慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	ピロリ菌CagAの宿主細胞内安定性を規定する細胞特性の解析
Sub Title	Host cell characteristics involved in gastric carcinogenesis by H. pylori infection
Author	津川, 仁(Tsugawa, Hitoshi)
Publisher	
Publication year	2016
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2015.)
JaLC DOI	
Abstract	H. pyloriのがん蛋白質CagA分解を司るautophagyの宿主細胞シグナルは, VacA受容体であるLRP1が, リソソーム産生亢進を仲介することで, autophagosomeとautolysosomeの融合起点において重要な役割を担うことを明らかとした。さらにLRP1への結合を介して, LRP1によるautophagy発現シグナルを不に制御する分子を見出し, この分子の過剰発現細胞はCagAを特異的に蓄積させるのみならず, CD44v9発現を惹起させることを明らかとした。本研究成果により, CagA蓄積とCD44v9発現亢進に繋がる極めて重要な宿主細胞キャラクターが同定された。 Intracellular CagA is degraded by autophagy. CagA-degradin autophagy was suppressed in CD44v9-expressing host cells, resulting in the specific accumulation of CagA in these cells. This autophagic pathway was activated by VacA via binding to LRP1. During autophagy, LRP1 was translocated to the nuclei, and increased the LAMP1 expression via binding to the lamp1 promoter. Specific knockdown of lamp1 decreased the formation of autophagolysosome, leading to the intracellular accumulation of CagA. Additionally, we identified a LRP1-binding protein which binds to LRP1 in the nuclei and suppresses transcription of LAMP1. In cells overexpressing the LRP1-binding protein, autophagy was suppressed and then CagA accumulated. The accumulation of CagA in LRP1-binding protein overexpressing cells caused increased CD44v9 expressions. The expression levels of the LRP1-binding protein determine the intracellular CagA stability associated with the induction of CD44v9 expression.
Notes	研究種目：基盤研究(C)(一般) 研究期間：2013～2015 課題番号：25460173 研究分野：細菌学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_25460173seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２８ 年　 ６ 月　 ７ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2013～2015
課題番号：２５４６０１７３

研究課題名（和文）ピロリ菌CagAの宿主細胞内安定性を規定する細胞特性の解析

研究課題名（英文）Host cell characteristics involved in gastric carcinogenesis by H. pylori infection

研究代表者
津川　仁（Tsugawa, Hitoshi）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：３０４６８４８３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,800,000円

研究成果の概要（和文）：H. pyloriのがん蛋白質CagA分解を司るautophagyの宿主細胞シグナルは、VacA受容体であるLRP1が、リソソーム産生亢進を仲介することで、autophagosomeとautolysosomeの融合起点において重要な役割を担うことを明らかとした。さらにLRP1への結合を介して、LRP1によるautophagy発現シグナルを不に制御する分子を見出し、この分子の過剰発現細胞はCagAを特異的に蓄積させるのみならず、CD44v9発現を惹起させることを明らかとした。本研究成果により、CagA蓄積とCD44v9発現亢進に繋がる極めて重要な宿主細胞キャラクターが同定された。

研究成果の概要（英文）：Intracellular CagA is degraded by autophagy. CagA-degradin autophagy was suppressed in CD44v9-expressing host cells, resulting in the specific accumulation of CagA in these cells. This autophagic pathway was activated by VacA via binding to LRP1. During autophagy, LRP1 was translocated to the nuclei, and increased the LAMP1 expression via binding to the lamp1 promoter. Specific knockdown of lamp1 decreased the formation of autophagolysosome, leading to the intracellular accumulation of CagA. Additionally, we identified a LRP1-binding protein which binds to LRP1 in the nuclei and suppresses transcription of LAMP1. In cells overexpressing the LRP1-binding protein, autophagy was suppressed and then CagA accumulated. The accumulation of CagA in LRP1-binding protein overexpressing cells caused increased CD44v9 expressions. The expression levels of the LRP1-binding protein determine the intracellular CagA stability associated with the induction of CD44v9 expression.

