

機関番号：12601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790412

研究課題名 (和文) ヘリコバクター・ピロリ菌 CagA による胃上皮細胞の極性破壊と細胞増殖の共役機構

研究課題名 (英文) Expression of CagA in polarized epithelial cells elicits forced mitogenesis

研究代表者

紙谷 尚子 (KAMIYA NAOKO)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40279352

研究成果の概要 (和文) : *cagA* 遺伝子を保有するヘリコバクター・ピロリ感染は胃癌発症の危険率を有意に高める。本研究の目的は、CagA による胃上皮細胞の極性破壊と細胞増殖をつなぐ分子機構を解明することである。CagA は SHP2 活性化を介して Erk-MAPK 経路を異常活性化すると同時に、PAR1 抑制を介して上皮細胞極性を破壊する。CagA 依存的な上皮極性破壊が RhoA を活性化し、p21 の発現を抑制する結果、細胞増殖を亢進させることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文) : Infection with *Helicobacter pylori cagA*-positive strains is associated with gastric carcinoma. CagA-deregulated SHP2 elicits sustained Erk-MAPK activation. CagA also interacts and inhibits PAR1, resulting in induction of junctional and polarity defects. In polarized epithelial cells, CagA-driven Erk-MAPK signal prevents p21 expression by activating RhoA, thereby inducing forced mitogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：感染腫瘍学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学 (含真菌学)

キーワード：ヘリコバクター・ピロリ、胃癌、*cagA* 遺伝子、上皮細胞極性、細胞増殖

1. 研究開始当初の背景

(1) 胃癌は日本を含む東アジア諸国において時に罹患率が高く、胃癌による死亡は全世界ならびに日本における部位別がん死亡の第2位を占める。

(2) ヘリコバクター・ピロリ (ピロリ菌) は、1983年に胃炎患者の胃内から単離された微好気性のグラム陰性桿菌である。

① ピロリ菌は世界の総人口の約50%に感染していると推察され、その慢性持続感染は萎縮性胃炎ならびに胃潰瘍などの胃粘膜病変

を引き起こす。

② ピロリ菌のゲノム配列には著しいゲノム多型が認められ、臨床的に採取されたピロリ菌株は *cagA* (*cytotoxin-associated gene A antigen*) 遺伝子を保有する菌株と保有しない菌株に大別される。

③ 疫学的調査により、*cagA* 遺伝子を保有する *cagA* 陽性ピロリ菌は *cagA* 陰性ピロリ菌と比較して、より激しい萎縮性胃炎ならびに消化性潰瘍を引き起こし胃癌発症の危険率を有意に高めることが明らかにされている。

(3) *cagA* 遺伝子産物である CagA タンパク質は、ピロリ菌の菌体内で産生された後、IV型分泌機構を介して胃上皮細胞内に直接注入される。細胞内に侵入した CagA は Src ファミリーチロシンキナーゼによりリン酸化を受ける。CagA のチロシンリン酸化部位は Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) 配列で特徴づけられる。

(4) CagA はリン酸化依存的に SH2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase (SHP2) に特異的に結合し、そのホスファターゼ活性を異常に亢進させる。

① SHP2 は増殖因子受容体と Erk-MAPK 経路をつなぐ正のシグナル伝達分子として機能し、細胞増殖および細胞運動を制御している。

② CagA との複合体形成により活性化された SHP2 は、Erk-MAPK 経路の異常活性化を介して細胞増殖を脱制御する。

(5) CagA はリン酸化非依存的に partitioning-defective 1 (PAR1) に特異的に結合し、そのキナーゼ活性を抑制する。

① 哺乳動物では4つの PAR1 ファミリー分子 (PAR1a, PAR1b, PAR1c, PAR1d) が存在する。なかでも PAR1b は上皮細胞の極性形成と維持に必須の役割を担う。

② CagA は PAR1b のキナーゼ活性を抑制することにより、上皮細胞のタイトジャンクション (密着結合) を破壊し、上皮細胞極性を喪失させる。

③ CagA-PAR1 複合体形成に必要な CagA の責任領域は、16 アミノ酸からなる CM 配列である。

(6) CagA はリン酸化非依存的に β -カテニンシグナル活性化し、その標的分子の1つである *cyclin D1* を転写活性化する。

① β -カテニンシグナルは動物の胚発生を広く制御するだけでなく、がんの発症に深く関与している。

② CagA による β -カテニンシグナル活性化の分子機構の全容は解明されていないが、CagA はリン酸化非依存的に E-カドヘリン/ β -カテニン複合体を不安定化させる。

③ β -カテニンシグナル活性化に必要な CagA の責任領域は、CagA の PAR1b 結合領域として機能する CM 配列である。したがって、CagA-PAR1 複合体形成が CagA による β -カテニンシグナル活性化に関与する可能性が考えられる。

