

令和元年6月3日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15926

研究課題名(和文)ピロリ菌病原因子CagAによるE-cadherin脱リン酸化と発がんへの関与

研究課題名(英文)Helicobacter pylori CagA-induced dephosphorylation of E-cadherin and its involvement in carcinogenesis

研究代表者

藤井 裕美子 (FUJII, Yumiko)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・特任助教

研究者番号：30722334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、ピロリ菌病原因子CagAがSHP1およびSHP2を介してE-cadherinをチロシン脱リン酸化することを明らかにした。このE-cadherinチロシンリン酸化量の低下には、CagAにより活性化したCSKも関与することが示唆された。CagA発現により脱リン酸化されるE-cadherin細胞内ドメイン中のチロシンを含む領域を2か所同定し、このうち1か所のチロシンのリン酸化量がEGF刺激により増加することを見出した。さらに、これらのチロシンのリン酸化状態が、隣接する細胞間の接着強度に関わることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果から、ピロリ菌CagAはE-cadherinのチロシンリン酸化状態を変化させることにより胃上皮細胞間の接着構造に影響を与えることが強く示唆された。上皮細胞間の接着構造の乱れは、その構造が持つ生理学的な意義から、様々な胃粘膜病変の発症につながる事が予想される。年間70万人が胃がんで命を落としている現状において、その予防法・治療法開発は急務である。予防としてはピロリ菌の除菌が有効ではあるが、腸上皮化生まで進行した段階での除菌は発がんリスクに影響しないとも言われる。本研究の成果は、ピロリ菌除菌では既に対処できない発がんの阻止や新たな胃がん治療法開発の上で重要な意義を持つ可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, I showed that CagA, a virulence factor of Helicobacter pylori, tyrosine dephosphorylates E-cadherin by mediating SHP1 and SHP2. It was suggested that CagA-activated CSK also participates in the reduction of the tyrosine phosphorylation level of E-cadherin. I identified the two regions including the tyrosine residues which were dephosphorylated under the presence of CagA in the cytoplasmic domain of E-cadherin, and found that the tyrosine phosphorylation level of one of these regions is increased by EGF stimulation. I further presented evidence that the tyrosine phosphorylation statuses of E-cadherin are involved in the strength of cell-cell adhesion.

研究分野：分子腫瘍学、感染腫瘍学

キーワード：ヘリコバクター・ピロリ CagA 胃がん 脱リン酸化 細胞間接着

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

1. 研究開始当初の背景

カドヘリンスーパーファミリーは、細胞の表面に発現して細胞間の接着を担う代表的な分子群の一つである。カドヘリンスーパーファミリーのうちクラシックカドヘリンに属する VE-cadherin は、血管内皮細胞に特異的に発現し、隣接する細胞の VE-cadherin と細胞外領域でホモフィリックな結合を形成することによりアドヘレンスジャンクションを形成している。ところで、白血球が血管外に溢出する際には、この血管内皮細胞間の接着は物理的に弱くなる必要がある。この接着強度の調節には、VE-cadherin の細胞内ドメインに位置するチロシンのリン酸化状態が関係する。細胞接着が閉じている時には 731 番目のチロシンはリン酸化された状態であるが、チロシンホスファターゼ SHP2 がこのチロシンを脱リン酸化すると細胞接着が弱まり白血球の溢出が可能になる(F Wessel *et al*, *Nat Immunol*, 2014)。消化管を含む上皮細胞では、VE-cadherin に代わり同じクラシックカドヘリンに属する E-cadherin が隣接する細胞間の接着を担っている。E-cadherin は VE-cadherin 同様、細胞外ドメイン同士でホモフィリックな結合を形成することにより上皮細胞のアドヘレンスジャンクションを形成している。これまでの報告から、E-cadherin は Src ファミリーキナーゼによりチロシンリン酸化を受けることが知られている。

