

令和 4 年 4 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07535

研究課題名(和文)ピロリ菌CagAによる胃上皮細胞のDNA損傷誘発機構と発がんにおける役割の解明

研究課題名(英文)Helicobacter pylori CagA induces DNA double-strand breaks that may underlie bacterial gastric carcinogenesis

研究代表者

紙谷 尚子(Kamiya, Naoko)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・講師

研究者番号：40279352

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：CagA蛋白質を産生するピロリ菌感染は胃癌発症の最大の危険因子である。CagAはヒト胃上皮細胞細胞内でPAR1bキナーゼに結合しキナーゼ活性を抑制する。本研究では、CagAが宿主ゲノムに重篤なDNA損傷であるDNA二本鎖切断(DSB)を誘発することを見出した。その分子機序として、CagAはPAR1bを抑制することによってBRCA1のリン酸化を阻害した。BRCA1リン酸化は核移行に必須であり、CagAがBRCA1の核移行を阻害する結果、DNA複製フォークが不安定化されDSBが誘導された。従って、CagAはPAR1b抑制を介して一過性BRCAnessを誘導することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本人の胃癌患者の99%はcagA陽性ピロリ菌感染者である。ピロリ菌は産生したCagA蛋白質を胃上皮細胞内に直接注入する。本研究では、CagAがPAR1bを抑制することによりBRCA1の核移行を阻害し、宿主ゲノムにDNA二本鎖切断を誘導することを見出した。BRCA1遺伝子は不活化変異により遺伝性乳癌・卵巣癌の原因となる癌抑制遺伝子である。胃癌ではBRCA1変異は殆ど見られないが、ゲノム解析からBRCA1不活化変異を有する癌と同じ変異パターンが生じていることが報告されている。本研究結果から、ピロリ菌CagAが一過性BRCAnessを引き起こし細胞癌化を促すことが示唆される。

研究成果の概要(英文)：Infection with CagA-producing *H. pylori* plays a critical role in the development of gastric cancer. CagA binds and thereby inhibits PAR1b kinase in human gastric epithelial cells. In the present study, we found that CagA elicits DNA double-strand breaks (DSB) that are the most dangerous type of DNA damage in cells. Mechanistically, CagA-induced PAR1b kinase inhibition prevents PAR1b-mediated phosphorylation of BRCA1, which is required for cytoplasmic-to-nuclear translocalization of BRCA1. CagA-induced shortage of nuclear BRCA1 provokes replication fork instability and thereby elicits DSB. Thus, CagA induces transient BRCAness through PAR1b inhibition, which may underlie gastric carcinogenesis.

研究分野：感染腫瘍学

キーワード：ピロリ菌 CagA BRCA1 DNA二本鎖切断 胃癌

1. 研究開始当初の背景

胃がんは特に日本人に多く、日本における部位別がん死因の第3位を占めており、毎年4万人以上が胃がんで死亡している。日本人を対象にした臨床疫学調査では、胃がん患者の99%以上がピロリ菌感染者であることが示されている。ピロリ菌は *cagA* 伝子を保有する株 (*cagA* 陽性株) と保有しない株 (*cagA* 陰性株) に大別されるが、胃がん発症に関与するのは *cagA* 陽性株である。日本に蔓延しているピロリ菌はほぼ100% *cagA* 陽性株であることから、日本人の胃がんの99%以上は *cagA* 陽性ピロリ菌感染が原因と推定される。

