	mucosa-associated lymphoid tissue
mCM	mutant CM motifs
MyD88	myeloid differentiation primary response gene 88
NAIP	NLR family, apoptosis inhibitory protein
NBD	nucleotide-binding domain
NF-κB	nuclear factor-kappa B
Ni-NTA	nickel-nitrilotriacetic acid
NLRs	Nod-like receptors
NLRC4	NLR family, card domain containing 4
NLRP3	NLR family, pyrin domain containing 3
OD_{600}	optical density at 600 nm
oxATP	adenosine 5′-triphosphate, periodate oxidized sodium salt
p-Tyr	phosphotyrosine
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PAR1b	partitioning-defective 1b
PBMCs	peripheral blood mononuclear cells
PCR	polymerase chain reaction
PEG	polyethylene glycol
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PIPES	piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)
PLC	phospholipase C
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
PR	phosphorylation-resistant
PVDF	polyvinylidine difluoride
PYD	pyrin domain
RLRs	RIG-I-like receptors
ROS	reactive oxygen species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SDS	sodium dodecyl sulfate
SHP-2	SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 2
siRNA	small interference RNA
TFSS	type IV secretion system
TLRs	Toll-like receptors
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
WCL	whole cell lysate

序章 – 研究の背景

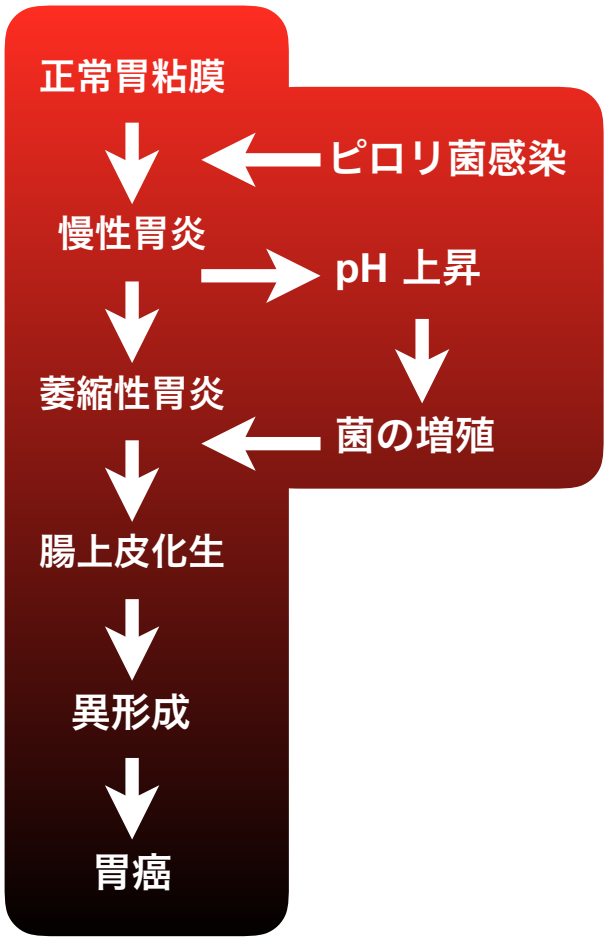
Helicobacter pylori

Helicobacter pylori（ピロリ菌）は1983年にMarshallとWarrenに同定されたグラム陰性微好気性らせん状桿菌である (Marshall and Warren, 1984)。ピロリ菌感染は、世界的に重要な健康問題であり、世界人口の約半数にピロリ菌は感染している。ピロリ菌は、ピロリ菌がもつウレアーゼによって尿素からアンモニアを生成することで胃酸を中和し、ヒトの胃に主に定着し、宿主であるヒトとピロリ菌の間での複雑な相互作用が関与することで、胃炎や胃潰瘍といった様々な病気の発症の原因となる (Dunne et al., 2014; Peek and Crabtree, 2006; Rieder et al., 2005a; Salama et al., 2013)。ピロリ菌が慢性感染すると、慢性胃炎、萎縮性胃炎、腸上皮化生と進展し、胃癌を発症することが知られている。これはCorreaのカスケードとして提唱されている (Correa, 1992)（図序-1）。これらのことからピロリ菌は世界保健機関の国際ガン研究機関によって、発癌因子として最も危険度の高いカテゴリーである「グループ I 発癌因子」に分類された (IARC working group, 1994)。

CagA

ピロリ菌感染に起因する病態に関与する、ピロリ菌が有する様々な病原因子が同定されてきた。そのなかでも強い細胞傷害性をもつピロリ菌から、CagA と呼ばれる 120~145 kDa のタンパク質が発見された (Cover et al., 1990; Crabtree et al., 1992)。CagA は *cagA* 遺伝子にコードされ、ピロリ菌ゲノム上に存在する cytotoxin associated gene pathogenicity island（*cag* PAI）と呼ばれる約 40 kbp、約 30 の遺伝子群の最下流に位置する (Hatakeyama, 2014)。その *cag* PAI は、注射針様構造の IV 型分泌装置（TFSS）に関する遺伝子をコードしており、CagA はその TFSS により宿主の細胞内に直接分泌され、宿主細胞内で炎症や発癌に寄与するシグナル伝達経路を活性化することが報告されている (Hatakeyama, 2014; Rieder et al., 2005a)。実際、慢性胃炎、消化性潰瘍、MALT リンパ腫、そして胃癌といった、胃の重症の疾患に罹患しているほとんどの患者のピロリ菌は *cagA* 陽性であり、*cagA* 遺伝子の存在

と疾患の病態には正の相関があることが示されている (Kusters et al., 2006; Yamaoka, 2012)。



図序-1 Correaのカスケード

Correaが提唱する胃癌発症モデルを示す。（Correa, 1992.を改変）

ピロリ菌と IL-1β

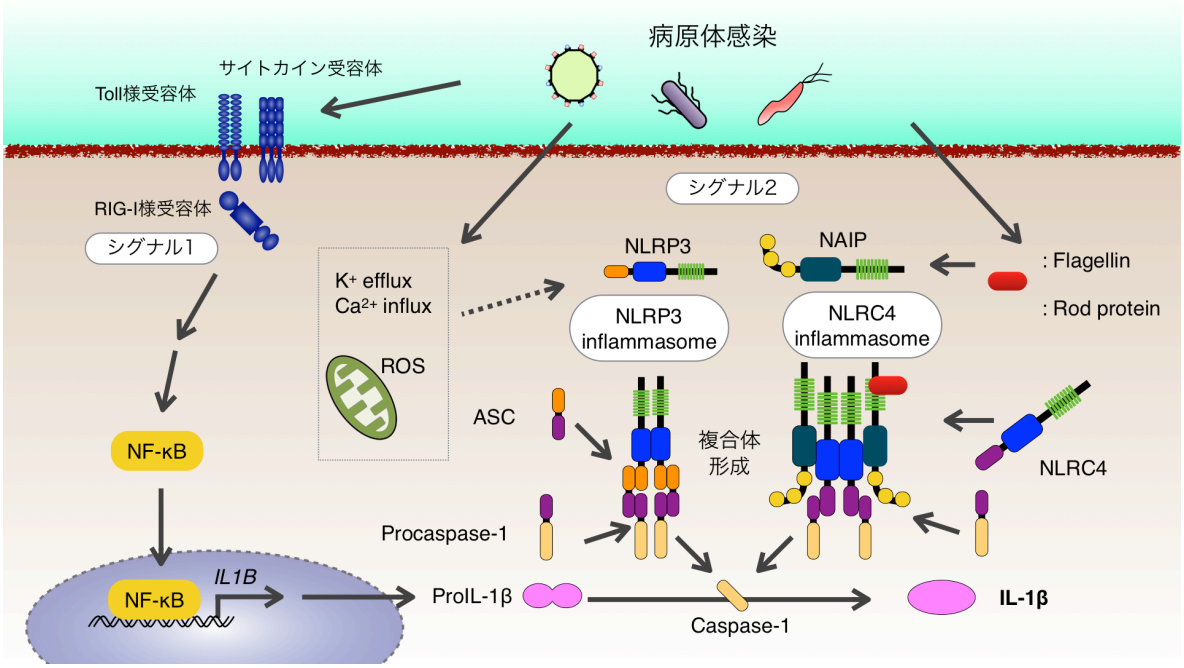
ピロリ菌感染によって、interleukin（IL）-1β をはじめ、IL-8、tumor necrosis factor（TNF）-α といった様々な炎症性サイトカイン量が増加する (Peek and Crabtree, 2006; Peek et al., 1995)。これらのピロリ菌感染によって誘導される炎症性サイトカインはピロリ菌感染患者の胃粘膜に高度に浸潤してくる好中球、リンパ球、形質細胞やマクロファージといった炎症性細胞と関連しており、それによりピロリ菌感染に関連疾患が引き起こされる (Portal-Celhay and Perez-Perez, 2006)。とくに IL-1β は、胃炎や胃癌発症と強く関連があることから、ピロリ菌感染における病態の鍵となるサイトカインのひとつとして知られている (El-Omar, 2001;

Hwang et al., 2002)。ピロリ菌感染によって増加する IL-1β はその胃酸の分泌を強く抑制することが知られており (Wallace et al., 1991)、その胃酸の分泌抑制は胃癌発症の要因となると考えられている (McColl and el-Omar, 1996; Ruiz et al., 1996)。また IL-1β は、その transgenic マウスにおいて胃の炎症および腫瘍形成が増加するという報告がなされている (Tu et al., 2008)。加えて、ピロリ菌感染時の IL-1β 産生量増加と関連する *IL1B* の一塩基多型が報告されており、その場合に胃癌が発症しやすくなるといわれている (El-Omar et al., 2000)。これらのことからピロリ菌と宿主の相互作用により引き起こされる IL-1β 産生機構の解明は重要な問題であるといえる。

IL-1β の産生機構

IL-1β 産生には次に示す 2 個のシグナル伝達経路が必要であることが一般的に知られている：（1）proIL-1β mRNA の誘導と（2）caspase-1 に調節される proIL-1β タンパク質の成熟化、プロセシングの過程である。前者はシグナル 1 といわれており Toll 様受容体（TLRs）や RIG-I 様受容体（RLRs）、サイトカイン受容体を介して活性化する NF-κB などの転写因子による *IL1B* 遺伝子の発現誘導に制御されている (Cogswell et al., 1994)。後者の過程はシグナル2といわれており inflammasome と呼ばれるタンパク質複合体の活性化によって制御されている (Davis et al., 2011; Lamkanfi and Dixit, 2014; Schroder and Tschopp, 2010; Strowig et al., 2012)。Inflammasome は細胞内のタンパク質複合体であり、古典的な inflammasome は、Nod 様受容体（NLRs）あるいは AIM2 様受容体（ALRs）を受容体として、アダプター分子の ASC および procaspase-1 といった構成因子により構成される。細胞に対して感染やストレスが加わると、受容体である NLRs や ALRs は活性化し、多量体化し、それに引き続いてアダプタータンパク質である ASC、さらに procaspase-1 が集合することにより inflammasome と呼ばれる複合体を形成する。その結果、procaspase-1 が自己分解的に開裂することで活性化型である caspase-1 となる（図序-2）。そして活性化型の caspase-1 により proIL-1β が切断され IL-1β となり、自然免疫やそれに続く炎症性反応を誘導するための

下流シグナルを活性化する。また caspase-1 の活性化は IL-1β や IL-18 といった炎症性サイトカインの成熟化およびその分泌を誘導するだけではなく、pyroptosis と呼ばれる細胞死の誘導もまた引き起こす (Miao et al., 2011)。



図序-2 IL-1β産生機構

病原体感染における IL-1β 産生機構を示す。IL-1β 産生は、TLRs や RLRs を介した自然免疫活性化経路または TNF-α などのサイトカインシグナルが入ると転写因子が活性化し proIL-1β が産生されるシグナル 1 と、シグナル 1 によって産生された proIL-1β の成熟化を引き起こす inflammasome の活性化であるシグナル 2 によって引き起こされる。

図序-2 に示すように、NLR ファミリーメンバーの中でも、NLRP3 と NLRC4 についてはこれまで多数の研究報告がなされている。NLRC4 は NAIP を介して *Shigella flexneri*、*Salmonella typhimurium*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Legionella pneumophila* といった細菌の鞭毛の構成成分である flagellin や、III 型分泌装置の構成成分である rod タンパク質を検知し、それら flagellin や rod タンパク質は NAIP に直接結合することで活性化を引き起こすことが知られている (Davis et al., 2011; Lamkanfi and Dixit, 2014; Schroder and Tschopp, 2010; Strowig et al., 2012; Zhao et al., 2011)。一方で、NLRP3 inflammasome の活性化因子は多数報告されており、細胞外 ATP の ATP 受容体の結合とそれに伴う細胞外へのカリウムイオンの流出 (K^+

efflux）シリカ、β-アミロイド、活性酸素種（ROS）、細胞質内カルシウムイオン（Ca^{2+}）濃度の上昇などと多岐にわたる (Davis et al., 2011; Lamkanfi and Dixit, 2014; Schroder and Tschopp, 2010; Strowig et al., 2012)。しかしながら、NLRC4 inflammasome と異なり、NLRP3 に直接結合し、その活性化を引き起こすリガンドは明らかにされていない。

CagA と IL-1β

これまで、IL-1β は *cagA* 陽性ピロリ菌感染患者の胃組織において *cagA* 陰性ピロリ菌感染患者と比較して増加するという報告がなされている (Peek et al., 1995; Yamaoka et al., 1997)。またスナネズミを用いた動物モデルにおいても IL-1β は *cagA* 遺伝子に依存していると報告されている (Rieder et al., 2005b)。一方で近年、ピロリ菌感染における IL-1β 産生機構が報告されてきた (Kim et al., 2013; Li et al., 2015; Semper et al., 2014) 。しかしながらこれらの報告においてはピロリ菌が持つ病原因子 CagA と IL-1β 産生機構の関与は示されておらず、CagA によって誘導される IL-1β 産生の詳細な分子機構は不明であった。

そのため本研究では、CagA による IL-1β 産生機構を明らかにすることを目的として実験を行った。その結果、ピロリ菌感染においてその病原因子である CagA が直接的に NLRP3 に結合することで、NLRP3 inflammasome の活性化を引き起こすという新しい知見を得た。

第1章 – ヒトではピロリ菌感染によるIL-1βはCagA依存的にマクロファージから産生される

1.1 序論

まずはじめに、ピロリ菌感染によってIL-1βがどの細胞から産生されるのかについて検討した。ピロリ菌は胃に定着し、胃上皮細胞に感染する。一方で、粘膜固有層に侵入し、マクロファージなどの炎症性細胞に感染することも知られている(Ito et al., 2008)。そこで、本症では胃上皮由来細胞株および単球/マクロファージ細胞株を用いて、どの細胞からIL-1βが産生誘導されるのか比較検討することを試みた。

1.2 材料と方法

細胞

THP-1（RCB1189）細胞は理化学研究所バイオリソースセンターから譲渡されたものを使用した。Mono Mac 6 細胞は German Research Centre for Microorganisms and Cell Cultures から購入したものを使用した。MKN45、MKN74、および KATO III 細胞は国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所　JCRB 細胞バンクから譲渡されたものを使用した。GES-1 細胞は野口博士 (Guo et al., 2013)より分与して頂いた。MKN45, MKN74 および THP-1 細胞は 10%非働化牛胎仔血清（FBS, GIBCO）添加 RPMI 1640 培地（R8758; Sigma）により培養した。Mono Mac 6 細胞は 10%FBS、2 mM の L-グルタミン（21051-024; GIBCO）、1 x MEM Non-essential Amino Acid Solution（M7145; Sigma）、1 mM ピルビン酸ナトリウム（S8636; Sigma）、10 μg/ml インスリン（I19278; Sigma）添加 RPMI 1640 培地にて培養した。KATO III 細胞は 10%FBS 添加 Eagle's minimal essential 培地（M4655; Sigma）と RPMI 1640 培地を 1：1 に混合した培地にて培養した。GES-1 は 10%FBS 添加ダルベッコ変法 Eagle's 培地（DMEM。05919; NISSUI）にて培養した。ヒト末梢血単球（PBMCs）については後述する。すべての細胞は 37°C、5% CO_2 のもとで培養した。

阻害剤

Caspase-1 阻害剤 (Ac-YVAD-CMK, Enzo Life Sciences) は最終濃度 50 μM になるようにピロリ菌感染 1 時間前に培地に添加した。

抗体

抗体は以下のものを用いた：マウス抗 CagA 抗体 (HPM-5001-5; AUSTRAL BIOLOGICALS)、マウス抗リン酸化チロシン抗体 (#9411S, P-Tyr-100; NEB)、ウサギ抗 Caspase-1 抗体 (D7F10; Cell signaling)、マウス抗 β-ACTIN 抗体 (A5441, AC-15; Sigma)。

THP-1 のマクロファージへの誘導

THP-1 をマクロファージに分化させるために、THP-1 は最終濃度 1 μM PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate)（P1585; Sigma）で 3 時間処理した後、PBS で洗浄し、10%FBS 添加 RPMI1640 培地で 2 日間培養し実験に用いた (Fernandes-Alnemri et al., 2009; Tsuchiya et al., 1982)。

PBMC のマクロファージへの誘導

PBMCs は健常人の末梢静脈血(北海道赤十字血液センターより提供を受けた)から Ficoll (Sigma)を用いて密度勾配遠心法により単離した。PBMCs をヒトマクロファージに分化させるために、PBMCs を 10%FBS および 2 mM の L-グルタミンを添加した RPMI 1640 培地に 100 ng/ml ヒト GM-CSF (Granulocyte Macrophage colony-stimulating Factor)（300-03; PeproTech）を加え 1 週間培養した (Greco et al., 2012)。この実験計画は 1975 年のヘルシンキ宣言に従っており、また北海道大学の施設内倫理委員会の承認のもと行っている。

ピロリ菌の培養および感染

野生型ピロリ菌株（WT）、*cagA* 遺伝子欠損株（Δ*cagA*）および *cagE* 遺伝子欠損株（Δ*cagE*; *cagE* 遺伝子は TFSS の構成因子 CagE をコードし、欠損させると TFSS を構築できず CagA を分泌できない）はトリプチケースソイ II 5%羊血液寒天培地(251239; BD)で 2 日間、37°C、微好気条件下（アネロパック微好気（A-28; 三菱ガス化学）を使用）で培養した。ピロリ菌の細胞への感染実験のために、10%FBS 添加ブルセラ培地 （211088; BBL）にて 20~24 時間、37°C、微好気条件下において、90~120 rpm で振とう培養した。振とう培養後、ピロリ菌を 1 分間、6,000 rpm にて遠心沈降し、感染させる細胞それぞれに用いた細胞培養液にて懸濁し、100 moi（multiplicity of infection）にて感染させた。ピロリ菌の菌数は OD_{600} において、8×10^8 bacteria/ml/OD_{600} として推定し、算出した。感染させた細胞は 37°C、5% CO_2 でインキュベーションし、各種解析を行った。

ELISA

細胞（2.5 x 10^5 cells per well、 24-well plate）の培養上清はピロリ菌感染後 24 時間で回収した。培養上清中の IL-1β と IL-8 の産生量は各々、IL-1β（R&D Systems）または IL-8 ELISA キット（Enzo Life Science）を用いて、製品に添付のプロトコールに従って測定した。

SDS-PAGE および immunoblot 法

ピロリ菌感染後 8 時間の THP-1 細胞を溶解バッファー（1% NP-40、50mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl、5 mM EDTA、2 mM Na_3VO_4、2mM PMSF、10 mg/ml leupeptin）中に懸濁し、4°C で 20 分間インキュベーションし細胞を溶解した。12,000 rpm で 10 分間、遠心分離を行った後、上清中のタンパク質濃度を Protein Assay kit（Bio-Rad）測定した。SDS-PAGE には 40 μg のタンパク質を用いた。Caspase-1 p20 の検出のためにはピロリ菌感染後 8 時間の細胞培養上清を Vivaspin 500（Sartorius）により 20 μL まで限外濾過して用いた。タンパク質溶液および濃縮した細胞培養上清に 1 mM DTT 添加 6 x SDS サンプルバッファーを加え 100°C で 5 分間加熱した。

