

Helicobacter pylori 病原因子 CagA による 胃上皮細胞内情報伝達系攪乱に関する研究

学位論文内容の要旨

Helicobacter pylori (*H. pylori*) はヒト胃粘膜に感染する螺旋状短幹菌であり、その持続感染は消化性潰瘍、萎縮性胃炎さらには胃癌等の胃粘膜病変発症と強い相関が報告されている。特に *H. pylori* がもつ病原遺伝子の1つである *cagA* 遺伝子を保持する菌株の感染は、疫学的に悪性度の高い胃病変発症との強い相関が知られている。しかし、*cagA* 陽性 *H. pylori* による胃粘膜病変発症の分子機構は未だ明らかになっていない。

cagA 遺伝子産物である CagA は *H. pylori* 菌株間で配列の差異をもつ 120-145kDa のタンパク質で、その C 端側に EPIYA モチーフと呼ばれる特徴的な配列を含む繰り返し配列が存在する。*cagA* 陽性 *H. pylori* は胃上皮細胞に接着した際、菌体内で産生した CagA を IV 型分泌機構と呼ばれる注射針状の分子集合体を用いて宿主細胞内に直接注入する。細胞内に侵入した CagA は細胞膜直下に局在し、内在性 Src ファミリーチロシンキナーゼ (SFK) により EPIYA モチーフ内のチロシン残基がリン酸化を受ける。

培養細胞に *cagA* 陽性 *H. pylori* を感染させると細胞増殖因子刺激時に見られる形態変化に類似した、ハミングバード表現型と呼ばれる形態変化が誘導される。したがって、リン酸化された CagA は宿主細胞において細胞増殖因子刺激様のシグナルを発生させることが推察され、*cagA* 陽性 *H. pylori* は CagA 依存的な宿主細胞内情報伝達系の脱制御を介して、胃癌をはじめとする種々の胃粘膜病変を引き起こす可能性が示唆された。そこで、本研究ではリン酸化 CagA により脱制御される宿主細胞内情報伝達経路を探索し、CagA の生物学的機能を検討した。

第1章では CagA が細胞増殖や細胞運動を正に制御する事が知られている細胞内チロシンホスファターゼ SHP-2 と複合体を形成することを示した。この CagA-SHP-2 複合体形成はリン酸化チロシン-SH2 ドメイン間相互作用を介して行われていた。また、CagA との複合体形成により SHP-2 のホスファターゼ活性が亢進することを明らかにした。さらに、ハミングバード表現型の誘導は CagA との複合体形成による SHP-2 の活性化および細胞膜への局在化に依存する。ハミングバード表現型の誘導は Ras 非依存的である一方、MAPK 活性に依存していることを示し、CagA が Erk1/2 の持続的活性化を引き起こすことを明らかにした。

第2章では CagA が SFK の制御を行う事が知られている細胞内チロシンキナーゼ Csk と複合

体を形成し、そのチロシンキナーゼ活性を亢進することを示した。また、CagA は異なる部位を用いて SHP-2 あるいは Csk と複合体を形成することを明らかにした。さらに、CagA により活性化した Csk が細胞内 SFK を不活化することを示し、アポトーシスなどの細胞傷害を引き起こす CagA-SHP-2 経路に対して、CagA-Csk 経路がネガティブフィードバック機構を構成している可能性を示した。

第3章では CagA が SHP-2 依存的に、細胞接着や細胞運動の制御に重要な役割を担うチロシンキナーゼ FAK のチロシンリン酸化レベルを低下させることを示した。また、FAK が SHP-2 の基質分子であることを示し、CagA により活性化した SHP-2 が FAK を直接脱リン酸化し、FAK のキナーゼ活性を顕著に抑制することを示した。さらに、この FAK キナーゼ活性の低下がハミングバード表現型の誘導において重要な役割を果たすことを明らかにした。ハミングバード表現型を示す細胞において、脱リン酸化を免れた活性化型 FAK が細胞質の突起の先端部分に集積していることを明らかにした。

以上、本研究により CagA の標的分子として SHP-2 および Csk が見出され、CagA が宿主細胞に示す生物学的機能の解明に向けて新たな知見が得られた。さらに、CagA が宿主細胞に増殖因子刺激様形態変化を誘導する際に引き起こされる細胞内情報伝達系攪乱の分子機構が明らかとなった。また、SHP-2-FAK 経路の存在が明らかとなり、細胞接着、細胞運動の制御機構における新たな知見が得られた。