cagA 陽性ピロリ菌の菌体内では、*cagA* 遺伝子にコードされる CagA タンパク質が作られる。産生された CagA タンパク質は、菌が保有する注射針様の構造体である IV 型分泌機構によってヒト胃上皮細胞内に注入される。細胞内に侵入した CagA は、宿主細胞のキナーゼによってチロシンリン酸化される(図1左経路)。申請者の研究室では、ピロリ菌 CagA を全身性に発現する *cagA* トランスジェニックマウスを樹立し、CagA が消化管腫瘍と血液がんを自然発症することを見出し、CagA が細菌性発がん因子であることを世界で初めて証明した(文献)。同時に、CagA 依存的な細胞がん化機構の解明に取り組み、CagA がチロシンリン酸化依存的に SHP2 ホスファターゼに結合し、SHP2 を異常活性化することで Ras-MAPK 経路を脱制御し細胞増殖能を亢進させることを見出した(文献)。SHP2 をコードする *PTPN11* 遺伝子は様々ながんにおいて機能獲得型変異や過剰発現が報告されており、がん原遺伝子とされている。さらに、CagA がチロシンリン酸化非依存的に多量体化 (CM) 配列を介して上皮細胞極性の形成・維持に必須の役割を担うセリン・スレオニンキナーゼ PAR1b/MARK2 と結合し、そのキナーゼ活性を抑制する結果、上皮細胞極性と上皮細胞間のタイトジャンクションを破壊することを明らかにした(文献)(図1右経路)。これらの研究成果から、ピロリ菌 CagA は SHP2 異常活性化と PAR1b 抑制を介して細胞をがん化に導くと考えられる。しかしながら、ピロリ菌感染者の一部にしか胃がんが発症しないこともまた事実である。

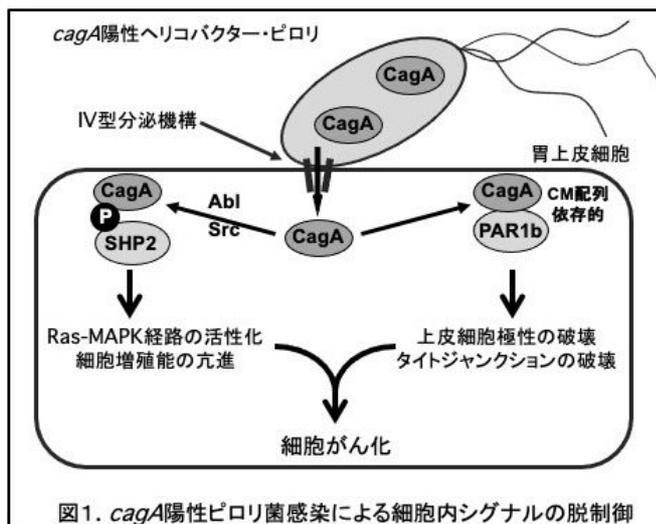


図1. *cagA*陽性ピロリ菌感染による細胞内シグナルの脱制御

申請者は研究開始当初、ヒト胃上皮由来の培養細胞を用いた実験で、CagA の発現により DNA 二本鎖切断が誘導されることを見出していた。興味深いことに、この現象は CagA のチロシンリン酸化に非依存的かつ CM 配列依存的であった。そこで、CagA の CM 配列結合タンパク質 PAR1b に着目し、siRNA を用いて PAR1b ノックダウン実験を行ったところ、CagA 発現と同様に DNA 二本鎖切断が誘導された。以上の結果から、ピロリ菌 CagA は宿主細胞内で PAR1b を抑制する結果、DNA 二本鎖切断を誘発すると考えられる。CagA 単独で DNA 二本鎖切断を誘発することは予想外の興味深い現象であり、世界で初めての知見である。

申請者は研究開始当初、ヒト胃上皮由来の培養細胞を用いた実験で、CagA の発現により DNA 二本鎖切断が誘導されることを見出していた。興味深いことに、この現象は CagA のチロシンリン酸化に非依存的かつ CM 配列依存的であった。そこで、CagA の CM 配列結合タンパク質 PAR1b に着目し、siRNA を用いて PAR1b ノックダウン実験を行ったところ、CagA 発現と同様に DNA 二本鎖切断が誘導された。以上の結果から、ピロリ菌 CagA は宿主細胞内で PAR1b を抑制する結果、DNA 二本鎖切断を誘発すると考えられる。CagA 単独で DNA 二本鎖切断を誘発することは予想外の興味深い現象であり、世界で初めての知見である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ピロリ菌 CagA は胃上皮細胞において、どのような分子機構で DNA 二本鎖切断を誘導するのかを解明することである。