SDS-PAGE は Laemmli の方法に準じた。SDS-PAGE によりタンパク質を 30 mA で電気泳動により分離した後、メタノールで親水化処理した PVDF 膜（Millipore）に 2 mA/cm^2 で 60 分間転写した。得られた PVDF 膜は TBS-T に溶解した 5% BSA を用いてブロッキング処理を行い、適切な一次抗体を用いて 4°C で一晩インキュベーションした後、適切な西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ（HRP）標識二次抗体で室温、1 時間処理した。処理後の PVDF 膜を ECL Plus Western Blotting Substrate（32132; Thermo Scientific）で発光させ、ImageQuant LAS 4000（GE Healthcare）を用いて検出した。

定量的 RT-PCR

PMA によりマクロファージに分化させた THP-1（2.5 x 10^5 cells per well, 24-well plate）にピロリ菌を 8 時間感染させた。細胞の RNA は ISOGEN（NIPPON GENE）を用いて精製し、DNaseI（Invitrogen）で処理した。得られた RNA から cDNA は ReverTra Ace Moloney murine

leukemia virus reverse transcriptase with point mutations（Toyobo）を用いて合成した。定量的 PCR は SYBR Premix Ex Taq reagent mixture（TAKARA）を用いて、StepOnePlus real-time PCR system（Applied Biosystems）にて解析した。プライマーの詳細は表 1 に示す。また内部標準として *ACTB* を用いた。

乳酸脱水素酵素（LDH）の定量

細胞（2.5 x 10^5 cells per well、 24-well plate）の培養上清はピロリ菌感染後 24 時間で回収した。培養上清中の LDH は LDH Cytotoxicity Detection Kit（TAKARA）を用いて検出した。また定量にあたって L-LDH（Roche）を用いて検量線を作成し、定量した。

統計学的解析

統計学的解析は Student's *t*-test により行った。

表 1: 定量的 PCR に用いたプライマー

Target genes	Forward (5′→3′)	Reverse (5′→3′)
IL1B	GCCGCGTCAGTTGTTGTGGC	TGAGTCCCGGAGCGTGCAGT
ACTB	CATGTACGTTGCTATCCAGGC	CTCCTTAATGTCACGCAT

1.3 結果

1.3.1 ピロリ菌感染時の IL-1β 産生細胞の同定

はじめに、IL-1β 産生細胞を同定するために胃上皮由来培養細胞株および単球/マクロファージ細胞株にピロリ菌（WT）を 24 時間感染させ、IL-1β および IL-8 の産生量を測定した (図 1-1A)。ヒト胃癌細胞株である MKN74、MKN45 および KATO III、そしてヒト不死化胃上皮細胞株 GES-1 のすべての胃上皮由来培養細胞株において IL-1β は検出されなかったが、IL-8 はその産生が認められた。一方でヒト単球由来細胞株 Mono Mac 6 およびマクロファージに分化させた THP-1 においては感染によって IL-1β および IL-8 は顕著にその産生増加がみとめられた。さらに IL-1β が菌の量依存的に産生されるかどうか調べたところ、マクロファージに分化させた THP-1 はピロリ菌感染量依存的に IL-1β 産生量が増加した (図 1-1B)。

1.3.2 マクロファージ細胞内への CagA 分泌の確認

胃上皮細胞に注入された CagA はチロシンリン酸化修飾を受けることが知られている (Stein et al., 2000)。そのため、マクロファージに分化させた THP-1 細胞にピロリ菌を 8 時間感染させ、その細胞溶解液を用いて SDS-PAGE および immunoblot を行った結果、CagA はチロシンリン酸化修飾を受けていた (図 1-2)。

1.3.3 IL-1β 産生への CagA の依存性の確認

前項においてマクロファージに分化させた THP-1 細胞内に CagA が移行することを明らかにした。これをうけて次に IL-1β 産生は CagA に依存しているかどうかをするために、WT、Δ*cagA* およびΔ*cagE*（*cagE* 遺伝子は TFSS の構成因子 CagE をコードし、欠損させると TFSS を構築できず CagA を分泌できない）を用いた感染実験を行った。その結果、マクロファージに分化させた THP-1 細胞の IL-1β 産生量は WT 感染に比べてΔ*cagA*、Δ*cagE* 感染において有意に低下した (図 1-3A)。

さらに PBMCs から分化させたヒトマクロファージにおいても同様の現象が認められる

かどうか検討した。その結果、WT 感染に比べてΔ*cagA*、Δ*cagE* 感染において有意に低下するという同様の結果が得られた (図 1-3B)。

1.3.4 CagA が *IL1B* の mRNA の転写に及ぼす影響

IL-1βの産生には*IL1B*遺伝子にコードされているproIL-1βの産生が必要であることから、*IL1B* の mRNA の転写レベルにおいて検討した。これまでいくつかの報告において、ピロリ菌のCagAが陽性であることと*IL1B*のmRNA量に正の相関があると言われている (Peek et al., 1995; Rieder et al., 2005b)。そのため、PMA でマクロファージに分化させた THP-1 細胞においてCagA と *IL1B* の mRNA に関連があるのかどうかを検討した。細胞に WT、Δ*cagA* およびΔ*cagE* を感染させ、*IL1B* の mRNA 量を定量的 RT-PCR にて定量したところ、非感染細胞に対して WT 感染細胞では *IL1B* の mRNA 量は有意に増加し、WT 感染細胞に対してΔ*cagA* およびΔ*cagE* の感染細胞では *IL1B* の mRNA 量は有意に低下した (図 1-4)。*IL1B* の転写は NF-κB に制御されていることが知られている(Cogswell et al., 1994)。また CagA による NF-κB の活性化はこれまで多くの報告がなされており(Backert and Naumann, 2010)、本結果で示された CagA に依存した *IL1B* mRNA の増加の機構はこれまでの報告に合致しているものと考えられる。

1.3.5 Caspase-1 の活性化に対する CagA の関与の検討

IL-1βの産生には活性化したcaspase-1によるproIL-1βの成熟化が必要である。そのため、ピロリ菌感染による IL-1β 産生に caspase-1 が関与していることを確認するためにマクロファージに分化させた THP-1 細胞に caspase-1 阻害剤（Ac-YVAD-CMK）を処理し、ピロリ菌（WT）感染実験を行った。感染後 24 時間の培養上清中に含まれる IL-1β 産生量を測定した結果、caspase-1 阻害剤処理によって IL-1β 産生は有意に低下した(図 1-5A)。次に、この caspase-1 活性化に CagA が関与しているかどうかを検討した。Caspase-1 の活性化は procaspase-1 の開裂による caspase-1 (p20)のタンパク質量により評価できる。そのためマクロファージに分化させた THP-1 に WT、Δ*cagA* およびΔ*cagE* を感染させ、8 時間後の培養

上清を限外濾過し、SDS-PAGE および immunoblot 解析を行った。その結果、WT 感染に比べて変異株感染では caspase-1 (p20)が顕著に抑制されていた (図 1-5B)。

1.3.6 CagA が pyroptosis に及ぼす影響の検討

Caspase-1 の活性化は、proIL-1β の成熟化に必須の酵素というのみならず、pyroptosis と呼ばれる細胞死にも関与している (Lamkanfi and Dixit, 2014; Schroder and Tschopp, 2010; Strowig et al., 2012)。そこで CagA が pyroptosis に関与しているかどうかを調べるために、ピロリ菌感染後24時間のTHP-1細胞の培養上清中のLDH量を測定した (Fernandes-Alnemri et al., 2007; 2009)。その結果培養上清中の LDH 量は WT 感染に比べて*ΔcagA*、*ΔcagE* 感染において有意に低かった (図 1-6)。したがって CagA 依存的に細胞外への LDH の放出が増強されたことは、caspase-1 による pyroptosis が誘導されている可能性が示唆された。

図 1-1

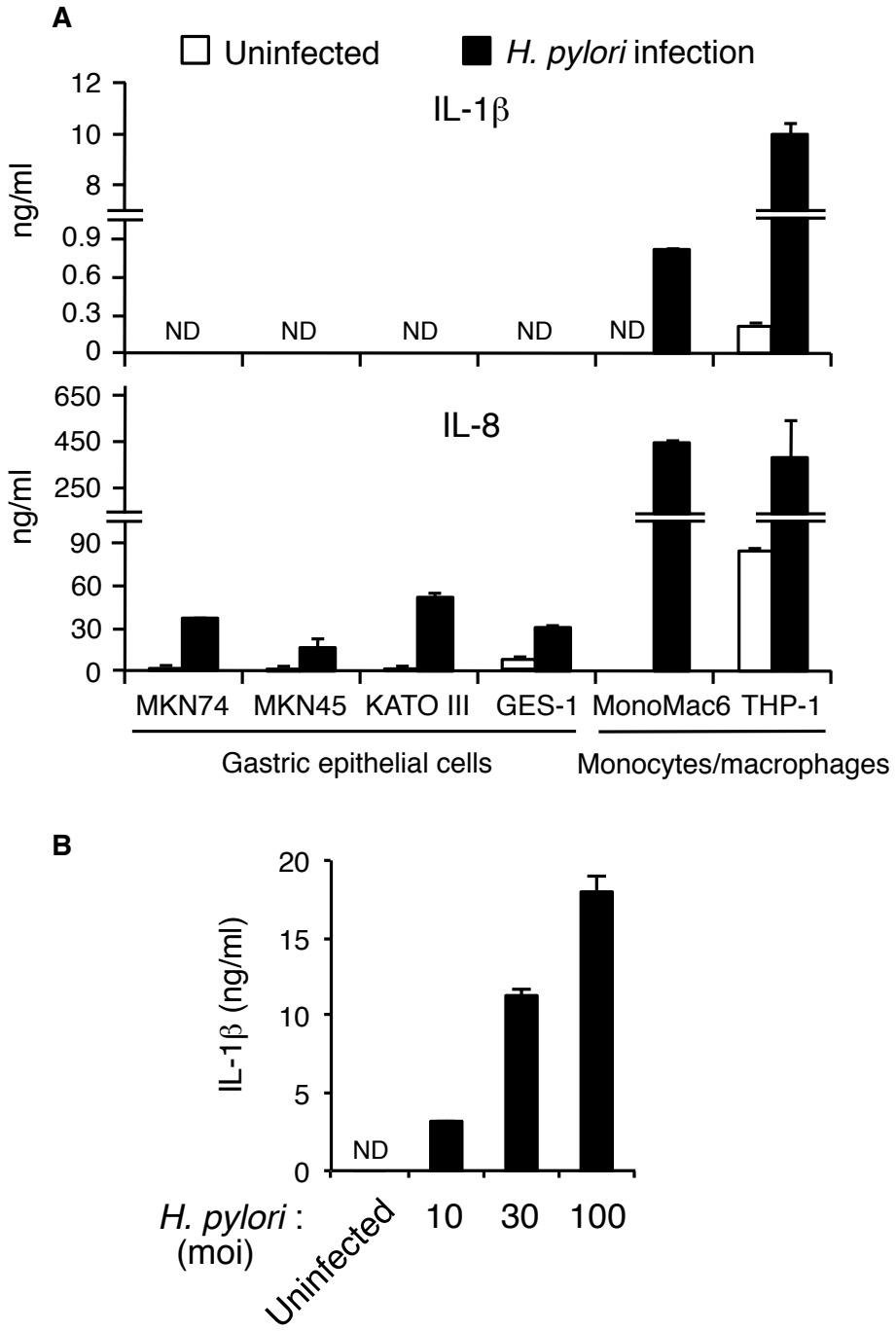


図1-1. ピロリ菌感染時におけるIL-1β産生細胞の同定

(**A**) 図に示す胃上皮由来培養細胞株および単球/マクロファージ細胞株にピロリ菌（WT）を24時間感染させ、IL-1β（上段）およびIL-8（下段）の産生量をELISAにより測定した（n=2）。

(**B**) PMAでマクロファージに分化させたTHP-1細胞に、図に示す量の菌を感染させ、24時間後の培養上清中のIL-1βをELISAにより測定した（n=3）。

エラーバーは標準偏差を示す。NDは検出限界以下を示す。

図 1-2

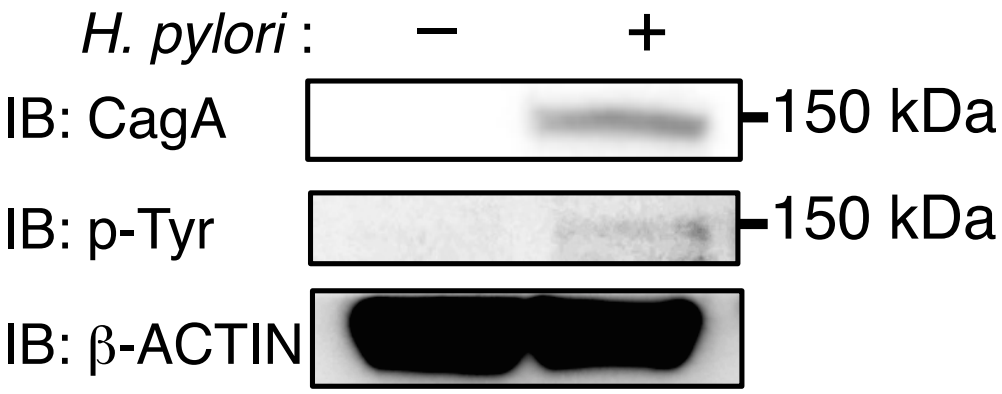


図1-2. ピロリ菌感染マクロファージにおけるCagAのリン酸化解析

PMAで分化させたTHP-1細胞にピロリ菌（WT）を感染させ8時間後の細胞溶解液の抗CagA抗体、抗リン酸化チロシン抗体、および抗β-ACTIN抗体を用いたimmunoblot像を示す。

図 1-3

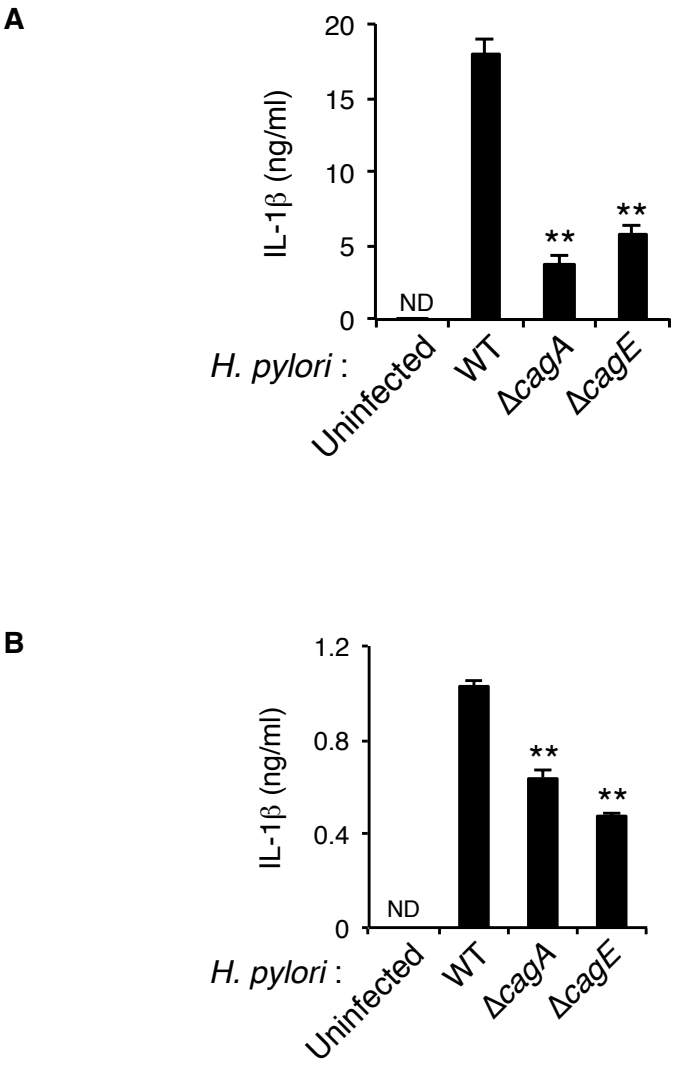


図1-3. IL-1β産生へのCagAの依存性の検討

(**A**,**B**) 各種ピロリ菌（WT、Δ*cagA*、Δ*cagE*）を24時間感染させ、培養上清中のIL-1βをELISAにより測定した。

(**A**) PMAで分化させたTHP-1細胞を用いた。

(**B**) ヒトPBMCsをマクロファージに分化させて用いた。

エラーバーは標準偏差を示す。NDは検出されなかったことを示す。

** $p < 0.01$（Studens't *t*-test, n=3）。

図 1-4

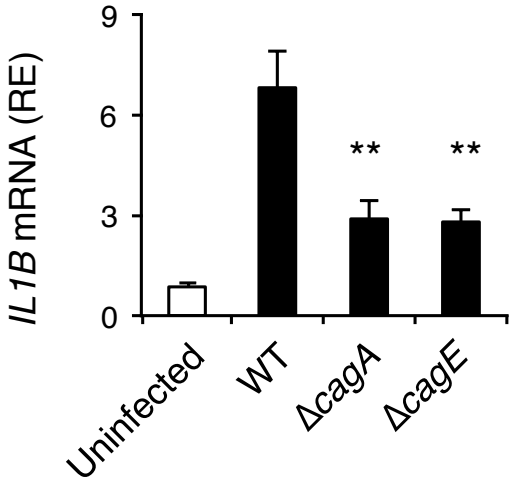


図1-4. CagAが*IL1B* mRNAの転写に及ぼす影響

PMAで分化させたTHP-1細胞に図に示すピロリ菌（WT、Δ*cagA*、Δ*cagE*）を8時間感染させ、細胞からRNAを抽出し、*IL1B*のmRNA量を定量的RT-PCRにて定量した。