研究分野：細菌学

キーワード：オートファジー　がん蛋白質　ピロリ菌　CD44　VacA　CagA

１．研究開始当初の背景

H. pylori 感染は胃がん発症の決定的なリスクファクターである。*H. pylori* のⅣ型分泌装置によって胃上皮細胞内へ注入される CagA が宿主細胞内でがん蛋白質として機能すること、*cagA* トランスジェニックマウスが胃がんを発症することが報告され、*H. pylori* 感染に伴う胃がん発症に CagA が強く関与することが明らかにされている。一方、研究代表者らは、宿主細胞内へ注入された CagA は、通常、autophagy で分解され、宿主細胞内で長期的に安定化しないことを明らかとしてきた。宿主細胞内 CagA が autophagy によって分解排除されるということは、「*H. pylori* 感染に伴う胃がん発症に CagA が寄与する」とは考え難くなるが、CagA 分解性 autophagy 発現が抑制される細胞では CagA が蓄積し、oncogenic signal が持続することで、発がんリスクが一気に高まると推測できる。事実、研究代表者らは、cancer stem cell のマーカー分子の 1 つである CD44 variant 9（CD44v9）発現細胞では、ROS 抵抗性を示すことで、CagA 分解性 autophagy が発現せず、CD44v9 発現細胞では CagA が蓄積することを明らかとした。つまり、細胞内に注入された CagA の安定性は、宿主細胞キャラクターに依存し、細胞特異的な蓄積性を示し、発がんシグナルを惹起すると考えられる。これらの知見から、CagA 分解性 autophagy 発現シグナルの解析は、*H. pylori* 感染に伴う発がんリスクに強く関与する宿主側要因を明確化し、更には、強制的 autophagy 誘導を介した CagA 分解促進による発がん抑制方法論の構築へと応用できると考えられる。

２．研究の目的

CagA 分解性 autophagy は、*H. pylori* の分泌毒素である VacA が細胞膜上の Low-density lipoprotein receptor-related protein-1（LRP1）へ結合することで発現することが明らかにされている。研究代表者らの検討でも、免疫沈降法により VacA が LRP1 へ結合することを確認し、また、LRP1 ノックダウン細胞では、GSH が低下せず、autophagy 発現が抑制され、CagA が蓄積することを示した。これらの知見から、VacA の LRP1 への結合を介したシグナル伝達は CagA 分解性 autophagy を発現させる極めて重要なトリガー反応であるといえる。そこで、本研究では、VacA の LRP1 への結合を介した細胞内シグナル伝達を解析し、CagA 分解性 autophagy を正常に発現する細胞キャラクターを明確化し、CagA 分解性 autophagy 発現抵抗性を示す細胞キャラクターに関する知見を提供する。

３．研究の方法

CagA 分解性 autophagy の発現に、VacA の LRP1 への結合を介したシグナル伝達は極めて重要なステップとなる。また、細胞膜上に局在する LRP1 は、リガンド刺激を受けた際には、intracellular domain（ICD）と extracellular domain に膜上でプロセッシングされ、生成した LRP1-ICD は核内へ移行し、転写制御因子として機能する（*Science Signaling*, 25: ra15, 2008）。そこで、LRP1-ICD 特異的抗体による western blot 並びに免疫染色法により、*H. pylori* 感染細胞において、LRP1-ICD 生成亢進の有無及び LRP1-ICD の核内移行の誘導が惹起されるかを明らかにする。また、LRP1-ICD の核内での役割を Chip assay により評価し、同時にどの様な分子の転写因子として機能しているかについて免疫沈降後の MAS 解析によって評価する。これら解析を通じて、autophagy の発現の有無は、Tet-on-EGFP-LC3-mCherry 発現誘導細胞を用いた autophagic flux assay により評価する。

