

論文の内容の要旨

論文題目 ヘリコバクター・ピロリの CagA による胃粘膜

障害機構の解析

指導教員 笹川 千尋 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 14 年 入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 鈴木 仁人

ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*、以下ピロリ菌)は、世界人口の半数以上が感染していると推定される病原細菌である。本菌の持続感染は、胃・十二指腸潰瘍、胃MALT (mucosa-associated lymphoid tissue)リンパ腫、胃癌などの胃関連疾病と疫学的な関連性が指摘されており、1994年にWHO (世界保健機構)/IARC (国際癌研究機関)はピロリ菌を確実な発癌因子 (definite carcinogen: group 1)として指定している。

経口的に侵入した菌は、胃粘膜上皮細胞に持続的に定着し、ウレアーゼ、空胞化毒素 VacA、IV 型分泌装置、CagA など様々な病原因子を産生・分泌する。このような分泌性病原因子、および LPS、ペプチドグリカンなどの菌体成分により、菌の感染した胃粘膜局所では慢性的な炎症反応が惹起される。上皮由来の IL-8 によって動員された好中球は、マクロファージなどと共にピロリ菌や菌に破壊された細胞の駆除を行う。細胞外寄生細菌であるピロリ菌に対する獲得免疫は液性免疫が主体であるが、菌への抗体は自己免疫的に胃粘膜上皮をも侵襲する。このような菌と宿主の激しい攻防によって生み出される上皮細胞の破壊と再生の“カ

オス”が、遺伝子の突然変異を蓄積し、癌細胞の発生とクローナルな増殖のリスクを上昇させるものと考えられている。

ピロリ菌染色体上に存在する *cag* 病原性遺伝子塊(*cagPAI*; *cag* pathogenicity island) にコードされる IV 型分泌装置は、本菌と宿主細胞との相互作用を考えるうえで最も重要な病原因子である。本菌を含めた多くのグラム陰性病原細菌に保存される IV 型分泌装置は、特定の蛋白、特定の DNA を菌体内から宿主細胞内にワンステップで輸送する特殊に分化した蛋白複合体である。多くの疫学的、および動物を用いた実験病理学的な研究により、*cagPAI* 陽性のピロリ菌は、*cagPAI* 陰性の菌と比較して胃発癌のリスクが大きいことが指摘されている。現在、ピロリ菌の IV 型分泌装置の分泌蛋白として明らかなのは唯一 CagA のみである。IV 型分泌装置を介して宿主細胞に注入された CagA は、Src キナーゼによって C 末のチロシン残基にリン酸化修飾を受け、SHP-2、Grb2、c-Met、ZO-1 などといった様々な宿主分子と会合し、細胞増殖、細胞運動、細胞死など多様なシグナル伝達系に関与することが報告されている。しかしながら、菌感染における CagA の役割においては依然不明な点が多い。本研究では、CagA が宿主 Crk アダプター蛋白と結合すること、CagA/Crk 複合体に活性化されるシグナル伝達がピロリ菌感染で観察される胃上皮の細胞間接着の脱制御、細胞増殖、細胞骨格の再構築などに中心的な役割を担っていることを明らかにした。

Crk は SH2 (Src homology 2)ドメインと、SH3 (Src homology 3)ドメインのみで構成されるアダプター蛋白である。ヒトの Crk 蛋白はトリ肉腫ウイルス CT10 にコードされる癌遺伝子産物 v-Crk のホモログとして同定され、Crk-II、Crk-I、Crk-L の 3 つが存在する。本研究では最初に、CagA が自己のリン酸化に依存して Crk 蛋白の SH2ドメインと結合することを、GST プルダウン法および免疫沈降法などによって証明した。

CagA はヒト胃上皮由来の AGS 細胞に細胞遊走(*cell scattering*)を惹起することが知られている。*Cell scattering* とは、上皮コロニーの細胞間接着が崩壊し、細胞が個々に分かれて分散するまでの一連の過程を称す。単独となった細胞は進行方向に葉状の突起を伸ばしながら、一つの場所から他の場所へ活発に動き回る。CagA と Crk の結合が機能的なものであることを確認するために、Crk 阻害条件下での CagA による *cell scattering* の形成能を観察した。その結果、Crk のドミナントネガティブ変異体の発現や RNA 干渉による Crk のノックダウンによって *cell scattering* が顕著に阻害されたことから、Crk に仲介されるシグナル伝達は CagA

