

平成22年6月20日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007-2009  
 課題番号：19590325  
 研究課題名（和文）ピロリ菌の分泌性病原因子の受容体とメンブランチラフィック機構の解析  
 研究課題名（英文）Identification of a receptor for the carcinogenic factor secreted from *H. pylori*, and analysis of its membrane trafficking mechanism  
 研究代表者  
 菅沼 雅美（SUGANUMA MASAMI）  
 埼玉県立がんセンター・臨床腫瘍研究所・主幹  
 研究者番号：20196695

研究成果の概要（和文）：ピロリ菌が分泌する発がん因子 Tipαの受容体としてヌクレオリンを同定した。ヌクレオリンは本来核小体に局在するタンパク質であるが、胃がん細胞では異常に細胞表面に局在したヌクレオリンが Tipαの受容体・輸送体として機能し、Tipαによる TNF-α遺伝子発現亢進に関与することを明らかにした。胃がんの発症過程でヌクレオリンが細胞表面に異常に局在した細胞に Tipαが作用してがん化を促進すると解釈する。ヌクレオリンと Tipαとの相互作用は新しい胃がん発症機構である。

研究成果の概要（英文）：Tumor necrosis factor-α inducing protein (Tipα) is a unique carcinogenic factor released from *H. pylori*. We found that nucleolin acts as a receptor for Tipα, that it shuttles Tipα from the cell surface to nuclei, resulting in TNF-α gene expression. Although nucleolin is a well-known nucleolar protein, nucleolin is also present on the cell surface of gastric cancer cells. So cells with nucleolin on the surface are thought to be a highly susceptible to Tipα for development of gastric cancer. These results indicate the significance of Tipα interaction with nucleolin as a new carcinogenic mechanism in the stomach.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：NF-κB

## 1. 研究開始当初の背景

ピロリ菌は胃がんの原因であり、発がんプ

ロモーターとして作用することが報告されている。「炎症性サイトカインである TNF-α

が発がんプロモータとして作用する」という私共の結果を基に、「ピロリ菌の感染によるTNF- $\alpha$ の誘導、NF- $\kappa$ Bの活性化が胃がんの発がんプロモーションにつながると考えた。

ピロリ菌のゲノムからクローニングしたTipaはcagPAIのType IV分泌機構を介さずに、ピロリ菌から分泌され胃粘膜上皮細胞に作用して、NF- $\kappa$ Bを活性化し、TNF- $\alpha$ 遺伝子の発現を亢進する。すなわち、Tipaは唯一のcagPAI非依存性のNF- $\kappa$ B活性化因子であり、Tipaの作用機構の解明は、ピロリ菌感染による慢性炎症と胃がんの発症機構において重要である。

## 2. 研究の目的

Tipaタンパク質は胃粘膜上皮細胞に結合し、温度依存的に細胞内に取り込まれ、NF- $\kappa$ Bを活性化してTNF- $\alpha$ 遺伝子発現を亢進する。本研究課題ではTipaの受容体を同定し、Tipaの細胞内取り込みに関与するメンブランチラフィックの分子機構を明らかにし、NF- $\kappa$ Bの活性化機構に関する新たな知見を得ることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) Tipa受容体の同定

① C末端にFLAGタグを融合したTipaとマウス胃粘膜上皮細胞抽出液を用いたプルダウン解析からTipaと結合し、不活性型のdel-Tipaとは結合しないポリペプチドをSDS-PAGEで分離した。

② 分離したポリペプチドをゲル内消化し、質量分析により同定した。

③ 質量分析により同定されたヌクレオリンについて、ヌクレオリン抗体を用いて免疫沈降し、ヌクレオリンがTipaの細胞内相互作用因子であるか検討した。

### (2) ヌクレオリンの細胞内局在の解析

ヌクレオリンの細胞内局在はヌクレオリン抗体を用いて、細胞分画、免疫染色、フローサイトメトリー解析によって検討した。

### (3) Tipaの取り込みとTNF- $\alpha$ 遺伝子発現誘導におけるヌクレオリンの機能解析

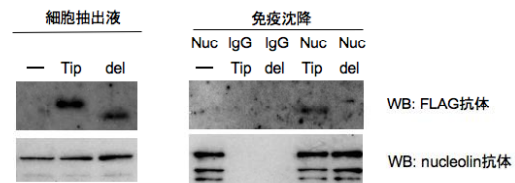
マウス胃がん細胞MGT-40をヌクレオリン抗体、あるいは、糖鎖修飾阻害剤ツニコマイシンで処理し、TipaのTNF- $\alpha$ 遺伝子発現誘導への影響についてRT-PCRによる解析とTipaの細胞内取り込みを検討した。更に、RNAiによるヌクレオリンのノックダウンによる効果についても検討した。