ヒト胃がんの大部分において細胞周期阻害因子 p21 の欠損・減少が認められている一方で、培養細胞を用いた *in vitro* 実験系においては CagA 発現により p21 が誘導され早期細胞老化が引き起こされる(文献)。この p21 誘導は宿主細胞の発がん抑制機構と理解されている。DNA 二本鎖切断に対する細胞応答として、がん抑制因子 p53 依存的な p21 誘導が知られていることから、CagA は DNA 二本鎖切断の誘発を介して p21 を誘導する可能性が極めて高い。本研究では、細胞極性を制御する PAR1b が、DNA 損傷・修復ならびに細胞周期にも影響を与える可能性を検討する。

ピロリ菌 CagA が宿主細胞の発がん抑制機構である早期細胞老化を回避し、がん化に導くメカ

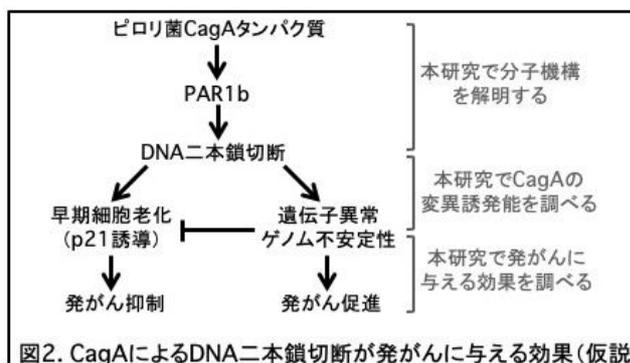


図2. CagAによるDNA二本鎖切断が発がんに与える効果(仮説)

ニズムの解明は手つかずのまま残されている。申請者は、CagA 依存的に遺伝子異常・ゲノム不安定性が誘導される結果、宿主細胞の発がん抑制機構が遮断されるという仮説を考えている(図2)。

3. 研究の方法

(1) CagA が DNA 二本鎖切断を誘導する分子機構の解明

CagA が活性酸素種(ROS)誘導を介して DNA 二本鎖切断を誘導する可能性について検討する。ピロリ菌感染実験において *cagA* 陽性ピロリ菌は *cagA* 陰性ピロリ菌に比べて ROS 誘導能が高いことが報告されている。そこで、ヒト胃上皮細胞由来の培養細胞に CagA を発現させ、ROS 検出試薬 CeIIROX により ROS 産生を調べる。

CagA が PAR1b のキナーゼ 活性を抑制する結果、DNA 二本鎖切断を誘導する可能性を検証する。

(2) PAR1b と DNA 二本鎖切断を繋ぐ分子機構の解明

PAR1b が標的とする "責任分子 X" を同定し、PAR1b と DNA 二本鎖切断をつなぐ分子機構を明らかにする。CagA-PAR1b 複合体は細胞質で形成されるのに対し、DNA 二本鎖切断は核内で生じる。そこで、DNA 二本鎖切断の制御に関与する分子のうち、細胞質と核を行き来する(シャトルする)分子に着目する。CagA 発現による細胞内局在変化を免疫染色により調べる。また、siRNA を用いて PAR1b ノックダウン実験を行い、細胞内局在変化を調べる。さらに、同定した "責任分子 X" と PAR1b の関係性を調べる。

4. 研究成果

(1) CagA による DNA 二本鎖切断の誘導に ROS は関与しない

ヒト胃上皮細胞由来の培養細胞に CagA を発現させ、ROS 検出試薬 CeIIROX により ROS 産生を調べたが、CagA 発現細胞での ROS 誘導は認められなかった。また、抗酸化剤処理によっても CagA 依存的な DNA 二本鎖切断の誘導は抑制されなかった。以上の結果から、ROS の関与は否定された。

