

学位論文題名

Helicobacter pylori stimulates epithelial cell migration via
CagA-mediated perturbation of host cell signaling

(ヘリコバクター・ピロリはCagAを介した宿主細胞内シグナル伝達の
攪乱により細胞運動性を増強する)

学位論文内容の要旨

【背景・目的】 *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)感染は、胃癌をはじめとする胃・十二指腸粘膜病変に関連する微好気性のグラム陰性らせん状桿菌である。なかでも CagA タンパク質を産生する *cagA* 陽性 *H. pylori* は激しい萎縮性胃炎を引き起こし、胃癌発症の危険率を有意に高める。*H. pylori* の菌体内で産生された CagA は、IV 型分泌装置を介して胃上皮細胞内に侵入した後、分子内の Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) モチーフがチロシンリン酸化をされる。チロシンリン酸化された CagA は Src homology 2-containing protein tyrosine phosphatase-2 (SHP2) と特異的に結合し、そのホスファターゼ活性を脱制御することにより細胞増殖・細胞運動の異常を引き起こす。一方、CagA はその-COOH 末側に存在する CagA 多量体化(CM)配列を介して partitioning-defective 1 (PAR1) とリン酸化非依存的に結合し、そのキナーゼ活性を抑制することにより上皮細胞極性を破壊する。本研究では、*cagA* 陽性 *H. pylori* の病原性における CagA-SHP2 相互作用と CagA-PAR1 相互作用の役割を解明することを目的に、相同組換えを用いてゲノム背景の均一な *H. pylori cagA* 変異株(isogenic 株)を作製し、胃上皮細胞株への感染実験を通してその病原生物活性を検討した。

【方法・材料】

Isogenic *H. pylori* 株の作製: natural transformation 法を用いて、*H. pylori* NCTC11637 株の *cagA* 遺伝子の相同組換えを行った。

H. pylori 感染実験: ヒト胃上皮細胞由来 AGS 細胞に NCTC11637 株ならびにその isogenic *H. pylori* 株を感染させた。

免疫沈降実験: *H. pylori* を感染させた AGS 細胞より細胞抽出液を調整し、抗 CagA 抗体を用いて免疫沈降を行った。続いて、細胞抽出液及び免疫沈降物を用いて SDS-PAGE 及び免疫ブロットを行った。

細胞運動能の解析: 高密度培養した AGS 細胞に *H. pylori* を感染させ、Wound healing assay を行った。

【結果】

1. Isogenic *H. pylori* 株の樹立

CagA の EPIYA 含有領域は、EPIYA モチーフ周辺のアミノ酸の違いから A, B, C, D の 4 種類のセグメントに区別され、個々の *H. pylori* 菌株で産生される CagA 分子内のこれらのセグメントの組み合わせに多様性が認められる。16 アミノ酸から構成される CM 配列は、C セグメント内ならびに EPIYA 含有領域の-COOH 末側下流に存在する。このため、*H. pylori* NCTC11637 株由来の CagA (ABCCC)は 4 つの CM 配列を保有するのに対し、F32 株由来の CagA (ABD)は CM 配列を 1 つだけ保有する。本研究では、形質転換効率の高い NCTC11637 株を用い、NCTC11637 株が保有する *cagA* 遺伝子内の EPIYA 含有領域(ABCCC)をコードする塩基配列を F32 株由来の相同部位(ABD)をコードする塩基配列に置換し、ABD 型の野生型 CagA (wt-CagA) 発現株を樹立した。次にこの株を用いて、EPIYA モチーフのチロシン残基をアラニン残基に置換したリン酸化耐性型 CagA (PR-CagA) 発現株ならびに CM 配列を欠失させた変異型 CagA (CagA-ΔCM) 発現株を樹立した。

2. Isogenic *H. pylori* 株の基本的性質の評価

NCTC11637 株ならびに作製した isogenic *H. pylori* 株の増殖速度は、菌株間で差がみられなかった。さらに、*H. pylori* 感染細胞に特異的にみられる細胞空胞化は、NCTC11637 株と同様に isogenic *H. pylori* 株の感染でも観察された。以上のことから、ゲノムの相同組換えが isogenic *H. pylori* 株の基本的性質に影響を与えないことを確認した。

