

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 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：2014～2015

課題番号：26860495

研究課題名(和文)ピロリ菌病原因子CagAによる限定的脱分化を介した胃発がん分子機構の解析

研究課題名(英文)Molecular mechanism of gastric carcinogenesis through restricted dedifferentiation by Helicobacter pylori CagA

研究代表者

藤井 裕美子(FUJII, YUMIKO)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：cagA陽性ヘリコバクター・ピロリ(ピロリ菌)の慢性感染は、胃炎・化生・がんなどの胃粘膜病変発症と関連する。本研究では、マウス胃体部において、ピロリ菌病原因子CagAが幽門腺化生(SPEM)と定義される前がん粘膜病変を引き起こすことを明らかにした。また、胃上皮細胞において、CagAがE-cadherinの細胞内ドメインのリン酸化状態を異常に制御していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Chronic infection with cagA-positive Helicobacter pylori is associated with gastric diseases including gastritis, metaplasia and carcinoma. In this project, we demonstrated that CagA protein induces precancerous mucosal lesion defined as spasmolytic polypeptide expressing metaplasia (SPEM) in mouse gastric corpus. We also found that CagA deregulates the phosphorylation status of the E-cadherin cytoplasmic domain in gastric epithelial cells.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：ヘリコバクター・ピロリ 化生

1. 研究開始当初の背景

胃がんは病理学的に腸型と未分化型に大別される。このうち多くを占める腸型胃がんは、胃炎、腸上皮化生という段階的な胃粘膜病変を経て発症すると考えられている。この多段階発がんの過程にはヘリコバクター・ピロリ（ピロリ菌）の慢性持続感染が密接に関わり、中でも、宿主の胃上皮細胞内に侵入する病原因子 CagA を産生するピロリ菌の感染は、CagA を産生しないピロリ菌に比べ、腸上皮化生や胃がんと言ったより段階の進んだ胃粘膜病変の発症と深く関わる。

胃上皮が腸上皮様に変化する病変である腸上皮化生を起こした胃粘膜には、本来胃には発現しない腸上皮特異的な転写因子 CDX1 が異所性に発現している。CDX1 を胃上皮特異的に発現させたトランスジェニックマウスは腸上皮化生を引き起こすことから、この転写因子の異所性発現が腸上皮化生の原因になることが示されている。一方、ピロリ菌 CagA を胃上皮の培養細胞に強制発現させると、CDX1 の発現が誘導される。このことから、CDX1 は *cagA* 陽性ピロリ菌感染を起点とした腸上皮化生発症、さらには胃発がんの過程で重要な役割を果たすことが推察された。

(1) 以前、研究代表者らは、CDX1 の胃上皮細胞内における転写標的遺伝子を網羅的に探索し、CDX1 が幹細胞性リプログラミングに関わる転写因子 SALL4 および KLF5 を異常に発現誘導することを明らかにした。CDX1 が発現した胃上皮細胞では腸上皮幹細胞マーカーの遺伝子群が一過性に異常に発現し、その後に各種の腸上皮分化細胞マーカーの発現が亢進した。この結果から、CDX1 が異所性発現した胃上皮細胞は腸上皮幹細胞様に限定的に脱分化した後、各種の腸上皮分化細胞に異常に再分化するというモデルを提唱した。腫瘍形成を担うがん幹細胞は組織幹細胞と似た性質を持つことが知られており、胃上皮細胞の限定的な脱分化を介した分化プログラムの転換が腸上皮化生のみならず胃がん発症にも関与することが推察される。しかしながら、この現象が実際に生体内で観察され得るかについての検討はこれまでされていなかった。

(2) CagA を強制発現した胃上皮培養細胞で CDX1 の異所性発現が観察される分子メカニズムは不明であった。CagA を胃上皮細胞に発現させると、本来、細胞膜上の E-cadherin と結合することで細胞膜に局在している Wnt

