

審査の結果の要旨

氏名 橋 香奈

本研究では、アメリンド型ピロリ菌 v225d CagA 及びサル胃由来ピロリ菌の保持する CagA の病原性の解析を行った。更に、マウス ES 細胞から胃様オルガノイドを作製し、CagA 陽性ピロリ菌 11637 株の病原性の解析を行い、下記の結果を得ている。

1. v225d 株由来 CagA(v225d CagA)を発現する哺乳動物細胞用ベクターを作製し、AGS 細胞及び COS-7 細胞にトランスフェクションさせ、共免疫沈降を行なった。結果、v225d CagA は PAR1b と結合しないことが示された。また、v225d CagA は SHP2 とは結合することが示され、SHP2 の脱制御により引き起こされるとされる AGS 細胞の伸長現象が観察された。
2. 京都大学霊長類研究所で飼育されているアカゲザルの胃液から *cagA* 遺伝子を PCR により検出し、その塩基配列の解析を行った。解析の結果、これまでに知られている CagA の配列と異なる EPIYA 繰り返し領域が見られた。次に、PCR により検出されたサル由来ピロリ菌の保持する CagA (サル由来 CagA)の病原性を解析するため、サル CagA を発現する哺乳動物細胞用ベクターを作製し、AGS 細胞にトランスフェクションさせ、共免疫沈降を行なった。結果、サル由来 CagA は PAR1b と結合しないことが示された。また、サル由来 CagA は SHP2 とは結合することが示され、SHP2 の脱制御により引き起こされるとされる AGS 細胞の伸長現象が観察された。次に、サル胃液より、CagA 陽性ピロリ菌の単離培養を行った。
3. マウス ES 細胞由来胃オルガノイドの作製を試みた。まず、マウス ES 細胞から胚葉体を形成し、胚体内胚葉への分化を試みた。胚体内胚葉マーカーの陽性を確認した後、後方前腸への分化を誘導した。次に、スフェロイド状に成長した細胞塊に免疫染色を行い、後方前腸のマーカーの陽性を確認した。後方前腸様のスフェロイドをマトリゲルで更に 17 日間培養することにより直径 500 μ m~1mm のオルガノイドの形成が確認された。このオルガノイドの凍結切片を作製し、断面を免疫染色した結果、E-cadherin 陽性単層上皮細胞、間質細胞、筋繊維芽細胞の存在が認められ、内腔側には胃特異的 mucin である mucin5ac 及び mucin6 の分泌が確認された。マイクロアレイ解析の結果、形成されたオルガの井戸の RNA 発現パターンは心臓や肺などの他の臓器と比較して、胃に近いことが示された。
4. 作製したオルガノイドの内腔側に、ピロリ菌 11637 株をマイクロインジェクションし、12 時間後に解析を行った。HE 染色の結果、CagA 依存的な著しいオルガノイド内部の損傷が示された。また、免疫染色の結果、E-cadherin 陽性単層上皮細胞の存在が確認されなかった。マイクロアレイ解析の結果、オルガノイドにおいて、がんにおいて発現の上昇が知られる *Epcam*, *Mmp3* の発現の上昇が CagA 依存的に示された。また、c-Myc 関連遺伝子の発現上昇が示されたことから、CagA により c-Myc が活性化された可能性が示唆された。

5. 作製したオルガノイドの内腔側に、ピロリ菌 v225d 株およびサル由来ピロリ菌株をマイクロインジェクションし、12 時間後に解析を行った。HE 染色の結果、ピロリ菌 v225d 株およびサル由来ピロリ菌株をマイクロインジェクションしたオルガノイドでは、11637 株により引き起こされた CagA 依存的な著しいオルガノイド内部の損傷が示されなかった。また、免疫染色の結果、ピロリ菌 v225d 株およびサル由来ピロリ菌株をマイクロインジェクションしたオルガノイドでは、11637 株により引き起こされた E-cadherin 陽性単層上皮細胞の消失は確認されなかった。これらの結果から、v225d 株及びサル由来ピロリ菌株は 11637 株に比べ病原性が低いことが示唆された。

以上、本論文はまず、アメリンド型ピロリ菌 v225d CagA の病原性、及びサル胃由来ピロリ菌の保持する CagA の病原性を評価した。更に、マウス ES 細胞から胃様オルガノイドを作製し、CagA 陽性ピロリ菌 11637 株の病原性を評価した。本研究は、これまでに明らかにされていなかったピロリ菌株の病原性を評価したと共に、CagA 陽性ピロリ菌の病原性の研究においてこれまでに使用されてきた *in vitro* 培養細胞実験系と *in vivo* マウス実験系の橋渡しとなる、新規実験手法を樹立したと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。