## 4. 研究成果

### (1) Tipa受容体ヌクレオリンの同定

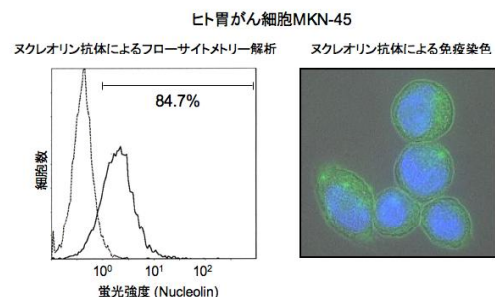
Tipaに結合し、不活性型のdel-Tipaには結合しないいくつかのポリペプチドをマウス

胃粘膜上皮細胞抽出液に見出した。質量分析により、そのうち2つのポリペプチドがヌクレオリンとその分解産物として同定された。次に、細胞内に取り込まれたTipaが細胞内のヌクレオリンと相互作用することをヌクレオリン抗体を用いた免疫沈降解析で証明した。また、Tipaはヌクレオリンフラグメント(中間とC末端ドメインを含む)と直接結合することを*in vitro*のプルダウン解析より見出した。TipaはTNF- $\alpha$ を誘導するユニークなピロリ菌の病原因子として注目されており、2009年には私どもの研究グループを含め、計3つのグループが立て続けに結晶構造を報告した。Tipaの相互作用因子としてヌクレオリンを発見したことは今後のピロリ菌の発がん機構の解明に大きな意義を持つ。



### (2) Tipa受容体ヌクレオリンの細胞内局在

マウス胃がん細胞(MGT-40)の細胞表面にヌクレオリンが存在することをヌクレオリン抗体を用いたフローサイトメトリー解析によって見出した。ヌクレオリンは本来、核小体に豊富に存在するタンパク質であり、マウスの正常腺胃粘膜を分画すると細胞膜画分にはヌクレオリンがほとんど検出されなかった。5つのヒト胃がん細胞についても検討したところ、その量はそれぞれ異なるが、細胞表面にヌクレオリンが局在することを明らかにした。細胞表面におけるヌクレオリンの局在はがん細胞特異的であると考えられる。これまでに、白血病や大腸がん、乳がん細胞等で局在異常が報告されているが、今回初めて胃がん細胞の表面にヌクレオリンが存在することを発見した。細胞表面のヌクレオリンは、抗がん剤やドラッグデリバリーの標的として関心が寄せられており、本発見は新たな胃がん治療への足がかりとなることが期待される。



### (3) Tipα受容体としてのヌクレオリンの機能解析

胃癌細胞表面に存在するヌクレオリンが Tipα の受容体として Tipα の細胞内取り込みや TNF-α 遺伝子の発現亢進に関与するかを検討した。

① 予め、マウス胃粘膜上皮細胞をヌクレオリン抗体で処理すると、予想に反して Tipα の取り込みが活性化され、TNF-α 遺伝子の発現がさらに亢進された。ヌクレオリン抗体処理によってヌクレオリンのエンドサイトーシスが活性化され、その結果、ヌクレオリンと結合した Tipα が効率よく細胞内に取り込まれたためと解釈される。Tipα がエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれることは、細胞膜からコレステロールを除去してエンドサイトーシスを阻害する MβCD の前処理が、その後の Tipα 処理による TNF-α 遺伝子発現亢進を減弱した結果からも支持される。

② 細胞表面に存在するヌクレオリンは特徴的な糖鎖修飾を受けており、ツニカマイシン処理により糖鎖修飾を阻害すると細胞表面のヌクレオリンが減少することが報告されている。MGT-40 細胞をツニカマイシンで前処理すると細胞表面のヌクレオリンが減少し、それに伴って、Tipα の細胞内取り込みが阻害され、TNF-α 遺伝子発現亢進が抑制された。

