

学位論文題名

Functional antagonism between *Helicobacter pylori* CagA and vacuolating toxin VacA in control of the NFAT signaling pathway in gastric epithelial cells

(胃上皮細胞のNFATシグナル伝達系に対するヘリコバクターピロリ病原因子CagAと空胞化毒素VacAの機能的拮抗作用)

学位論文内容の要旨

背景と目的

Helicobacter pylori (*H. pylori*) 感染と胃炎、消化性潰瘍、胃癌等の胃における多様な病態との関連性は、臨床統計をはじめとした多くの研究報告により明らかにされてきた。特に、*cagA* 陽性 *H. pylori* は強い胃粘膜障害を惹起し、CagA タンパク質は *H. pylori* 病原因子の一つとして考えられている。さらに、臨床疫学的な研究から *cagA* 陽性 *H. pylori* の感染と胃癌発症の間に強い関連性があることが示され、CagA が有する病原生物活性の解明は、胃癌の発生、進展の解明のみならず胃癌の予防や治療法の開発においてもきわめて重要な意義を有すると考えられる。本研究では、CagA を異所性発現させた胃上皮細胞の遺伝子発現プロファイル解析を通して、CagA が攪乱する未知の細胞内シグナル伝達系を同定し、*cagA* 陽性 *H. pylori* による胃粘膜障害機構、胃癌発症機構を明かにすることを目的とした。

方法

遺伝子発現プロファイルの解析：ヒト胃上皮細胞株 AGS に *H. pylori* NCTC11637 株由来 *cagA* 遺伝子を一過性導入し、CagA タンパク質を異所性発現させた。*cagA* 導入細胞より抽出した RNA を用い、GeneChip Human Genome Focus Array (Affymetrix 社) により 8500 の既知の遺伝子に対する CagA 発現依存的な mRNA 発現量の変動の有無を解析した。*cagA* 遺伝子導入 12 時間後の時点で mRNA 発現の増加が認められた 71 遺伝子について、プロモーター/エンハンサー領域を含むと考えられる転写開始点より上流 1000 ベースペアまでの塩基配列内における既知の転写因子結合配列を検索した。無作為に抽出した同数のコントロール遺伝子セットと比較し、CagA 発現により mRNA の増加を示した 71 遺伝子の転写開始点 5' 上流領域に有意に多く存在する結合配列を検索した。

luciferase assay : CagA による NFAT 依存的な転写活性の変化を検証するため、NFAT 結合配列をもつ luciferase reporter plasmid (pNFAT-Luc) を用い luciferase assay を施行した。

細胞免疫染色ならび Electrophoretic Mobility Shift Assay(EMSA) : CagA 発現による

NFATc3 (胃細胞に発現する主要な NFAT 分子種) の細胞内局在の変化を抗 NFATc3 抗体による細胞免疫染色ならびにヒト *interleukin-2* 遺伝子プロモーター内 NFAT 結合配列をプローブとした核抽出液の EMSA 解析により検討した。

CagA と VacA の機能的相互作用: AGS を 2.5 μ g/ml (空胞化を起こさない濃度) の組み換え型 VacA (s1/ml) に暴露し、NFAT 活性に対する CagA と VacA の機能的相互作用を検討した。

結果

1. CagA による遺伝子発現プロファイルの変化: CagA 発現細胞における mRNA の発現量の変化を解析した結果、CagA は胃上皮細胞において NFAT 依存的な転写を活性化していることが示唆された。
2. CagA による NFAT 依存的な転写の活性化: *cagA* 導入 AGS 細胞において pNFAT-Luc を用い luciferase reporter assay を行った結果、CagA 発現によって NFAT 依存的な転写が活性化することが明らかになった。
3. *cagA* 陽性 *H. pylori* 感染による NFAT の活性化: *cagA* 陽性 *H. pylori* を AGS 胃上皮細胞に感染させ NFAT の活性化を検証した。その結果、感染により *H. pylori* から細胞内に直接注入された CagA 分子も、*cagA* 遺伝子異所性発現とまったく同様に NFAT を活性化することが示された。
4. CagA による NFAT の核内移行: NFAT は通常不活性型として細胞質に存在し、calcineurin により脱リン酸化されることで核内移行し、NFAT 標的遺伝子の転写を活性化する。細胞免疫染色ならびに EMSA の結果から、CagA はリン酸化非依存的に NFATc3 を細胞質から核内に移行させることが明らかとなった。
5. CagA による PLC γ -calcineurin 依存的な NFAT の活性化: calcineurin の特異的阻害剤である Cyclosporin A あるいは PLC γ の特異的阻害剤である U73122 によって、CagA の NFAT 活性化ならびに NFATc3 の核内移行は抑制された。したがって、CagA はリン酸化非依存的に PLC γ もしくはその上流分子に作用し、Ca²⁺ 依存的な calcineurin 活性化を介して NFAT の核内移行ならびに NFAT 依存的転写活性化を引き起こす可能性が示唆された。
6. CagA 依存的 NFAT 活性化に対する VacA の影響: NFAT 活性に対する CagA と VacA の機能的相互作用を luciferase assay および細胞免疫染色で検証した。その結果、CagA による NFAT 依存的な転写活性化は低濃度の VacA 暴露下により抑制され、NFATc3 の CagA による核内移行も阻害した。以上のことから VacA は NFAT に対して抑制的に働くことが示された。

