

令和元年5月20日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08349

研究課題名（和文）胃発がんリスク亢進に繋がるピロリ菌感染宿主細胞の分子特性解析

研究課題名（英文）Molecular characterization of *H. pylori*-infected cells associated with the development of gastric cancer

研究代表者

津川 仁（Tsugawa, Hitoshi）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：30468483

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：*H. pylori*感染胃粘膜において、酸化ストレス依存的に発生するCAPZA1過剰発現細胞は、オートファジー発現不全細胞であり、*H. pylori*感染を受ける事で癌蛋白質CagA蓄積を介してCD44v9発現癌幹細胞へと進展することが明らかとなった。これらの結果から、CAPZA1発現とその機能制御論の構築により、*H. pylori*感染胃粘膜における癌幹細胞発生予防論の開発に繋がると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではオートファジー制御分子としてCAPZA1を同定し、CAPZA1の新規機能を明示した。今後の研究展開により、これまで隠されていたCAPZA1の本性が次々と明らかにされると期待できる。*H. pylori*感染者の中でも、胃癌発症者は4%であり、また、除菌後でも胃癌を発症する患者が存在する。これらの患者がなぜ胃癌発症者として選択されるのか明らかではなかった。本研究成果は、*H. pylori*感染者の中でもCAPZA1発現レベルの高い患者ほど胃発がんリスクが高まる事を示唆しており、今後、より制度の高い胃発がんリスク検診の開発に向けた応用研究が期待される。

研究成果の概要（英文）：*Helicobacter pylori*-derived CagA plays a role as an oncogenic driver in gastric epithelial cells. However, upon delivery into gastric epithelial cells, CagA is usually degraded by autophagy. We report that enhancement of lysosome associated membrane protein 1 (LAMP1) expression is necessary for autophagolysosome formation. In contrast, CAPZA1 inhibits the LAMP1 expression in the nuclei. Thus, in CAPZA1-overexpressing gastric epithelial cells infected with *H. pylori*, autophagolysosome formation is inhibited and CagA escapes autophagic degradation. These findings identify CAPZA1 as a novel negative regulator of autophagolysosome formation and suggest that deregulation of CAPZA1 expression leads to increased risk of gastric carcinogenesis. Our findings demonstrate that regulation of autophagy by CAPZA1 could be a central mechanisms to account for the effects of CagA on gastric carcinogenesis, and represent new insight for understanding and manipulating the development of gastric cancer.

研究分野：分子細菌学

キーワード：癌幹細胞 オートファジー 胃癌 ピロリ菌 CAPZA1 CD44

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦は、毎年約5万人が胃癌で死亡する胃癌多発国である。胃癌発症の決定的なリスクファクターは *H. pylori* 感染である。*H. pylori* のエフェクター分子 CagA が宿主細胞内で産生され、機能することから、*H. pylori* 感染に伴う胃癌発症に CagA が強く関与することが明らかとされている。一方、本邦における *H. pylori* 感染者は6,000万人とされるが、そのうち、胃癌発症者は一部であることから、感染に伴う胃癌発症プロセスには未知なる「発癌制御システム」の存在が指摘されている。研究代表者らは、CagA が装填された宿主細胞は、通常、autophagy により CagA を分解し、細胞内での CagA の長期的な安定化を許していないことを明らかとしてきた (Tsugawa H., et al., *Cell Host Microbe*, 12:764, 2012)。つまり、宿主細胞の CagA 分解性 autophagy 発現能は、「発癌制御システム」として *H. pylori* 感染に伴う胃癌発症プロセスを抑制的に制御し、一方で、autophagy 発現不全細胞は、CagA 蓄積により癌化する「発癌ポテンシャル細胞」となり、*H. pylori* 感染者において、その存在が胃癌発症に強く関与すると考えられていた。CagA 分解性 autophagy は、*H. pylori* の分泌毒素 VacA が宿主細胞膜上の Low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP1) へ結合することで発現する。研究代表者は、autophagy 発現時に、LRP1 は細胞膜上で processing を受け intracellular domain (LRP1-ICD) が核内移行し、LAMP1 発現を転写レベルで誘導することを見出していた。一方、核内移行した LRP1-ICD には、F-actin-capping protein subunit alpha-1 (CAPZA1) が結合し、LRP1-ICD による過剰な LAMP1 発現亢進を抑制することも確認していた。そのため、CAPZA1 過剰発現細胞への *H. pylori* 感染では、LAMP1 発現が誘導されず、autophagy 発現不全となり、CagA が蓄積することも確認されていた。これらの知見から、CAPZA1 は autophagy の negative regulator として機能し、CAPZA1 過剰発現細胞が、*H. pylori* 感染者において胃癌発症に強く関与する「発癌ポテンシャル細胞」であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究課題では、CAPZA1 が制御する autophagy 発現を明確化し、また、autophagy 発現不全細胞の要因となる CAPZA1 の発現制御機構を解析し、CAPZA1 過剰発現細胞への *H. pylori* 感染がどのように「発癌ポテンシャル細胞」として胃癌発症に関与するかを明確化する。これらの知見から、胃癌発症リスクを高める宿主細胞特性を明らかとし、*H. pylori* 感染者から胃癌発症者へセレクトされる理由を分子レベルで提示する。