(7) CagA を全身性に発現するトランスジェニックマウスは、胃や小腸などの消化管における腫瘍ならびに血液系腫瘍を発症する。

① CagA のリン酸化部位である EPIYA 配列中のチロシン残基をフェニルアラニン残基に置換したリン酸化耐性型 CagA を発現するト

ランスジェニックマウスでは腫瘍性病変を含む異常は認められない。このことから、CagA トランスジェニックマウスにおけるがんの発症には、CagA による SHP2 の異常活性化が重要な役割を担うことが推察される。

② SHP2 のホスファターゼ活性が増強した機能獲得型 SHP2 を発現するマウスは血液系腫瘍のみを発症することが報告されている。

これらの事実から、上皮細胞のがん化には過剰な増殖シグナルの誘導に加えて、上皮細胞極性の破壊が重要な役割を担うと推察される。

2. 研究の目的

(1) CagA-PAR1b 相互作用と β -カテニンシグナル活性化の関連性を明らかにする。

① PAR1b と E-カドヘリン/ β -カテニン複合体は、極性化上皮細胞において側方側膜 (lateral membrane) に共局在する。そこで、両者が物理的に相互作用する可能性を検証する。

② CagA による β -カテニンシグナル活性化に PAR1b が関与するか否かを明らかにする。

(2) CagA による上皮極性破壊と細胞増殖の関連性を解析する。

① 極性化上皮細胞において CagA は細胞増殖能を亢進するか否かを解析する。

② CagA により細胞増殖が亢進した場合には、その分子機構を解明する。

(3) CagA 発現を制御可能な細胞株をヌードマウスに接種し腫瘍形成の有無を解析する。

3. 研究の方法

(1) CagA-PAR1b 相互作用と β -カテニンシグナル活性化の関連性の解析

① PAR1b と E-カドヘリン/ β -カテニン複合体が物理的に相互作用する可能性を免疫沈降実験により検討した。

② CagA 依存的な β -カテニンシグナル活性化における PAR1b のキナーゼ活性の関与を調べた。TCF 結合配列をルシフェラーゼ遺伝子の upstream に組み込んだ TOPtkLuciferase を用いてレポーターアッセイを行った。

(2) CagA による上皮極性破壊と細胞増殖の関連性の解析

極性化上皮細胞モデルとしてイヌ腎臓由来 MDCK 細胞を用いた。まず、MDCK 細胞を用いて、薬剤 (テトラサイクリン誘導体であるドキシサイクリン) の添加により CagA を誘導発現する細胞株を樹立した。

① 樹立した MDCK 細胞由来の CagA 誘導発現株を用いて Br-dU 取り込み実験を行い、CagA

発現細胞の細胞増殖能を解析した。また、極性化培養した MDCK 細胞に CagA を一過性に発現させた実験系を用いて Br-dU 取り込み実験を行い、CagA 発現細胞の細胞増殖能を解析した。対照実験として、上皮細胞極性を持たない細胞に CagA を発現させる実験についても検討した。

② ウェスタンブロット法により CagA 発現細胞における種々のタンパク質の発現を解析した。免疫染色により CagA 発現細胞内の種々のタンパク質の局在を解析した。

(3) CagA 発現細胞の腫瘍形成能の解析

CagA 誘導および非誘導 MDCK 細胞をヌードマウスに接種し、腫瘍の生着率ならびに腫瘍形成能を検討した。

4. 研究成果

(1) CagA-PAR1b 相互作用と β -カテニンシグナル活性化の関連性の解析

① PAR1b と E-カドヘリン/ β -カテニン複合体が物理的に相互作用する可能性を免疫沈降実験により検討したが、両者の直接的な相互作用は認められなかった。

② CagA 依存的な β -カテニンシグナル活性化は、野生型 PAR1b の過剰発現により抑制される一方、キナーゼ活性を保有しない変異型 PAR1b によっては抑制されなかった。よって、CagA による β -カテニンシグナル活性化において CagA による PAR1b キナーゼ活性の抑制が重要な役割を担うことが示唆された。

(2) CagA による上皮極性破壊と細胞増殖の関連性の解析

① 上皮細胞極性を形成していない細胞においては、CagA は SHP2 の脱制御を介して Erk-MAPK 経路を異常活性化し、CDK 阻害分子である p21 を誘導した。その結果、細胞周期 G1 期停止ならびに過剰な発がんストレスによって生じる早期細胞老化が誘導された。一方、極性化上皮細胞においては、CagA は Erk-MAPK 経路を異常活性化したものの p21 の誘導は認められなかった。その結果、CagA 発現細胞では細胞増殖能が亢進した。よって、CagA による Ras-MAPK 経路依存的な p21 の誘導が上皮細胞極性依存的に制御されていることが推察された。

② Ras-MAPK 経路依存的な p21 誘導は RhoA 活性化により制御されることが報告されている。そこで、CagA による p21 誘導における RhoA の関与を解析したところ、極性化上皮細胞において CagA は RhoA を活性化した。一方、上皮細胞極性を形成していない細胞においては、CagA による RhoA 活性化は見られなかった。さらに、極性化上皮細胞において CagA