シグナル伝達分子 β -catenin の細胞核への移行が観察される。CDX1 は β -catenin の転写標的遺伝子であることから、CagA による Wnt/ β -catenin シグナルの異常な活性化が胃上皮細胞における CDX1 異所性発現の原因と考えられた。しかしながら、CagA がどのような分子機構で β -catenin の細胞核移行を誘起するのかについてはこれまで明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、上記背景をもとに、ピロリ菌 CagA が CDX1 異所性発現誘導を介して胃上皮細胞を限定的に脱分化することで胃がんを誘発するという仮説を立て、以下の2項目について明らかにすることを目指した。

- (1) 胃上皮細胞の限定的脱分化と胃発がんの関与
- (2) CagA 依存的な β -catenin 細胞核移行の分子機構

以上を明らかにすることを通して、*cagA* 陽性ピロリ菌感染を起点とした胃発がん分子機構の全容を解明することを最終的な目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 胃上皮細胞の限定的脱分化と胃発がんの関与

これまでに CagA を胃上皮の培養細胞に強制発現させると、CDX1 の発現が誘導されることが示されていた。そこで、当研究室で作製した、タモキシフェン処理によりピロリ菌病原因子 CagA を誘導発現できるトランスジェニックマウス(CagA-Tg マウス)を用いて、その胃上皮組織を解析した。生後6週の CagA-Tg マウスにタモキシフェンを処理し CagA を2か月誘導発現した後、CagA に付加した HA タグを免疫組織学的に検出する手法により、このマウスの胃上皮組織での CagA の発現領域を確認した。CagA 陽性領域を特定した後、その領域をヘマトキシリン・エオシン染色し、組織構造の評価を行った。さらに、Alucian Blue 染色、Tff2 および各種組織特異的 μ チンに対する抗体を用いた免疫組織染色を行い、その組織構造を化学的に解析した。CagA によって異所性発現が誘導されると期待される Cdx1、さらに幹細胞マーカー Lgr5 の発現を、*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて解析した。

(2) CagA 依存的な β -catenin 細胞核移行の分子機構

CDX1 は Wnt/ β -catenin の転写標的遺伝子である。これまでに、CagA を胃上皮細胞に強制的に発現させると、E-cadherin と結合して細胞膜に局在していた β -catenin が細胞核へ移行することが明らかになっていた。このことから、CagA は β -catenin の細胞核移行を介して胃上皮細胞に CDX1 を異所性に発現誘導しているというモデルが考えられた。E-cadherin は主に細胞間の接着を担う分子で、胃発がんとの関連が指摘されるタンパク質の一つであるが、胃上皮細胞内に侵入した CagA が E-cadherin に対して与える影響はほとんど知られていなかった。そこで、E-cadherin 発現細胞において CagA を強制発現し、特に他分子との相互作用に関わる E-cadherin の細胞内ドメインに着目し、その変化を免疫沈降法、ウエスタンブロッティング法、蛍光免疫染色法により解析した。

4. 研究成果

(1) 生後 6 週の CagA-Tg マウスにタモキシフェンを処理して CagA を誘導発現し、2 か月後の胃粘膜上皮を観察した。免疫組織染色により、胃体部周辺の胃上皮組織に CagA 陽性の腺管がまとまって存在する領域があることが示された。CagA 発現が確認された胃上皮組織の周辺では、正常な腺管に比較して構造が乱れ、異形な細胞が存在していることが明らかになった。この病変部において Alcian Blue 染色を行ったところ、その染色結果は陽性であった。さらに Tff2 発現細胞が存在することが免疫組織染色によって示された。このことから、この化生性の変化は幽門腺化生 (SPEM: spasmodic polypeptide expressing metaplasia) であると判断した。この化生領域において、胃上皮および腸上皮特異的な各種抗ムチン抗体を用いた免疫組織染色を行った。その結果、これらの領域では胃上皮特異的ムチンが産生されていないことが明らかになった一方、腸上皮特異的ムチンの産生も観察されなかった。以上のことから、現段階ではこの CagA 陽性の領域に腸上皮化生は起きていないと判断した。同じ領域において、Cdx1 および幹細胞マーカー Lgr5 の発現を *in situ* ハイブリダイゼーションを用いて解析したが、現段階では陽性の細胞は観察されなかった。