3. CagA-SHP2 相互作用と CagA-PAR1 相互作用の解析

AGS 細胞に isogenic *H. pylori* 株を感染させ、免疫沈降実験を行った。その結果、細胞内に注入された CagA がリン酸化依存的に SHP2 と結合することに加え、リン酸化非依存的に CM 配列を介して PAR1 と結合することが示された。

4. Isogenic *H. pylori* 株が示す病原生物活性の解析

H. pylori 感染における CagA-SHP2 相互作用ならびに CagA-PAR1 相互作用の病原生物活性を明らかにするため、isogenic *H. pylori* 株感染が胃上皮細胞の細胞運動能に及ぼす役割を比較検討した。その結果、*cagA* 陽性 *H. pylori* 株 (wt-CagA、PR-CagA 及び CagA- Δ CM 発現株) はいずれも細胞運動性を亢進させた。なかでも、wt-CagA 発現株による細胞運動亢進能が有意に高かった。一方、*cagA* 遺伝子を欠損した isogenic *H. pylori* 株 (Δ CagA) は細胞運動性に影響を与えなかった。さらに、*H. pylori* 感染細胞の細胞形態変化を調べたところ、wt-CagA 発現株は細胞を著しく伸長させたのに対し、PR-CagA 発現株 と CagA- Δ CM 発現株は細胞形態に明確な影響を与えなかった。これらの結果から、細胞運動性亢進に代表される *cagA* 陽性 *H. pylori* の病原生物活性発現には CagA の病原性には CagA-SHP2 相互作用と CagA-PAR1 相互作用が協調的に作用することが明らかになった。

【考察】 本研究では、isogenic *H. pylori* 株を作製し、*H. pylori* 感染実験を通して、CagA がリン酸化依存的に SHP2 と結合すること一方、CM 配列を介してリン酸化非依存的に PAR1 と結合することを示した。これまでに、CagA を全身性に発現するトランスジェニックマウスは消化管腫瘍と血液系腫瘍を発症するのに対し、機能獲得型 SHP2 発現マウスは血液系腫瘍のみを発症することが報告されている。この事実は、胃癌発症には CagA による SHP2 の脱制御だけでは不十分であり、PAR1 抑制を介した上皮細胞の極性破壊もまた重要な役割を担うことを示唆している。本研究では、wt-CagA、PR-CagA 及び CagA-DCM を発現する *H. pylori* が胃上皮細胞に与える効果を比較したところ、*cagA* 陽性 *H. pylori* の病原性の指標の一つと考えられる感染胃上皮細胞の運動性亢進や細胞形態変化誘導において、CagA-SHP2 相互作用と CagA-PAR1 相互作用が共に重要な役割を担うことが明らかになった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 平 野 聡
副 査 教 授 今 村 雅 寛
副 査 教 授 田 中 伸 哉

学 位 論 文 題 名

Helicobacter pylori stimulates epithelial cell migration via CagA-mediated perturbation of host cell signaling

(ヘリコバクター・ピロリはCagAを介した宿主細胞内シグナル伝達の
攪乱により細胞運動性を増強する)

Helicobacter pylori (*H. pylori*) 感染は胃・十二指腸粘膜病変に深く関連する。なかでも *cagA* 陽性 *H. pylori* は激しい萎縮性胃炎を引き起こし、胃癌発症の危険率を有意に高める。*H. pylori* の菌体内で産生された CagA は、胃上皮細胞内に注入された後、チロシンリン酸化依存的にチロシン脱リン酸化酵素 SHP2 と特異的に結合し、細胞増殖・細胞運動を脱制御する。一方、CagA はリン酸化非依存的に CagA 多量体化(CM)配列を介して partitioning-defective 1 (PAR1)に結合し、そのキナーゼ活性を抑制することにより上皮細胞極性を破壊する。本研究では、遺伝的背景の均一な isogenic *H. pylori* 感染実験を行い、*cagA* 陽性 *H. pylori* の病原性における CagA-SHP2 相互作用と CagA-PAR1 相互作用の役割を解明することを目的とした。