3. 研究の方法

(1) autophagy 発現に対する CAPZA1 の役割

H. pylori 感染細胞では、核内移行した LRP1-ICD が、LAMP1 の転写因子として機能し、*Irf1* 遺伝子ノックダウンにより autophagy 発現は抑制される。そこで、LAMP1 発現亢進が、autophagosome-lysosome 融合を促進させる要因となっているかを Tet-on-EGFP-LC3-mCherry 発現誘導細胞を用いた autophagic flux assay で明らかにする。さらに CAPZA1 過剰発現細胞 (pCMV6-AC::CapZA1) における autophagosome-lysosome 形成変化を LysoTracker 染色で評価するとともに、CagA の蓄積性と合わせて評価する。

(2) CAPZA1 過剰発現を誘導する因子

CAPZA1 過剰発現細胞は、CagA 分解性 autophagy の Negative regulator であることから、CAPZA1 過剰発現細胞の存在は、胃癌発症リスクの亢進に繋がると考えられる。そこで、*H. pylori* 感染動物モデルを用いて、*H. pylori* 感染に伴う CAPZA1 発現変化を組織免疫染色及び western blotting により解析する。さらに、CAPZA1 発現制御機構の解明を目的に、CAPZA1 発現に対するエピジェネティック制御機構について、パイサルファイトシークエンス解析による promoter 領域のメチル化解析ならびに ChIP 解析によるアセチル化解析を実施し、CAPZA1 発現に対するエピジェネティック制御機構の関与の有無を明らかにする。さらに、*H. pylori* が感染した宿主胃粘膜上皮では、多形核白血球の遊走により過剰な酸化ストレス刺激に暴露されることから、このような酸化ストレス刺激が CAPZA1 発現の誘導に繋がるかについても in vivo 及び in vitro 解析の両者から評価する。

(3) CAPZA1 過剰発現細胞における CD44v9 発現誘導機構の解析

研究代表者らの予備検討により、CAPZA1 過剰発現細胞への *H. pylori* 感染により癌幹細胞マーカー蛋白質である CD44v9 の発現が誘導されることを確認していた。そこで、CAPZA1 過剰発現細胞での CD44v9 発現誘導機構を以下の分子に注目して解析し、CD44v9 陽性細胞の誕生に関わる分子シグナルを明らかとする。CD44 は、APC/ β -catenin pathway のターゲット遺伝子のひとつであり、また、CagA は β -catenin の核内蓄積を誘導し、 β -catenin シグナルを亢進させる。さらに、CD44v9 のスプライシングバリエーションは epithelial splicing regulatory protein 1 (ESRP1) によって構築される。従って、「CAPZA1 過剰発現細胞では β -catenin 及び ESRP1 発現が亢進しており、そこへ CagA が蓄積することで β -catenin シグナルの異常活性化が誘発され CD44v9 発

現が惹起される」と推察されるため、CAPZA1 強制発現細胞 (pCMV6-AC::CapZA1) を用いて、CAPZA1 発現亢進が β -catenin 並びに ESRP1 発現を誘導するかを明らかとする。次に、CagA 蓄積が β -catenin シグナルの異常活性化を介して CD44 発現を誘導するかを、MKN28 細胞を用いて構築した CagA 発現誘導システム (tet-off-CagA expression system) 及び *cagA* 欠損 *H. pylori* 菌株を用いて明らかとする。これらが明らかとなった場合には、CAPZA1 強制発現細胞 (pCMV6-AC::CapZA1) への *H. pylori* 感染モデルを用いて、CAPZA1 過剰発現細胞では、*H. pylori* 感染により蓄積された CagA が β -catenin シグナルの異常活性化を誘導し、CD44v9 発現誘導に至るかを明らかにする。