４．研究成果

まず、LRP1 依存的 CagA 分解性 autophagy 発現機構の解析を行った。その結果、LRP1 は autophagy 発現時に、細胞表層にてプロセシングを受け核内移行が亢進することが明らかとなった。さらに、核内移行した LRP1-ICD ドメインは、lysosome 表層蛋白質の転写因子として機能し、これにより発現が亢進した lysosome 表層蛋白質は、CagA 分解性 autophagosome 及び autolysosome の両者に局在することが autophagic flux assay を用いた免疫染色より明らかとなった。つまり、核内移行が亢進する LRP1-ICD ドメインは autophagosome と autolysosome の融合起点において、リソソーム産生亢進を仲介するという重要な役割を担っていることが示された。次に、核内移行した LRP1-ICD による lysosome 表層蛋白質の転写制御機構の解析を実施した。その結果、autophagy 発現時にのみ、核内において、LRP1-ICD に結合する蛋白質を、免疫沈降後の nano LC-MS/MS 解析により見出し、同定した。そこで、この LRP1-ICD 結合性蛋白質（LRP1-binding protein）の機能解析を実施したところ、核内移行した LRP1-ICD への結合を介して、LRP1-ICD による lysosome 表層蛋白質の発現誘導を負に制御している事が、LRP-binding protein の過剰発現細胞への *H. pylori* 感染モデル解析により明らかとなった。さらに、このモデルでは、autophagy 発現が誘導されず、細胞内に CagA が蓄積し始めることが示された。これらの結果から、LRP1-binding protein が過剰に発現している宿主細胞へ、*H. pylori* 感染により CagA が装填されてしまうと、胃発がんシグナルの亢進に関わると考えられ、LRP1-binding protein の発現レベルは *H. pylori* 感染時の胃発がんリスクを規定する重要な宿主細胞キャラクターであると考えられた。そこで、LRP1-binding protein の発現レベル解析を実施したところ、興味深いことに、*H. pylori* 感染に関わらず、LRP1-binding protein 発現レベルが亢進している胃上皮細胞が存在することがマウスを用いた *H. pylori* 感染実験により明

らかとなった。そこで、LRP1-binding protein の発現制御システムをエピジェネティクス制御に注目して解析した結果、LRP1-binding protein の発現は、DNA メチル化制御の関与は少なく、promoter 領域のアセチル化制御を受けている可能性がバイサルファイトシークエンス解析及び Chip assay により示唆された。さらに興味深いことに、LRP1-binding protein 過剰発現細胞への *H. pylori* 感染では、autophagy 発現が抑制されCagA が蓄積することで、CD44v9 発現を惹起することが明らかとされた。以上の結果から、LRP1-binding protein の発現亢進細胞は、autophagy 発現抵抗性を示し、CagA を蓄積させる細胞であることが示され、さらには、CD44v9 発現細胞の誕生にも寄与する極めて重要な宿主細胞キャラクターであることが示された。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 8 件）

