

学 位 論 文 題 名

Helicobacter pylori CagA による
上皮細胞極性破壊と細胞癌化に関する研究

学位論文内容の要旨

Helicobacter pylori (*H. pylori*) はヒト胃粘膜上皮に感染する微好気性グラム陰性のらせん状短桿菌であり、胃癌をはじめとする胃粘膜病変の発症に深く関わっている。*H. pylori* は *cagA* 遺伝子を持つ株と持たない株に大別され、*cagA* 陽性 *H. pylori* 株は *cagA* 陰性 *H. pylori* 株よりも強い病原性を有する。*cagA* 陽性 *H. pylori* は菌体内において CagA タンパク質を産生し、産生された CagA は注射器様の IV 型分泌機構を介してヒト胃上皮細胞に侵入する。胃上皮細胞に侵入した CagA は Src ファミリーキナーゼならびに Abl キナーゼによりリン酸化される。

CagA は分子量 120~130 kDa のタンパク質であり、C 末端側にグルタミン酸-プロリン-イソロイシン-チロシン-アラニンからなる EPIYA モチーフを複数個持ち、このモチーフ内のチロシンがリン酸化される。さらに、CagA の C 末端部位には EPIYA モチーフ近傍のアミノ酸配列の違いから、A、B、C、D の 4 つの EPIYA フラグメントが同定される。CagA には地域的な分子多型が存在し、胃癌の発症率が比較的低い欧米諸国より単離される *H. pylori* 株では EPIYA フラグメント-ABC から構成される CagA を保有するのに対し、胃癌の発症率が極めて高い東アジア諸国より単離される *H. pylori* 株では EPIYA フラグメント-ABD から構成される CagA を有する。

CagA は胃上皮細胞内に侵入後、様々な細胞内タンパク質と相互作用することにより細胞内シグナル伝達を攪乱・脱制御する。当研究室では、CagA が多様な体細胞に広く発現している癌タンパク質 SHP-2 と結合することにより、その機能を脱制御し、Ras/MAPK 経路を異常に活性化することを明らかにしている。また、CagA は細胞極性制御因子である PAR1/MARK と相互作用し、PAR1 のキナーゼ活性を抑制することにより、胃上皮細胞のタイトジャンクションや上皮細胞極性（頂端側-基底側極性）を破壊することを明らかにした。

上皮細胞極性は発癌を抑制する働きを持つことが示唆されている。さらに、上皮細胞の癌化には上皮細胞極性の破壊が常に伴うことから、CagA による上皮細胞極性の破壊が胃上皮細胞の癌化における多段階的発癌分子機構の一端を担っていることが推察される。そこで、本研究では、CagA による上皮極性破壊が細胞の癌化、特に、細胞増殖シグナルに対しどのような役割を果たすかを検討した。なお、本論文で「極性化」とは「頂端側-基底側極性」を形成することを意味し、この頂端側-基底側極性を形成していない状態を

‘非極性化’と表記している。

第1章では、上皮細胞極性を形成していない（非極性化）上皮細胞において CagA が Erk シグナルに依存してサイクリン依存性キナーゼ（CDK）阻害分子である p21^{Waf1/Cip1}（以下 p21）の蓄積を引き起こし、早期細胞老化を誘導することを示す。ヒト胃上皮由来細胞株 MKN28 細胞を用いて CagA を誘導発現する細胞株 WT-A10 細胞株を樹立し、CagA 発現が Erk シグナルを異常に亢進すること、さらに、この Erk シグナルに依存して p21 が細胞内に蓄積することを見出した。また、CagA により誘導・蓄積した p21 は細胞周期を G1 期に停止させるとともに、早期細胞老化を誘導することを明らかにした。

第2章では、生体内の胃上皮細胞と同様な頂端側-基底側極性を形成している（極性化）上皮細胞において、CagA が細胞増殖を亢進することを示す。極性化上皮細胞では CagA が Erk 依存的に細胞増殖を亢進すること、ならびに極性化上皮細胞では CagA は p21 を誘導しないことを見出した。また、Erk 依存的 p21 の蓄積は上皮細胞極性によって制御されていることを示した。

第3章では、極性化上皮細胞において CagA は低分子量 G タンパク質である RhoA を活性化し、Erk 依存的 p21 誘導を抑制していることを示す。非極性化上皮細胞に発現させた CagA は RhoA を活性化しなかったのに対し、極性化上皮細胞では CagA が RhoA を活性化することを明らかにした。

第4章では、極性化上皮細胞において CagA による RhoA 活性化の責任分子が RhoA 特異的 GDP/GTP 交換因子（GEF）の GEF-H1 であることを示す。極性化上皮細胞では GEF-H1 はタイトジャンクションに集積し、そこで、GEF 活性抑制因子である cingulin と複合体を形成し、不活性化されている。極性化上皮細胞に発現した CagA は GEF-H1 を cingulin から解離させ、GEF-H1 を活性化していることを見出した。上皮細胞極性を強制的に破壊することによっても GEF-H1/cingulin 複合体の解離が引き起こされることから、CagA は上皮細胞極性破壊を通じて GEF-H1 を活性化することが示唆された。さらに、CagA は PAR1 を介して GEF-H1 と複合体を形成し、上皮細胞極性依存的に GEF-H1 を持続的に活性化していることを明らかにした。

第5章では、CagA による RhoA 活性化を介した p21 蓄積の抑制分子機構を示す。RhoA はその下流に位置する Rho キナーゼ ROCK を介して c-Myc を活性化し、p21 の翻訳抑制を担う microRNA（miR-17 および miR-20a）の発現を上昇させることを見出した。miR-17 および miR-20a の microRNA が上皮細胞極性依存的な p21 制御に重要な役割を担うことを明らかにした。