エラーバーは標準偏差を示す。** $p < 0.01$（Student's *t*-test, n=3）。

図 1-5

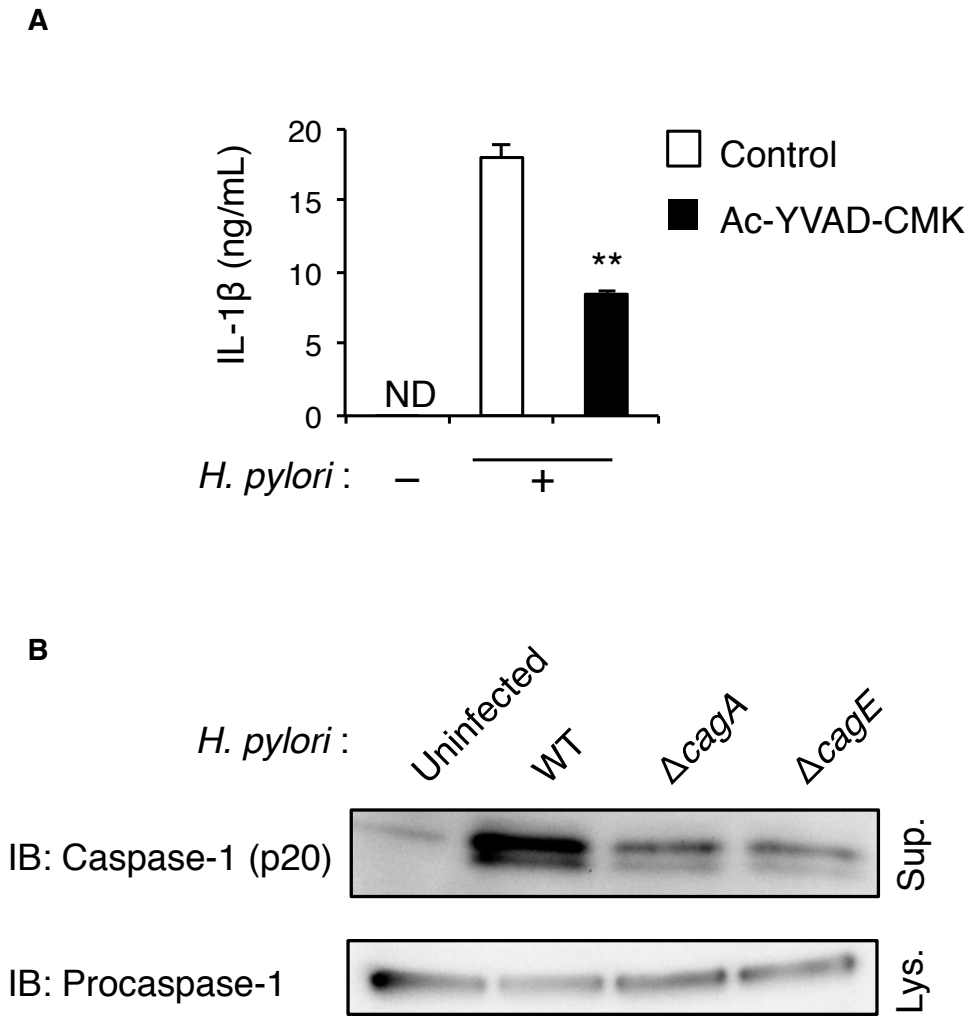


図1-5. ピロリ菌感染におけるcaspase-1の依存性とCagAの関与の検討

(**A**) PMAで分化させたTHP-1細胞にcaspase-1阻害剤（Ac-YVAD-CMK. 50 μM）を添加し、ピロリ菌（WT）を感染させ、24時間後の培養上清中のIL-1βをELISAにて測定した。

エラーバーは標準偏差を示す。NDは検出限界以下を示す。

** $p < 0.01$（Student's *t*-test, n=3）。

(**B**) PMAで分化させたTHP-1細胞にピロリ菌（WT、Δ*cagA*、Δ*cagE*）を8時間感染させた。限外濾過した培養上清（Sup.）および細胞溶解液（Lys.）の抗Caspaes-1抗体を用いたimmunoblot像を示す。

図 1-6

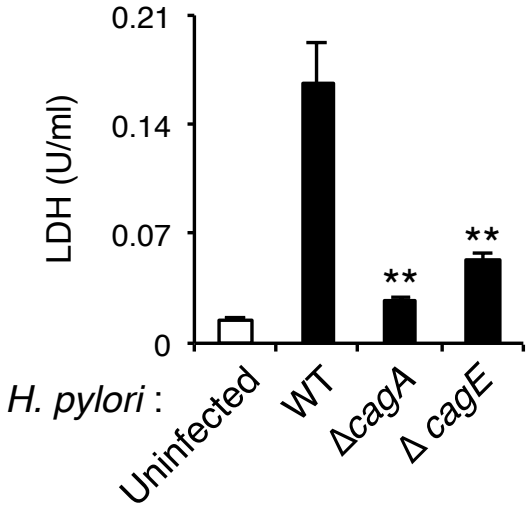


図1-6. ピロリ菌感染におけるCagAのpyroptosisに及ぼす影響

PMAで分化させたTHP-1細胞に図に示すピロリ菌（WT、Δ*cagA*、Δ*cagE*）を24時間感染させ、培養上清に含まれるLDH量を定量した。

エラーバーは標準偏差を示す。** $p < 0.01$（Student's *t*-test, n=3）。

1.4 小括

- ピロリ菌感染による IL-1β はマクロファージから産生される。
- ピロリ菌感染おけるマクロファージでの IL-1β 産生は CagA に依存して顕著な産生が認められる。
- ピロリ菌感染による *IL1B* の mRNA の転写は CagA に依存して促進される。
- ピロリ菌感染において caspase-1 は CagA 依存的に活性化する。
- ピロリ菌感染により CagA 依存的に LDH の放出量が増加されたことにより、caspase-1 による pyroptosis が誘導されていることが示唆された。

第 2 章 – CagA は NLRP3 inflammasome を活性化し、IL-1β を産生する

2.1 序論

第 1 章では、ヒトマクロファージの IL-1β 産生において CagA 依存的に *IL1B* の転写および caspase-1 の活性化が生じていることを示した。CagA に依存した *IL1B* の転写機構については、前章で記載したようにこれまでの報告に基づいていると考えられる(Backert and Naumann, 2010; Cogswell et al., 1994)。そのため、本章以降においては、これまで不明であった CagA に依存した caspase-1 の活性化を引き起こす機構の解析を行うこととした。

序章で述べたように、caspase-1 の活性化には inflammasome の活性化が必須であることから、CagA は inflammasome の活性化に関与していることが考えられる。そのため、本章では細菌感染において多くの報告がある inflammasome の受容体 NLRP3 と NLRC4 に焦点を置き、CagA に依存した IL-1β 産生に関与する NLR の同定を試みた。さらに、その受容体である NLR が活性化すると多量体化し、それに引き続いてアダプタータンパク質である ASC、さらに procaspase-1 が集合することにより inflammasome の複合体を形成することから (Davis et al., 2011; Lamkanfi and Dixit, 2014; Schroder and Tschopp, 2010; Strowig et al., 2012)、CagA が NLR と ASC の複合体に影響を及ぼすかどうかや、NLR の多量体化に影響するかどうかなど、どのように inflammasome の活性化機構に関与しているのか解析を試みた。

2.2 材料と方法

細胞

THP-1 細胞は第 1 章の記述に従った。ヒト胎児由来腎細胞株 HEK293T 細胞は American Type Culture Collection から得た。HEK293T 細胞は 10% FBS 添加 DMEM で培養した。

抗体

抗体は以下のものを用いた：マウス抗 CagA 抗体 (HPM-5001-5; AUSTRAL BIOLOGICALS)、ウサギ抗 ASC 抗体 (AG-25B-0006, AL177; AdipoGen)、マウス抗 NLRP3 抗体 (AG-20B-0014, Cryo-2; AdipoGen)、マウス抗 FLAG 抗体 (F1804, M2; Sigma)、ラット抗 hemagglutinin（HA）抗体 (3F10; Roche)、マウス抗 Myc 抗体 (sc-40, 9E10; Santa Cruz)、ウサギ抗 GFP 抗体 (632592; Clontech：YFP の検出および免疫沈降法に用いた)、マウス抗 β-ACTIN 抗体 (A5441, AC-15; Sigma)。

THP-1 のマクロファージへの誘導

第 1 章の記述に従って行った。

ピロリ菌の培養および感染

第 1 章の記述に従って行った。

siRNA による遺伝子抑制

ターゲット遺伝子をノックダウンするために、表に示す人工合成 siRNA およびコントロール siRNA (siPerfect Negative Control) を Sigma から得た (表 2)。THP-1 細胞への siRNA の導入は 50 nM siRNA、6.0 μl HiPerFect（QIAGEN）の条件で指示書に従って行い、それに続く実験を行った。

定量的 RT-PCR

定量的 PCR は第 1 章の記述に従った。用いたプライマーの詳細は表 3 に示す。

発現ベクターおよび遺伝子導入

ヒト NLRP3（Accession No. AK314998）の cDNA は独立行政法人製品評価技術基盤機構 バイオテクノロジーセンター（NBRC, Japan）より得た。ヒト ASC、procaspase-1α、proIL-1β の cDNA はピロリ菌感染 THP-1 細胞の全 RNA を逆転写し、特異的なプライマーを用いてクローニングした。各々の cDNA の配列は BigDye Terminator v3.1 sequencing kit（Applied Biosystems）により確認した。哺乳動物細胞発現ベクターの構築にあたっては、NLRP3 は 5′末端に kozak 配列を付加し、終止コドンの前に 3xFLAG タグあるいは Myc タグ配列を挿入し、哺乳動物細胞発現ベクターpcDNA3.1 ベクター（Invitrogen）に挿入した。ASC は 5′末端に kozak 配列を付加し、終止コドンの前に Venus（本論文では YFP と呼ぶ）タグあるいは 3xFLAG タグ配列を挿入し、pcDNA3.1 ベクターに挿入した。Procaspase-1α は 5′末端に kozak 配列を付加し、終止コドンの前に Myc タグ配列を挿入し、pcDNA3.1 に挿入した。ProIL-1β は 5′末端に kozak 配列を付加し、終止コドンの前に Myc タグ配列を挿入し、哺乳動物細胞発現ベクターpCAGGS に挿入した。pCAGGS ベクターおよび Venus は各々、宮崎博士および宮脇博士より分与いただいた。

ピロリ菌 NCTC11637 株由来 *cagA* 遺伝子は 5′末端に kozak 配列を付加し、終止コドンの前に HA タグ配列を挿入し、哺乳動物細胞発現ベクターpCAGGS に挿入されたものを東京大学大学院医学系研究科・医学部 微生物学研究室 畠山昌則教授より分与いただいた。HEK293T 細胞へのベクターのトランスフェクションは FuGENE 6（Promega）を用いて、指示書に従い行い、その後の解析を行った。

免疫沈降法

細胞を第 1 章に従って溶解し、上清中のタンパク質濃度を Protein Assay kit（Bio-Rad）測定した。免疫沈降にはタンパク質を 1 mg 用いた。細胞溶解バッファーにてタンパク質溶

液を 500 μL にし、適切な抗体を加え、4°C でひと晩、転倒混和した後、Dynabeads Protein G（Life Technologies）を加えて 4°C で 1 時間転倒混和した。溶解バッファーで 5 回の洗浄を行い、SDS サンプルバッファーを加えて 100°C で 5 分加熱し SDS-PAGE のサンプルとした。

SDS-PAGE および immunoblot 法

免疫沈降法のコントロールとしての 40 μg のタンパク質および免疫沈降法により得たサンプルは第 1 章の記述に従って SDS-PAGE および immunoblot 解析を行った。

HEK293T 細胞を使用した NLRP3 inflammasome 再構築系法

HEK293T 細胞を 2 x 10^5 cells/well（12-well plate）に播種し、NLRP3（50 ng）、ASC（40 ng）、procaspase-1α（20 ng）および proIL-1β（400 ng）を FuGENE 6 を用いてトランスフェクションし (Chuang et al., 2011)、それに続く解析を行った。

- NLRP3 inflammasome 再構築 HEK293T 細胞へのピロリ菌感染

NLRP3 inflammasome 再構築のためのトランスフェクションした 24 時間後にピロリ菌を感染させ、20 時間後の培養上清を回収した。

- NLRP3 inflammasome 再構築 HEK293T 細胞への CagA の過剰発現

NLRP3 inflammasome 再構築のためのトランスフェクションと同時に 1000 ng の空ベクターおよびCagA の発現ベクターをトランスフェクションし、24時間インキュベーションし、培養上清を回収した。

ELISA

第 1 章の記述に従って行った。

統計学的解析

統計学的解析は Student's *t*-test により行った。

表 2: siRNA のターゲット配列

Target genes	ターゲット配列
NLRP3	ACCGCGGUGUACGUCUUCUUCCUUU
NLRC4	UGCAGUUCGAAAUCAAACUUGUGGG
MyD88	CUGGAACAGACAAACUAUC
TICAM1 (*TRIF*)	GCCAUAGACCACUCAGCUU

表 3: 定量的 PCR に用いたプライマー

Target genes	Forward (5′→3′)	Reverse (5′→3′)
NLRP3	GATCTTCGCTGCGATCAAC	GGCATATCACAGTGGGATTC
NLRC4	TGAACTGATCGACAGGATGAAC	GTCTCCAGTTTTTCAACCCAAG
ACTB	CATGTACGTTGCTATCCAGGC	CTCCTTAATGTCACGCAT

2.3 結果

2.3.1 ピロリ菌感染活性化する NLR の同定

ヒトマクロファージにおけるピロリ菌感染時の IL-1β 産生に関与する NLR を同定するために、マクロファージに分化させた THP-1 細胞の NLRP3 および NLRC4 の遺伝子ノックダウンを siRNA のトランスフェクションにより行い、ピロリ菌の感染実験を実施した。その結果 NLRP3 をノックダウンした場合においてピロリ菌（WT）感染による IL-1β 産生は抑制されたが、NLRC4 をノックダウンしたものでは IL-1β 産生は抑制されなかった (図 2-1A)。TLRs のアダプタータンパク質のひとつである TRIF は caspase-11 を介する非定型 inflammasome の活性化に関与することが知られている (Gurung et al., 2012; Rathinam et al., 2012) ことから、TLRs を介したシグナルがピロリ菌感染時における IL-1β 産生に関与しているかどうかを検討した。そのため、マクロファージに分化させた THP-1 細胞に TLRs のアダプタータンパク質 MyD88 および TRIF の発現を siRNA を用いて抑制し、ピロリ菌（WT）感染実験を行った。その結果、MyD88 および TRIF どちらを抑制しても IL-1β 産生は減少しなかった (図 2-1B)。

2.3.2 ピロリ菌感染において CagA 依存的に NLRP3 inflammasome が活性化するかどうかの検討

前項で NLRP3 がピロリ菌感染時の IL-1β 産生に寄与していることを示した。そのため次に CagA が NLRP3 inflammasome の活性化に寄与しているかどうかを検討した。NLRP3 が活性化するとアダプタータンパク質 ASC と結合し、inflammasome 複合体が形成される。このことから免疫沈降法を用いて ASC と NLRP3 の会合性が CagA 依存的にピロリ菌感染で増強するかどうかを検討した。そのためマクロファージに分化させた THP-1 細胞に WT 感染および Δ*cagA* を感染させ、ASC に対する抗体を用いて免疫沈降を行った。その結果、WT 感染後、NLRP3 と ASC の会合が増強することが認められ、一方、Δ*cagA* 感染においてはその増強はみられなかった (図 2-2)。

2.3.3 HEK293T 細胞に NLRP3 inflammasome を再構築し、ピロリ菌感染おける CagA が IL-1β 産生に関与するかどうかを検討する

マクロファージに分化させた THP-1 細胞への感染実験では NLRP3 inflamasome およびそれにともなう IL-1β 産生に対して様々な要因が影響を及ぼす。一方で、HEK293T 細胞は inflammasome の構成因子（NLRs、ALRs、ASC、procaspase-1、proIL-1β）がすべて欠損しているため、評価したい inflammasome の構成因子を過剰発現させることで、その inflammasome だけの活性化について評価することが可能となる(Chuang et al., 2011; Kofoed and Vance, 2011)。そこで NLRP3 inflammasome の再構築の実験系を用いて、CagA が NLRP3 inflammasome を活性化するかについて検討した。NLRP3 inflammasome を再構築した HEK293T 細胞に WT、Δ*cagA* および Δ*cagE* を感染させた結果、WT 感染に対して変異株の感染では有意に IL-1β の産生が低下した(図 2-3)。

2.3.4 CagA 単独で NLRP3 inflammasome が活性化するかどうかの検討

前項までにおいてピロリ菌感染によって細胞内に注入される CagA が NLRP3 inflammasome を活性化していることが示された。そこで次に、ピロリ菌の病原因子 CagA のみで NLRP3 inflammasome が活性化するかどうかを検討した。HEK293T 細胞に NLRP3 inflammasome を再構築する実験系を用いて、CagA を過剰発現させ、IL-1β の産生を測定した結果、CagA の過剰発現により IL-1β 産生は有意に上昇した (図 2-4)。

2.3.5 CagA の NLRP3 inflammasome 活性化に対する影響の検討

さらに、CagA による NLRP3 inflammasome の活性化機構を検証するために NLRP3 と ASC の会合性への影響を評価した。そのために NLRP3-FLAG と ASC-YFP、および CagA を HEK293T 細胞に過剰発現し、抗 GFP 抗体を用いて免疫沈降を行った。その結果、CagA の存在下では NLRP3 と ASC の結合性は増強した (図 2-5A)。NLRP3 inflammasome が活性化する際には NLRP3 は多量体化する。そのため前述の検証に加えて、CagA が NLRP3 の多量体化に影響を及ぼすかどうかを評価するために NLRP3-FLAG と NLRP3-Myc、および

CagA を HEK293T 細胞に過剰発現し、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行った。その結果、CagA の存在下では NLRP3 の多量体化が促進された (図 2-5B)。これらの結果から CagA は NLRP3 の多量体化を促進し、inflammasome の複合体形成を引き起こすことで caspase-1 が活性し、IL-1β の産生に寄与していることが示唆された。

図 2-1

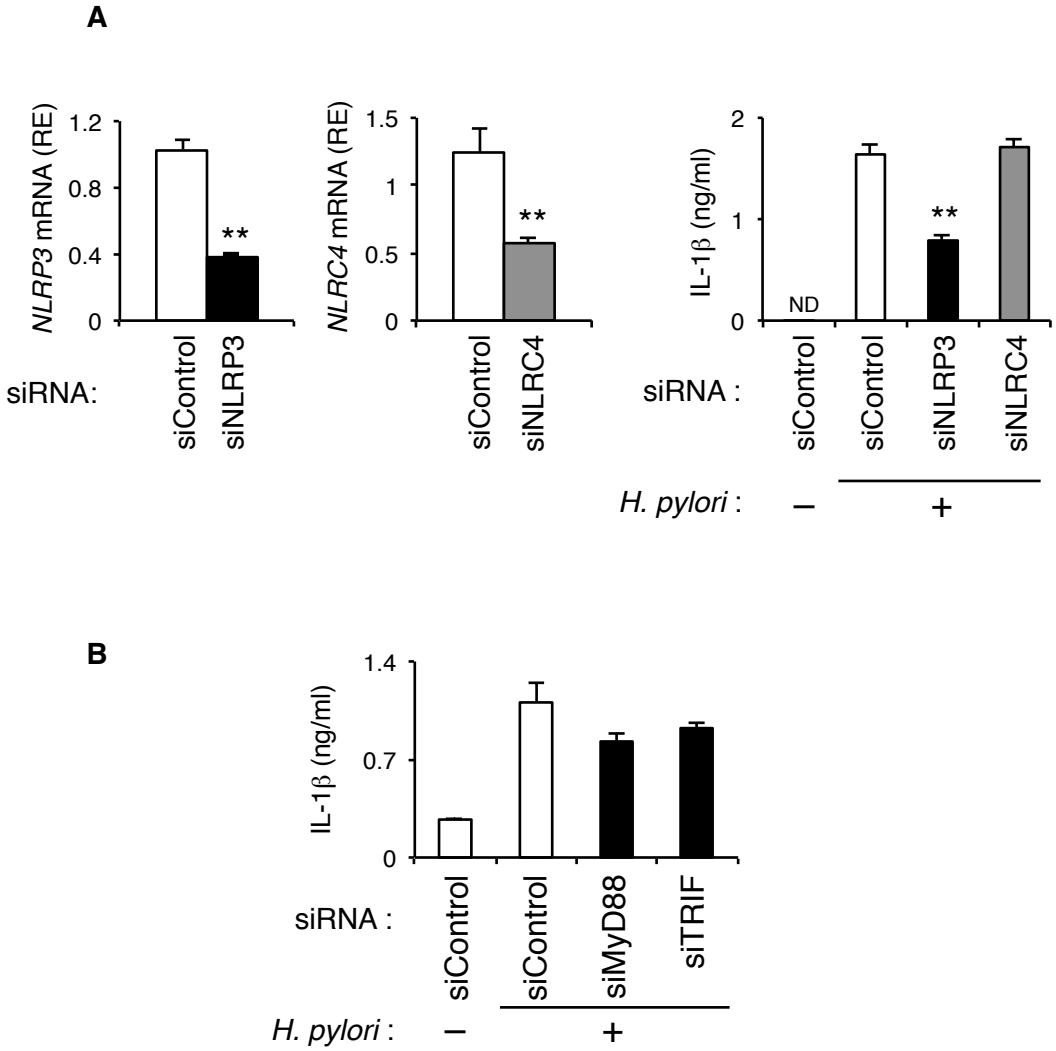


図2-1. ピロリ菌感染活性化するNLRの同定

(**A,B**) PMAで分化させたTHP-1細胞に図に示すsiRNAをトランスフェクションしピロリ菌（WT）を感染させた。各々のmRNA量は感染8時間後に定量的RT-PCRにて行った。また感染24時間後の培養上清中のIL-1β量をELISAにて測定した。エラーバーは標準偏差を示す。NDは検出限界以下であることを示す。