マウス胃上皮では幽門腺化生から腸上皮化生への進展が報告されている。今後引き続

きタモキシフェン処理後の CagA-Tg マウスの胃上皮を長期間段階的に観察することで、ピロリ菌 CagA に起因する Cdx1 の異所性発現誘導、さらには多段階発がんの様子が解析できると期待される。

(2) ヒト胃上皮由来 AGS 細胞を抗 E-cadherin 抗体を用いて免疫染色したところ、内因性 E-cadherin の発現は観察されなかった。そこで E-cadherin を AGS 細胞に強制発現させると、外因性の E-cadherin は正常な局在と考えられる細胞膜に均等に位置した。この細胞においてピロリ菌病原因子 CagA を発現させると、E-cadherin のリン酸化状態が著しく変化することが明らかになった。次に、その CagA 依存的な E-cadherin リン酸化量の変化を引き起こす分子メカニズムを明らかにするため、色々な分子との相互作用に必須な部位を変異・欠損させた種々の CagA 変異体を用いて解析を行った。E-cadherin を発現させた AGS 細胞に、各種変異体 CagA を導入したところ、CagA 依存的な E-cadherin のリン酸化量変化は CagA によって異常に活性が制御されることが知られる内因性ホスファターゼおよびキナーゼ両者の関与により引き起こされていることが明らかになった。CagA により修飾変化を起こす候補となるアミノ酸を置換した E-cadherin 変異体を用いた解析からは、CagA 依存的にリン酸化状態が変化している E-cadherin 細胞内ドメインのアミノ酸を複数同定することに成功した。それらのアミノ酸が位置する配列周辺は、E-cadherin の働きに重要な分子が相互作用するために必須な領域であった。このことから、そのリン酸化量の変化が E-cadherin と他分子との結合力、さらには E-cadherin の働きに影響を及ぼすことが示唆された。通常 E-cadherin は Wnt シグナル伝達分子 β -catenin を細胞膜近傍に留め置く働きを担うが、今後、この E-cadherin リン酸化状態の変化と β -catenin 細胞核移行の関与についてさらに解析を進める予定である。

本研究を通して、ピロリ菌病原因子 CagA を誘導発現したトランスジェニックマウスを用いた研究からは、CagA が胃上皮に前がん病変と考えられる化生性変化をもたらす能力を持つことを生体内で初めて明らかにした。この結果は、今後、胃の多段階発がんの経過と分子機構を解明する上で重要な知見の一つになると考える。また、胃発がん

の関連が指摘される分子の一つである E-cadherin において、その機能に重要な意義を持つと考えられる領域のリン酸化状態がピロリ菌 CagA により異常に調節されることを明らかにした。この結果は、CagA を起点とした未知の胃発がんメカニズムの解明につながる可能性がある。胃における腸上皮化生は、ほぼ全てピロリ菌感染を背景にして起こる。本研究の成果は胃がんの予防法を考えていく上で重要な意義を持つ。

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

5. 主な発表論文等

(研究代表者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

(1) Nobumi Suzuki, Naoko Murata-Kamiya, Kohei Yanagiya, Wataru Suda, Masahira Hattori, Hiroaki Kanda, Atsuhiko Bingo, Yumiko Fujii, Shin Maeda, Kazuhiko Koike & Masanori Hatakeyama Mutual reinforcement of inflammation and carcinogenesis by the Helicobacter pylori CagA oncoprotein. *Scientific Reports* 5, 10024 (2015) pp1-14 査読有
DOI: 10.1038/srep10024

〔学会発表〕(計1件)

(1)柳谷公平、藤井裕美子、神田浩明、畠山昌則、Spasmolytic polypeptide expressing metaplasia (SPEM) induced in mouse stomach by Helicobacter pylori CagA、第73回日本癌学会学術総会、2014年9月25日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

〔図書〕(計0件)

〔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

6. 研究組織

(1)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・特任助教

研究者番号: 30722334