4. 研究成果

Autophagic flux assay 解析により、*H. pylori* 感染宿主細胞で、LRP1-ICD によって発現誘導された LAMP1 は、autophagosome 並びに autophagolysosome の両者と共局在しており、*lamp1* 遺伝子ノックダウンによって autophagolysosome 形成が顕著に低下したことから、*H. pylori* 感染宿主細胞では LRP1-ICD 依存的な LAMP1 発現亢進により autophagolysosome 形成が促進されることで autophagy 発現を完結すると考えられた。また、興味深い事に、この現象は、LAMP2 では認められなかったことから、*H. pylori* 感染細胞の autophagy は LAMP1 依存的に制御されているものと考えられた。核内で LRP-ICD と結合する事で LAMP1 発現を抑制し、autophagy 発現を制御する CAPZA1 の過剰発現細胞への *H. pylori* 感染では、LC3- 発現は抑制されないが、autophagolysosome 形成が顕著に低下する結果、CagA の蓄積を招いていることが示された。即ち、CAPZA1 過剰発現細胞は、autophagolysosome 形成不全細胞であることが明らかとなった。CagA 蓄積性を示す CAPZA1 過剰発現細胞は、ヒト胃癌組織内においても検出され、実際に、CagA を蓄積させた状態の CAPZA1 過剰発現細胞も検出された。これらの結果から、CAPZA1 過剰発現細胞の存在は、*H. pylori* 感染者の中で胃癌リスクを規定する重要な「発癌ポテンシャル細胞」であると考えられた。

H. pylori 感染胃粘膜では、CAPZA1 発現が有意に亢進することが明らかとなり、CAPZA1 発現の亢進は、酸化ストレスマーカー (lipid peroxidation) の亢進と有意な相関性を示すと同時に、AGS 細胞への H_2O_2 並びに Di-*tert*-butyl peroxide 処理は CAPZA1 発現を顕著に誘導し、抗酸化薬 (NAC) 処理によって CAPZA1 発現誘導はキャンセルされることが示された。さらに、*H. pylori* 感染胃粘膜における CAPZA1 過剰発現細胞と 8-OHdG 染色が共局在することも明らかとなり、CAPZA1 発現は、*H. pylori* 感染に伴う酸化ストレス刺激によって惹起される事が明らかとなった。実際に、*H. pylori* 感染患者のみならず除菌後の患者においても、炎症細胞浸潤が顕著に残っている患者では CAPZA1 発現が亢進した状態の胃粘膜であることが組織免疫染色によって明らかとなった。CAPZA1 発現制御機構の解明目的で注目したエピジェネティック解析の結果から、CAPZA1 promoter 領域には CpG island が存在することが確認されたが、これらのメチル化は誘導されていない。一方、ChIP assay の結果から、CAPZA1 発現はアセチル化によって制御されていることが明らかとなり、HDAC 阻害薬は CAPZA1 発現を顕著に誘導した。さらに、酸化ストレス刺激によっても CAPZA1 promoter 領域のアセチル化が亢進することが明らかとなり、*H. pylori* 感染胃粘膜で惹起される酸化ストレスは、アセチル化の誘導を介して CAPZA1 発現を亢進させることが明らかとなった。

CD44v9 陽性癌幹細胞は、オートファジー発現不全であり *H. pylori* 由来癌蛋白質 CagA を蓄積させることで胃癌の発生に強く寄与し、同時に、胃癌の再発にも関与することを報告してきたが、CD44v9 陽性細胞がどの様に誕生するのかは明らかではなかった。本研究により、CAPZA1 過剰発現細胞への *H. pylori* 感染に伴う CagA の蓄積が、CD44v9 発現を惹起することを明確にした。CAPZA1 過剰発現細胞は、CD44v9 のスプライシングバリエーションを誘導する ESRP1 発現が顕著に亢進していると同時に、 β -catenin の高発現も示した。そこへ、*H. pylori* の感染に伴う CagA の蓄積により β -catenin の核内移行が増進されることで、CD44v9 発現の亢進に至る事が明らかとなった。この時、ESRP1 遺伝子をノックダウンすることで CD44v9 発現誘導を抑制することができたため、CAPZA1 過剰発現細胞における ESRP1 発現の亢進は CD44v9 誘導に重要であることが示された。さらに、CAPZA1 過剰発現細胞では、*H. pylori* 感染を受けることで SALL4 及び KLF5 のリプログラミング因子の発現も顕著に増強される事が明らかとなり、CAPZA1 過剰発現細胞は、*H. pylori* 感染により幹細胞特性を獲得しやすい状況にあることも明らかとなった。また、*H. pylori* 感染動物実験の結果から、*H. pylori* 感染に伴う酸化ストレス刺激によって誘導された CAPZA1 過剰発現細胞が CD44v9 陽性細胞となっていることを確認した。さらに、ヒト胃癌組織検体を用いた解析により、胃癌部では、CAPZA1 の過剰発現と CD44v9 発現が共局在することも明らかとなった。つまり、*H. pylori* 感染胃粘膜における CAPZA1 過剰発現細胞は、CD44v9 陽性癌幹細胞の前駆細胞として機能し、*H. pylori* 感染者における胃癌リスクを亢進させる極めて重要な宿主細胞特性であることが明らかとなった。