** $p < 0.01$（Student's *t*-test, n=3）。

図 2-2

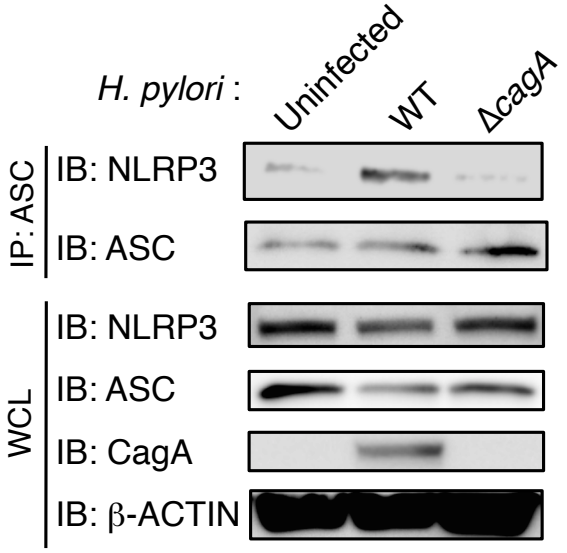


図2-2. マクロファージにおいてピロリ菌感染時にCagA依存的にNLRP3-ASC複合体形成が生じるかどうかの検討

PMAで分化させたTHP-1細胞にピロリ菌（WTおよびΔ*cagA*）を感染させ、8時間後の細胞溶解液を用いて抗ASC抗体で免疫沈降した。免疫沈降物および細胞溶解液の抗NLRP3抗体、抗ASC抗体、抗CagA抗体、および抗β-ACTIN抗体を用いたimmunoblot像を示す。

図 2-3

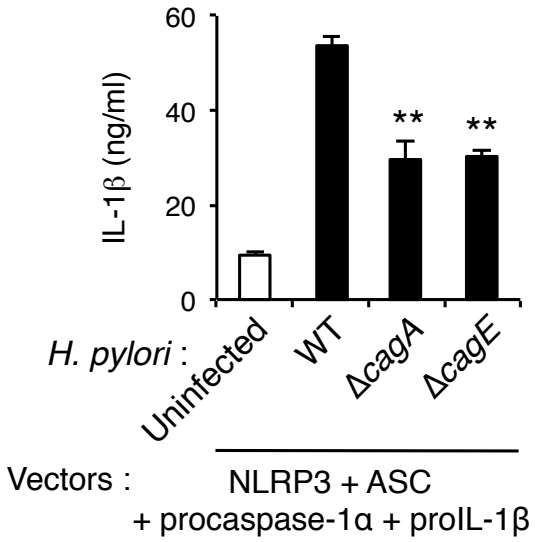


図2-3. NLRP3 inflammasomeを再構築したHEK293T細胞を用いたピロリ菌感染におけるIL-1β産生へのCagAの依存性の検討

HEK293T細胞にNLRP3、ASC、procaspase-1α、proIL-1βをトランスフェクションし、NLRP3 inflammasomeを再構築した。トランスフェクションした24時間後に各種ピロリ菌（WT、Δ*cagA*、Δ*cagE*）を感染させ、感染20時間後の培養上清中のIL-1βをELISAにより測定した。

エラーバーは標準偏差を示す。** $p < 0.01$（Student's *t*-test, n=3）。

図 2-4

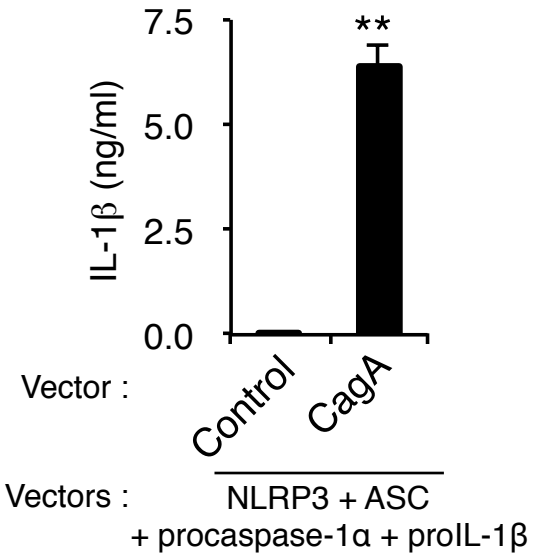


図2-4. CagAがNLRP3 inflammasomeを再構築したHEK293T細胞においてIL-1β産生を誘導するかどうかの検討

HEK293T細胞にNLRP3、ASC、procaspase-1α、proIL-1βと、ControlまたはCagAをトランスフェクションし、24時間後の培養上清中のIL-1βをELISAにより測定した。

エラーバーは標準偏差を示す。** $p < 0.01$（Student's *t*-test, n=3）。

図 2-5

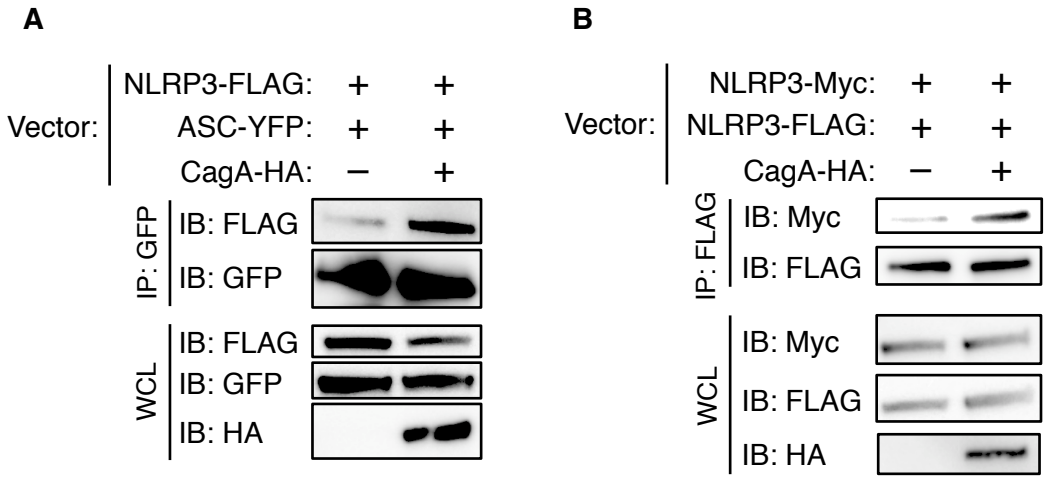


図2-5. CagAのNLRP3 inflammasome活性化に対する影響の検討

(**A**) HEK293T細胞にNLRP3-FLAG、ASC-YFP、およびCagA-HAを過剰発現した細胞溶解液を用いて抗GFP抗体で免疫沈降した。免疫沈降物および細胞溶解液の抗FLAG抗体、抗GFP抗体および抗HA抗体を用いたimmunoblot像を示す。

(**B**) HEK293T細胞にNLRP3-FLAG、NLRP3-Myc、およびCagA-HAを過剰発現した細胞溶解液を用いて抗FLAG抗体で免疫沈降した。免疫沈降物および細胞溶解液の抗FLAG抗体、抗Myc抗体および抗HA抗体を用いたimmunoblot像を示す。

2.4 小括

- ピロリ菌感染時おける IL-1β 産生には NLRP3 inflammasome が関与する。
- ピロリ菌感染時に CagA 依存的に NLRP3 と ASC の会合が増強する。
- CagA 単独で NLRP3 inflammasome が活性化し、IL-1β 産生を誘導する。
- CagA は NLRP3 と ASC の会合性を増強する。
- CagA は NLRP3 の多量体化を促進する。

第 3 章 – CagA による細胞質内 Ca^{2+}の増加により、NLRP3 inflammasome が活性化する

3.1 序論

第2章までにおいて、CagAはNLRP3 inflammasomeを活性化することでIL-1βを産生することを示した。これまでの報告において、NLRP3 inflammaomeの活性化は、細胞外ATPの膜受容体への結合やそれに伴うK^+の流出、またホスホリパーゼC（PLC）を介した細胞内Ca^{2+}の増加などにより引き起こされることが言われている (Lee et al., 2012; Murakami et al., 2012)。またピロリ菌感染させたTHP-1からのIL-1β産生にはROSが関与しているという報告がある (Li et al., 2015)。そこで、本章ではピロリ菌感染においてこれらシグナル伝達経路が関与しているかどうか検証した。さらにCagAはPLCγとの結合および細胞内Ca^{2+}の増加に関与していることが報告されていること (Churin et al., 2003; Marlink et al., 2003) から、CagAはPLCγを介して細胞内Ca^{2+}を増加させることによってNLRP3 inflammasomeの活性化を引き起こしていることが予想された。そこで、このPLCを介した細胞内Ca^{2+}シグナル活性化経路によるNLRP3 inflammasome活性化にCagAが関与しているかどうか検証した。

3.2 材料と方法

細胞

THP-1 細胞と HEK293T 細胞は前述の記載に従った。

阻害剤

阻害剤は以下のものを用いた： ROS 阻害剤 (N-acetyl-L-cysteine, Enzo Life Sciences) は最終濃度 5 mM、細胞外 ATP 阻害剤 (Adenosine 5′-triphosphate, periodate oxidized sodium salt (oxATP), A6779, Sigma) は最終濃度 300 μM、K^+流出阻害剤 (塩化カリウム (KCl), Wako) は最終濃度 40 mM、細胞内 Ca^{2+}阻害剤（キレート剤）(BAPTA/AM, AAT Bioquest) は最終濃度 10 μM、PLC 阻害剤 (U73122, Cayman CHEMICAL) は最終濃度 10 μM となるようにピロリ菌感染 1 時間前に培地に添加した。

THP-1 のマクロファージへの誘導

第 1 章の記述に従って行った。

ピロリ菌の培養および感染

第 1 章の記述に従って行った。

発現ベクターおよび遺伝子導入

発現ベクターおよび遺伝子導入は第 2 章に従った。

HEK293T 細胞を使用した NLRP3 inflammasome 再構築系法

HEK293T 細胞への NLRP3 inflammasome 再構築およびそれに伴う CagA の過剰発現は第 2 章の記述に従った。

- NLRP3 inflammasome 再構築 HEK293T 細胞への阻害剤処理

NLRP3 inflammasome の構成因子および CagA の発現ベクターをトランスフェクションし

た 6 時間後に阻害剤を添加した培地を用いて培地交換を行った。

- siRNA による遺伝子抑制および HEK293T 細胞への NLRP3 inflammasome 再構築

HEK293T 細胞における *PLCG1* をノックダウンするために、人工合成 siRNA（ターゲット配列：GAGAGAUCGAGGAGCCUA）およびコントロール siRNA (siPerfect Negative Control) を Sigma から得た。HEK293T 細胞への siRNA の導入は 25 nM siRNA、0.5 μl RNAiMAX（Invitrogen）の条件で指示書に従って行い、siRNA のトランスフェクションの 24 時間後に細胞を 2 x 10^5 cells/well（12-well plate）に播種し、その 24 時間後に第 2 章の記載の通りに NLRP3 inflammasome の構成因子および CagA 発現ベクターをトランスフェクションした。

ELISA

第 1 章の記述に従って行った。

統計学的解析

統計学的解析は Student's *t*-test により行った。

3.3 結果

3.3.1 ピロリ菌感染時の IL-1β 産生に及ぼす細胞外 ATP および細胞外への K^+流出の影響の検討

NLRP3 inflammasome の活性化は、細胞膜に存在する ATP 受容体への細胞外 ATP の結合およびそれに伴う K^+チャネルの開口による細胞外への K^+の流出によって引き起こされることが知られている (Davis et al., 2011; Lamkanfi and Dixit, 2014; Schroder and Tschopp, 2010)。そのため、ピロリ菌感染時においてもこれらが関与しているかどうかを検討した。PMA でマクロファージに分化させた THP-1 を細胞外 ATP 受容体の阻害剤である oxATP および K^+の流出を阻害するために KCl で処理し、ピロリ菌（WT）感染を行った。その結果、IL-1β 産生は有意に抑制された (図 3-1A,B)。

3.3.2 ピロリ菌感染時の IL-1β 産生への ROS の関与の確認

これまでの報告においてピロリ菌感染を行った THP-1 細胞の IL-1β 産生には ROS が関与していることが阻害剤を用いた実験により示されている (Li et al., 2015)。そのため本項ではその確認を行うために PMA でマクロファージに分化させた THP-1 を ROS 阻害剤（N-acetyl-L-cysteine）で処理し、ピロリ菌（WT）感染を行った。その結果、これまでの報告に一致して IL-1β 産生は抑制された (図 3-2)。

3.3.3 ピロリ菌感染時の IL-1β 産生への PLC および Ca^{2+}の関与の検討

序論で述べた通り、CagA は PLCγ への結合とそれに続く細胞内 Ca^{2+}の増加への関与が考えられている (Churin et al., 2003; Marlink et al., 2003)。加えてこの PLC の活性化に続く細胞内 Ca^{2+}の増加は NLRP3 inflammasome の活性化を引き起こすことが知られている (Lee et al., 2012; Murakami et al., 2012)。そのため、このシグナル伝達経路が THP-1 細胞のおけるピロリ菌感染時の IL-1β 産生に関与しているかどうか、PLC 阻害剤（U73122）および Ca^{2+}キレート剤（BAPTA/AM）で処理し、ピロリ菌（WT）を感染させた。その結果、培養上清中の IL-1β は PLC 阻害剤および Ca^{2+}キレート剤処理によって抑制された (図 3-3A,B)。

3.3.4 CagA による NLRP3 inflammasome 活性化への ROS の関与の検討

前項により示されたピロリ菌感染により産生される ROS が、CagA によっても同様に NLRP3 inflammasome を活性化していることを検討するために、HEK293T 細胞への NLRP3 inflammasome 再構築系を用いて評価した。NLRP3 inflammasome 再構築 HEK293T 細胞に CagA を過剰発現し、ROS 阻害剤を培地に添加し、培養上清中の IL-1β を測定した。その結果、ROS 阻害剤の処理により IL-1β 産生量は低下した。このことから CagA により ROS が産生され、NLRP3 inflammasome が活性化していることが明らかとなった (図 3-4)。

3.3.5 CagA による NLRP3 inflammasome 活性化への PLC の関与の検討

前項により示されたピロリ菌感染により活性化する PLC に続くシグナル伝達経路が、CagA によっても同様に NLRP3 inflammasome を活性化するかどうかを検討するために、HEK293T 細胞における PLCγ1 の発現量を siRNA を用いて抑制し (図 3-5A)、NLRP3 inflammasome の再構築系を用いた CagA の過剰発現による IL-1β 産生量を評価した。その結果、CagA によって増加する IL-1β 産生量は PLCγ1 の抑制によって有意に減少した (図 3-5B)。

図 3-1

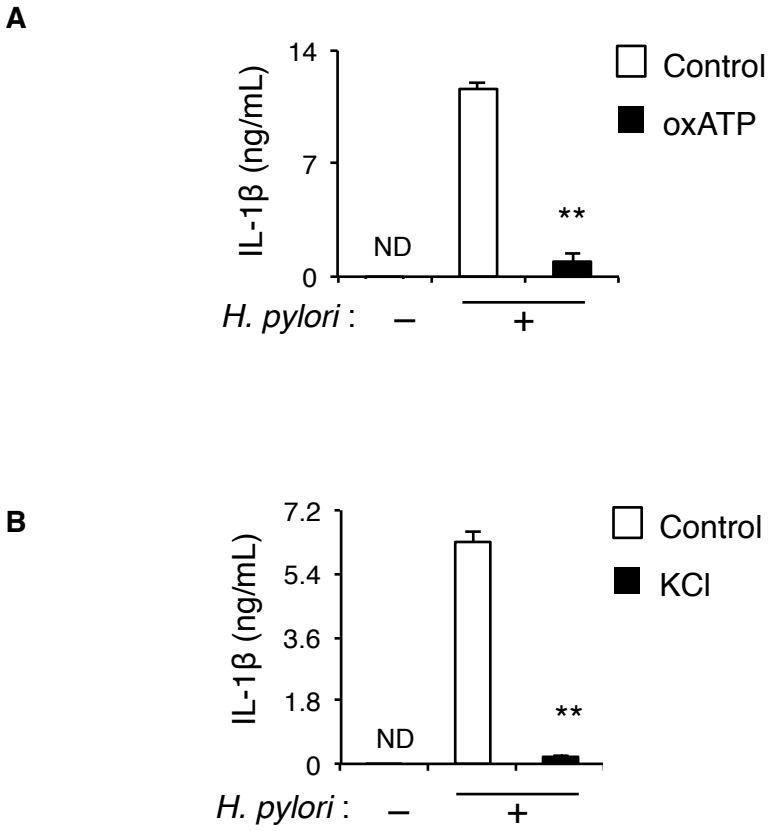


図3-1. ピロリ菌感染時のIL-1β産生に及ぼす細胞外ATPおよび細胞外へのK⁺流出の影響の検討

(**A,B**) PMAで分化させたTHP-1細胞に(**A**) oxATP (300 μM)、または(**B**) KCl (40 mM) を処理し、1時間後にピロリ菌（WT）を感染させた。感染24時間後の培養上清中のIL-1β量をELISAにて測定した。

エラーバーは標準偏差を示す。NDは検出限界以下であることを示す。

** $p < 0.01$（Student's *t*-test, n=3）。

図 3-2

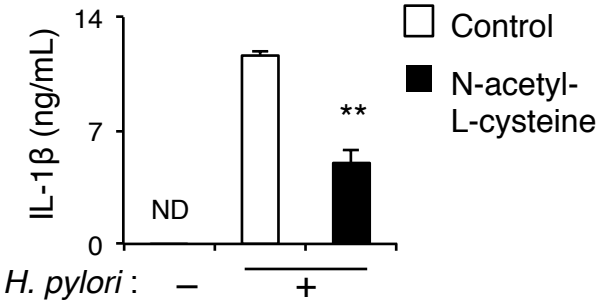


図3-2. ピロリ菌感染時のIL-1β産生に及ぼすROSの影響の検討

PMAで分化させたTHP-1細胞にN-acetyl-L-cysteine (5 mM) を処理し、1時間後にピロリ菌（WT）を感染させた。感染24時間後の培養上清中のIL-1β量をELISAにて測定した。

