

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2019～2021
 課題番号：19K05945
 研究課題名(和文) 胃上皮オルガノイドを用いた平面内細胞極性動態解析系の創出による胃発がん機序の解明

研究課題名(英文) Understanding of the mechanism of gastric carcinogenesis by the development of the system that visualizes dynamics of the planar cell polarity within gastric epithelial organoids

研究代表者
 金光 昌史(高橋昌史)(Takahashi-Kanemitsu, Atsushi)
 東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教

研究者番号：00624496
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ピロリ菌のがんタンパク質CagAが、Wnt-平面内細胞極性シグナルを攪乱することを明らかにした。CagAによる平面内細胞極性シグナルの攪乱は、CagAのN端側ドメインと平面内細胞極性シグナルのコア分子の結合が重要であった。頂底細胞極性の制御キナーゼPAR1bの基質としてBRCA1を同定した。CagAはPAR1bの活性を阻害することで、BRCA1の核内移行を阻害し、DNA損傷の相同組換え修復を抑制した。ヒトのYAP1遺伝子は選択的スプライシングにより8種のアイソフォームを発現する。第6エキソンに対応する領域を持つYAP1と持たないYAP1の間で、造腫瘍性活性が異なることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頂底細胞極性に関わるPAR1bがゲノム安定性を制御することを示した。PAR1bはYAP1を介したHippoシグナルや平面内細胞極性の制御に重要である。本研究では、ピロリ菌のCagAによる「頂端/平面内細胞極性-DNA傷害の修復-Hippoシグナル」の機能連関の攪乱を示した。病理学・疫学的な解析から、ピロリ菌/CagAは胃発がんに不可欠である。多段階発がん過程を経た胃のがん部にはピロリ菌は存在しないことから、CagAの注入が胃のがん化を開始する一方で、胃がん形成後にはCagAは不要であると考えられてきた(Hit and Run型の発がん)。本研究は世界に先駆けてこの機序を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：I revealed that a bacterial oncoprotein CagA, which is injected into the gastric epithelial cells by Helicobacter pylori, has an activity to perturb the Wnt-Planar Cell Polarity (PCP) signaling pathway. The CagA-caused perturbation of Wnt-PCP signaling was due to the CagA-Protein X (a PCP core protein) complex formation via the N-terminal domain of the CagA protein. We identified BRCA1 as a novel substrate of PAR1b, a kinase responsible for apical-basal cell polarity. CagA inhibits the kinase activity of PAR1b therefore we found that CagA prevents the phosphorylation-dependent nuclear translocation of BRCA1, which is required for homologous recombination-driven repairing of DNA double strand breaks. The human YAP1 gene generates 8 isoforms through alternative splicing. We found that an alternative exon, the exon 6, plays a key role in the tumorigenic potential of the YAP protein in the subcutaneous of nude mice and then uncovered the molecular mechanism underlying the phenomenon.

研究分野：分子腫瘍学、分子生物学、細胞生物学、細胞内シグナル伝達

キーワード：Wntシグナル伝達系 平面内細胞極性 ヘリコバクター・ピロリ CagA PAR1b Hippoシグナル伝達系

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- A) ピロリ菌の細菌性がんタンパク質CagAは上皮細胞の頂端細胞極性を制御するキナーゼ、PAR1bと複合体を形成して、活性を阻害する[Takahashi-Kanemitsu et al. *Cell Mol Immun* 2020]。
- B) CagAタンパク質をアフリカツメガエル初期胚に異所性に発現すると、収斂伸長運動 (Convergent extension movements) の阻害に起因した神経管閉鎖障害が生じる。CagAが引き起こす発生異常の形態的特徴などから、CagAがWnt-PCP (Planar Cell Polarity: 平面内細胞極性) シグナルを攪乱する可能性が考えられていた。CagAがVanglに代表されるWnt-PCPシグナルの主要分子と複合体を形成する実験データを得ていた。以上から、CagAが胃上皮細胞においてVangl2などのWnt-PCPシグナル主要分子の機能を攪乱し、胃上皮組織の平面内細胞極性 (PCP極性) を障害すると仮説が立てられた。
- C) PAR1bががん抑制性のHippoシグナル伝達経路の構成分子、MSTをリン酸化することで活性化し、Hippoシグナル伝達を促進することを報告していた[Ooki et al. *Dev Cell* 2019]。

2. 研究の目的

- A) CagAがWnt-PCPシグナル伝達を攪乱するか、その分子機序を含めてより詳細に解析する。
- B) カエル/マウス/ヒト由来の細胞試料を対象にした、平面内細胞極性の評価系を開発する。
- C) ヒトやマウスなどの哺乳動物の胃上皮において、平面内細胞極性が恒常的に存在するか明らかにする。CagAが平面内細胞極性の制御を攪乱するか検討する。