まとめ

H. pylori 病原因子 CagA は、胃上皮細胞内でチロシンリン酸化非依存的に NFAT の核内移行ならびに NFAT 標的遺伝子の転写活性化を誘導することが明らかとなった。さらに、*H. pylori* が保有する主要毒素である VacA は胃上皮細胞内での CagA 依存的な NFAT 活性化を抑制することが示された。以上の結果から、胃上皮細胞の NFAT 活性に対し CagA と VacA は拮抗的な関係にあり、CagA 優勢の状況下では NFAT 核内移行を介して *p21* 転写に代表される NFAT 依存的転写を誘導し、細胞増殖の抑制あるいはアポトーシスを引き起こすこ

とが予想される。一方、VacA 優勢の状況下では NFAT の CagA 依存的活性化が抑制される一方、チロシンリン酸化依存的な CagA 活性 (SHP-2-MAP キナーゼ経路の活性化など) は保持される結果、脱制御された細胞増殖が誘導されることが示唆される。個々の胃上皮細胞に作用する CagA と VacA の相対的濃度により、細胞内 NFAT 活性の脱制御の方向 (正あるいは負) と程度が決定され、その結果、胃潰瘍や胃癌に向かう多彩な胃粘膜病変が惹起されるものと推察される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 今 村 雅 寛
副 査 教 授 守 内 哲 也
副 査 教 授 近 藤 哲
副 査 教 授 畠 山 昌 則

学 位 論 文 題 名

Functional antagonism between *Helicobacter pylori* CagA and vacuolating toxin VacA in control of the NFAT signaling pathway in gastric epithelial cells

(胃上皮細胞の NFAT シグナル伝達系に対するヘリコバクターピロリ
病原因子 CagA と空胞化毒素 VacA の機能的拮抗作用)

Helicobacter pylori (*H. pylori*) 感染と胃における多様な病態との関連性は、臨床統計をはじめとした多くの研究報告により明らかにされてきた。特に、*cagA* 陽性 *H. pylori* は強い胃粘膜障害を惹起し、CagA タンパク質は *H. pylori* 病原因子の一つとして考えられている。そのため、CagA が有する病原生物活性の解明は、胃癌の発生、進展の解明のみならず胃癌の予防や治療法の開発においても極めて重要な意義を有すると考えられる。本研究では、CagA を異所性発現させた胃上皮細胞の遺伝子発現プロファイル解析を通して、CagA が攪乱する未知の細胞内シグナル伝達系を同定し、*cagA* 陽性 *H. pylori* による胃粘膜障害機構、胃癌発症機構を明らかにすることを目的とした。

遺伝子発現プロファイルの解析：ヒト胃上皮細胞株 AGS に *H. pylori* NCTC11637 株由来 *cagA* 遺伝子を一過性導入し、CagA タンパク質を異所性発現させた。*cagA* 導入細胞より抽出した RNA を用い、GeneChip Human Genome Focus Array (Affymetrix 社) により 8500 の既知の遺伝子に対する CagA 発現依存的な mRNA 発現量の変動の有無を解析した。*cagA* 遺伝子導入 12 時間後の時点で mRNA 発現の増加が認められた 71 遺伝子について、プロモーター / エンハンサー領域を含むと考えられる転写開始点より上流 1000bp までの塩基配列内における既知の転写因子結合配列を検索した。

Luciferase assay : CagA による NFAT 依存的な転写活性の変化を検証するため、NFAT 結合配列をもつ luciferase reporter plasmid を用い luciferase assay を施行した。

細胞免疫染色および Electrophoretic Mobility Shift Assay(EMSA) : CagA 発現による NFATc3 (胃細胞に発現する主要な NFAT 分子種) の細胞内局在の変化を抗 NFATc3 抗体による細胞免疫染色ならびにヒト *interleukin-2* 遺伝子プロモーター内 NFAT 結合配列をプロ

