

令和元年6月20日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08778

研究課題名(和文)ピロリ菌VacAの宿主受容体を基盤とした病原メカニズムの解析

研究課題名(英文)Role of a VacA receptor in the Helicobacter pylori infection

研究代表者

中野 政之 (NAKANO, Masayuki)

長崎大学・熱帯医学研究所・助教

研究者番号：60398005

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：胃がんの原因菌であるHelicobacter pylori(ピロリ菌)が産生する空砲化毒素VacAのピロリ菌感染時における新たな役割についての検証を行った。その結果、VacAは宿主細胞上に存在する受容体であるRPTP α を介してシグナル伝達因子であるc-Srcをリン酸化し、その後ピロリ菌が産生する発がん因子CagAの特異的なリン酸化に関することが認められた。これらの現象は、VacAの宿主細胞内における新たな機能を示すものであると同時に、ピロリ菌が産生する病原因子の宿主細胞内における機能的な相互作用の存在を示唆するものであると考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

医療技術の進歩に関わらず、胃がんは未だに日本における重要な疾患であり続けていることから、有効な対策が求められている。ピロリ菌は日本における胃がん発症において最も重要な要因であることから、本感染症を制御することができれば日本の胃がんや関連する疾患を制御することに繋がる。本研究で得られた成果は、ピロリ菌が産生する主要な2つの病原因子(VacAとCagA)の機能的な相互作用を示すものである。つまり、どちらか一方の病原因子の機能を抑制することができれば本菌の病原性の低減に繋がることを意味するものであり、今後の研究の一層の進展が待たれる。

研究成果の概要(英文)：Helicobacter pylori is a major cause of gastroduodenal diseases including gastric cancer and produces virulence factors, VacA and CagA. In this study, we found that VacA induced c-Src phosphorylation in vitro infection condition through receptor protein tyrosine phosphatase (RPTP) α , a VacA receptor. c-Src is responsible for phosphorylation of CagA in H. pylori infection. We also found that wild-type H. pylori but not a vacA gene-disrupted mutant strain induced phosphorylation of CagA in AZ-521 cells, suggesting that VacA is required for CagA phosphorylation in H. pylori infection. These results indicate that VacA mediates CagA phosphorylation through RPTP in AZ-521 cells. Therefore, we propose that Src phosphorylation induced by VacA in H. pylori infection is mediated through RPTP and this event is resulting in activation of c-Src and then leading to CagA phosphorylation.

研究分野：細菌学

キーワード：ピロリ菌 VacA

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

1. 研究開始当初の背景

胃がんの原因菌であるピロリ菌が産生する空胞化毒素 VacA は、受容体を介して宿主細胞に多様な性状を示すことが知られている ()。すでに VacA 受容体として少なくとも3種の膜タンパク質が同定され、本菌の病原性に重要な役割を担うことが示唆されている。特に、LRP1 は VacA 依存性オートファジーの誘導に関与し、本菌により宿主細胞内に導入された発がん因子である CagA の安定性に寄与する ()。また、RPTPbeta は胃潰瘍の発症に関与することも報告されている ()。その一方で、RPTPalpha は VacA 受容体として同定されたが、ピロリ菌感染における役割や機能は不明である。

RPTPalpha は胃ガン細胞に高頻度に発現していることから、胃ガンとの関連性が指摘されており、また宿主細胞の多様な機能の制御因子である c-Src のリン酸化に関与する。ピロリ菌によって宿主細胞内に導入された CagA は宿主細胞内でリン酸化されることが発がん作用には重要であるが、興味深いことに CagA のリン酸化には c-Src が関与する ()。これらの情報を元に検証を行ったところ、VacA が c-Src のリン酸化を亢進するという初期の結果を得た。これにより、「VacA が RPTPalpha/c-Src を介する経路で CagA のリン酸化に関与し、ピロリ菌の病原性に重要な役割を担う」という仮説に至った。

2. 研究の目的

本研究では、宿主細胞内の VacA の新規機能を明らかにすることを目的とし、特に「ピロリ菌感染において、VacA が受容体である RPTPalpha を介して、CagA のリン酸化に資する因子であるのか？」ということに着目する。そこで以下に示す2点を中心に検証を進めることで VacA と CagA リン酸化との関係性を明らかにし、ピロリ菌感染における RPTPalpha を介した VacA の役割を理解する。

(1) VacA は RPTPalpha を介して CagA のリン酸化に関与するのかを明らかにする

本研究では「VacA が RPTPalpha/c-Src を介する経路で CagA のリン酸化に関与し、ピロリ菌の病原性に重要な役割を担うのではないか」という仮説の立証を目指す。特に、RPTPalpha と c-Src の2つの因子を中心に究明する。

(2) VacA による CagA リン酸化が CagA の病原性に関与するのかを明らかにする

VacA が CagA の病原性に関与するのかは不明である。そこで、本研究では CagA の細胞生物学的な作用変化を検証することで、VacA による CagA リン酸化が宿主細胞に及ぼす効果を明らかにし、同時にピロリ菌感染における役割の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 本研究ではピロリ菌感染における VacA の新規を明らかにすることを目的とし、VacA による c-Src のリン酸化の亢進や CagA リン酸化に対する VacA の作用メカニズムについて、特に VacA 受容体の関与に着目し、培養細胞を用いた in vitro での解析を行う。