1. Mori H., Suzuki H., Matsuzaki J., Tsugawa H., Fukuhara S., Miyoshi S., Hirata K., Seino T., Matsushita M., Nishizawa T., Masaoka T., Kanai T. Efficacy of 10-day and 14-day triple therapy as a third-line and fourth-line regimen for Helicobacter pylori eradication: a pilot study. ***United European Gastroenterology Journal,*** （査読有） Nov.13, 2015. doi:10.1177/2050640615618043.
2. Mori H., Suzuki H., Matsuzaki J., Tsugawa H., Fukuhara S., Miyoshi S., Hirata K., Seino T., Matsushita M., Masaoka T., Kanai T. Efficacy of 10-day sitafloxacin-containing third-line rescue therapies for *Helicobacter pylori* strains containing the *gyrA* mutation. ***Helicobacter,*** （査読有） 2015 Nov 27. doi:10.1111/hel.12286. [Epub]
3. Akazawa Y., Isomoto H., Matsuda K., Matsushima K., Kido Y., Yamaguchi N., Ohnita K., Takeshima F., Kondo H., Tsugawa H., Suzuki H., Hirayama T., Nakao K., Nakashima M. Association of BH3-only protein Bim with the degree of gastritis and its localization in the mitochondria of inflammatory cells of *Helicobacter pylori*-infected mucosa. ***Int. J. Med. Microbiol.,*** (査読有) 305(6), 2015, 553-62 doi:10.1016/j.ijmm.2015.07.002
4. Tsugawa H., Mori H., Matsuzaki J., Masaoka T., Hirayama T., Nagasawa H., Sakakibara Y., Suematsu M., Suzuki, H. Nordihydroguaiaretic acid disrupts the antioxidant ability of *Helicobacter pylori* through the repression of SodB activity *in vitro*. ***Biomed. Res. Int.***, (査読有), ID 734548, 2015. doi:10.1155//2015/734548.
5. Matsuzaki J., Suzuki H., Tsugawa H., Watanabe M., Hossain S., Arai E., Saito Y., Sekine S., Akaike T., Kanai Y., Mukaisho K.I., Auwerx J., Hibi T. Bile acids increase levels of *microRNAs 221 and 222*, leading to degradation of CDX2 during esophageal carcinogenesis. ***Gastroenterology***, (査読有), 145(6), 2013, 1300-11. doi:10.1053/j.gastro.2013.08.008
6. Hirata K., Suzuki H., Imaeda H., Matsuzaki J., Tsugawa H., Nagano O., Asakura K., Saya H., Hibi T. CD44 variant 9 expression in primary early gastric cancer as a predictive marker for recurrence. ***Br. J. Cancer***, (査読有), 109(2), 2013, 379-386. doi: 10.1038/bjc.2013.314.
7. Mogami S., Suzuki H., Tsugawa H., Fukuhara S., Hibi T. Impaired heme oxygenase-1 induction in the gastric antrum induces disruption of the interstitial cells of Cajal network in a rat model of storeptozotocin-induced diabetes. ***Neurogastroenterol. Motil.***, (査読有) 25(7), 2013, 609-e465. doi: 10.1111/nmo.12122.
8. Saito Y., Suzuki H., Imaeda H., Matsuzaki J., Hirata k., Tsugawa H., Hibino S., Kanai Y., Saito H., Hibi T. The tumor suppressor microRNA-29c is downregulated and restored by celecoxib in human gastric cancer cells. ***Int. J. Cancer***, (査読有), 132(8), 2013, 1751-1760. doi: 10.1002/ijc.27862.

〔学会発表〕（計 16 件）

1. 津川仁.ピロリ菌感染戦略における酸化ストレスの意義と制御. 日本薬学第 136 年会, 2016 年 3 月 28 日, パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）
2. 津川仁、森英毅、三好佐和子、柏崎有紀、松崎潤太郎、佐藤聡、井本正哉、末松誠、鈴木秀和. 胃発がんに関わるピロリ菌感染宿主細胞のオートファジー発現調節機構. 第 88 回日本胃癌学会総会, 2016 年 3 月 19 日, ビーコンプラザ（大分県別府市）
3. Tsugawa H., Kashiwazaki Y., Mori H., Matsuzaki J., Masaoka T., Suematsu M., Suzuki H. Repression of autophagy in gastric epithelial cells infected with *H. pylori* induces

CD44 expression through the accumulation of CagA oncoprotein. 10th world congress for Microcirculation, 2015 年 9 月 25 日, 京都国際会館（京都府京都市）