エラーバーは標準偏差を示す。NDは検出限界以下であることを示す。

** $p < 0.01$（Student's *t*-test, n=3）。

図 3-3

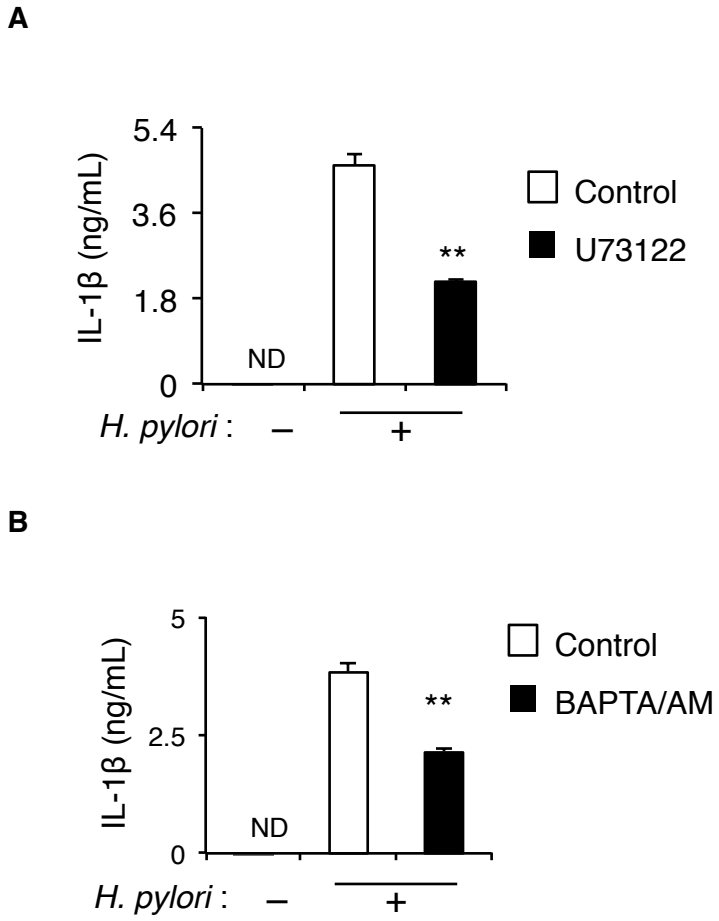


図3-3. ピロリ菌感染時のIL-1β産生へのPLCおよびCa^{2+}の関与の検討

(**A,B**) PMAで分化させたTHP-1細胞に(**A**) U73122 (10 μM)、または(**B**) BAPTA/AM (10 μM) を処理し、1時間後にピロリ菌（WT）を感染させた。感染24時間後の培養上清中のIL-1β量をELISAにて測定した。

エラーバーは標準偏差を示す。NDは検出限界以下であることを示す。

** $p < 0.01$（Student's *t*-test, n=3）。

図 3-4

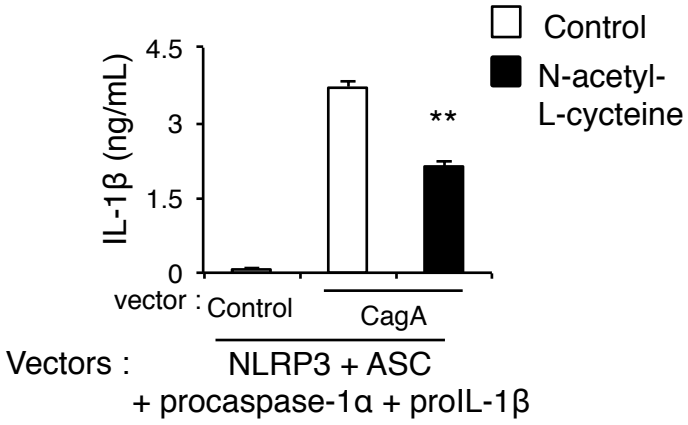


図3-4. CagAによるNLRP3 inflammasome活性化へのROSの関与の検討

HEK293T細胞にNLRP3、ASC、procaspase-1α、proIL-1βと、ControlまたはCagAをトランスフェクションし、6時間後にN-acetyl-L-cysteine (5 mM) を含む培地に培地を交換し、トランスフェクションから24時間後の培養上清中のIL-1βをELISAにより測定した。

エラーバーは標準偏差を示す。** $p < 0.01$（Student's *t* test, n=3）。

図 3-5

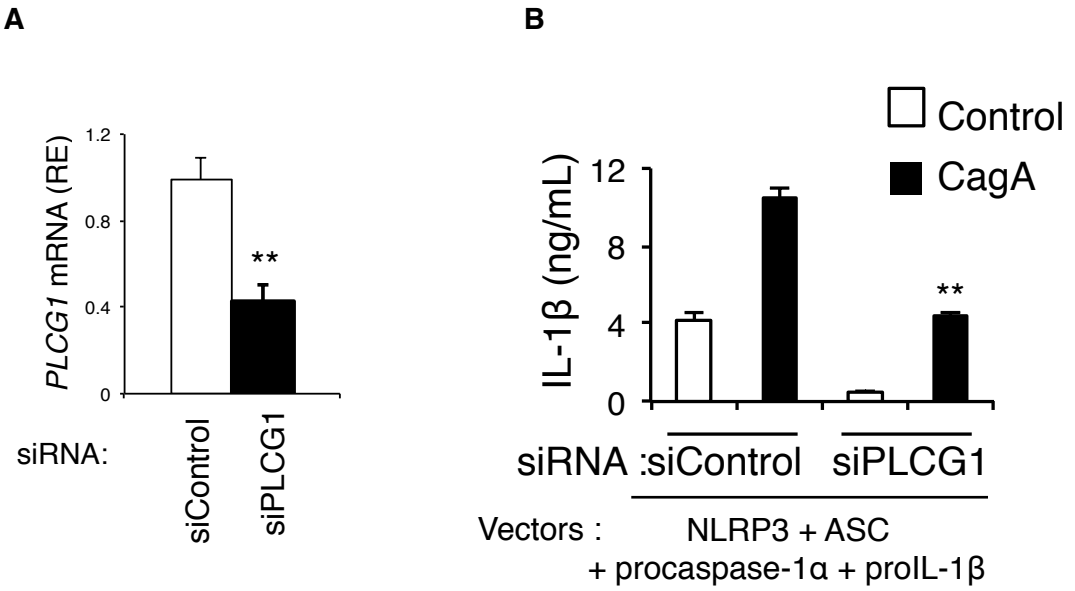


図3-5. CagAによるNLRP3 inflammasome活性化へのPLCの関与の検討

(**A**) HEK293T細胞にsiControlおよびsiPLCG1をトランスフェクションし、その48時間後の*PLCG1* mRNA量を定量的RT-PCRにより定量した。

(**B**) HEK293T細胞にsiRNAをトランスフェクション後48時間にNLRP3、ASC、procaspase-1α、proIL-1βと、ControlまたはCagAをトランスフェクションし、その24時間後の培養上清中のIL-1βをELISAにより測定した。

エラーバーは標準偏差を示す。** $p < 0.01$（Student's *t* test, n=3）。

3.4 小括

- ピロリ菌感染時の IL-1β 産生には細胞外 ATP および細胞外への K^+流出が関与する。
- ピロリ菌感染時の IL-1β 産生には ROS が関与する。
- ピロリ菌感染時の IL-1β 産生には PLC および Ca^{2+}シグナルが関与する。
- CagA の NLRP3 inflammasome の活性化にともなう IL-1β 産生には ROS が関与する。
- CagA の NLRP3 inflammasome の活性化にともなう IL-1β 産生には PLCγ1 が関与する。

第 4 章 – CagA は細胞質において NLRP3 と共局在し、NLRP3 の LRR ドメインを介して会合する

4.1 序論

第 3 章において CagA は PLCγ を介した細胞内 Ca^{2+}シグナルによる NLRP3 inflammasome の活性化を示した。一方で、これまで CagA は宿主細胞内で多量体化することや、宿主細胞内の様々なタンパク質と結合し、それらタンパク質の活性化制御の足場として機能していることが考えられている (Dunne et al., 2014; Hatakeyama, 2014; Woon et al., 2013)。このことから NLRP3 inflammasome の活性化においても同様に CagA と NLRP3 が結合することで inflammasome 複合体形成が生じている可能性について検証した。そのため本章では細胞内における CagA と NLRP3 の会合性の検討を行った。

4.2 材料と方法

細胞

THP-1 細胞および HEK293T 細胞は前章の記述に従った。

THP-1 のマクロファージへの誘導

第 1 章の記述に従って行った。

ピロリ菌の培養および感染

第 1 章の記述に従って行った。

細胞染色および共焦点レーザー顕微鏡による解析

ポリ-L-リジン（TREVIGEN）でコートした4 wellチャンバーカルチャースライド（Falcon）でPMA処理したTHP-1細胞（1 x 10^5 cells/well）を2日間培養後、ピロリ菌を8時間感染させた。細胞はPBSで3回洗浄し、4%パラホルムアルデヒドを含むPBS（Wako）により10分間、室温で固定し、PBSで3回洗浄した。固定した細胞を10分間、0.5% Triton X-100を含む緩衝液（0.5% Triton X-100、4%PEG (6000)、1 mM EGTA、0.1 M PIPES (pH 7.2)）により室温で10分間処理し、PBSで3回洗浄した。次に細胞を、3%BSAを含むPBSにより室温で10分間ブロッキングし、1%BSAを含むPBSで希釈したマウス抗NLRP3抗体 (1:200。AG-20B-0014, Cryo-2; AdipoGen) およびウサギ抗 CagA 抗体 (1:200。HPP-5003-9; AUSTRAL BIOLOGICALS)により37°Cで1時間処理し、PBSで3回洗浄した。最後に細胞を1%BSAを含むPBSで希釈したAlexa Fluor 488標識抗マウスIgG（1:500; Molecular Probes）およびAlexa Fluor 594標識抗ウサギIgG（1:500; Molecular Probes）により37°Cで1時間処理し、PBSで2回洗浄し、核をHoechst 33342（Invitrogen）で対比染色し、封入した。NLRP3およびCagAの観察は共焦点レーザー顕微鏡（IX-81、Olympus）により行った。

発現ベクターおよび遺伝子導入

発現ベクターおよび遺伝子導入については第2章の記述に従って行った。

- NLRP3 欠損変異体の作成

NLRP3の欠損変異体を各々、NLRP3のもつドメイン構造（PYD（Pyrin domain）、NBD（Nucleotide-binding domain）、LRR（Leucine-rich repeat domain））に基づいてPYD、PYD-NBD、NBD、NBD-LRR、LRRとして命名し、以下のように作成した：すべて5′末端にkozak配列、加えてNBD、NBD-LRR、LRRにおいては開始コドンを付加し、終止コドンの前に3xFLAGタグ配列を挿入し、哺乳動物細胞発現ベクターpcDNA3.1ベクターに挿入した。PYD変異体は134番目以降のアミノ酸をコードする配列を欠損させた。PYD-NBD変異体は555番目以降のアミノ酸をコードする配列を欠損させた。NBD変異体は132番目以前の配列および555番目以降のアミノ酸をコードする配列を欠損させた。NBD-LRR変異体は132番目以降のアミノ酸をコードする配列を欠損させた。LRR変異体は554番目以前のアミノ酸をコードする配列を欠損させた。

HEK293T 細胞を使用した NLRP3 inflammasome 再構築系法

HEK293T 細胞への NLRP3 inflammasome 再構築は第 2 章の記述に従って行った。

- LRR を用いた競合阻害実験

NLRP3 inflammasome再構築のためのトランスフェクションと同時に2,000 ngの空ベクターおよびCagAの発現ベクターをトランスフェクションし、24時間インキュベーションし、培養上清および第 1 章に従って細胞溶解液を回収した。

免疫沈降法

免疫沈降法は第 2 章の記述に従って行った。

SDS-PAGE および immunoblot 法

第 1 章の記述に従って SDS-PAGE および immunoblot を行った。

統計学的解析

統計学的解析は Student's *t*-test により行った。

4.3 結果

4.3.1 CagA と NLRP3 inflammasome 複合体の会合性の検討

CagA が NLRP3 inflammasome 複合体と会合するかどうかを検証するために、マクロファージに分化させた THP-1 細胞にピロリ菌（WT）を感染させ、抗 ASC 抗体を用いて免疫沈降を行った。その結果、CagA と NLRP3 がともに ASC と会合することが明らかとなった (図 4-1)。

4.3.2 CagA と NLR との会合性の検討

前項の ASC に対する免疫沈降により CagA が NLRP3 とともに会合性を示したこと、また第 2 章の HEK293T 細胞を用いた実験によって CagA は、NLRP3 inflammasome の構成因子のうち NLRP3 だけが存在する状態で、NLRP3 の多量体化を促進したことを踏まえて、内在性の NLRP3 が CagA と会合している可能性を考えた。それを検証するためマクロファージに分化させた THP-1 にピロリ菌（WT）を感染させ、抗 CagA 抗体により免疫沈降法を行った。その結果、CagA は NLRP3 と会合することが示された (図 4-2)。一方、NLRC4 には会合しないことが示された。

4.3.3 マクロファージにおける NLRP3 と CagA の局在の検討

前項で示した CagA と NLRP3 の会合が細胞内において生じているかどうか、その局在を検証した。マクロファージに分化させた THP-1 細胞にピロリ菌 (WT) を 8 時間感染させ、抗 CagA 抗体と抗 NLRP3 抗体を用いた免疫細胞染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡によりその局在を確認した。その結果、CagA と NLRP3 は細胞質において共局在することが観察された (図 4-3)。

4.3.4 NLRP3 の各種ドメイン欠損変異体の作成および CagA との会合における NLRP3 の結合部位の同定

前項までに NLRP3 は CagA と会合することを示した。その NLRP3 と CagA の会合にお

ける NLRP3 の責任領域を同定するために、NLRP3 のドメイン構造に基づいて欠損変異体を作成した (図 4-4A)。全長の NLRP3 と作成した欠損変異体および CagA-HA を HEK293T 細胞に過剰発現し、抗 HA 抗体を用いて免疫沈降を行った。その結果、全長の NLRP3 と同様に、NBD-LRR および LRR が CagA と会合した。一方、LRR を含まない変異体である PYD、PYD-NBD、NBD においては CagA との会合性が認められなかった (図 4-4B)。これらの結果は NLRP3 の LRR が CagA と NLRP3 の会合に必要であることを示している。

4.3.5 NLRP3 の LRR と CagA の結合が NLRP3 inflammasome の活性化に及ぼす影響の検討

前項で会合性が明らかとなった NLRP3 の LRR と CagA の会合が NLRP3 inflammasome の活性化に寄与しているかどうかの検証を試みた。そのため、まず CagA による NLRP3 の多量体化への影響を評価した。HEK293T 細胞に NLRP3-FLAG と NLRP3-Myc、および CagA を HEK293T 細胞に過剰発現し、加えて LRR-FLAG を過剰発現し、抗 Myc 抗体を用いて免疫沈降を行った。その結果、CagA により促進される NLRP3 の多量体化（Lane 2）が、LRR-FLAG の過剰発現により抑制された（Lane 3） (図 4-5A)。そして CagA による IL-1β 産生への影響を NLRP3 inflammasome を再構築した HEK293T 細胞を用いて評価した。NLRP3 inflammasome を再構築した HEK293T 細胞に LRR を過剰発現させると、LRR の発現量依存的に CagA による IL-1β 産生量は抑制された (図 4-5B)。これらの結果から、ピロリ菌の病原タンパク質である CagA と宿主の自然免疫受容体である NLRP3 は、NLRP3 の LRR を介して会合し、IL-1β 産生を促進していることが示された。

図 4-1

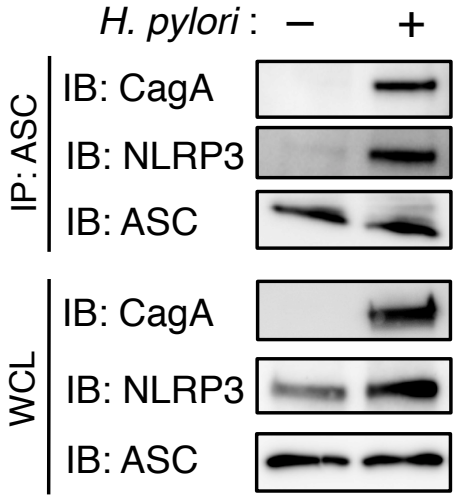


図4-1. CagAがNLRP3 inflammasome複合体に含まれるかどうかの検討
PMAで分化させたTHP-1細胞にピロリ菌（WT）を感染させ、8時間後の細胞溶解液を用いて抗ASC抗体で免疫沈降した。免疫沈降物および細胞溶解液の抗NLRP3抗体、抗ASC抗体、および抗CagA抗体を用いたimmunoblot像を示す。

図 4-2

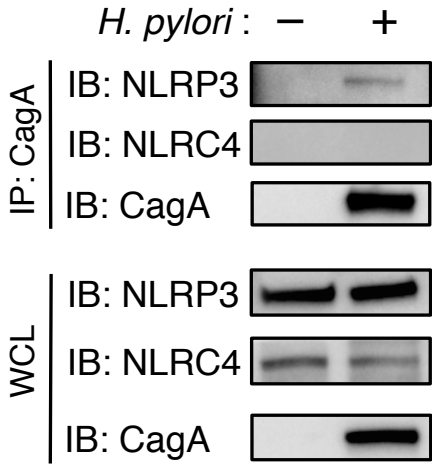


図4-2. CagAとNLRP3の会合性の検討

PMAで分化させたTHP-1細胞にピロリ菌（WT）を感染させ、8時間後の細胞溶解液を用いて抗CagA抗体で免疫沈降した。免疫沈降物および細胞溶解液の抗NLRP3抗体、抗NLRC4抗体、および抗CagA抗体を用いたimmunoblot像を示す。

図 4-3

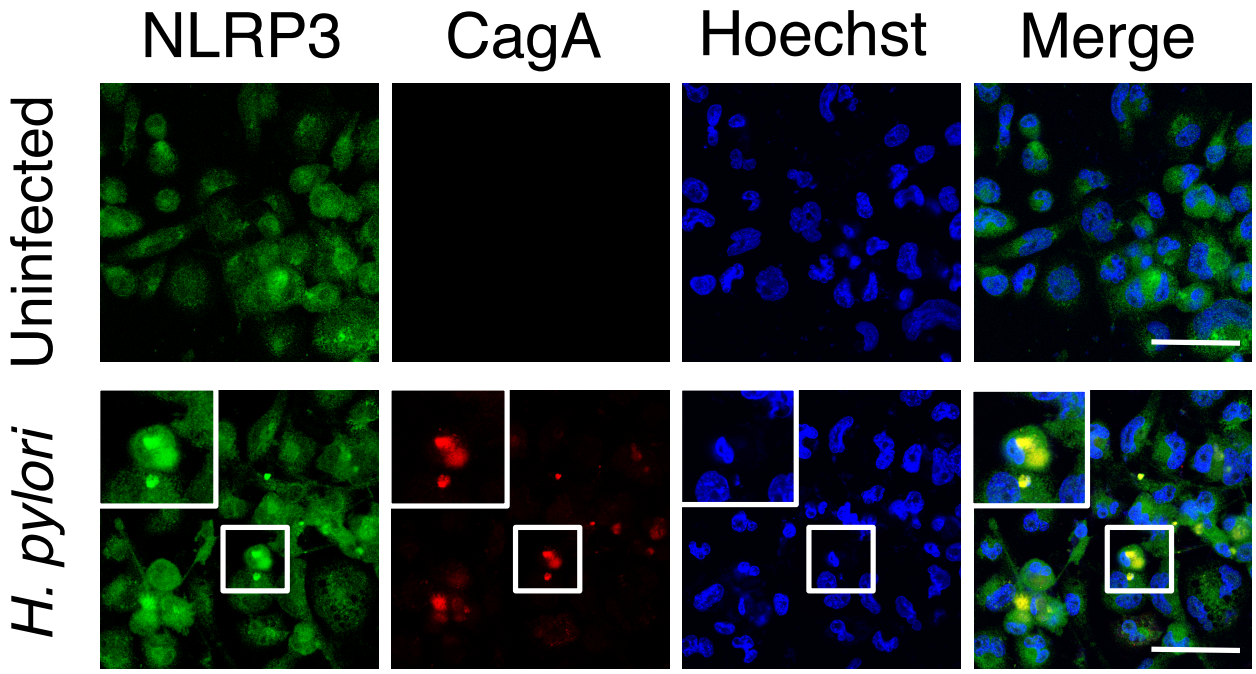


図4-3. NLRP3とCagAの細胞内における局在

PMAで分化させたTHP-1細胞にピロリ菌（WT）を感染させ、8時間後の細胞における抗NLRP3抗体（緑）および抗CagA抗体（赤）による免疫染色像を示す。
核をHoechst 33342により対比染色した。スケールバーは50 μm。