③ レンチウイルスベクターを利用した shRNA によるヌクレオリンのノックダウンは著しく細胞の増殖を阻害し、同時に Tipα の細胞内への取り込みを阻害し、TNF-α 遺伝子発現亢進を減弱した。

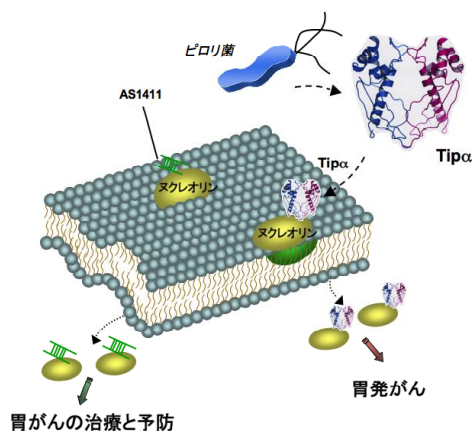
これらの結果は、細胞表面に存在するヌクレオリンは Tipα の受容体として Tipα の細胞内取り込み、さらに、TNF-α 遺伝子発現亢進に関与することを示す。

世界にはピロリ菌に感染しているヒトがおおよそ 50%とされているが、そのうち 0.4% ほどしか胃癌を発症していない。細胞表面にヌクレオリンがどの程度存在しているかが胃発がんのリスクを左右する一因であると推測している。

### (4) ヌクレオリンと Tipα を標的にした胃癌予防・治療への展開

ヒト胃癌細胞株 (MKN-1, MKN-45, MKN-74, AGS, KATOIII) では、すべて細胞膜表面にヌクレオリンが局在することを見出した。ヌクレオリンを標的にした DNA アプタマー AS1411 は、現在米国で白血病と腎臓がんに対しての第 II 相臨床介入試験が実施されている。AS1411 はこれら 5 つの胃癌細胞株の増殖を阻害した。ヌクレオリンアプタマー AS1411 が Tipα とヌクレオリンとの

結合を阻害すれば、胃癌の予防にも役立つと考える。Tipα と細胞表面のヌクレオリンを標的とした化合物は新しい胃癌の予防、さらには、治療に有効に機能すると期待される。



胃癌患者のピロリ菌は Tipα タンパク質を多く分泌している。さらに、発がんの過程でヌクレオリンが細胞表面に多く発現するようになるとピロリ菌による胃癌の発症に有利な環境になると考えられる。これまで、がん細胞におけるヌクレオリンの過剰発現や異常局在が多数報告されているが、ヌクレオリンの膜表面局在を誘導する因子や膜表面への局在化機構などは依然として解明されていない。ヌクレオリンの発現・局在変化に伴う細胞の変化や発がんの過程におけるヌクレオリンの役割を解明することは、胃癌の予防や治療に新しい方向性をもたらすことが期待される。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 16 件)

1. Watanabe, T., Suganuma, M., et al. 他 5 名 7 番目 Nucleolin on the cell surface as a new molecular target for gastric cancer treatment. Biol. Pharm. Bull. 査読有, 33, (2010), 796-803
2. Nakamura, K., Suganuma, M., et al. 他 4 名 5 番目 Neocomplanines A and B, a complanine family isolated from the marine fireworm. J. Nat. Prod. 査読有, 73, (2010), 303-305
3. Watanabe, T., Suganuma, M., et al. 他 8 名 10 番目 Nucleolin as cell surface receptor for tumor necrosis factor-α inducing protein: a carcinogenic factor of *Helicobacter pylori*. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 査読有, 136, (2009), 911-921
4. Inoue, K., Suganuma, M., et al. 他 7 名 5 番目 Evaluation of a new tumor necrosis factor-α-inducing membrane protein of