(2) *cagA* 遺伝子をクローン化したプラスミドを導入した培養細胞を用いた解析などを行うことで、VacA による CagA リン酸化に対する詳細な分子機構の解明を目指す。さらに、マウスを用いた動物実験を行い、ピロリ菌感染部位である胃上皮組織などにおける VacA と CagA や c-Src のリン酸化との関連性について検討し、ピロリ菌感染における VacA の役割を多角的に究明する。

4. 研究成果

(1) はじめに、ピロリ菌より精製した VacA を十二指腸由来の培養細胞である AZ-521 細胞に投与したところ、時間依存的に c-Src のリン酸化を亢進することを認めた (Fig. 1)。また、胃がん由来の培養細胞でも確認したところ、使用する細胞種により VacA による c-Src のリン酸化への効果に差があることが認められた。

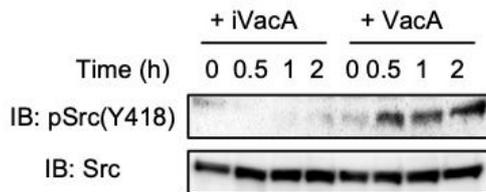


Fig. 1. VacA 存在下における c-Src のリン酸化の検出

AZ-521 細胞にピロリ菌より精製した VacA を投与し、c-Src を Western blotting により検出した。iVacA は熱失活した VacA を示す。

(2) その作用機序について検証したところ、VacA 受容体である RPTPalpa を siRNA にて発現抑制した AZ-521 細胞ではコントロール siRNA を用いた場合と比較して有意に c-Src のリン酸化が抑制されることを発見した。この現象は、精製した VacA を用いた場合のみならず、野生型ピロリ菌と *vacA* 遺伝子破壊ピロリ菌を用いた感染実験においても同様に認められた。したがって、この結果は VacA による c-Src のリン酸化が RPTPalpa 依存的な現象であることを示している。

(3) さらに、c-Src はピロリ菌の発がん因子である CagA のリン酸化に関与することから、上記の現象に対する CagA のリン酸化への影響について検証した。遺伝子破壊ピロリ菌を用いた感染実験を行い、免疫沈降法によりリン酸化された CagA 量を測定したところ、*vacA* 遺伝子破壊ピロリ菌を用いた場合では野生株と比較してリン酸化された CagA 量の顕著な減少が認められ、且つリン酸化された CagA と特異的に結合する SHP2 ホスファターゼも *vacA* 遺伝子破壊ピロリ菌では野生株と比較して顕著な減少が認められた。これらの結果は、VacA が発がん因子である CagA のリン酸化に関与することを示唆するものであり、同時にこの発見は VacA の宿主細胞内における新たな機能を示すものである。

(4) また、RPTPalpa と c-Src は細胞内において定常的に複合体を形成することが報告されている。そこで、ピロリ菌より精製した VacA を投与した AZ-521 細胞ではコントロールと比較して RPTPalpa-Src 複合体量が減少することが認められたが、他方でリン酸化 c-Src 量については VacA の有無にかかわらず大きな違いが認められないことがわかった (Fig. 2)。このことは、VacA により c-Src がリン酸化されることで、RPTPalpa との結合が解消され、細胞内に遊離するというを示唆するものであると考えており、この複合体量の減少が CagA のリン酸化に関与しているのではないかと推測している。その詳細については、現在も分析を継続している。

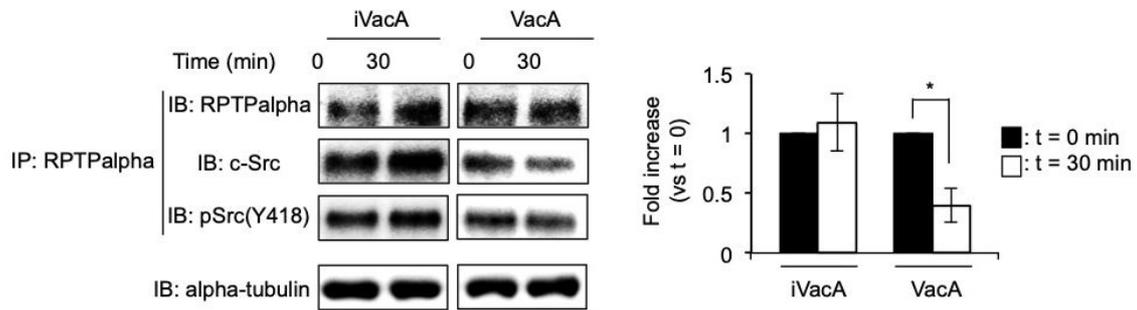


Fig.2. VacA 存在下における RPTPalph-Src 複合体への影響

AZ-521 細胞における VacA による RPTPalph-Src 複合体への影響を検証。(A) VacA 投与後、RPTPalph に対する抗体を用いた免疫沈降法にて RPTPalph-Src 複合体を回収し、その後に各種抗体を用いた Western blotting による検出をした。(B) その後、alpha-tubulin にて標準化を行った後に、c-Src のリン酸化を定量した。IP は免疫沈降法に用いた抗体の種類を表し、IB は Western blotting による分析を示す。

