

# 久恒 順三 論文内容の要旨

## 主 論 文

*Helicobacter pylori* VacA Enhances Prostaglandin E<sub>2</sub> Production through Induction of Cyclooxygenase-2 Expression via a p38 Mitogen-Activated Protein Kinase/Activating Transcription Factor-2 Cascade in AZ-521 Cells.

*Helicobacter pylori* VacA 毒素は p38/ATF-2 経路を介してシクロオキシゲナーゼ-2 の発現を誘導し、プロスタグランジン E<sub>2</sub> の生成を促す

久恒順三 山崎栄樹 中山真彰 白坂大輔 倉園久生 片方陽太郎  
井上裕康 Jiahuai Han Jan Sap 八尋錦之助 Joel Moss 平山壽哉

(Infection and Immunity · 75 巻 9 号 4472-4481 2007 年)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科新興感染症病態制御系専攻  
(主任指導教員：平山 壽哉 教授)

### [緒 言]

*Helicobacter pylori* が産生する空胞化致死毒素(VacA)は空胞形成のみならず、広範多岐な生物活性を示す。すなわち、細胞接着機能障害、ミトコンドリア障害によるアポトーシス誘導作用、T 細胞不活化作用、さらには、種々の転写因子の機能攪乱による発現障害である。我々は、以前、VacA が標的細胞の p38 MAP kinase (MAPK)/ATF-2 経路を活性化することを報告した(*J. Biol. Chem.* 2004, *Infect. Immun.* 2006)。本研究では VacA による p38 MAPK の活性化が、本菌の感染においてどのような意義をもつかのを知る目的で、MAPK の関与が示唆されている Cyclooxygenase (COX)に着目し、COX-1 及び COX-2 発現と PGE<sub>2</sub> 産生への影響をしらべた。

### [対象と方法]

- **VacA による COX-2 mRNA の発現誘導**：ヒト胃由来株化細胞 AZ-521 に毒素を処理時間、あるいは、処理濃度を変えて作用させた後に全 RNA を抽出した。そして、COX-1 及び COX-2 mRNA の量的変化を RT-PCR、または real-time PCR にて解析した。
- **VacA の COX-2 発現誘導に及ぼす各種阻害剤の影響**：MAPK シグナル伝達系における p38MAPK 阻害剤 (SB203580)、Erk 経路阻害剤 (PD98059) および空胞形成阻害剤 (Bafilomycin A1、NPPB、PI-PLC)で細胞を処理した後に VacA を作用させて、COX-2 mRNA の発現量を RT-PCR 及び real-time PCR にて解析した。
- **ドミナントネガティブ p38MAPK 安定発現細胞株への VacA 作用解析**：ドミナントネガティブ p38MAPK 発現プラスミドを AZ-521 細胞に導入し、G418 を用いてスクリーニングしてドミナントネガティブ p38MAPK 強発現細胞株を得た。そしてこの細胞に VacA を作用させて COX-2 発現に及ぼす影響をしらべた。
- **ATF-2 ノックダウン細胞を用いた解析**：ATF-2 特異的 siRNA を AZ-521 細胞に transfect し、ウエスタンブロット法により ATF-2 発現の抑制を確認した。その後、この細胞株を用いて、VacA を処理し、COX-2 mRNA の量的変化を real-time PCR に

て解析した。

- **COX-2 転写活性およびそのプロモーター領域の解析**： COX-2 promoter 遺伝子、または、その変異遺伝子を含む Luciferase レポーター遺伝子を細胞に導入し、VacA 処理後の Luciferase 活性を測定した。
- **VacA の PGE<sub>2</sub> 産生に及ぼす影響**： VacA を作用させた細胞の培養上清に遊離される PGE<sub>2</sub> を EIA 法により測定した。

### [結果及び考察]

VacA を既報に従い *Helicobacter pylori* ATCC49503 の培養液から精製した。VacA を作用させた AZ-521 細胞では、COX-2 mRNA の量が毒素処理時間及び処理濃度に依存して増加したが、COX-1 mRNA の量に変化が認められなかった。この VacA による COX-2 mRNA の増加は、p38MAPK 阻害剤で処理、あるいはドミナントネガティブ p38MAPK (DN-p38) 発現細胞株において顕著に抑制された。一方、VacA による COX-2 mRNA の増加は、VacA の空胞化活性を阻害する Bafilomycin A1 及び NPPB によって影響されなかったが、PI-PLC 処理によって著明に抑制された。したがって、VacA による COX-2 mRNA の増加は、VacA の空胞化活性とは無関係であるが、細胞膜上の何らかの GPI アンカータンパク質が関与していることが示唆された。この事実に一致して、PI-PLC 処理により、VacA による p38 MAPK の活性化が阻害された。次に、VacA による COX-2 の転写活性への影響を調べた。その結果、正常な COX-2 レポーター遺伝子を導入した細胞に認められる VacA による転写活性の亢進が、ATF-2 が結合する CRE 配列を変異させた COX-2 レポーター遺伝子を導入した細胞ではルシフェラーゼ活性が著しく低下した。そこで、ATF-2 特異的 siRNA により ATF-2 の発現を抑制させた細胞への VacA の影響を調べたところ、VacA による COX-2 mRNA の発現増加が阻害された。したがって、VacA は p38 MAPK を活性化し、それによって活性化した ATF-2 が COX-2 プロモーター領域の CRE 配列に結合して転写が亢進し、COX-2 の発現が促されることが分かった。さらに、VacA は positive control として用いた EGF と同様に PGE<sub>2</sub> の量を増加させ、この作用は COX-2 特異的阻害剤 NS-398 あるいは DN-p38 発現細胞株において著明に阻害された。

以上の事実から、*H. pylori* VacA が p38 MAPK/ATF-2 経路を介して COX-2 の発現を誘導し、その結果、PGE<sub>2</sub> の産生が亢進することが分かった。VacA が宿主転写因子の機能を攪乱し、炎症性メディエーター及び細胞増殖誘導因子などの多様な機能をもつ PGE<sub>2</sub> の産生を促すことが、本菌感染症にどのように関わっているのかを知る新たな課題が生じた。