まずは、形質転換効率のよい NCTC11637 株をもとに相同組み換えにより、*cagA* 遺伝子を CM sequence を一つのみしかもたない F32 株タイプの野生型 CagA (wt-CagA)、リン酸化耐性型 CagA (PR-CagA)、CM 配列欠損型 CagA (CagA-ΔCM)をコードする遺伝子に置換した isogenic *H. pylori* 株を樹立した。樹立した isogenic 株の CagA の注入を検討するために、ヒト胃上皮細胞由来の AGS 細胞と isogenic *H. pylori* 株を共培養して 0.1%サポニンで抽出した。

次に、Isogenic *H. pylori* 株の基本的性質の評価をするため、isogenic *H. pylori* 株を液体培地で培養し増殖速度を調べたところ、菌株間に差は認められなかった。さらに、AGS 細胞への感染実験を行い、*H. pylori* 特異的な細胞空胞化を観察したところ、NCTC11637 株と同様に isogenic *H. pylori* 株感染によって細胞空胞化が誘導された。以上のことから、ゲノムの相同組換えが isogenic *H. pylori* 株の基本的性質に影響を与えないことを確認した。また、一方で、CagA-SHP2 相互作用と CagA-PAR1 相互作用の解析を行うために、AGS 細胞に isogenic *H. pylori* 株を感染させ、免疫沈降実験を行った。その結果、細胞内に注入された CagA がリン酸化依存的に SHP2 と結合することに加え、リン酸化非依存的に CM 配列を介して PAR1 と結合することを示した。

最後に、Isogenic *H. pylori* 株の病原性を評価するために、*H. pylori* 感染 AGS 細胞の細胞遊走能を調べた。その結果、*cagA* 陽性 *H. pylori* 株 (wt-CagA、PR-CagA 及び CagA-ΔCM 発現株) はいずれも細胞遊走能を亢進させた。なかでも、wt-CagA 発現株による細胞遊走の亢進能が有意に高かった。一方、*cagA* 遺伝子を欠損した isogenic *H. pylori* 株(ΔCagA)は細胞遊走能に影響を与えなかった。さらに、*H. pylori* 感染細胞の細胞形態変化を調べたところ

ろ、wt-CagA 発現株は細胞を著しく伸長させたのに対し、PR-CagA 発現株 と CagA-ΔCM 発現株は細胞形態に影響を与えなかった。これらの結果から、CagA の病原性には CagA-SHP2 相互作用と CagA-PAR1 相互作用が共に必要であることを明らかにした。

本研究では、wt-CagA、PR-CagA 及び CagA-ΔCM を発現する *H. pylori* が胃上皮細胞に与える効果を感染実験を用いて比較したところ、*cagA* 陽性 *H. pylori* の病原性の指標の一つと考えられる感染胃上皮細胞の運動性亢進や細胞形態変化誘導において、CagA-SHP2 相互作用と CagA-PAR1 相互作用が共に重要な役割を担うことが明らかになった。

口頭発表に続き副査今村雅寛教授より CagA の病原性に関して SHP2 と Par1 の協調的な作用および humming bird 表現型と癌化の関連について質問があった。続いて副査田中伸哉教授より CagA と胃癌発症の関連性およびヒトへのピロリ菌感染による発がんメカニズムの解明に向けた感染実験の今後の応用について質問があった。最後に主査平野聡教授より病理検体での SHP2 や PAR1 の発現に関する報告の有無についての質問、ピロリ菌感染胃がんの疫学的検討についての質問に加えてピロリ菌の治療への臨床応用の可能性などの質問があった。

いずれの質問に対しても申請者はその主旨をよく理解し、自らの研究内容と文献的考察を混じえて適切に回答した。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有すると判定した。