の活性に重要な役割を担うことが示唆された。

また本研究では、ピロリ菌がCagAの活性に依存して、E-カドヘリン/ β -カテニン複合体を含むアドヘレンスジャンクション(AJ; adherens junction)を破壊することを見出した。AGS細胞は機能的なAJを形成していないため、CagA依存的なAJの破壊はヒト胃上皮由来のMKN74細胞やNCI-N87細胞などで観察した。極性上皮細胞であるMDCK細胞においても、発現ベクターを用いたCagAの発現によりAJの崩壊が惹起されたが、CagAのリン酸化耐性変異体の発現ではその現象は起こらなかった。そのため、CagAは単独でリン酸化に依存した上述の活性を誘導することが明らかとなった。CagAによるAJの脱制御は、CagAによるcell scatteringと同様に、Crkのドミナントネガティブ変異体の発現やRNA干渉によるCrkのノックダウンによって阻害された。以上の結果から、CagAにより胃上皮細胞に誘導される複数の形質発現には、CrkおよびCrk下流の分子の働きが重要であることが示唆された。

次にCrk下流のシグナル伝達がCagAの活性に与える影響を検討した。CrkはSH3ドメインを介してC3G、SoS1、Dock180などのGDP/GTP交換因子(GEF; guanine-nucleotide exchange factor)のプロリンリッチ領域(PRR; proline-rich region)と結合した状態で細胞質中に存在している。細胞膜近傍にリクルートされたCrk/GEFの複合体は、同じく膜近傍に存在する小分子G蛋白であるRap1 (C3Gの標的)、H-Ras (SoS1の標的)、Rac1 (Dock180の標的)を活性化する。RasファミリーのG蛋白であるH-Ras、Rap1はそれぞれRaf1、B-Rafを活性化し、下流のMAPK (mitogen-activated protein kinase)カスケードを亢進させる。一方、RhoファミリーのG蛋白であるRac1は、WAVE (Wiskott-Aldrich syndrome protein family verprolin homologous protein)などアクチン重合に関わるエフェクターの作用によって細胞骨格の再構築を促進する。細胞内でC3G、SoS1、Dock180のPRRペプチドを過剰発現させることによってCagAとCrkの結合を阻害すると、菌感染におけるCagA依存的なcell scatteringが顕著に阻害された。

C3G、SoS1下流のRap1、H-Rasをドミナントネガティブ変異体によって阻害することでも、cell scatteringは有意に抑制された。Rap1/B-Raf経路、H-Ras/Raf1経路は、細胞増殖に必須で中心的な役割を果たすMEK (MAPK/ERK kinase)/ERK (extracellular signal-regulated kinase)経路の上流に位置する。ヒト胃上皮由来のKATOIII細胞のCrk蛋白をRNA干渉によりノックダウンすると、菌感染時のCagAに依存したMEK/ERK経路の活性化が有意に抑制された。これらの結果より、CagA/Crk下流のC3G/Rap1/B-Raf経路、SoS1/H-Ras/Raf1経路は、MAPKカスケード

を正に制御していることが示唆された。また、Dock180下流のRac1、WAVEをドミナントネガティブ変異体によって阻害することでも、cell scatteringは有意に抑制された。一方で、Rac1と同様にRhoファミリーG蛋白であるCdc42、RhoAの阻害、WAVEと同様にWASPファミリーであるN-WASP (neural-WASP)の阻害は、cell scatteringの形成には影響しなかった。これらの結果から、CagAの活性にDock180/Rac1/WAVE経路によるアクチン細胞骨格の再構築が重要であることが示された。

E-カドヘリンとカテニンの複合体で形成される AJ は、細胞運動、細胞増殖、細胞分化などを負に制御しており、発癌シグナルの抑制因子として重要な役割を担っている。CagA 陽性のピロリ菌が感染した細胞では、本来、細胞-細胞間の接着部位にアンカーされているβ-カテニンが核内に局在する像が高頻度に観察された。β-カテニンは AJ の構成蛋白であるが、核内で Wnt 経路の転写因子である TCF/LEF (T cell factor/lymphoid enhancer factor)のコアクティベーターとして働き、細胞増殖促進に寄与する MMP-7、サイクリン D1、*c-myc* などの転写を活性化させることが知られている。そのため、CagA/Crk の作用によって AJ のプールから遊離したβ-カテニンが核内に移行することが、ピロリ菌感染による胃発癌のリスク上昇の一因となっていることが考えられる。

以上、本研究の結果をまとめると、1) CagA はリン酸化に依存して Crk 蛋白と結合する、2) CagA はリン酸化に依存して AJ を破壊する、3) AJ の破壊などの CagA の活性には Crk の働きが重要である、4) CagA の活性には Crk 下流の C3G/Rap1/B-Raf 経路、SoS1/H-Ras/Raf1 経路、Dock180/Rac1/WAVE 経路が個々に重要であることが示された。今後、本研究を基盤とした更なる研究が、ピロリ菌感染による胃発癌のメカニズムの解明につながるものと考えられる。