図 4-4

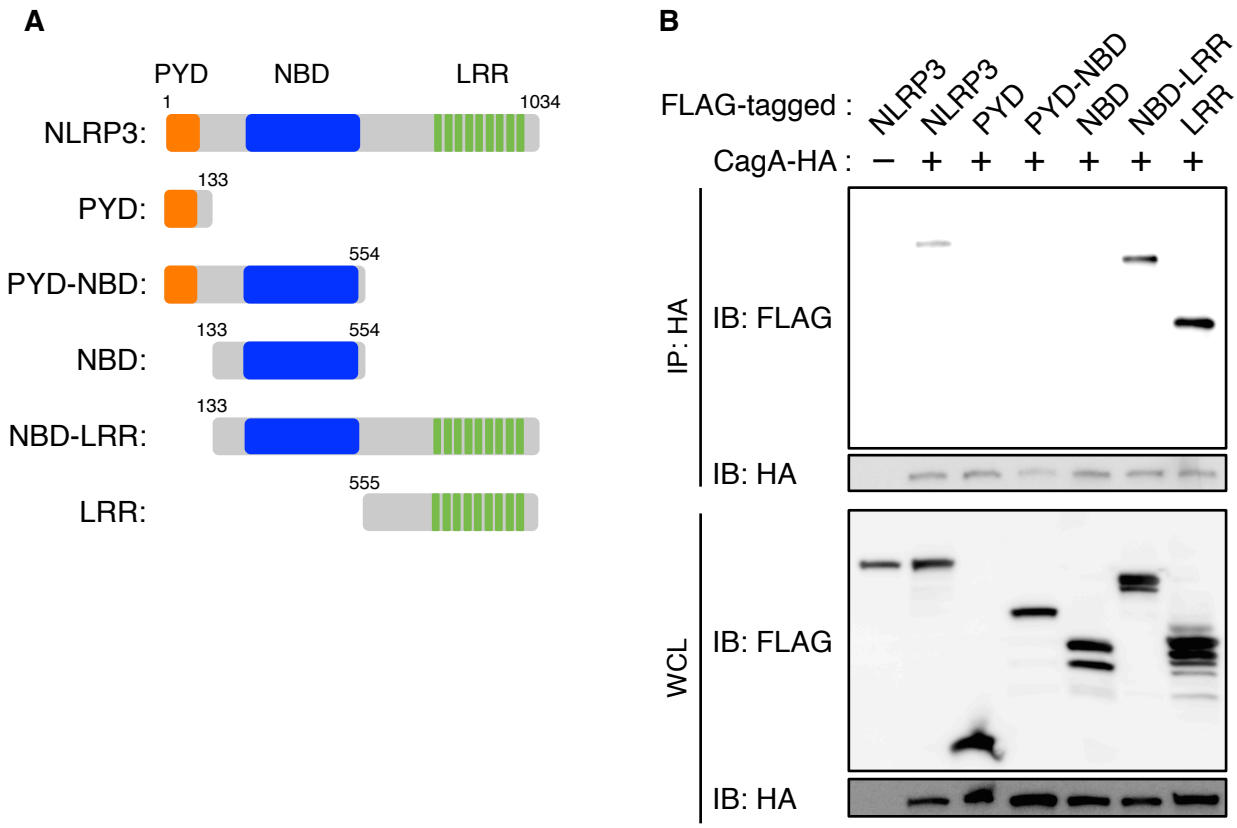


図4-4. CagAとの会合におけるNLRP3の結合部位の同定

(**A**) 本章で用いた全長のNLRP3および作成したNLRP3変異体を模式的に示す。NLRP3のドメインはPYD (Pyrin domain: オレンジ)、NBD (Nucleotide-binding domain: 青)、LRR (Leucine-rich repeat domain: 緑)として示す。数字はアミノ酸番号を示す。

(**B**) HEK293T細胞に(**A**)で示すFLAGタグを付与したNLRP3およびNLRP3変異、そしてCagA-HAを過剰発現した細胞溶解液を用いて抗HA抗体で免疫沈降した。免疫沈降物および細胞溶解液の抗FLAG抗体および抗HA抗体を用いたimmunoblot像を示す。

図 4-5

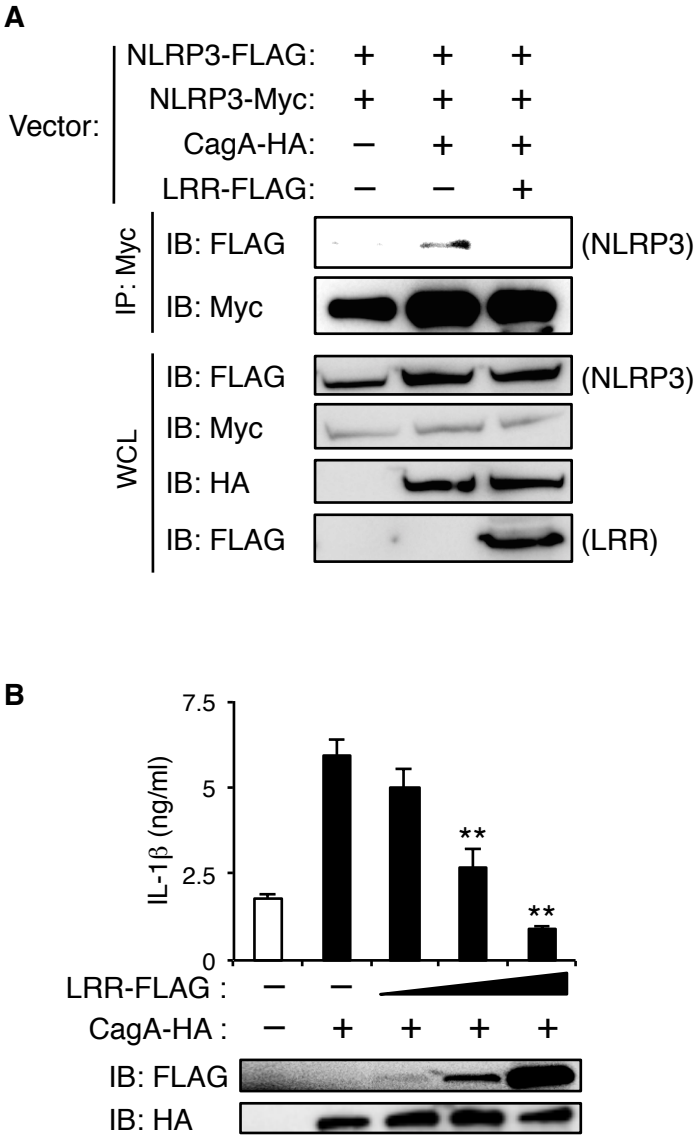


図4-5. NLRP3のLRRドメインとCagAの結合がNLRP3の活性化に及ぼす影響の検討

(**A**) HEK293T細胞にNLRP3-FLAG、NLRP3-Myc、CagA-HA、そしてLRR-FLAGを過剰発現した細胞溶解液を用いて抗Myc抗体で免疫沈降した。免疫沈降物および細胞溶解液の抗FLAG抗体、抗Myc抗体および抗HA抗体を用いたimmunoblot像を示す。

(**B**) HEK293T細胞にNLRP3、ASC、procaspase-1α、proIL-1β、およびControlまたはCagAと、LRR-FLAGを量を変えてトランスフェクションし、24時間後の培養上清中のIL-1βをELISAにより測定した。またその細胞溶解液の抗FLAG抗体、抗HA抗体を用いたimmunoblot像を示す。

エラーバーは標準偏差を示す。** $p < 0.01$（Student's *t*-test, n=3）。

4.4 小括

- CagA は NLRP3 inflammasome 複合体と会合する。
- CagA は NLRP3 に会合する。
- CagA は NLRP3 と細胞内で共局在する。
- CagA は NLRP3 の LRR ドメインと会合する。
- CagA が NLRP3 の LRR ドメインに会合することは NLRP3 を介する IL-1β 産生に重要である。

第 5 章 – CagA は NLRP3 と直接的に結合し、NLRP3 を活性化する

5.1 序論

第 4 章において、CagA は細胞質内において NLRP3 の LRR ドメインを介して会合し、その活性を制御していることを示した。LRR ドメインは TLRs や一部の NLRs においてリガンドとの結合領域として知られている (Monie, 2013; Takeuchi and Akira, 2010)。NLRP3 に直接結合し、活性化を引き起こすリガンドはこれまで知られていなかったが、第 4 章の結果を受けて CagA が NLRP3 のリガンドとなっている可能性を考えた。NLRP3 はその活性化の際に ATPase 活性を示し、多量体化することで、それに続く inflammasome 複合体を形成する (Duncan et al., 2007)。そのため、CagA が直接的に NLRP3 の ATPase 活性を増強し、NLRP3 の多量体化を引き起こすかどうかに焦点を置き、検討を行った。

また CagA は、C 末端領域に様々なタンパク質と結合する Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala（EPIYA）motif および CagA-multimerization（CM）motif を含む繰り返し配列（これらを合わせて EPIYA segment と呼ばれる）を有している。EPIYA segments は EPIYA motif 周辺の配列から A、B、C、D の segment に分類される。本論文で用いているピロリ菌 NCTC11737 株が有する CagA は、ABCCC 型の EPIYA segments をもつ (Hatakeyama, 2014)。本章において、この EPIYA segments を介して CagA と NLRP3 が結合し、NLRP3 inflammasome の活性化が制御されている可能性を考えて検討を行った。

5.2 材料と方法

細胞

HEK293T 細胞は第 2 章に従った。

発現ベクターおよび遺伝子導入

発現ベクターおよび遺伝子導入については第2章の記述に従った。

- 哺乳動物細胞発現ベクターCagA 変異体の作成

CagA 変異体は次の通り、ピロリ菌 NCTC11637 株由来 *cagA* 遺伝子をもとに作成した。ABCCC segments を欠損する変異体（ΔABCCC）、すべての EPIYA motifs を欠損させた変異体（ΔEPIYA）、すべての CM motifs を欠損させた変異体（ΔCM）、EPIYA motifs を EPIAA のアミノ酸をコードする配列に置換した変異体（PR）、すべての CM motifs のアミノ酸配列 FPLKRHDKVDDLSKVG を FPLKAHDKVDDLSKVG のアミノ酸をコードする配列に置換した変異体（mCM）である。すべて終止コドンの前に HA タグ配列を挿入し、哺乳動物細胞発現ベクターpCAGGS に挿入した。その詳細は図 4-5A および図 4-6A に図示した。

- 大腸菌発現ベクターおよび昆虫細胞発現ベクター

組み換え glutathione-S-transferase（GST）標識 CagA タンパク質（rGST-CagA）のためには *cagA* 遺伝子の終止コドンの前にヘキサヒスチジン（6xHis）タグ配列を付与し、大腸菌発現ベクターpGEX-6P-1（GE Healthcare）に挿入した。CagA の変異体の作成にあたって、GST 標識 CagA(1-872)（rGST-CagA(1-872)）は *cagA* 遺伝子の 873 番目以降、CagA(873-1247)（rGST-CagA(873-1247)）は 872 以前のアミノ酸をコードする配列を欠損させ、終止コドンの前に 6xHis タグ配列を付与し、pGEX-6P-1 に挿入した。組み換え GST 標識 NLRP3（rGST-NLRP3）のために、NLRP3 の cDNA の 5′末端に kozak 配列に続いて GST タグ配列を挿入し、昆虫細胞発現ベクターpFastBac1（Invitrogen）に挿入した。

組み換えタンパク質の精製

rGST、rGST-CagA-6xHis、rGST-CagA(1-872)およびrGST-CagA(873-1247)作成のために、前述のベクターを用いて大腸菌BL21 (DE3)を形質転換した。大腸菌はLB培地にて30℃でOD_{600} = 0.5まで振盪培養した後、0.1 mM IPTGを添加して3時間培養し、組み換えタンパク質を発現誘導した。大腸菌を3,700 × gで10分間、4℃にて遠心分離し、溶解バッファー（1% Triton X-100、50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、1 mM EDTA、および1 mM PMSF）にて懸濁し、超音波処理にて溶解した。溶解液は、13,000 rpmで10分間遠心分離し、上清をglutathione-Sepharose 4Bカラムで処理し、洗浄バッファー（0.1% Triton X-100、50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、300 mM NaCl、1 mM EDTA、および1 mM PMSF）にて洗浄後、溶出バッファー（50 mM Tris-HCl pH 8.0、100 mM NaCl、0.1% Triton X-100および30 mM glutathione）にて溶出した。rGST-NLRP3はSf9細胞に製品の指示書（Bac-to-Bac baculovirus expression system (Invitrogen)）に従って発現させGlutathione Sepharose 4B (GE Healthcare)にて精製した。GSTタグはPrecision protease (GE Healthcare)にて適宜切断した。ATPase assayに用いる組み換えNLRP3-FLAG（rNLRP3-FLAG）にあたっては、NLRP3-FLAGをHEK293T細胞に発現させ、細胞培養を溶解バッファー（1% Triton X-100、50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、150 mM NaCl、1 mM EDTA、および1 mM PMSF）にて溶解し、Protein G sepharose beads (GE Healthcare)にて精製した。

in vitro pull-down assay

Hisタグに対する*in vitro* pull-down assayのために、組み換えGST（rGST）あるいは組み換えGST-NLRP3タンパク質（rGST-NLRP3）40 ngと、組み換えCagA-6xHis（rCagA-6xHis）40 ngを混合し、2時間4 ˚Cにてインキュベーションし、その後Ni-NTA agarose beads (QIAGEN)加え、1時間4 ˚Cにてインキュベーションした。GSTタグに対する*in vitro* pull-down assayのために、組み換えNLRP3（rNLRP3）5 μgと、rGSTあるいは組み換えGST標識CagAおよびCagAの欠損変異体を混合し、さらにglutathione-Sepharose beadsを加え2時間4 ˚Cにてインキ

ュベーションした。ビーズを洗浄後、サンプルバッファーを加えて100 ˚Cで5分間加熱し、SDS-PAGEおよびimmunoblotを行った。

タンパク質架橋

NLRP3の多量体化の検出のために、HEK293T細胞にNLRP3-Mycを過剰発現させ、溶解バッファーにて細胞を溶解後、遠心分離により上清を細胞溶解液とした。その細胞溶解液にrCagAを混合し、4˚Cで16時間インキュベーションした。その後、溶液にdisuccinimidyl suberate (DSS; 2 mM, Thermo)を添加し、 室温で30分間インキュベーションし、溶液中のタンパク質間結合を架橋した (Park et al., 2013)。

SDS-PAGE および immunoblot 法

SDS-PAGEおよびimmunoblotについては、第1章に従って行った。

NLRP3 ATPase assay

精製した rNLRP3-FLAG (0.5 μg)と rCagA (0.5-4 mg)を ATPase reaction buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1.5 mM $MgCl_2$ および 1.5 mM DTT)中に混合し、37 °C で 30 分間インキュベーションし、それに続いて 10 mM の ATP を加え、37 °C にて 15 分間インキュベーションした。ATPase 活性の測定は、混合液中の遊離リン酸を GREEN phosphate assay reagent (Biomol)を用いて、指示書に従い測定した。

HEK293T 細胞を使用した NLRP3 inflammasome 再構築系法

第 2 章に従って行った。

- NLRP3 inflammasome 再構築 HEK293T 細胞への CagA の過剰発現

第 2 章に従って行った。

ELISA

第 1 章の記述に従って行った。

統計学的解析

統計学的解析は Student's *t*-test により行った。

5.3 結果

5.3.1 CagA と NLRP3 の直接的な結合性の検討

第 4 章において、CagA は細胞質内において共局在していることを示した。そのため、その会合が直接的な結合であるかどうかを検証した。そのため CagA-6xHis および、GST および GST-NLRP3 の組み換えタンパク質を精製し、pull-down assay を行った結果、CagA は NLRP3 と直接結合し、GST には結合しなかった (図 5-1)。

5.3.2 CagA による NLRP3 活性化機構の解析

前項において、CagA は NLRP3 に直接結合することを示した。NLRP3 はその活性化の際に ATPase 活性を示し、多量体化することで、それに続く inflammasome 複合体を形成する (Duncan et al., 2007)。そのため、CagA が直接的に NLRP3 の ATPase 活性を増強し、NLRP3 の多量体化を引き起こすかどうかに焦点を置き、検討を行った。

- NLRP3 の ATPsse 活性の解析

NLRP3 はその活性化において ATPase 活性を示す。そのため HEK293T 細胞に NLRP3-FLAG を発現させ精製した rNLRP-FLAG を用いてその ATPase 活性を評価した。その結果、NLRP3 の ATPase 活性は CagA のタンパク質量依存的に増強することが明らかとなった (図 5-2A)。

- NLRP3 の多量体化の解析

NLRP3 を過剰発現させたタンパク質溶液に CagA のリコンビナントタンパク質を加えて NLRP3 の多量体化を解析した。NLRP3-Myc を含むタンパク質溶液に rCagA を加え、DSS にてタンパク質間結合を架橋させ SDS-PAGE を行った。その結果、NLRP3 の多量体化を検出した (図 5-2B)。

5.3.3 CagA 変異体作成と NLRP3 との結合部位の同定およびその機能解析

CagA は多くの場合、C 末端側に保有する EPIYA segments にある EPIYA motifs および CM motifs を介して宿主細胞内のシグナル伝達経路を活性化することが知られている (Hatakeyama, 2014)。そこで前項までに示した NLRP3 との結合性について、CagA のどの領

域が重要であるのかどうかを検討するために、EPIYA segments を含まない rCagA(1-872)および EPIYA seguments を含む rCagA(873-1247)の組み換えタンパク質を作製した。それら組み換えタンパク質と rNLRP3 を用いた pull-down 法を行った結果、CagA は EPIYA segments を含む C 末端側の 873-1247 アミノ酸領域にくらべて、N 末端側の 1-872 アミノ酸領域において NLRP3 とのより強い結合性を示した (図 5-3A)。そのため、NLRP3 inflammasome の活性化による IL-1β 産生に対して EPIYA segments との会合に影響しないと考えられた。一方で、CagA の EPIYA segments 欠損変異体であるΔABCCC を NLRP3 inflammasome を再構築した HEK293T 細胞に過剰発現し、IL-1β の産生量を測定した。その結果、ΔABCCC 変異体では全長の CagA（WT）に比べて IL-1β 産生誘導は有意に低下し、コントロールと比べて差がみられなかった (図 5-3B)。

5.3.4 NLRP3 inflammasome の活性化に寄与する CagA の責任領域の同定

前項で、NLRP3 inflammasome 活性化による IL-1β 産生には CagA の EPIYA segments が重要であることが分かった。次に、EPIYA segments に含まれる motif である EPIYA motif および CM motif の欠損変異体（ΔEPIYA およびΔCM）あるいはアミノ酸置換変異体（PR および mCM）を作成し、HEK293T 細胞への NLRP3 inflammasome 再構築系を用いた IL-1β の産生量を測定した。その結果、WT の CagA に比べてΔCM および mCM では IL-1β 産生は有意に低下し、ΔEPIYA および PR では WT 比べて IL-1β 産生に差はみられなかった(図 5-4A,B)。これらの結果から NLRP3 inflammasome 活性化による IL-1β 産生には CM motif が重要であること、そして EPIYA motif は関与しないことが明らかとなった。