以上、本研究では上皮細胞極性に焦点をあて、CagA による細胞癌化の分子機構の一端を解明した。早期細胞老化は異常な細胞増殖を抑制し、生体内においても観察される癌抑制機構であるが、CagA は早期細胞老化を回避するため、上皮細胞極性を巧みに利用し細胞増殖を亢進させることが明らかとなった。したがって、CagA による上皮細胞極性の破壊は胃上皮細胞の癌化に重要な役割を担うと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 坂 口 和 靖

副 査 教 授 村 上 洋 太

副 査 教 授 高 岡 晃 教

副 査 教 授 石 森 浩一郎

副 査 教 授 畠 山 昌 則 (東京大学大学院

医学系研究科)

学 位 論 文 題 名

Helicobacter pylori CagA による

上皮細胞極性破壊と細胞癌化に関する研究

Helicobacter pylori (*H. pylori*) はヒト胃粘膜上皮に感染する微好気性グラム陰性のらせん状短桿菌であり、胃癌をはじめとする胃粘膜病変の発症に深く関わっている。*H. pylori* は *cagA* 遺伝子を持つ株と持たない株に大別され、*cagA* 陽性 *H. pylori* 株は *cagA* 陰性 *H. pylori* 株よりも強い病原性を有する。*cagA* 陽性 *H. pylori* は菌体内において CagA タンパク質を産生し、産生された CagA は IV 型分泌機構を介してヒト胃上皮細胞に侵入する。侵入した CagA は Src ファミリーキナーゼなどによってチロシンリン酸化される。

CagA はチロシンリン酸化依存적もしくは非依存的に細胞内タンパク質と相互作用し、細胞内シグナル伝達を攪乱・脱制御する。CagA はリン酸化依存的に癌タンパク質 SHP-2 と結合し、その機能的脱制御により Erk を異常に活性化する。また、CagA はリン酸化非依存的にセリン・スレオニンキナーゼである PAR1 と結合し、PAR1 のキナーゼ活性を抑制し、胃上皮細胞の上皮細胞極性（頂端側-基底側極性）を破壊する。

上皮細胞極性と細胞増殖は密接に関わっていることが示唆されている。よって、CagA による上皮細胞極性の破壊が胃上皮細胞の癌化における多段階的発癌分子機構の一端を担っていることが推察された。本論文は、CagA による上皮極性破壊が細胞の癌化、特に、細胞増殖に対する影響を検討したものである。

第 1 章では、通常の培養細胞における CagA 発現が Erk を活性化し、この Erk 活性化に依存して、サイクリン依存性キナーゼ阻害分子である p21^{Waf1/Cip1} (以下 p21) の蓄積を引き起こし、早期細胞老化を誘導することを示した。

第2章では、生体内の胃上皮細胞と同様な頂端側-基底側極性を形成している（極性化）上皮細胞において CagA を発現させると、p21 を蓄積することなく、Erk 依存的に細胞分裂を亢進することを示した。また、Erk 依存的な p21 の蓄積は上皮細胞極性によって制御されていることを見出した。

第3章では、極性化上皮細胞に発現させた CagA が低分子量 G タンパク質である RhoA を活性化し、極性依存的に p21 蓄積を抑制していることを示した。

第4章では、CagA による極性依存的な RhoA の活性化の責任分子が RhoA 特異的 GDP/GTP 交換因子（GEF）である GEF-H1 であることを示した。極性化上皮細胞では GEF-H1 はタイトジャンクションに集積し、そこで、GEF 活性抑制因子である cingulin と複合体を形成し、不活性化されている。極性化上皮細胞に発現させた CagA は上皮細胞極性破壊により、GEF-H1 を cingulin から解離させ、GEF-H1 を活性化していることを見出した。さらに、CagA は PAR1 を介して GEF-H1 と複合体を形成し、上皮細胞極性依存的に GEF-H1 を持続的に活性化していることを明らかにした。

第5章では、CagA による RhoA 活性化を介した p21 蓄積の抑制分子機構を示した。活性化 RhoA は Rho キナーゼ ROCK を介して c-Myc を活性化し、p21 の翻訳抑制を担う microRNA（miR-17 および miR-20a）の発現を上昇させることを見出した。これらの microRNA が上皮細胞極性依存的な p21 制御に重要な役割を担うことを明らかにした。

早期細胞老化は異常な細胞増殖を抑制する生体内においても観察される癌抑制機構であるが、CagA はこの早期細胞老化を回避するため、上皮細胞極性を巧みに利用し、細胞分裂を亢進させることが示唆された。したがって、CagA による上皮細胞極性の破壊は胃上皮細胞の癌化に重要な役割を担うことが考えられる。

これを要するに、著者は、本論文にて上皮細胞極性と細胞増殖を繋ぐ一連のシグナル伝達系を初めて明らかにしており、癌タンパク質 CagA がこの新たなシグナル伝達系を利用し、胃上皮細胞の細胞分裂を亢進することを明らかにした。この成果は権威ある国際学術雑誌 The Journal of Experimental Medicine に報告しており、*H. pylori* CagA による胃癌発症機序の解明に貢献するのみならず、上皮細胞極性と細胞増殖を繋ぐ新たなシグナル伝達系は上皮細胞極性を有する全ての上皮細胞の癌化の解明に貢献するところ大なるものがある。

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。