(5) さらに、マウスを用いた感染実験を行うことで VacA による CagA のリン酸化についての検証を行うことを試みたが、残念ながらピロリ菌がマウスの胃上皮組織に定着せず、感染実験による検証を行うことができなかった。本研究では in vitro での検証を中心に行っており、そのため動物実験などを用いた解析を行うことでピロリ菌感染における VacA と CagA の相互作用についてより詳細に解析することが必要であることから、実験動物を用いた解析は今後の検討課題となっている。

<引用文献>

Isomoto H, *et al.* Pleiotropic actions of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, VacA. The Tohoku journal of experimental medicine. Vol.220, No. 1, 2010, 3-14.

Tsugawa H, *et al.* Reactive oxygen species-induced autophagic degradation of *Helicobacter pylori* CagA is specifically suppressed in cancer stem-like cells. Cell host and microbe. Vol. 12, No. 6, 2012, 764-77.

Fujikawa A, *et al.* Mice deficient in protein tyrosine phosphatase receptor type Z are resistant to gastric ulcer induction by VacA of *Helicobacter pylori*. Nature genetics. Vol. 33, No. 3, 2003, 375-81.

Mueller D, *et al.* c-Src and c-Abl kinases control hierarchic phosphorylation and function of the CagA effector protein in Western and East Asian *Helicobacter pylori* strains. The Journal of clinical investigation. Vol. 122, No. 4, 2012, 1553-66.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

Nakano M, Hirayama T. Response to '*Helicobacter pylori* infection of AZ-521 cells reveals a type IV secretion defect and VacA-independent CagA phosphorylation'. Disease Models & Mechanisms, 査読有, Vol. 10, No. 12, 2017, 1541-1543.

doi: 10.1242/dmm.032821.

中野政之、八尋錦之助 . 宿主受容体 RPTPa を介した VacA の新たな機能 . 日本ヘリコバクター学会誌 , 査読無 , Vol.18 , No. 2 , 2017 , 28-31 .

<http://mol.medicalonline.jp/library/archive/search?jo=dy6jahel&ye=2017&vo=18&issue=2&UserID=133.45.225.226>

Nakano M, Yahiro K, Yamasaki E, Kurazono H, Akada J, Yamaoka Y, Niidome T, Hatakeyama M, Suzuki H, Yamamoto T, Moss J, Isomoto H, Hirayama T. *Helicobacter pylori* VacA, acting through receptor protein tyrosine phosphatase , is crucial for CagA phosphorylation in human duodenum carcinoma cell line AZ-521. *Disease Models & Mechanisms* , 査読有 , Vol. 9 , No. 12 , 2016 , 1473-1481.

doi: 10.1242/dmm.025361.

〔学会発表〕(計 6 件)

中野政之、八尋錦之助 . RPTP を介した VacA の新規機能解析 . 第 90 回日本細菌学会総会 . 2017.

Akashi T, Matsushima K, Kanda T, Nakano M, Kamiya M, Akazawa Y, Ohnita K, Takeshima F, Nakao K, Ueno Y, Isomoto H . *Helicobacter pylori* detection by -glutamyltranspeptidase-activated Fluorescent probe. UNITED EUROPEAN GASTROENTEROLOGY WEEK Annual Meeting 2017 . 2017.

八尋錦之助、中野政之、平山壽哉、野田公俊 . ピロリ菌の空胞化毒素 VacA の Cx43 の細胞内蓄積は陰イオンチャネル活性と Rac1 が関与する . 第 89 回日本細菌学会総会 . 2016 .

八尋錦之助、赤澤祐子、中野政之、鈴木秀和 . ピロリ菌の空胞化毒素 VacA による Connexin 43 細胞内蓄積を介した細胞死誘導 . 第 22 回日本ヘリコバクター学会学術集会 . 2016.

中野政之、八尋錦之助 . 宿主細胞受容体 RPTP を介した VacA の機能発現 . 第 22 回日本ヘリコバクター学会学術集会 . 2016.

赤司太郎、松島加代子、神田努、中野政之、神谷真子、赤澤祐子、大仁田賢、竹島史直、中尾一彦、浦野泰照、磯本一 . *H. pylori* 感染診断における -グルタミルトランスぺプチダーゼ活性を検出する蛍光プローブの有用性の検討 . 第 22 回日本ヘリコバクター学会学術集会 2016.

〔図書〕(計 1 件)

Nakano M, et al. *Helicobacter pylori* VacA exhibits pleiotropic actions in host cells. In: *Helicobacter pylori*, Part II (Edited by Suzuki H, Warren R, and Marshall B). Springer Japan , 2016 , 49-66 .

doi: 10.1007/978-4-431-55705-0

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等
なし

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。