ヘリコバクター・ピロリ(ピロリ菌)は世界人口の約半数が感染しているとされる細菌で、その慢性感染は胃炎や胃潰瘍、さらには胃がんの発症と強く関連する。とりわけ *cagA* 遺伝子を持つピロリ菌の感染は、*cagA* 陰性菌の感染より激しい萎縮性胃炎を誘発し胃がん発症ともより強い相関を示す。CagA タンパク質はピロリ菌体内で産生された後、ピロリ菌が持つ型分泌機構により胃上皮細胞内に直接注入される病原因子である。注入された CagA は宿主由来の Src ファミリーキナーゼによりチロシンリン酸化を受け、SHP2 チロシンホスファターゼと細胞膜近傍で結合してその酵素機能を亢進し、下流のシグナル異常を引き起こす。以前、研究代表者は、CagA が SHP2 のホスファターゼ活性の亢進を介して E-cadherin をチロシン脱リン酸化するという仮説を立て、CagA 発現時の E-cadherin チロシンリン酸化量を調べた。その結果、CagA を異所性発現した胃上皮細胞では E-cadherin のチロシンリン酸化状態が著しく低下することを見出した。VE-cadherin の事例から、E-cadherin のチロシンリン酸化状態は細胞間接着を制御する可能性が考えられた。さらに、正常部位と腫瘍部位で E-cadherin のチロシンリン酸化状態が異なることが報告されており、そのチロシンリン酸化と発がんとの関連も示唆された(G Serini *et al*, *J Natl Cancer Inst*, 1996; B Nawrocki *et al*, *Am J Pathol*, 1998)。

2. 研究の目的

上記背景をもとに、ピロリ菌病原因子 CagA 依存的な E-cadherin チロシンリン酸化状態の異常が胃上皮組織における発がんに関与するという仮説を立て、本研究では以下の 3 項目を明らかにすることを目的とした。

- (1)ピロリ菌 CagA による E-cadherin チロシン脱リン酸化機構
- (2) E-cadherin 細胞内ドメインにおけるチロシンリン酸化機構
- (3)胃上皮細胞における E-cadherin チロシンリン酸化状態と発がんとの関連

3. 研究の方法

- (1)ピロリ菌 CagA による E-cadherin チロシン脱リン酸化機構

CagA は SHP2 のチロシンホスファターゼ活性を亢進することから、CagA 依存的な E-cadherin 脱リン酸化における SHP2 の関与が示唆された。そこで、SHP2 との結合部位を欠損した CagA 変異体、SHP2 のノックダウンおよび酵素活性欠損変異体を用いて、CagA 発現時の E-cadherin のチロシンリン酸化状態を調べた。

- (2) E-cadherin 細胞内ドメインにおけるチロシンリン酸化機構

CagA 依存的にリン酸化状態が変化する E-cadherin 細胞内ドメイン中のチロシンを特定するため、リン酸化部位予測サイトの結果をもとに、リン酸化を受ける可能性の高いチロシンをフェニルアラニンに置換したリン酸化耐性型 E-cadherin 変異体を作成して CagA 発現時の E-cadherin チロシンリン酸化状態を調べた。E-cadherin は Src ファミリーキナーゼによりチロシンリン酸化を受けることが知られている。そこで、今回同定した E-cadherin のチロシンリン酸化における Src の関与を、Src 特異的阻害剤 PP2 を用いて調べた。Src 以外のチロシンキナーゼの関与が考えられた場合には、リン酸化モチーフ解析から責任キナーゼを予測してその関与を調べた。

- (3)胃上皮細胞における E-cadherin チロシンリン酸化状態と発がんとの関連

E-cadherin 細胞内ドメインはアドヘレンスジャンクション形成に関わる様々な分子と結合する領域であることから、その部位におけるチロシンリン酸化状態の変化は相互作用する分子との結合に大きな変化をもたらす可能性が考えられた。そこで、CagA 依存的な E-cadherin チロシン脱リン酸化がアドヘレンスジャンクションの構造に変化をもたらすと予想し、まず、チロシンリン酸化耐性型 E-cadherin 変異体を発現した時の細胞間接着の強度を、dispass を用いた細胞接着アッセイならびに transepithelial electrical resistance (TER) で評価した。さらに、リン酸化耐性型 E-cadherin 変異体を用いて細胞間接着構成分子に対する蛍光免疫染色を行い、それらの分子の局在の変化を観察した。