ープとした核抽出液の EMSA 解析により検討した。

CagA と VacA の機能的相互作用： AGS を 2.5 μ g/ml (空胞化を起こさない濃度) の組み換え型 VacA に暴露し、NFAT 活性に対する CagA と VacA の機能的相互作用を検討した。

その結果、①胃上皮細胞の CagA による遺伝子発現プロファイルの変化を解析したところ、CagA は胃上皮細胞において NFAT 依存的な転写を活性化していた。②cagA 導入 AGS 細胞において pNFAT-Luc を用い luciferase reporter assay を行ったところ、CagA 発現によって NFAT 依存的な転写が亢進した。③cagA 陽性 *H. pylori* を AGS 胃上皮細胞に感染させると、*H. pylori* から細胞内に直接注入された CagA 分子も、cagA 遺伝子異所性発現とまったく同様に NFAT を活性化した。④NFAT は通常不活性型として細胞質に存在し、calcineurin により脱リン酸化されることで核内移行し、NFAT 標的遺伝子の転写を活性化する。細胞免疫染色ならびに EMSA の結果から、CagA はリン酸化非依存的に NFATc3 を細胞質から核内に移行させることが明らかとなった。⑤calcineurin の特異的阻害剤である Cyclosporin A あるいは PLC γ の特異的阻害剤である U73122 によって、CagA の NFAT 活性化ならびに NFATc3 の核内移行は抑制された。したがって、CagA はリン酸化非依存的に PLC γ もしくはその上流分子に作用し、Ca²⁺依存的な calcineurin 活性化を介して NFAT の核内移行ならびに NFAT 依存的転写活性化を引き起こすことが示唆された。⑥NFAT 活性に対する CagA と VacA の機能的相互作用を検証した結果、CagA による NFAT 依存的な転写活性化は低濃度の VacA 暴露により抑制され、NFATc3 の CagA による核内移行も阻害された。以上のことから、VacA は NFAT に対して抑制的に働くことが示された。

H. pylori 病原因子 CagA は、胃上皮細胞内でチロシンリン酸化非依存的に NFAT の核内移行ならびに NFAT 標的遺伝子の転写活性化を誘導することが明らかとなった。さらに、*H. pylori* が保有する主要毒素である VacA は胃上皮細胞内での CagA 依存的な NFAT 活性化を抑制することが示された。以上の結果から、胃上皮細胞の NFAT 活性に対し CagA と VacA は拮抗的な関係にあり、CagA 優勢の状況下では NFAT 核内移行を介して p21 転写に代表される NFAT 依存的転写を誘導し、細胞増殖の抑制あるいはアポトーシスを引き起こすことが予想される。一方、VacA 優勢の状況下では NFAT の CagA 依存的活性化が抑制されるが、チロシンリン酸化依存的な CagA 活性は保持される結果、脱制御された細胞増殖の誘導がなされる。個々の胃上皮細胞に作用する CagA と VacA の相対的濃度により、細胞内 NFAT 活性の脱制御の方向 (正あるいは負) と程度が決定され、その結果、胃潰瘍や胃癌に向かう多彩な胃粘膜病変が惹起されるものと推察される。

口頭発表において、副査守内哲也教授より、①NFAT より存在頻度の高い Ik-2 の関与、②ゲルシフトアッセイで抗 NFATc3 抗体によるスーパーシフトが認められない理由、③*H. pylori* 感染時 CagA による p21 転写活性亢進の継続性、④発癌との関連で幹細胞レベルでの増殖の亢進と DNA 障害の蓄積をみているが CagA による個々の細胞の変化を調べる意義、⑤NFAT の他の標的について質問があった。続いて、副査近藤 哲教授より、萎縮性胃炎と CagA の関与について、副査島山昌則教授より、CagA の PLC γ 活性化機構について質問があった。最後に、主査今村雅寛教授より、CagA と VacA の二つの拮抗するシグナルと発癌の関係、およびその適切な実験系について質問があったが、いずれの質問に対しても、申請者は主旨をよく理解し自らの研究データと文献的考察を混じえて適切な回答をした

胃上皮細胞に作用する CagA と VacA の相対的濃度により、細胞内 NFAT 活性の脱制御の

方向と程度が決定され、多彩な胃粘膜病変が惹起されることを明らかにした本研究の意義は高く、審査員一同協議の結果、申請者が博士（医学）の学位授与に値するものと判定した。