(2) CagA は PAR1b のキナーゼ活性の抑制を介して DNA 二本鎖切断を誘導する

PAR1b のキナーゼ活性の関与を調べる目的で、ヒト胃上皮細胞由来の培養細胞を用いて CagA と PAR1b の共発現実験を行った。その結果、CagA によって引き起こされる DNA 二本鎖切断は、野生型 PAR1b の共発現によって阻止されたが、キナーゼ活性を持たない変異型 PAR1b は効果がなかった。以上の結果から、CagA は PAR1b のキナーゼ活性の抑制を介して宿主細胞に DNA 二本鎖切断を誘導することが明らかになった。

(3) CagA は PAR1b 抑制を介して BRCA1 の核移行を阻害する(図3)

DSB 制御に関わる分子群のうち細胞質と核の間を行き来する分子に着目し、CagA 発現細胞で細胞局在異常を示す分子を探索した。その結果、CagA 発現細胞では核内 BRCA1 が減少していた。同様に、PAR1b ノックダウン細胞でも核内 BRCA1 が減少していた。BRCA1 遺伝子は遺伝性乳癌・卵巣癌の原因となる癌抑制遺伝子であり、不活化変異によるゲノム不安定性の誘導が発癌に大きく関与する。BRCA1 は DNA 複製フォークを保護する役割を持つが、CagA 陽性細胞では DNA 複製フォークが不安定化され DNA 二本鎖切断が誘導された。

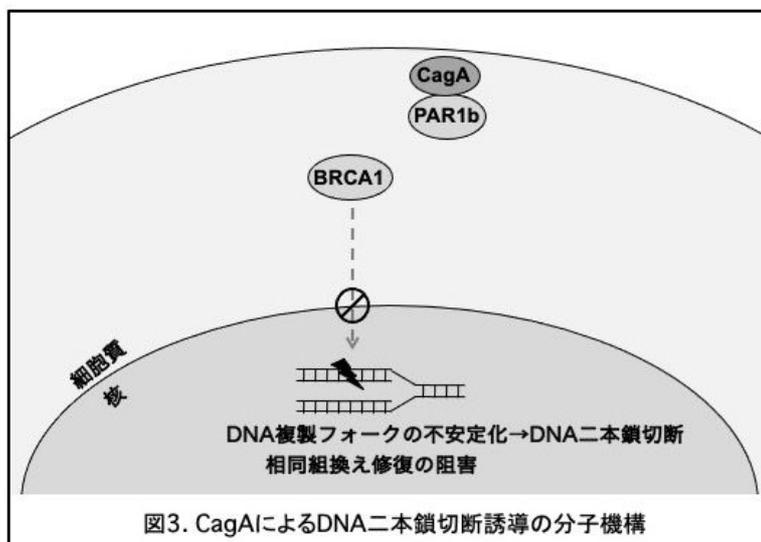
生じた DNA 二本鎖切断は、主として相同組換えまたは非相同末端結合によって修復される。このうち、相同組換えは遺伝子変異を伴わない修復であるが、非相同末端結合は変異誘発性(error-prone)の修復経路である。BRCA1 は相同組換えに必須の役割を担うことから、CagA による BRCA1 核移行阻害が相同組換えを抑制した。その結果、DNA 二本鎖切断が非相同末端結合によって修復され、遺伝子変異の異常な蓄積(ゲノム不安定性)が誘導されると考えられる。

(4) PAR1b は BRCA1 のセリン残基(S616)をリン酸化する

PAR1b はセリン・スレオニンキナーゼであることから、BRCA1 が PAR1b によってリン酸化される可能性を検討した。リン酸化データベース PhosphoSitePlus を利用し、BRCA1 のセリン・スレオニンのリン酸化報告数を調べた。その結果、T509 が最も多く、次いで S616/S617 であった。そこで合成ペプチドを用いて in vitro リン酸化試験を行ったところ、PAR1b によって BRCA1 の S616 がリン酸化されることが明らかになった。そこで、S616 リン酸化 BRCA1 特異的抗体を作製し、PAR1b ノックダウン細胞では S616 リン酸化が低下することを示した。