4. 研究成果

(1) ピロリ菌 CagA による E-cadherin チロシン脱リン酸化機構

ヒト胃上皮細胞株 AGS は、遺伝子のフレームシフトが原因で内因性の E-cadherin を発現していない。そこで、AGS 細胞に一過性に E-cadherin 発現プラスミドを導入してその発現パターンを蛍光免疫染色法で確認したところ、通常の E-cadherin 同様に細胞膜に局在した。この実験系を用いて、研究代表者はこれまでに、CagA を異所性発現した胃上皮細胞では E-cadherin のチロシンリン酸化が著しく低下することを見出していた。CagA はチロシンホスファターゼ SHP2 の酵素活性を亢進することから、CagA 依存的な E-cadherin チロシン脱リン酸化には SHP2 が関与することが予想された。たしかに、SHP2 を過剰発現した場合に E-cadherin のチロシンリン酸化量は著しく低下した。しかしながら、SHP2 をノックダウンしても CagA 依存的な E-cadherin 脱リン酸化は大きく抑制されることは無かった。CagA は SHP2 だけでなく、SHP2 のホモログである SHP1 およびチロシンキナーゼ CSK と結合してその酵素活性を亢進することが知られている。SHP1 を過剰発現した場合にも E-cadherin チロシンリン酸化量は低下した。そこで、SHP1 および SHP2 の働きを阻害する変異体を発現した時の CagA 依存的な E-cadherin リン酸化量変化を観察したところ、それぞれ単独に阻害した場合にリン酸化量の低下がわずかに抑制され、両者を同時に阻害するとその抑制レベルはさらに大きくなった。以上のことから、CagA 依存的な E-cadherin チロシンリン酸化レベルの低下は、SHP1 および SHP2 の両者を介していることが明らかになった。一方、様々な標的分子との結合責任領域をそれぞれ欠損した各種の CagA 変異体を用いて E-cadherin のチロシンリン酸化状態を観察したところ、SHP2 結合領域を欠損させた場合と同様、CSK 結合領域を欠損した場合にも E-cadherin のリン酸化レベルの低下が抑制された。CagA 結合分子の一つである PAR1 セリンスレオニンキナーゼとの結合責任領域を欠損させた CagA ではそのような変化は見られなかったことから、CagA 依存的な E-cadherin のチロシンリン酸化量低下には、CSK が関与することが強く示唆された。CSK は Src ファミリーキナーゼを抑制する働きを持つことから、Src による E-cadherin チロシンリン酸化を抑制することで E-cadherin のリン酸化レベルを抑制していることが推察された。

(2) E-cadherin 細胞内ドメインにおけるチロシンリン酸化機構

CagA によって脱リン酸化される E-cadherin 内のチロシンを特定するため、まず、E-cadherin の細胞内ドメインにおけるチロシンリン酸化部位を、ニュートラルネットワークを用いた NetPhos 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos-2.0/>) で予測した。その結果、Y753, Y754, Y827, Y859, Y861 の 5 つのチロシンが候補となった。Y753, Y754 および Y755 は Src キナーゼによりリン酸化を受けることが報告されている。そこで、Y753/Y754/Y755 と Y859/Y861 をそれぞれひとまとめの領域として、それぞれのチロシンをフェニルアラニンに置換した変異体 (Y753/754/755F および Y859/861F) ならびにその両領域のチロシンを全て置換した変異体 (Y753/754/755/859/861F) の 3 種類の発現コンストラクトを作成した。それぞれの E-cadherin 変異体を AGS 細胞に発現させてそのチロシンリン酸化レベルを観察したところ、Y753/754/755F および Y859/861F の E-cadherin 変異体では野生型 E-cadherin に比較してそれぞれチロシンリン酸化レベルが低下した。さらに、Y753/754/755/859/861F 変異体ではリン酸化がほぼ検出できなくなるレベルまで低下した。このことから、Y753/754/755 および Y859/861 の 2 領域のチロシンがそれぞれリン酸化を受けることが示された。次に、これらの E-cadherin 変異体を CagA と共発現したところ、Y753/754/755F および Y859/861F の変異体では依然として CagA 発現依存的に E-cadherin チロシンリン酸化レベルの低下が見られた。一方、Y753/754/755/859/861F 変異体では、CagA 発現による E-cadherin チロシンリン酸化量の変化は見られなくなった。以上の結果から、CagA によりリン酸化状態が変化するチロシンは Y753/Y754/Y755 および Y859/Y861 の両領域に存在するチロシンであることが明らかになった。