は PAR1b を介して RhoA 特異的 GDP/GTP 交換因子 (GEF) である GEF-H1 を持続的に活性化していることを明らかにした。従って、CagA による上皮細胞極性破壊は RhoA を活性化し、p21 発現抑制を介して細胞増殖を亢進させることを見いだした。

(3) CagA 発現細胞の腫瘍形成能の解析

MDCK 細胞由来の CagA 誘導発現株を CagA 誘導および非誘導条件で培養し、ヌードマウスに皮下注射したが、CagA 発現の有無に関わらず細胞が生着しなかった。これまでに MDCK 細胞がヌードマウスに生着することは複数の論文で報告されている。本研究期間においては CagA 発現細胞の腫瘍形成能を解析することが出来なかったが、細胞接種条件の検討等が今後の課題として考えられる。

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 6 件)

① N. Murata-Kamiya, Pathophysiological functions of the CagA oncoprotein during infection by *Helicobacter pylori*. *Microbes Infect.* (2011) (掲載確定 (印刷中)), 査読有

② Y. Saito, N. Murata-Kamiya, Y. Ohba, T. Hirayama, M. Hatakeyama. Conversion of *Helicobacter pylori* CagA from senescence inducer to oncogenic driver through polarity-dependent regulation of p21. *J. Exp. Med.* (2010) 207, 2157-2174, 査読有

③ 紙谷尚子、畠山昌則. 胃癌発症におけるピロリ菌癌タンパク質 CagA の役割. *細胞工学* (2010) 29 巻 6 号, 554-560, 査読無

④ N. Murata-Kamiya, K. Kikuchi, T. Hayashi, H. Higashi, M. Hatakeyama. *Helicobacter pylori* exploits host membrane phosphatidylserine for delivery, localization, and pathophysiological action of the CagA oncoprotein. *Cell Host Microbe* (2010) 7, 399-411, 査読有

⑤ H. Lu, N. Murata-Kamiya, Y. Saito, M. Hatakeyama. Role of PAR1/MARK kinases in the morphogenetic activity of *Helicobacter pylori* CagA. *J. Biol. Chem.* (2009) 284, 23024-23036, 査読有

⑥ M. Umeda, N. Murata-Kamiya, Y. Saito, Y. Ohba, M. Takahashi, M. Hatakeyama. *Helicobacter pylori* CagA causes mitotic impairment and induces chromosomal instability. *J. Bio. Chem.* (2009) 284, 22166-22172, 査読有

〔学会発表〕（計 8 件）

- ① 紙谷尚子、菊地健司、林剛瑠、東秀明、
畠山昌則. *Helicobacter pylori* がんタンパク質 CagA と宿主細胞膜ホスファチジルセリンの相互作用. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会、2010 年 12 月 10 日、神戸ポートピアホテル（兵庫県）
- ② 紙谷尚子、菊地健司、林剛瑠、東秀明、
畠山昌則. ヘリコバクター・ピロリは細胞膜ホスファチジルセリンを利用して宿主細胞に CagA 癌タンパク質を注入する. 第 69 回日本癌学会学術総会、2010 年 9 月 22 日、大阪国際会議場（大阪府）
- ③ 齊藤康弘、紙谷尚子、畠山昌則.
PHelicobacter pylori CagA による上皮細胞極性依存的な細胞増殖の亢進. 第 69 回日本癌学会学術総会、2010 年 9 月 22 日、大阪国際会議場（大阪府）
- ④ 菊地健司、紙谷尚子、近藤哲、畠山昌則.
SHP-2 もしくは PAR1 と結合できない CagA を発現する遺伝子組み換えヘリコバクターピロリ菌の病態生理学的な検討. 第 69 回日本癌学会学術総会、2010 年 9 月 22 日、大阪国際会議場（大阪府）
- ⑤ 山橋幸恵、齊藤康弘、紙谷尚子、畠山昌則.
GEF-H1 は細胞極性制御因子 PAR1b/MARK2 の下流分子として機能する. 第 69 回日本癌学会学術総会、2010 年 9 月 22 日、大阪国際会議場（大阪府）
- ⑥ 紙谷尚子、畠山昌則. 胃がん発症におけるヘリコバクター・ピロリ CagA の意義. 第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年 10 月 2 日、パシフィコ横浜（神奈川県）
- ⑦ 齊藤康弘、紙谷尚子、大場雄介、畠山昌則.
Helicobacter pylori CagA は上皮細胞極性を利用して異常細胞増殖を誘導する. 第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年 10 月 1 日、パシフィコ横浜（神奈川県）
- ⑧ 吉山裕規、紙谷尚子、高田賢蔵、畠山昌則.
Epstein-Barr ウィルスによる上皮細胞の発癌の初期変化. 第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年 10 月 1 日、パシフィコ横浜（神奈川県）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

紙谷 尚子 (KAMIYA NAOKO)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：40279352

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し