CagA による胃上皮細胞情報伝達機構の脱制御は正常な胃粘膜構造の破壊を引き起こす可能性が考えられ、*cagA* 陽性 *H. pylori* が引き起こす強い胃粘膜病変の発症に寄与していることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 畠 山 昌 則
副 査 教 授 菊 池 九 二 三
副 査 教 授 矢 澤 道 生
副 査 教 授 坂 口 和 靖
副 査 教 授 及 川 英 秋

学 位 論 文 題 名

Helicobacter pylori 病原因子 CagA による 胃上皮細胞内情報伝達系攪乱に関する研究

Helicobacter pylori (*H. pylori*) はヒト胃粘膜に感染し、胃癌をはじめとする様々な胃粘膜病変を引き起こす。特に *H. pylori* 病原遺伝子の1つである *cagA* 遺伝子を保持する菌株は病原性が高く胃癌との密接な関連が報告されている。*cagA* 陽性 *H. pylori* は胃上皮細胞に接着した際、菌体内で産生した CagA を宿主細胞内に直接注入することから、CagA が宿主細胞において宿主細胞内情報伝達系の脱制御し、胃癌発症にいたる種々の胃粘膜病変を引き起こす可能性が示唆された。申請者は、これまで不明であった *H. pylori* CagA が標的とする宿主胃上皮細胞内情報伝達経路の探索に取り組み、病原因子としての CagA の生物学的役割を検討した。本論文は、筆者が解明した CagA による胃上皮細胞内細胞情報伝達系攪乱の分子機構に関して述べたものである。

第1章では、CagA が細胞増殖や細胞運動を正に制御する事が知られている細胞内チロシンホスファターゼ SHP-2 と複合体を形成することを示した。この CagA-SHP-2 複合体形成はリン酸化チロシン-SH2 ドメイン間相互作用を介して行われていた。また、CagA との複合体形成により SHP-2 のホスファターゼ活性が亢進することを明らかにした。さらに、細胞の著しい伸長で特徴づけられるハミングバード表現型の誘導は CagA との複合体形成を介した SHP-2 の活性化および細胞膜への局在化に依存することを示した。ハミングバード表現型の誘導は Ras 非依存的である一方、Erk MAP キナーゼ経路に依存し、CagA が Erk1/2 の持続的活性化を引き起こすことを明らかにした。

第2章では、CagA が Src ファミリーキナーゼ (SFK) の活性制御を担うことが知られている細胞内チロシンキナーゼ Csk と複合体を形成し、そのキナーゼ活性を亢進することを示した。また、CagA は異なるチロシンリン酸化部位を用いて SHP-2 あるいは Csk と複合体を形成することを明らかにした。さらに、CagA により活性化した Csk が細胞内 SFK を不活化することを示し、過剰な持続的活性化がアポトーシスなどの細胞傷害を引き起こす CagA-SHP-2 経路に対して、CagA-Csk 経路がネガティブフィードバック機構を構成している可能性を示した。

第3章では、CagA が SHP-2 依存的に、細胞接着や細胞運動の制御に重要な役割を担うチロシンキナーゼ FAK のチロシンリン酸化レベルを低下させることを明らかにした。また、FAK が SHP-2 の基質分子であることを示し、CagA により活性化した SHP-2 が FAK を直接脱リン酸化し、FAK のキナーゼ活性を顕著に抑制することを見出した。さらに、この FAK キナーゼ活性の低下がハミングバード表現型の誘導において重要な役割を果たすことを明らかにした。ハミングバード表現型を示す細胞において、脱リン酸化を免れた活性化型 FAK が細胞質の伸長突起先端部分に集積していることを見出した。

以上、本研究により CagA の宿主胃上皮細胞内標的分子として SHP-2 および Csk が世界に先駆けて見出され、*H. pylori*-宿主細胞間相互作用理解に向けてのまったく新たな知見が得られた。さらに、エフェクター経路としての CagA-SHP-2-FAK 経路ならびにフィードバック制御経路としての CagA-Csk 経路など、CagA が胃上皮細胞内において引き起こす情報伝達系攪乱の分子機構が明らかとなった。本研究から得られたこれらの一連の知見は、複数の権威ある国際学術雑誌に発表され既に高い評価を得ており、*cagA* 陽性 *H. pylori* の感染により惹起される胃癌をはじめとする様々な胃粘膜病変発症の分子機構の解明に貢献するところがきわめて大きい。

よって著者は北海道大学博士(理学)の学位を授与される資格あるものと認める。