Y753/754/755 が Src ファミリーキナーゼによりチロシンリン酸化されることが知られる一方、Y859/Y861 はこれまでリン酸化の報告はされていない。Src ファミリーキナーゼ阻害剤 PP2 を用いた解析から、Y859/Y861 のチロシンリン酸化に Src ファミリーキナーゼは関与しないことが示された。リン酸化モチーフの解析からは、この領域のチロシンがレセプター型チロシンキナーゼ EGFR によりリン酸化を受けることが予想された。そこで、EGFR を高発現しているヒト胃上皮細胞株 A431 を用いて、EGF 刺激前後の E-cadherin Y753/754/755F および Y859/861F 変異体のチロシンリン酸化状態を解析した。その結果、EGF 刺激により E-cadherin Y753/754/755F 変異体のチロシンリン酸化量が増加する一方、Y859/861F 変異体ではその変化が見られないことが示された。以上のことから、EGFR が E-cadherin Y859/861 のチロシンリン酸化に関わるということが強く示唆された。

(3) 胃上皮細胞における E-cadherin チロシンリン酸化状態と発がんとの関連

E-cadherin 変異体を用いた解析から、CagA 依存的にリン酸化状態が変化する E-cadherin 細胞内ドメインのチロシンを含む領域を 2 か所同定したが、それらの領域はアドヘレンスジャンクションを形成するための構成分子が結合するのに必須な領域であった。このことから、E-cadherin Y753/Y754/Y755 および Y859/Y861 のチロシンリン酸化状態が E-cadherin と他分子との結合能、さらには E-cadherin の働きに影響を及ぼす可能性が考えられた。そこで、これらの

領域のチロシン脱リン酸化が細胞生物学的にどのような意義を持つのかを明らかにするため、上記の E-cadherin 脱リン酸化型変異体を用いて、隣接細胞との接着強度の変化を disperse 細胞接着アッセイならびに transepithelial electrical resistance (TER) で評価した。その結果、脱リン酸化型 E-cadherin 変異体は野生型 E-cadherin に比べて隣接細胞との強固な接着が形成されないことが明らかになった。さらにその詳細を明らかにするため、タイトジャンクション構造を制御する ZO-1 で免疫染色を行ったところ、E-cadherin 脱リン酸化型変異体ではタイトジャンクション様の構造が形成されないことが示された。

一方、E-cadherin チロシンリン酸化依存的に結合するタンパク質を明らかにする目的で、野生型および脱リン酸化型 E-cadherin に対する結合タンパク質を免疫沈降実験で比較したところ、野生型特異的に結合するタンパク質が観察された。LC/MS/MS 解析によりこのタンパク質の同定を試みたところ、候補の一つとして、リン酸化チロシンに結合する SH2 ドメインを持つタンパク質が検出された。現段階までに、特異的抗体を用いた免疫沈降実験により、このタンパク質が E-cadherin に確かに結合することを明らかにしており、今後この結合タンパク質の働きを観察することにより E-cadherin 脱リン酸化が細胞へ及ぼす効果の分子機構を明らかにすることができるかと期待している。

本研究の結果から、ピロリ菌病原因子 CagA は E-cadherin のチロシンリン酸化状態を変化させることにより、胃上皮細胞間の接着構造に影響を与えることが強く示唆された。上皮細胞間の接着構造の乱れは、その構造が持つ生理学的な意義から、様々な胃粘膜病変の発症につながる事が予想される。胃がんは世界で 4 番目に多いがんで、年間 70 万人が胃がんにより命を落としている現状において、その予防法・治療法開発は急務である。予防としてはピロリ菌の除菌が有効ではあるが、初期の胃粘膜病変におけるピロリ菌除菌は胃の発がんリスクを減らす一方、腸上皮化生まで進行した段階での除菌は発がんリスクに影響しないとも言われる。本研究の結果得られる成果は、ピロリ菌除菌では既に対処できない発がんの阻止や新たな胃がん治療法開発の上で非常に重要な意義を持つ可能性がある。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

Yumiko Fujii and Masanori Hatakeyama,
Helicobacter pylori CagA-induced alterations of E-cadherin modifications,
The 37th Sapporo International Cancer Symposium (国際学会), 2018 年

Yumiko Fujii and Masanori Hatakeyama,
A novel binding partner for *Helicobacter pylori* CagA in gastric epithelial cells,
The 5th Symposium Max Planck-The University of Tokyo Center for Integrative Inflammalogy (国際学会), 2018 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者 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。