図 5-1

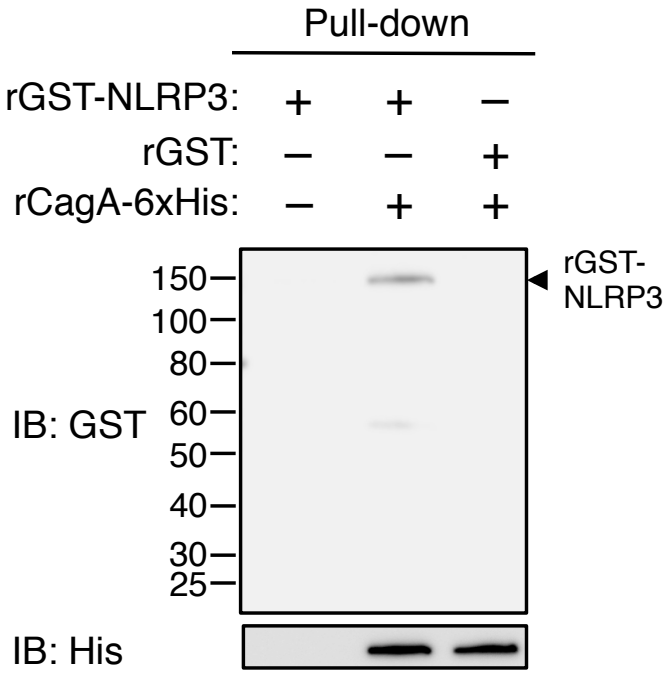


図5-1. CagAとNLRP3の結合性の検討

CagA-6xHisとGST-NLRP3あるいはGSTの組み換えタンパク質を混合し、Ni-NTA agarose beadsを用いてHisタグに対するpull-down assayを行った。抗GST抗体および抗His抗体を用いたimmunoblot像を示す。

図 5-2

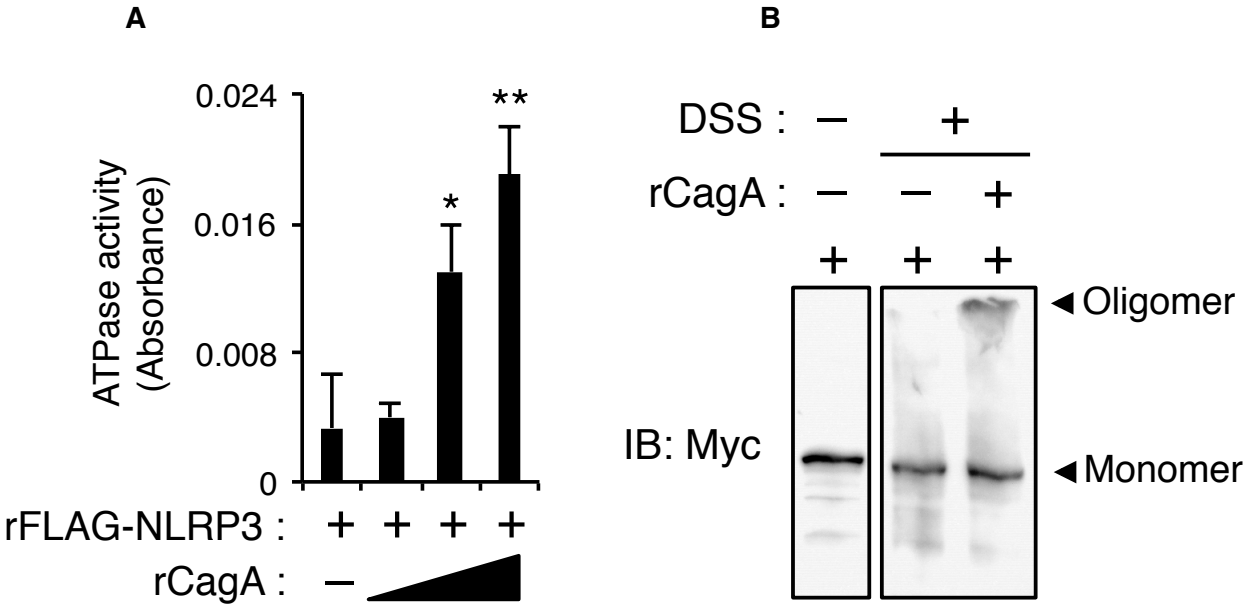


図5-2. CagAによるNLRP3活性化機構の解析

(**A**) 精製した組み換えNLRP3とCagAを混合し、インキュベーションした後にATPを加え、遊離リン酸量を定量した結果を示す。
エラーバーは標準偏差を示す。* $p < 0.05$、** $p < 0.01$（Student's *t*-test, n=3）
(**B**) HEK293T細胞にNLRP3-Mycを過剰発現した細胞溶解液にCagAの組み換えタンパク質を加え、さらにDSSを終濃度2 mMになるように加えた細胞溶解液の抗Myc抗体を用いたimmunoblot像を示す。

図 5-3

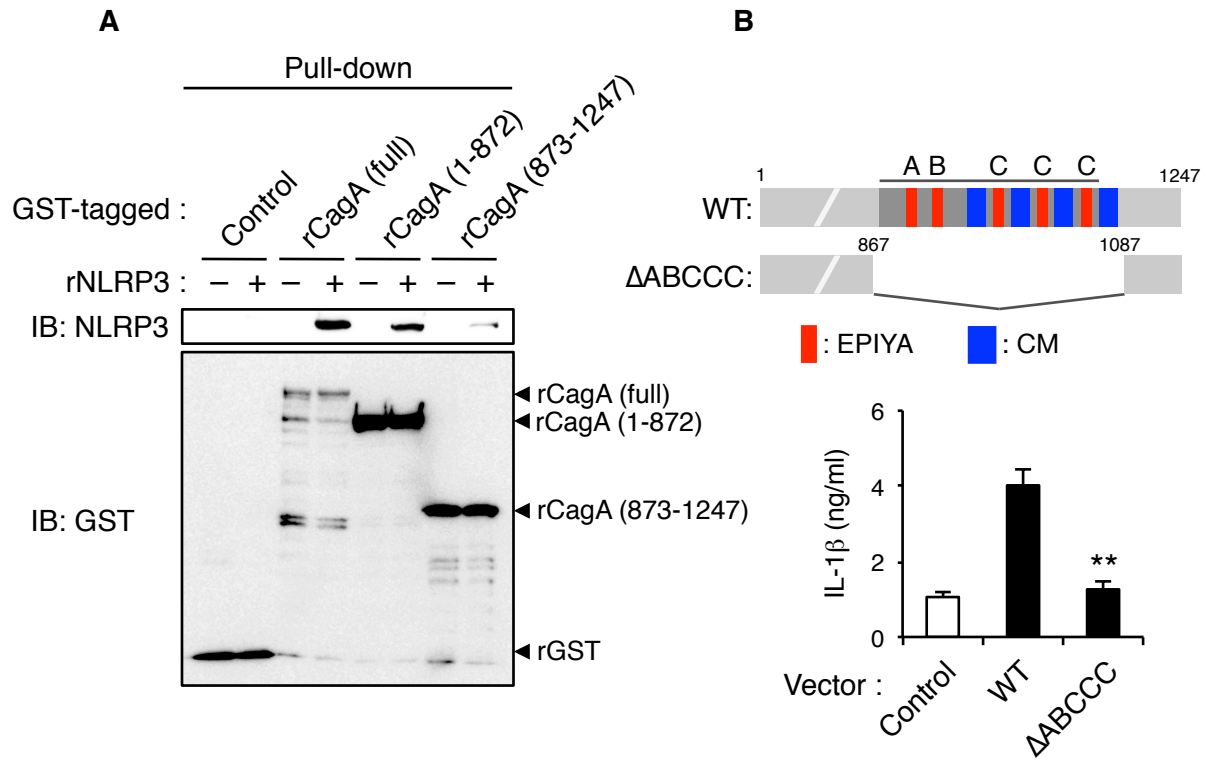


図5-3. CagAのNLRP3との結合領域の検討と、NLRP3 inflammasomeの活性化に対する影響の検討

(**A**) 精製した組み換えGST-CagAあるいはGSTと、NLRP3を混合し、glutathione-Sepharose beadsを用いてGSTタグに対するpull-down assayを行った。抗NLRP3抗体および抗GST抗体を用いたimmunoblot像を示す。

(**B**) 図上段に本章で用いた全長のCagA（WT）と作成したCagAの変異体ΔABCCCの模式図を示す。EPIYA segmentsはWTの上部にバーで示すABCCCと記載した領域である。EPIYA motifs: 赤、CM motifs: 青で示す。数字はアミノ酸番号を示す。図下段はHEK293T細胞にNLRP3、ASC、procaspase-1α、proIL-1βと、Control、WTまたはΔABCCCをトランスフェクションし、24時間後の培養上清中のIL-1βをELISAにより測定した結果を示す。
エラーバーは標準偏差を示す。** $p < 0.01$（Student's *t*-test, n=3）。

図 5-4

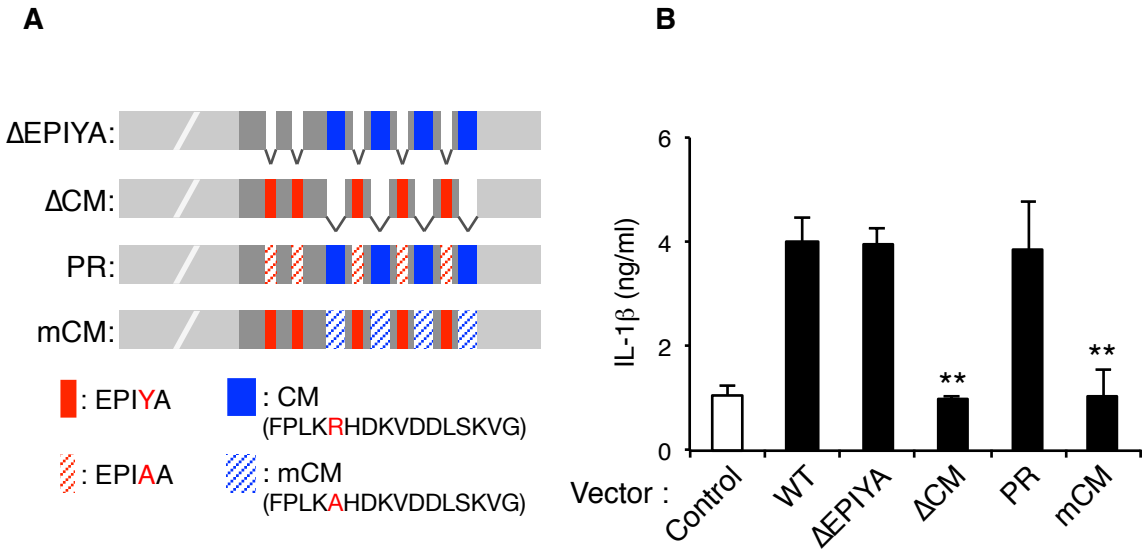


図5-4. CagAとの会合におけるNLRP3の結合部位の同定

(**A**) 本章で用いたCagAの変異体の模式図を示す。EPIYAおよびCM motifsにおける置換したアミノ酸を赤字で示す。

(**B**) HEK293T細胞にNLRP3、ASC、procaspase-1α、proIL-1βと、Controlまたは WT、ΔEPIYA、ΔCM、PR、mCMをトランスフェクションし、24時間後の培養上清中のIL-1βをELISAにより測定した結果を示す。

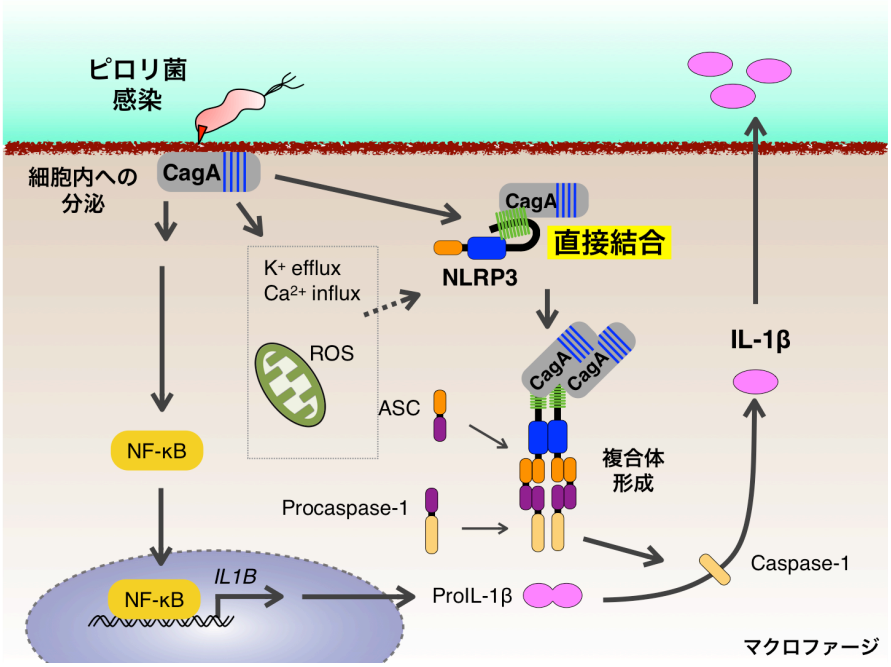
エラーバーは標準偏差を示す。** $p < 0.01$（Student's *t*-test, n=3）。

5.4 小括

- CagA は NLRP3 と直接的に結合する。
- CagA は NLRP3 の ATPase 活性を増強する。
- CagA は NLRP3 を多量体化する。
- CagA は N 末端側（1-872）で NLRP3 と強く結合する。
- NLRP3 inflammasome 活性化には CagA の C 末端側に存在する EPIYA segments のうち EPIYA motifs ではなく CM motifs が必要である。

終章 – 考察

序章で記載した通り、ピロリ菌感染によって IL-1β の産生が増加し、それによって胃癌の発症のリスクが増加することがこれまでに報告されてきた。したがって、ピロリ菌感染による IL-1β 産生機構の解明は重要な課題といえる。本研究は、ピロリ菌感染時に、細菌由来因子の CagA が NLRP3 inflammasome の活性化を介して IL-1β 産生誘導を引き起こすという初めての報告である (図終)。



図終 ピロリ菌感染におけるCagA依存的なIL-1β産生機構
本研究で明らかにした CagA 依存的な IL-1β 産生機構を模式的に示した。マクロファージ細胞内に分泌された CagA は *IL1B* の転写を促進することで proIL-1β の産生を誘導する。また CagA は細胞内の Ca^{2+}シグナル、ROS を介した NLRP3 inflammasome の活性化を引き起こす。加えて、CagA は NLRP3 と直接結合することで NLRP3 の活性化を引き起こす。これら 3 つのシグナルを活性化することで IL-1β の産生を強く誘導する。

ピロリ菌は胃上皮細胞への感染に加えて、ピロリ菌感染患者の臨床検体の胃の粘膜固有層において菌体が存在することが報告されていることから (Ito et al., 2008; Jhala et al., 2003; Necchi et al., 2007; Ozbek et al., 2010)、胃の粘膜固有層においてピロリ菌がマクロファージや樹状細胞（DCs）などの細胞に感染し、IL-1β が産生されることが予想された。本研究の結

果から、ピロリ菌感染による IL-1β の主要な産生源は、マクロファージであることが示唆された。さらに本論文の第 1 章において示したように、マクロファージにおいて IL-1β は CagA に依存して産生されることを示した。一方で、胃の上皮細胞にピロリ菌感染させた場合と同様に、マクロファージにおいても CagA は、チロシンリン酸化修飾されていることが示された (図 1-2)。Δ*cagE* (CagA を有しているが TFSS が欠損するために CagA を分泌できない) 感染においては、☒*cagA* 感染と同様に IL-1β 産生が有意に抑制された(図 1-3A,B)ことは、マクロファージにおいて CagA が TFSS を介して細胞内に注入されることが、IL-1β 産生に重要であることを示唆している。この結果は、これまでなされてきたピロリ菌感染患者の胃における IL-1β 量と CagA の存在が非常に関連しているという報告を裏付けるものと言える (Figueiredo et al., 2002; Yamaoka et al., 1997)。一方で興味深いことに、CagA を胃上皮細胞に長期間（6 日以上）異所性発現させた場合に、マクロファージにおいて見られたものよりも低いレベルではあるものの、成熟型の IL-1β が検出されるという報告もなされている (N. Suzuki et al., 2015)。この胃上皮細胞においても CagA による IL-1β の産生メカニズム、特に本研究で見出した CagA による NLRP3 の活性化機構が関与しているのかどうかについて、今後検討したい。

ピロリ菌感染時の IL-1β 産生という点において、これまで他の研究者らがマウス骨髄由来 DCs において、NLRP3 がピロリ菌感染による IL-1β 分泌に関与しているという報告がなされており、それらの報告ではマウスの DCs においては *cagA* 遺伝子非依存的に、主に ROS や K^+の細胞外への流出、リソソームの崩壊といった宿主の因子が NLRP3 の活性化を引き起こしていると記載している (Kim et al., 2013; Semper et al., 2014)。本研究においては、IL-1β 産生が *cagA* 遺伝子に依存しているという相違はあるものの、第 3 章で示したようにヒトのマクロファージにおいても ROS や K^+の細胞外への流出により NLRP3 inflammasome が活性化していることが示された。

本研究では、マクロファージの細胞内に移行した CagA は NLRP3 に直接的に認識されていることを示した。CagA と結合した NLRP3 は ATPase 活性を示し、多量体を形成した（図 5-2）。その結果、ASC と procaspase-1 を含む NLRP3 inflammasome 複合体形成が生じることで IL-1β が産生されることを示唆する結果を得た。これらの結果から、CagA は NLRP3 のリガンドとなっているという、これまでに知られてこなかった NLRP3 の細菌由来因子の新しい認識機構を見出した。CagA の組み換えタンパク質を用いて NLRP3 の ATPase 活性 (Duncan et al., 2007)が誘導されたことから、CagA は NLRP3 を直接活性化することを強く示唆している。しかしながらこの CagA による NLRP3 の直接的な活性化と第 3 章で示した Ca^{2+}や ROS を介する NLRP3 の活性化との関連性は本研究では明らかにすることは出来なかった。これらの関係性については今後、さらなる検討で明らかにしたい。IL-1β は非常に強く胃酸の分泌を抑制するサイトカインとして報告されており (El-Omar, 2001; McColl and el-Omar, 1996; Rieder et al., 2005b; Ruiz et al., 1996)、CagA による NLRP3 の活性化は細菌の侵入戦略として働き、ピロリ菌が胃に定着することを促している可能性が考えられる。今後、この直接的な CagA による NLRP3 の活性化によって産生される IL-1β が、ピロリ菌による発癌機構にどのように関与するのかについて、CagA や NLRP3 などの遺伝子改変動物を用いることによって、より詳細な検証を行っていきたい。

CagA はその C 末端領域に EPIYA motifs と CM motifs といった独自の配列構造をもち、これらを介して、細胞増殖や細胞形態、細胞死に関わる細胞内の様々なシグナル伝達経路を撹乱する (Backert et al., 2010; Hatakeyama, 2014; Rieder et al., 2005a; Salama et al., 2013)。EPIYA motifs は Src ファミリーにチロシンリン酸化修飾を受け、リン酸化修飾を受けた EPIYA segments は様々な宿主タンパク質とリン酸化依存的に結合する(e.g. Abl kinases, Srd, PAR1b CrkII, SHP-2) (Dunne et al., 2014; Hatakeyama, 2014; Woon et al., 2013)。一方で、CM motifs はチロシンリン酸化非依存的に PAR1b と直接結合し、その活性化を抑制することで c-Met

を介した PI3K/Akt 経路を活性化する (M. Suzuki et al., 2009)。第 5 章で示したように、この両方の motifs を含む CagA の C 末端領域（873-1247）は NLRP3 との結合性が非常に弱かったことから、EPIYA segments は CagA と NLRP3 の結合には関係しないと考えられる。一方で CagA による NLRP3 inflammasome を介した IL-1β 産生機構の活性化には EPIYA segments は重要であり、中でも CagA の EPIYA motifs は関与しておらず、CM motifs が必要であった。CM motifs は CagA の多量体化に重要な motif であることから、CagA の多量体化が NLRP3 の多量体化を引き起こしていることが予想される。しかしながら本研究では HEK293T 細胞を用いた NLRP3 inflammasome の再構築系で検証したため、CM motifs が PLCγ1 を介した Ca^{2+}、ROS シグナルによる NLRP3 の活性化に影響する可能性は否定できない。今後、CM motifs が PLCγ1 を介した Ca^{2+}、ROS シグナルに関与するかどうかや、CM motifs の変異体組み換えタンパク質が NLRP3 の ATPase 活性に影響を及ぼすのかどうかについて検証することで、CagA の CM motifs が NLRP3 を活性化する、より詳細な分子機構について検討を行っていきたい。

CagA は細菌由来の発癌タンパク質として初めて同定され (Ohnishi et al., 2008)、そして CagA の胃癌発症に対する分子機構は多くの報告がなされてきた。本研究では CagA による NLRP3 を介した自然免疫の活性化という新たな分子機構を明らかにした。前述のようにこれまでピロリ菌による IL-1β 産生はピロリ菌の胃への定着や胃癌の発症のリスク因子となっていると考えられている (El-Omar, 2001; Hwang et al., 2002; Rieder et al., 2005b)。この点に関して CagA による NLRP3 を活性化することで増加する IL-1β はピロリ菌の慢性感染を成立させる機構なのかもしれない。今後、この CagA による NLRP3 を介する IL-1β 産生の生物学的意義を追求することや、CagA と NLRP3 のより詳細な活性化機構についてさらなる研究を行うことで、ピロリ菌感染、またそれによる胃癌発症に対する新たな予防法や治療法の開発につなげていきたい。

参考文献

Backert, S., Naumann, M., 2010. What a disorder: proinflammatory signaling pathways induced by Helicobacter pylori. Trends Microbiol. 18, 479–486.