3. 研究の方法

- A) CagAを哺乳動物培養細胞に発現し、Wnt-PCPシグナルの主要構成分子とCagAの細胞内相互作用を免疫沈降やPLA (Proximity Ligation Assay) 試験で調べる。CagAおよびPCP主要分子の相互作用に用いられる分子内責任領域を同定する。PCPシグナル伝達のエフェクターとして知られるRHOファミリーGTPaseのプルダウン試験などにより、CagAがWnt-PCPシグナル伝達を促進するのか抑制するのかを明らかにする。CagAの発現が既存のPCPタンパク質複合体の形成や機能に及ぼす影響を免疫沈降やPLA試験で明らかにする。
- B) カエル胚の神経板やマウス胃上皮を試料として、内在性のPCP主要タンパク質に対する蛍光免疫染色を行う。蛍光レポーター分子を付加したPrickleなどのPCP主要分子を作成し、これをPCPレポーターとしてカエル初期胚に発現することで、形成中の神経板を構成する細胞における平面内極性化分布を可視化して観察する。培養細胞などを試料としてPLA試験を行い、内在性PCP主要分子の複合体形成を *in situ* で可視化する。CagA発現によって、内在性PCP主要分子およびPCPレポーターの細胞内分布ならびにPCP複合体の形成が変化(脱極性化)するか観察する。
- C) 野生型マウスの胃上皮組織の切片を作成し、PCP主要分子を標的とした免疫組織化学染色 (IHC) を行い、平面内極性化分布が観察されるか検討する。胃上皮でCagAを発現するトランスジェニックマウスから胃上皮を採取し、CagA発現に依存したPCP主要分子の細胞内局在や発現の異常が見られるか検討する。

4. 研究成果

- A) ピロリ菌のがんタンパク質CagAが、N端側ドメインに依存して、Wnt-平面内細胞極性(PCP極性)シグナル伝達を脱制御することを活性化型RHOや活性化型RACのプルダウン試験によって明らかにした。CagAによる平面内細胞極性シグナルの攪乱は、CagAがN端側ドメインを責任領域として、PCP主要タンパク質と複合体を形成することで生じることを示唆した。CagAの発現は、PCP主要タンパク質から成る複合体の形成を阻害した [Takahashi-Kanemitsu et al. *in revision*]。
- B) 頂底細胞極性の制御キナーゼPAR1bの新規基質としてBRCA1を同定した。CagAはPAR1bのキナーゼ活性を阻害することで、BRCA1の核内移行を阻害し、相同組換えに依存したDNA二本鎖切断の修復を抑制することを明らかにした [Imai et al. *Cell Host Microbe* 2021]。

C) ヒトのYAP1遺伝子は選択的スプライシングを経て8種のYAP1アイソフォームを発現する。本研究では、第6エクソンにコードされた領域を分子内に持つYAP1アイソフォームと持たないYAP1アイソフォーム間で、ヌードマウス皮下における造腫瘍性活性が異なること、およびその機能の差異を与える分子メカニズムを明らかにした [Ben et al J Biol Chem 2020]。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Chi Ben, Xiaojing Wu, Atsushi Takahashi-Kanemitsu, Christopher Takaya Knight, Takeru Hayashi, Masanori Hatakeyama	4. 巻 295
2. 論文標題 Alternative splicing reverses the cell-intrinsic and cell-extrinsic pro-oncogenic potentials of YAP1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 13965-13980
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA120.013820.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Takuya Ooki, Naoko Murata-Kamiya, Atsushi Takahashi-Kanemitsu, Weida Wu, Masanori Hatakeyama	4. 巻 49
2. 論文標題 High-Molecular-Weight Hyaluronan Is a Hippo Pathway Ligand Directing Cell Density-Dependent Growth Inhibition via PAR1b	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 590-604
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.devcel.2019.04.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Atsushi Takahashi-Kanemitsu, Christopher T Knight, Masanori Hatakeyama	4. 巻 17
2. 論文標題 Molecular anatomy and pathogenic actions of Helicobacter pylori CagA that underpin gastric carcinogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cellular & Molecular Immunology	6. 最初と最後の頁 50-63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41423-019-0339-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 S. Imai, T. Ooki, N. Murata-Kamiya, D. Komura, K. Tahmina, W. Wu, A. Takahashi-Kanemitsu, C. T. Knight, A. Kunita, N. Suzuki, A. A. Del Valle, M. Tsuboi, M. Hata, Y. Hayakawa, N. Ohnishi, K. Ueda, M. Fukayama, T. Ushiku, S. Ishikawa, M. Hatakeyama	4. 巻 29
2. 論文標題 Helicobacter pylori CagA elicits BRCAness to induce genome instability that may underlie bacterial gastric carcinogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Host & Microbe	6. 最初と最後の頁 941-958
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.chom.2021.04.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 武 暁セイ, 貴 馳, 高橋 昌史, 林 剛瑠, 畠山 昌則
2. 発表標題 選択的スプライシングはYAP1に細胞非自律的な造腫瘍活性を付与する
3. 学会等名 第79回 日本癌学会学術総会（リーガロイヤルホテル広島など）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋 昌史, 盧 夢雪, 平良 眞規, 畠山 昌則
2. 発表標題 ヘリコバクター・ピロリ菌がんタンパク質CagAによる非古典的Wnt/平面内細胞極性シグナル伝達の攪乱
3. 学会等名 第78回 日本癌学会学術総会（国立京都国際会館）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大木 拓也, 紙谷 尚子, 高橋 昌史, 畠山 昌則
2. 発表標題 高分子量ヒアルロン酸によるがん抑制性Hippo経路の活性化と乳がんにおけるその破綻
3. 学会等名 第78回 日本癌学会学術総会（国立京都国際会館）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋昌史
2. 発表標題 チロシン脱リン酸化酵素SHP2による形態形成シグナルの制御機構
3. 学会等名 順天堂大学 大学院医学研究科 DBSBセミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kamrunnesa Tahmina, Narumi Hikawa, Atsushi Takahashi-Kanemitsu, Christopher Takaya Knight, Kengo Sato, Masanori Hatakeyama
2. 発表標題 Molecular mechanisms connecting Helicobacter pylori virulence factor CagA and atherosclerosis.
3. 学会等名 The 19th International Symposium on Atherosclerosis (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------