本研究では *H. pylori* 感染宿主細胞でオートファジー制御分子として機能する CAPZA1 の新規

機能を明示した。今後の研究展開により、これまで明らかにされてこなかった CAPZA1 の新規機能とその病態への関与が次々と明らかにされると期待できる。*H. pylori* 感染者の中でも、胃癌発症者は4%であり、また、除菌後でも胃癌を発症する患者が存在する。これらの患者がなぜ胃癌発症者として選択されるのか明らかではなかった。本研究成果は、*H. pylori* 感染者の中でも CAPZA1 発現レベルの高い患者ほど胃癌リスクが高まる事を示しており、本研究成果を基盤に、今後、より制度の高い胃癌リスク検診の開発に向けた応用研究が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 13 件)

1. **Tsugawa H**, Kato C, Mori H, Matsuzaki J, Kameyama K, Saya H, Hatakeyama M, Suematsu M, Suzuki H. Cancer stem-cell marker CD44v9-positive cells arise from Helicobacter pylori-infected CAPZA1-overexpressing cells. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.*, *in press*. 査読有
2. Matsuzaki J*, **Tsugawa H***, Kashiwazaki Y, Mori H, Yamamoto Y, Kameyama H, Masaoka T, Kanai T, Suzuki H. Neutrophil-activating protein polymorphism of Helicobacter pylori determines the host risk of dyspepsia. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.*, *in press*. *Contributed equally to this work. 査読有
3. **津川仁**. マイクロバイオータと *H. pylori* 感染. *日本ヘリコバクター学会誌*, 20(2): 112-117, 2019. http://www.jshr.jp/journal/backnumber_vol20-2.html 査読無
4. **Tsugawa H**, Suzuki H. Gastric Carcinogenesis. In: Shiotani A. (eds) Gastric Cancer. Springer, pp 51-62, 2019. <https://www.springer.com/la/book/9789811311192> 査読無
5. **Tsugawa H**, Mori H, Matsuzaki J, Sato A, Saito Y, Imoto M, Suematsu M, Suzuki H. CAPZA1 determines the risk of gastric carcinogenesis by inhibiting Helicobacter pylori CagA-degraded autophagy. *Autophagy*, 15:2, 242-258, 2019. doi: 10.1080/15548627.2018.1515530. 査読有
6. Miyoshi S, **Tsugawa H**, Matsuzaki J, Hirata K, Mori H, Saya H, Kanai T, Suzuki H. Inhibiting xCT Improves 5-Fluorouracil Resistance of Gastric Cancer Induced by CD44 Variant 9 Expression. *Anticancer Res.*, 38:6163-6170, 2018. doi: 10.21873/anticancer.12969. 査読有
7. **津川仁**, 鈴木秀和. 新興・再興感染症[4] *H. pylori* 感染症を制御する病原因子と宿主細胞応答. *日本防菌防黴学会誌*, 46, pp. 27-32, 2018. http://www.saaaj.jp/magazine/abstract/magazine_4601abstract04.html 査読無
8. Fukuhara S, Masaoka T, Nishimura S, Nakamura M, Matsuzaki J, **Tsugawa H**, Miyoshi S, Mori H, Kawase S, Shibata S, Okano H, Kanai T, Suzuki H. Enteric Glial Dysfunction Evoked by Apolipoprotein E Deficiency Contributes to Delayed Gastric Emptying. *Dig. Dis. Sci.*, 62(12): 3359-3369, 2017. doi: 10.1007/s10620-017-4820-7. 査読有
9. Pati ML, Groza D, Riganti C, Kopecka J, Niso M, Berardi F, Hager S, Heffeter P, Hirai M, **Tsugawa H**, Kabe Y, Suematsu M, Abate C. Sigma-2 receptor and progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) are two different proteins: Proofs by fluorescent labeling and binding of sigma-2 receptor ligands to PGRMC1. *Pharmacol. Res.*, 117: 67-74, 2017. doi: 10.1016/j.phrs.2016.12.023. 査読有
10. **Tsugawa H**, Suzuki H. Autophagy., Helicobacter pylori, Springer Book pp67-71, 2016. <https://www.springer.com/jp/book/9784431557043> 査読無
11. Kabe Y, Yamamoto T, Kajimura M, Sugiura Y, Koike I, Ohmura M, Nakamura T, Tokumoto Y, **Tsugawa H**, Handa H, Kobayashi T, Suematsu M. Cystathionine γ -synthase and PGRMC1 as CO sensors. *Free Radic. Biol. Med.*, 99:333-344, 2016. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.08.025. 査読有
12. Mori H, Suzuki H, Matsuzaki J, **Tsugawa H**, Fukuhara S, Miyoshi S, Hirata K, Seino T, Matsushita M, Nishizawa T, Masaoka T, Kanai T. Rifabutin-based 10-day and 14-day triple therapy as a third-line and fourth-line regimen for Helicobacter pylori eradication: A pilot study. *United European Gastroenterol. J.*, 4(3): 380-387, 2016. doi: 10.1177/2050640615618043. 査読有
13. Mori H, Suzuki H, Matsuzaki J, **Tsugawa H**, Fukuhara S, Miyoshi S, Hirata K, Seino T, Matsushita M, Masaoka T, Kanai T. Efficacy of 10-day Sitafloxacin-containing third-line rescue therapies for Helicobacter pylori strains containing the gyrA mutation. *Helicobacter*, 21(4): 286-294, 2016. doi: 10.1111/hel.12286. 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