4. 津川仁、柏崎有紀、森英毅、松崎潤太郎、佐藤聡、金井弥栄、井本正哉、末松誠、鈴木秀和. CD44 発現に繋がるピロリ菌感染宿主細胞キャラクター. 第 21 回日本ヘリコバクター学会, 2015 年 6 月 26 日, 神戸ポートピアホテル（兵庫県神戸市）
5. 津川仁, 松崎潤太郎, 森英毅, 正岡建洋, 井本正哉, 末松誠, 鈴木 秀和. LRP1-dependent host cell response in gastric epithelial cells infected with *H. pylori*. 第 88 回日本細菌学会総会, 2015 年 3 月 26 日, 長良川国際会議場（岐阜県岐阜市）
6. Tsugawa H., Matsuzaki J., Mori H., Masaoka T., Sato A., Imoto M., Hirayama T., Suematsu M., Suzuki H. Nnuclear-translocated LRP1-ICD is related to the formation of autophagolysosome associated with CagA degradation in gastric epithelial cells infected with *H. pylori* via induction of LAMP1 expressions. XXVIIth International Workshop on Helicobacter & Microbiota in Inflammation & Cancer, 2014 年 9 月 12 日,ローマ（イタリア）
7. 津川仁, 鈴木秀和. ピロリ菌感染時の胃発がんリスクを規定する宿主キャラクター. 第 100 回日本消化器病学会, 2014 年 4 月 24 日, 東京国際フォーラム（東京都千代田区）
8. 津川仁, 鈴木秀和, 佐藤聡, 松崎潤太郎, 福原誠一郎,岡田佐和子, 森英毅, 正岡 建洋, 金井隆典, 水島徹, 井本正哉, 平山壽哉. Role of LRP1 signals on the induction of autophagy causing CagA degradation. 第 87 回日本細菌学会総会, 2014 年 3 月 26 日, 船堀タワホール（東京都江戸川区）
9. 津川仁. ピロリ菌感染戦略に対抗する宿主細胞応答と除菌戦略. 寄生虫学会, 第 26 回分子生物学・生理生化学研究会, 2014 年 3 月 25 日, 愛媛大学（愛媛県松山市）
10. Tsugawa H., Suzuki H. The role of reactive oxygen species (ROS) in gastric carcinogenesis evoked by *H. pylori* infection. 17th Biennial Meeting of Society for Free Radicals Research International, 2014 年 3 月 24 日, 京都国際会館（京都府京都市）
11. 津川仁, 鈴木秀和. ピロリ菌がん蛋白質 CagA を排除する宿主応答. 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 3 日, 神戸ポートピアホテル（兵庫県神戸市）
12. Tsugawa H., Matsuzaki J., Okada S., Fukuhara S., Mori H., Msaoka T., Sato A., Saya H., Hatakeyama M., Hirayama T., Suzuki H. Autophagy causing CagA degradation is triggered by cytoplasmic accumulation of low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP1) in gastric epithelial cells infected with *H. pylori*. United European Gastroenterology Week 2013, 2013 年 10 月 15 日, ベルリン（ドイツ）
13. 津川仁. ピロリ菌感染時の胃発がんリスクを規定するオートファジーの発現制御システム, Suppressed autophagy of *H. pylori* -derived CagA in gastric cancer development. 第 72 回日本癌学会, 2013 年 10 月 3 日, パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）
14. 津川仁. 細胞内 CagA 安定性を規定する細胞表層 LRP1 の autophagy 制御機構. 第 19 回日本ヘリコバクター学会, 2013 年 6 月 29 日, 長崎大学（長崎県長崎市）
15. 津川仁, 鈴木秀和, 佐谷秀行, 松崎潤太郎, 平田賢郎, 福原誠一郎, 岡田佐和子, 正岡建洋, 畠山昌則, 平山壽哉, 日比紀文. Specific accumulation of CagA oncoprotein in CD44v9 expressing cancer stem cells. 第 86 回日本細菌学会総会, 2013 年 3 月 20 日, 幕張メッセ（千葉県千葉市）
16. Tsugawa H., Suzuki H., Saya H., Hatakeyama M., Hirayama T., Hirata K., Matsuzaki J., Hibi T. Accumulation of *Helicobacter pylori*-derived CagA oncoprotein in CD44-variant expressing cancer stem-like cells by escaping autophagy. The 6th International Gastrointestinal Consensus Symposium (IGICS), 2013 年 1 月 26 日, 京王プラザホテル（東京都新宿区）

〔図書〕（計 1 件）

1. 平田賢郎, 津川仁, 鈴木秀和. 診断と治療社. *Section 9. Helicobacter pylori* 感染症と酸化ストレス. 『酸化ストレスの医学改訂第 *2* 版』 吉川敏一 監修、内藤裕二、豊國伸哉 編集. *pp316-321, 2014.*

〔産業財産権〕

○出願状況（計 2 件）

名称：宿主異物排除応答依存的除菌剤
発明者：鈴木秀和、津川仁、榊原康文
権利者：慶應義塾
種類：国際出願
番号：PCT/JP2015/064525
出願年月日：平成 27 年 5 月 20 日
国内外の別： 国外

名称：宿主異物排除応答依存的除菌剤
発明者：鈴木秀和、津川仁、榊原康文
権利者：慶應義塾
種類：国内特許出願
番号：2014-106192
出願年月日：平成 26 年 5 月 22 日
国内外の別： 国内

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

６．研究組織

(1)研究代表者

津川 仁（TSUGAWA HITOSHI）
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号： 30468483

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし