

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590725

研究課題名(和文) ピロリ菌病原因子による宿主細胞エンドサイトーシス阻害から胃疾患誘導への機序解明

研究課題名(英文) Functional analysis of *H. pylori* virulence factors for gastric disease induction through its endocytosis inhibition

研究代表者

赤田 純子 (AKADA JUNKO)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30346548

研究成果の概要(和文)：胃疾患を引き起こすピロリ菌が宿主胃内環境に適応する上で、主要な病原因子である高活性型 VacA と CagA の両方を保有することが有利であると疫学的に示唆されているが、両病原因子の機能的関連は不明である。我々は、CagA がピノサイトーシス経路を特異的に阻害して、VacA の細胞毒性を抑制することを報告する。この結果は、ピロリ菌は VacA を分泌して遠方の細胞を傷害する一方で、菌体が接着している細胞には CagA を注入して VacA 毒素から細胞を守り、局所的な生育場所を確保していることを示唆する。この機構によってピロリ菌は、傷害と保護のバランスを取り持続感染を可能にしているのかもしれない。

研究成果の概要(英文)：*Helicobacter pylori* is a common pathogen that causes chronic gastritis and gastric cancer. Epidemiologic evidence suggests that *H. pylori* with both highly active vacuolating cytotoxin A (VacA) and cytotoxin-associated gene A (CagA), the major virulence factors, have an advantage in adapting to the host environment. However, the mechanistic relationship between VacA and CagA remains obscure. We report that CagA suppresses pinocytic endocytosis and the cytotoxicity of VacA in gastric epithelial cells. Our data suggest that *H. pylori* secretes VacA to attack distant host cells while injecting CagA into the gastric epithelial cells to which the bacteria are directly attached, thereby protecting these attached host cells from the cytotoxicity of VacA and creating a local ecological niche. This mechanism may allow *H. pylori* to balance damage to one population of host cells with the preservation of another, allowing for persistent infection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：胃歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：上部消化管学（胃）、ピロリ菌

1. 研究開始当初の背景

胃ガン発症率が世界で最も高い我が国において、原因究明と克服は医学の重要課題である。ピロリ菌は、胃粘膜に定着して世界人口の半数以上に生涯持続感染し、胃炎、胃潰瘍、さらに胃癌を誘発することが証明された唯一の病原細菌である。ピロリ菌の除菌療法は有効な対処法と期待されるが、除菌対象者および治療時期が限定できないことや耐性菌の出現が、世界的に感染率の高い現状と併せて大きな問題となっており、新たな治療戦略の開発にはピロリ菌による発癌機構解明が急務である。我々はこれまでに酵母遺伝子破壊株シリーズを用いた CagA の新規機能スクリーニングに始まり、CagA 発現させた胃上皮細胞では特異的にエンドサイトーシスが阻害されていることを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

CagA によるエンドサイトーシス阻害という全く新しい視点に基づき、ピロリ菌による発癌機構を解明する。

3. 研究の方法

2 種類のピロリ菌（日本株 CPY2052 株および西洋標準株 NCTC11657 株）の、*cagA* 遺伝子欠損株、*vacA* 遺伝子欠損株、両遺伝子欠損株を作成した。菌は胃上皮系細胞に感染させ、時間を追って VacA の蛍光免疫染色を行った。CagA の存在する感染と存在しない感染を比較して、感染細胞における VacA の細胞内局在を観察した。また、CagA 発現細胞および野生株または上記遺伝子欠損株の感染細胞を用い、VacA の細胞膜受容体である RPTP \cdot 、および細胞増殖に重要な役割を果たす EGF 受容体のエンドサイトーシスを免疫染色およびウェスタン解析にてモニターした。

4. 研究成果

CagA 発現細胞では、クラスリン依存性エンドサイトーシスのプローブであるトランスフェリンのエンドサイトーシスには影響はないにもかかわらず、コレラトキシン B、デキストランの取り込みが低下していた。このことから、CagA はこれらのタンパク質がエン

ドサイトーシスされる時の共通経路であるピノサイトーシス経路を、特異的に阻害していると考えられた。VacA はすでにピノサイトーシス経路で細胞に取り込まれるとの報告があったので、CagA 発現細胞に精製 VacA を添加して観察したところ、VacA の細胞付着に影響はないが、VacA の細胞内取り込みは著しく低下していることが判明した。この現象は、CagA を菌体により注入させた感染細胞でも同様であった。さらに VacA の取り込みに続いて起こる細胞障害も、CagA の存在する感染系では CagA なし感染系と比較して抑制されていた。

続いて、VacA のエンドサイトーシスを阻害する機構を明らかにするために、VacA 受容体 RPTP \cdot の恒常的エンドサイトーシスを特異抗体により追跡した。CagA 発現細胞では RPTP \cdot は細胞膜に留まりやすく、エンドサイトーシスがゆっくりになっていた。EGF 受容体でも同様の現象が認められた。このことから、CagA はさまざまな細胞膜蛋白のエンドサイトーシスに影響を与えて、胃疾患誘導に関与する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 1 件）

① Junko K. Akada, Hiroki Aoki, Yuji Torigoe, Takao Kitagawa, Hisao Kurazono, Hisashi Hoshida, Jun Nishikawa, Suji Terai, Masunori Matsuzaki, Toshiya Hirayama, Teruko Nakazawa, Rinji Akada, and Kazuyuki Nakamura. *Helicobacter pylori* CagA Inhibits Endocytosis of Cytotoxin VacA in Host Cells. *Disease Models & Mechanisms* 3: 605-617, 2010.

〔学会発表〕（計 9 件）

① Junko K. Akada, Hiroki Aoki, Toshiya Hirayama, Teruko Nakazawa, Rinji Akada, Kazuyuki Nakamura. *Helicobacter pylori* CagA Inhibits Endocytosis of Cytotoxin VacA in Host Cells. The American Society

for Cell Biology (ASCB) 50th Annual Meeting December 11-15, 2010, Pennsylvania Convention Center, Philadelphia, PA, U.S.A.

② Junko K. Akada, Hiroki Aoki, Toshiya Hirayama, Teruko Nakazawa, Rinji Akada, Kazuyuki Nakamura. *Helicobacter pylori* CagA Inhibits Endocytosis of Cytotoxin VacA in Host Cells. The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity, September 7-10, 2010, Awajishima Yumebutai International Conference Center, Hyogo, Japan

③ 赤田純子、中澤晶子、平山壽哉、中村和行 ピロリ菌 CagA は細胞膜 VacA 受容体 RPTR・のエンドサイトーシスを阻害する。第 83 回日本細菌学会総会、2010 年 3 月 27-29 日、パシフィコ横浜国際会議場、横浜。

④ Junko K. Akada, Hiroki Aoki, Hisao Kurazono, Toshiya Hirayama, Teruko Nakazawa Kazuyuki Nakamura. *Helicobacter pylori* CagA inhibit VacA endocytosis and vacuolation during infection. 15th International Workshop on Campylobacter, Helicobacter, and Related organisms (CHRO2009), September 2-5, 2009, Toki-Messe, Niigata, Japan.

⑤ 赤田純子、中澤晶子、平山壽哉、中村和行 CagA による細胞膜 VacA 受容体 RPTP・のエンドサイトーシス阻害。第 15 回日本ヘリコバクター学会学術集会、2009 年 6 月 25-26 日、東京ステーションコンファレンス、東京

⑥ 赤田純子、倉園久生、平山壽哉、中澤晶子、中村和行 *Helicobacter pylori* CagA inhibits VacA endocytosis during infection. 第 82 回日本細菌学会総会、2009 年 3 月 12-14 日、名古屋市国際会議場、名古屋

⑦ 赤田純子、青木浩樹、平山壽哉、中村和行 ピロリ菌病原エフェクター蛋白質 CagA は宿主細胞において細胞空胞化毒素 VacA のエンドサイトーシスと細胞障害を低減する。BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会) 2008 年 12 月 9-12 日 神戸ポートアイランド、神戸。

⑧ Junko K. Akada, Hiroki Aoki, Teruko Nakazawa, Rinji Akada and Kazuyuki Nakamura. *Helicobacter pylori* CagA inhibits

endocytosis in yeast and gastric epithelial cells. 8th International Workshop on Pathogenesis and Host Response in *Helicobacter* Infections LO-skolen, Helsingor, Denmark, July 2-5, 2008

⑨ 赤田純子、西川潤、中澤晶子、平山壽哉、中村和行 培養細胞感染系において CagA は VacA の細胞空胞化を抑制する。第 14 回日本ヘリコバクター学会 2008 年 6 月 26-28 日 神戸、神戸ポートピアホテル

〔図書〕 (計 1 件)

赤田純子 「微生物増殖学の現在・未来」福井作蔵・秦野琢之編 第 11 章 11-3 医学系の計数培養 pp306-310 (2008) 地人書館 東京

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：自己抗体の検出方法
発明者：赤田純子、中村和行、蔵満保宏
権利者：山口大学
種類：特許
番号：特願 2010-188841
出願年月日：平成 22 年 8 月 25 日
国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤田 純子 (AKADA JUNKO)
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：30346548

(2)研究分担者

青木 浩樹 (AOKI HIROKI)
久留米大学・循環器研究所・准教授
研究者番号：60322244

中村 和行 (NAKAMURA KAZUYUKI)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：90107748

西川 潤 (NISHIKAWA JUN)
山口大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：00379950

(3)連携研究者

なし