1. **津川仁**、金井彩香、杉浦悠毅、鈴木秀和、末松誠、加部泰明. Role of host innate immunity regulated by microbiota for protection against Salmonella infection. 第 92 回日本細菌学会総会, 2019 年
2. **Tsugawa H**, Matsuzaki J, Kato C, Mori H, Suematsu M, Suzuki H. Overexpression of CAPZA1, a novel negative regulator of autophagy, develops CD44v9-expressing cancer stem-like cells in Helicobacter pylori-infected gastric mucosa. XXXIst International Workshop on Helicobacter & Microbiota in Inflammation & Cancer, 2018. (Poster Session)
3. **Tsugawa H**. Mechanisms of CD44v9-positive cancer stem cell development in H. pylori-infected gastric mucosa. The 17th Awaji International Forum on Infection and Immunity, S4. Bacteria, 2018. (Invited Speaker)
4. **津川仁**、加藤智尋、森英毅、松崎潤太郎、佐藤聡、斉藤義正、末松誠、鈴木秀和. 宿主細胞内へ装填されたピロリ菌がん蛋白質 CagA の安定性を規定する宿主細胞分子とその制御. 第 65 回トキシシンポジウム, シンポジウム指名講演, 2018 年
5. **Tsugawa H**, Kato C, Mori H, Suematsu M, Suzuki H. Association between oxidative stress and gastric carcinogenesis in H. pylori-infected patients. Summer School on Stress 2018, Free oral communications, 2018 (Invited Speaker)
6. Kato C, **Tsugawa H**, Saito Y, Suzuki H. Expression of CAPZA1, a negative regulator of CagA-degrading autophagy, is enhanced by oxidative stress-induced histone acetylation in Helicobacter pylori-infected gastric mucosa: A possible risk for gastric carcinogenesis. Digestive Disease Week 2018, Monumental Developments in Science & Medicine Esophageal, Gastric & Duodenal Disorders (EGD) Section, 2018.
7. **Tsugawa H**. Host-cell response against Helicobacter pylori-derived CagA oncoprotein. 第 91 回日本細菌学会総会/第 14 回日韓国際微生物学シンポジウム, JKISM workshop for young researchers-1, 2018. (Invited Speaker)
8. 加藤智尋、**津川仁**、斉藤義正、佐谷秀行、末松誠、鈴木秀和. 胃発がんリスク亢進に関わる CapZA1 発現誘導機構. 第 23 回日本ヘリコバクター学会 ワークショップ 2, 2017 年
9. **津川仁**. ピロリ菌感染による胃発がんリスクを高める宿主細胞特性. 第 90 回日本細菌学会総会 シンポジウム 6, 2017 年 (依頼講演)
10. **津川仁**. Oxidative stress in Helicobacter pylori infection. 日本薬学会第 136 年会, 2016 年 (依頼講演)

6. 研究組織

(1) 研究分担者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。