(5) BRCA1 の S616 リン酸化は PAR1b の核移行に必須である(図3)

BRCA1 の S616 リン酸化と BRCA1 の細胞内局在の関係性を調べるため、野生型の BRCA1 発現ベクターに加えて、リン酸化抵抗性のアラニン置換体 BRCA1(S616A)およびリン酸化模倣性のアスパラギン酸(S616D)の発現ベクターを作製した。免疫染色の結果、野生型およびリン酸化模倣性の S616D は主として細胞核に局在したが、リン酸化抵抗性の S616A は細胞質に局在した。よって、BRCA1 の核移行には S616 リン酸化が必須であると考えられる。



<引用文献>

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. Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*105(3): 1003-8 (2008)

Higashi, H., Tsutsumi, R., Muto, S., Sugiyama, T., Azuma, T., Asaka, M. and Hatakeyama, M. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science* 295: 683-6 (2002)

Saadat, I., Higashi, H., Obuse, C., Umeda, M., Murata-Kamiya, N., Saito, Y., Lu, H., Ohnishi, N., Azuma, T., Suzuki, A., Ohno, S. and Hatakeyama, M. *Helicobacter pylori* CagA targets PAR-1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. *Nature* 447: 330-3 (2007)

Saito, Y., Murata-Kamiya, N., Hirayama, T., Ohba, Y., Hatakeyama, M. Conversion of *Helicobacter pylori* CagA from senescence inducer to oncogenic driver through polarity-dependent regulation of p21. *J. Exp. Med.* 207(10): 2157-2174 (2010)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Imai S, Ooki T, Murata-Kamiya N, Komura D, Tahmina K, Wu W, Takahashi-Kanemitsu A, Knight CT, Kunita A, Suzuki N, Del Valle AA, Tsuboi M, Hata M, Hayakawa Y, Ohnishi N, Ueda K, Fukayama M, Ushiku T, Ishikawa S, Hatakeyama M.	4. 巻 29
2. 論文標題 Helicobacter pylori CagA elicits BRCAness to induce genome instability that may underlie bacterial gastric carcinogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Host & Microbe	6. 最初と最後の頁 941-958
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chom.2021.04.006.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shrestha R, Murata-Kamiya N, Imai S, Yamamoto M, Tsukamoto T, Nomura S, Hatakeyama M	4. 巻 23
2. 論文標題 Mouse gastric epithelial cells resist CagA delivery by the Helicobacter pylori Type IV secretion system	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Science	6. 最初と最後の頁 2492
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23052492.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yumiko Fujii, Naoko Murata-Kamiya, Masanori Hatakeyama	4. 巻 111
2. 論文標題 Helicobacter pylori CagA oncoprotein interacts with SHIP2 to increase its delivery into gastric epithelial cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1596-1606
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14391	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ooki Takuya, Murata-Kamiya Naoko, Takahashi-Kanemitsu Atsushi, Wu Weida, Hatakeyama Masanori	4. 巻 49
2. 論文標題 High-Molecular-Weight Hyaluronan Is a Hippo Pathway Ligand Directing Cell Density-Dependent Growth Inhibition via PAR1b	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 590 ~ 604.e9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.devcel.2019.04.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 紙谷尚子、畠山昌則
2. 発表標題 ピロリ菌CagAはゲノム不安定性を介して胃がん発症を促す
3. 学会等名 日本ヘリコバクター学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Naoko Kamiya, Massanori Hatakeyama
2. 発表標題 The Helicobacter pylori CagA oncoprotein drives Hit-and-Run carcinogenesis by inducing genomic instability
3. 学会等名 第78回 日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 紙谷尚子、畠山昌則
2. 発表標題 胃がん発症におけるピロリ菌がんタンパク質CagA の役割
3. 学会等名 第57回 日本癌治療学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------