Backert, S., Tegtmeyer, N., Selbach, M., 2010. The versatility of *Helicobacter pylori* CagA effector protein functions: The master key hypothesis. Helicobacter 15, 163–176.

Chuang, Y.-T., Lin, Y.-C., Lin, K.-H., Chou, T.-F., Kuo, W.-C., Yang, K.-T., Wu, P.-R., Chen, R.-H., Kimchi, A., Lai, M.-Z., 2011. Tumor suppressor death-associated protein kinase is required for full IL-1β production. Blood 117, 960–970.

Churin, Y., Al-Ghoul, L., Kepp, O., Meyer, T.F., Birchmeier, W., Naumann, M., 2003. *Helicobacter pylori* CagA protein targets the c-Met receptor and enhances the motogenic response. J Cell Biol 161, 249–255.

Cogswell, J.P., Godlevski, M.M., Wisely, G.B., Clay, W.C., Leesnitzer, L.M., Ways, J.P., Gray, J.G., 1994. NF-kappa B regulates IL-1 beta transcription through a consensus NF-kappa B binding site and a nonconsensus CRE-like site. J Immunol 153, 712–723.

Correa, P., 1992. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. Cancer Res 52, 6735–6740.

Cover, T.L., Dooley, C.P., Blaser, M.J., 1990. Characterization of and human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity. Infect Immun 58, 603–610.

Crabtree, J.E., Figura, N., Taylor, J.D., Bugnoli, M., Armellini, D., Tompkins, D.S., 1992. Expression of 120 kilodalton protein and cytotoxicity in *Helicobacter pylori*. J Clin Pathol 45, 733–734.

Davis, B.K., Wen, H., Ting, J.P.-Y., 2011. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. Annu Rev Immunol 29, 707–735.

Duncan, J.A., Bergstralh, D.T., Wang, Y., Willingham, S.B., Ye, Z., Zimmermann, A.G., Ting, J.P.-Y., 2007. Cryopyrin/NALP3 binds ATP/dATP, is an ATPase, and requires ATP binding to mediate inflammatory signaling. Proc Natl Acad Sci USA 104, 8041–8046.

Dunne, C., Dolan, B., Clyne, M., 2014. Factors that mediate colonization of the human stomach by *Helicobacter pylori*. World J Gastroenterol 20, 5610–5624.

El-Omar, E.M., 2001. The importance of interleukin 1beta in *Helicobacter pylori* associated disease. Gut 48, 743–747.

El-Omar, E.M., Carrington, M., Chow, W.H., McColl, K.E., Bream, J.H., Young, H.A., Herrera, J., Lissowska, J., Yuan, C.C., Rothman, N., Lanyon, G., Martin, M., Fraumeni, J.F., Rabkin, C.S., 2000. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. Nature 404, 398–402.

Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., Yu, J.-W., Datta, P., Miller, B., Jankowski, W., Rosenberg, S., Zhang, J., Alnemri, E.S., 2007. The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. Cell Death Differ 14, 1590–1604.

Fernandes-Alnemri, T., Yu, J.-W., Datta, P., Wu, J., Alnemri, E.S., 2009. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. Nature 458, 509–513.

Figueiredo, C., Machado, J.C., Pharoah, P., Seruca, R., Sousa, S., Carvalho, R., Capelinha, A.F., Quint, W., Caldas, C., van Doorn, L.-J., Carneiro, F., Sobrinho-Simões, M., 2002. *Helicobacter pylori* and interleukin 1 genotyping: an opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma. J Natl Cancer Inst 94, 1680–1687.

Greco, E., Quintiliani, G., Santucci, M.B., Serafino, A., Ciccaglione, A.R., Marcantonio, C., Papi, M., Maulucci, G., Delogu, G., Martino, A., Goletti, D., Sarmati, L., Andreoni, M., Altieri, A., Alma, M., Caccamo, N., Di Liberto, D., De Spirito, M., Savage, N.D., Nisini, R., Dieli, F., Ottenhoff, T.H., Fraziano, M., 2012. Janus-faced liposomes enhance antimicrobial innate immune response in *Mycobacterium tuberculosis* infection. Proc Natl Acad Sci USA 109, E1360–8.

Guo, T., Qian, J.-M., Zhao, Y.-Q., Li, X.-B., Zhang, J.-Z., 2013. Effects of IL-1β on the proliferation and apoptosis of gastric epithelial cells and acid secretion from isolated rabbit parietal cells. Mol Med Rep 7, 299–305.

Gurung, P., Malireddi, R.K.S., Anand, P.K., Demon, D., Vande Walle, L., Liu, Z., Vogel, P., Lamkanfi, M., Kanneganti, T.-D., 2012. Toll or interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing adaptor inducing interferon-β (TRIF)-mediated caspase-11 protease production integrates Toll-like receptor 4 (TLR4) protein- and Nlrp3 inflammasome-mediated host defense against enteropathogens. J Biol Chem 287, 34474–34483.

Hatakeyama, M., 2014. *Helicobacter pylori* CagA and gastric cancer: a paradigm for hit-and-run carcinogenesis. Cell Host Microbe 15, 306–316.

Hwang, I.-R., Kodama, T., Kikuchi, S., Sakai, K., Peterson, L.E., Graham, D.Y., Yamaoka, Y., 2002. Effect of interleukin 1 polymorphisms on gastric mucosal interleukin 1beta production in *Helicobacter pylori* infection. Gastroenterology 123, 1793–1803.

IARC working group, 1994. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994., IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer.

Ito, T., Kobayashi, D., Uchida, K., Takemura, T., Nagaoka, S., Kobayashi, I., Yokoyama, T., Ishige, I., Ishige, Y., Ishida, N., Furukawa, A., Muraoka, H., Ikeda, S., Sekine, M., Ando, N., Suzuki, Y., Yamada, T., Suzuki, T., Eishi, Y., 2008. *Helicobacter pylori* invades the gastric mucosa and translocates to the gastric lymph nodes. Lab Invest 88, 664–681.

Jhala, N.C., Siegal, G.P., Klemm, K., Atkinson, B.F., Jhala, D.N., 2003. Infiltration of Helicobacter pylori in the gastric mucosa. Am. J. Clin. Pathol. 119, 101–107.

Kim, D.-J., Park, J.-H., Franchi, L., Backert, S., Núñez, G., 2013. The Cag pathogenicity island and interaction between TLR2/NOD2 and NLRP3 regulate IL-1β production in *Helicobacter pylori* infected dendritic cells. Eur J Immunol 43, 2650–2658.

Kofoed, E.M., Vance, R.E., 2011. Innate immune recognition of bacterial ligands by NAIPs determines inflammasome specificity. Nature 477, 592–595.

Kusters, J.G., van Vliet, A.H.M., Kuipers, E.J., 2006. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Clin Microbiol Rev 19, 449–490.

Lamkanfi, M., Dixit, V.M., 2014. Mechanisms and functions of inflammasomes. Cell 157, 1013–1022.

Lee, G.-S., Subramanian, N., Kim, A.I., Aksentijevich, I., Goldbach-Mansky, R., Sacks, D.B., Germain, R.N., Kastner, D.L., Chae, J.J., 2012. The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca^{2+} and cAMP. Nature 492, 123–127.

Li, X., Liu, S., Luo, J., Liu, A., Tang, S., Liu, S., Yu, M., Zhang, Y., 2015. Helicobacter pylori induces IL-1β and IL-18 production in human monocytic cell line through activation of NLRP3 inflammasome via ROS signaling pathway. Pathog Dis 73, ftu024–ftu024.

Marlink, K.L., Bacon, K.D., Sheppard, B.C., Ashktorab, H., Smoot, D.T., Cover, T.L., Deveney, C.W., Rutten, M.J., 2003. Effects of *Helicobacter pylori* on intracellular Ca^{2+} signaling in normal human gastric mucous epithelial cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 285, G163–76.

Marshall, B.J., Warren, J.R., 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet 1, 1311–1315.

McColl, K.E., el-Omar, E., 1996. *Helicobacter pylori* and disturbance of gastric function associated with duodenal ulcer disease and gastric cancer. Scand J Gastroenterol Suppl 215, 32–37.

Miao, E.A., Rajan, J.V., Aderem, A., 2011. Caspase-1-induced pyroptotic cell death. Immunol Rev 243, 206–214.

Monie, T.P., 2013. NLR activation takes a direct route. Trends Biochem. Sci. 38, 131–139.

Murakami, T., Ockinger, J., Yu, J., Byles, V., McColl, A., Hofer, A.M., Horng, T., 2012. Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome. Proc Natl Acad Sci USA 109, 11282–11287.

Necchi, V., Candusso, M.E., Tava, F., Luinetti, O., Ventura, U., Fiocca, R., Ricci, V., Solcia, E., 2007. Intracellular, intercellular, and stromal invasion of gastric mucosa, preneoplastic lesions, and cancer by Helicobacter pylori. Gastroenterology 132, 1009–1023.

Ohnishi, N., Yuasa, H., Tanaka, S., Sawa, H., Miura, M., Matsui, A., Higashi, H., Musashi, M., Iwabuchi, K., Suzuki, M., Yamada, G., Azuma, T., Hatakeyama, M., 2008. Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. Proc Natl Acad Sci USA 105, 1003–1008.

Ozbek, A., Ozbek, E., Dursun, H., Kalkan, Y., Demirci, T., 2010. Can Helicobacter pylori invade human gastric mucosa?: an in vivo study using electron microscopy, immunohistochemical methods, and real-time polymerase chain reaction. J Clin Gastroenterol 44, 416–422.

Park, S., Juliana, C., Hong, S., Datta, P., Hwang, I., Fernandes-Alnemri, T., Yu, J.-W., Alnemri, E.S., 2013. The mitochondrial antiviral protein MAVS associates with NLRP3 and regulates its inflammasome activity. J Immunol 191, 4358–4366.

Peek, R.M., Crabtree, J.E., 2006. *Helicobacter* infection and gastric neoplasia. J Pathol 208, 233–248.

Peek, R.M., Miller, G.G., Tham, K.T., Perez-Perez, G.I., Zhao, X., Atherton, J.C., Blaser, M.J., 1995. Heightened inflammatory response and cytokine expression in vivo to *cagA*$^{+}$ *Helicobacter pylori* strains. Lab Invest 73, 760–770.

Portal-Celhay, C., Perez-Perez, G.I., 2006. Immune responses to *Helicobacter pylori* colonization: mechanisms and clinical outcomes. Clin Sci 110, 305–314.

Rathinam, V.A.K., Vanaja, S.K., Waggoner, L., Sokolovska, A., Becker, C., Stuart, L.M., Leong, J.M., Fitzgerald, K.A., 2012. TRIF licenses caspase-11-dependent NLRP3 inflammasome activation by gram-negative bacteria. Cell 150, 606–619.

Rieder, G., Fischer, W., Haas, R., 2005a. Interaction of *Helicobacter pylori* with host cells: function of secreted and translocated molecules. Curr Opin Microbiol 8, 67–73.

Rieder, G., Merchant, J.L., Haas, R., 2005b. *Helicobacter pylori* cag-type IV secretion system facilitates corpus colonization to induce precancerous conditions in Mongolian gerbils. Gastroenterology 128, 1229–1242.

Ruiz, B., Correa, P., Fontham, E.T., Ramakrishnan, T., 1996. Antral atrophy, *Helicobacter pylori* colonization, and gastric pH. Am J Clin Pathol 105, 96–101.

Salama, N.R., Hartung, M.L., Müller, A., 2013. Life in the human stomach: persistence strategies of the bacterial pathogen *Helicobacter pylori*. Nature Reviews Microbiology 11, 385–399.

Schroder, K., Tschopp, J., 2010. The inflammasomes. Cell 140, 821–832.

Semper, R.P., Mejías-Luque, R., Groß, C., Anderl, F., Müller, A., Vieth, M., Busch, D.H., Prazeres da Costa, C., Ruland, J., Gross, O., Gerhard, M., 2014. *Helicobacter pylori*-Induced IL-1β Secretion in Innate Immune Cells Is Regulated by the NLRP3 Inflammasome and Requires the Cag Pathogenicity Island. J Immunol 193, 3566–3576.

Stein, M., Rappuoli, R., Covacci, A., 2000. Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag-driven host cell translocation. Proc Natl Acad Sci USA 97, 1263–1268.

Strowig, T., Henao-Mejia, J., Elinav, E., Flavell, R., 2012. Inflammasomes in health and disease. Nature 481, 278–286.

Suzuki, M., Mimuro, H., Kiga, K., Fukumatsu, M., Ishijima, N., Morikawa, H., Nagai, S., Koyasu, S., Gilman, R.H., Kersulyte, D., Berg, D.E., Sasakawa, C., 2009. *Helicobacter pylori* CagA phosphorylation-independent function in epithelial proliferation and inflammation. Cell Host Microbe 5, 23–34.

Suzuki, N., Murata-Kamiya, N., Yanagiya, K., Suda, W., Hattori, M., Kanda, H., Bingo, A., Fujii, Y., Maeda, S., Koike, K., Hatakeyama, M., 2015. Mutual reinforcement of inflammation and carcinogenesis by the *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein. Sci Rep 5, 10024.

Takeuchi, O., Akira, S., 2010. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. Cell 140, 805–820.

Tsuchiya, S., Kobayashi, Y., Goto, Y., Okumura, H., Nakae, S., Konno, T., Tada, K., 1982. Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. Cancer Res 42, 1530–1536.

Tu, S., Bhagat, G., Cui, G., Takaishi, S., Kurt-Jones, E.A., Rickman, B., Betz, K.S., Penz-Oesterreicher, M., Bjorkdahl, O., Fox, J.G., Wang, T.C., 2008. Overexpression of interleukin-1beta induces gastric inflammation and cancer and mobilizes myeloid-derived suppressor cells in mice. Cancer Cell 14, 408–419.

Wallace, J.L., Cucala, M., Mugridge, K., Parente, L., 1991. Secretagogue-specific effects of interleukin-1 on gastric acid secretion. Am J Physiol 261, G559–64.

Woon, A.P., Tohidpour, A., Alonso, H., Saijo-Hamano, Y., Kwok, T., Roujeinikova, A., 2013. Conformational analysis of isolated domains of *Helicobacter pylori* CagA. PLoS ONE 8, e79367.

Yamaoka, Y., 2012. Pathogenesis of *Helicobacter pylori*-Related Gastroduodenal Diseases from Molecular Epidemiological Studies. Gastroenterol Res Pract 2012, 371503–9.

Yamaoka, Y., Kita, M., Kodama, T., Sawai, N., Kashima, K., Imanishi, J., 1997. Induction of various cytokines and development of severe mucosal inflammation by *cagA* gene positive *Helicobacter pylori* strains. Gut 41, 442–451.

Zhao, Y., Yang, J., Shi, J., Gong, Y.-N., Lu, Q., Xu, H., Liu, L., Shao, F., 2011. The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. Nature 477, 596–600.

謝辞

北海道大学 遺伝子病制御研究所 分子生体防御分野に博士後期課程の大学院生として、分子生物学的、生化学的実験手法などなにも知らない状態の私を受け入れていただいてから約7年、本研究に要した5年以上にわたり、ご指導、ご鞭撻賜りました高岡晃教先生に感謝申し上げます。また多くのご迷惑をおかけいたしまして申し訳ございません。引き続き、折々につけてご指導いただけますと幸いです。

本学位論文の副査として御校閲を賜り、貴重な御助言を頂きました北海道大学 遺伝子病制御研究所 分子腫瘍分野 教授 藤田恭之先生、北海道大学大学院理学研究院化学部門 物質化学研究室 教授 佐田和己先生ならびに北海道大学大学院理学研究院化学部門 生物有機化学研究室 教授 村上洋太先生に深く感謝申し上げます。

本研究は、北海道大学 遺伝子病制御研究所 分子生体防御分野助教 亀山武志氏、佐藤精一氏のご助言、ご助力なくして成し得るものではありませんでした。両名には心より感謝いたします。

北海道大学 人獣共通感染症リサーチセンター 感染・免疫部門教授 東秀明先生、助教 大西なおみ氏にはこれまでピロリ菌を扱ったことのなかった私に本研究の開始時より多大なるご助言、ご協力を頂きました。ここに感謝の意を申し上げます。

また東京大学大学院医学系研究科微生物学研究室教授 畠山昌則先生、講師 紙谷尚子先生、助教 林剛瑠氏のご助言、ご指導があり本研究を行うことが出来ました。深く感謝申し上げます。

本研究で用いました実験試料をご供与いただいた、野口博士、宮崎博士、宮脇博士に感謝申し上げます。

また大学院入学からこれまで、卒業生も含めて高岡研で関わった、早川清雄先生（現東京医科歯科大学 助教）をはじめ、分子生体防御分野の皆様に感謝いたします。

この7年の間、私生活において精神的支柱となってくれた大坪渉氏、大坪風花氏、梶田美穂子氏（元北海道大学 遺伝子病制御研究所 分子腫瘍分野助教）、鹿野内-寺田智美氏、鹿野内義宜氏、栢森康司氏、小寺千絵氏、昆俊亮氏（北海道大学 遺伝子病制御研究所 分子腫瘍分野助教）、近藤敦美氏、下山瑞樹氏、高橋志穂美氏、高橋哲也氏、八丸久美子氏、福原裕司氏、藤井仰氏、藤井由紀子氏、藤野寛氏、斑目広郎先生（麻布大学 教授）、宮崎幸恵氏、矢部慎氏、矢部絵美子氏、吉村卓也氏、その他、多くの皆様には誠に感謝しております。皆様の支えがあって、この7年間を過ごすことができました。ありがとうございました。

最後に、これまでの研究生活については両親、姉、祖母、他界した祖父母の支えがあって成り立ちました。私がしたいようにすればいいと、何も言わずに支え続けてくれたことには感謝してもし尽くすことができません。ありがとうございました。

2016 年 3 月

亀岡 章一郎