- Helicobacter pylori* as a prophylactic vaccine antigen. *Helicobacter* 査読有, 14, (2009), 135-143
5. Tsuge, H., Suganuma, M., et al. 他 6 名 8 番目 Structural basis for the *Helicobacter pylori*-carcinogenic TNF- $\alpha$ -inducing protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有, 388, (2009), 193-198
  6. Tera, M., Suganuma, M., et al. 他 6 名 5 番目 Synthesis of a potent G-quadruplex-binding macrocyclic heptaoxazole. *Chem. BioChem.* 査読有, 10, (2009), 431-435
  7. Shimizu, M., Suganuma, M., et al. 他 7 名 7 番目 Green tea extracts for the prevention of metachronous colorectal adenomas: a pilot study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 査読有, 17, (2008), 3020-3025
  8. Dodo, K., Suganuma, M., et al. 他 3 名, 4 番目 Antiproliferative and apoptosis-inducing activities of alkyl gallate and gallamide derivatives related to (-)-epigallocatechin gallate. *Bioorg. Med. Chem.*, 査読有, 16, (2008), 7975-7982
  9. Nakamura, K., Suganuma, M., et al. 他 4 名, 5 番目 Complamine, an inflammation-inducing substance isolated from the marine fireworm *Eurythoe complanata*. *Org. Biomol. Chem.* 査読有, 6, (2008), 2058-2060
  10. Tera, M., Suganuma, M., et al. 他 4 名, 4 番目. Macrocyclic hexaoxazoles as sequence- and mode-selective G-quadruplex binders. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 査読有, 47, (2008), 5557-5560
  11. Suganuma, M., Yamaguchi, K., et al. 他 8 名, 1 番目 TNF- $\alpha$  inducing protein, a carcinogenic factor secreted from *H. pylori*, enters gastric cancer cells. *Int. J. Cancer.* 査読有, 123, (2008), 117-122
  12. Kuzuhara, T., Suganuma, M., et al. 他 4 名, 5 番目 Generation of mouse monoclonal antibody against (-)-epigallocatechin gallate. *Biol. Pharm.Bull.* 査読有, 31, (2008), 816-819
  13. Kuzuhara, T., Suganuma, M., Fujiki, H. Green tea catechin as a chemical chaperone in cancer prevention. *Cancer Lett.* 査読有, 26, (2008), 12-20
  14. Kuzuhara, T., Suganuma, M., et al. 他 4 名, 5 番目 Synergistic effects of multiple treatments, and both DNA and RNA direct bindings on, green tea catechins. *Mol. Carcinog.*, 査読有, 46, (2007), 640-645
  15. Kuzuhara, T., Suganuma, M., Oka, K., Fujiki, H. DNA-binding activity of TNF- $\alpha$  inducing protein from *Helicobacter pylori*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有, 362, (2007), 805-810
  16. Kuzuhara, T., Suganuma, M., Kurusu, M., Fujiki, H. *Helicobacter pylori*-secreting protein Tip $\alpha$  is a potent inducer of chemokine gene expressions in stomach cancer cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 査読有, 133, (2007), 287-296
- [学会発表] (計 16 件)
1. Suganuma, M., (Watanabe, T.) Tip $\alpha$ , *H. pylori*-carcinogenic factor, enters gastric cancer cells via a new membrane trafficking mechanism with cell surface nucleolin. 第32回日本分子生物学会年会 2009, Dec., Yokohama, Japan
  2. 菅沼雅美, (高橋淳) 緑茶カテキン EGCG による線虫 *Caenorhabditis elegans* の寿命延長効果第 3 回食品薬学シンポジウム. 2009, Nov., Ohsaka, Japan
  3. Suganuma, M., (Watanabe, T.) Tip-alpha, a gene of *H. pylori*, reveals a new carcinogenic mechanism mediated through nucleolin. 68<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association 2009, Oct. Yokohama, Japan
  4. 菅沼雅美, 新しい時代に入った緑茶によるがん予防の研究. 第 6 回日本カテキン学会. 2009, Sep Nagoya, Japan
  5. Suganuma, M. Up-regulation of GADD153 gene related to ER stress by EGCG and alkyl gallate: a unique lung cancer prevention biomarker. 68<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association 2009, Oct. Yokohama, Japan
  6. Suganuma, M. Nucleolin as a new specific binding protein of Tip $\alpha$ , a carcinogenic factor released from *H. pylori*. 100<sup>th</sup> Annual Meeting of AACR 2009, Apr. Denver, U.S.A.
  7. Suganuma, M., (Watanabe, T.) Identification of nucleolin as a specific binding protein of Tip $\alpha$ , a carcinogenic factor of *Helicobacter pylori*. 9<sup>th</sup> Korea-Japan Symposium on Cancer and Ageing Research. 2009, Mar., Damyang, Korea
  8. Suganuma, M. New aspects of green tea catechin: synergist with cancer preventive agents and a chemical chaperone. 9<sup>th</sup> Korea-Japan Symposium on Cancer and Ageing Research. 2009, Mar., Damyang, Korea
  9. 菅沼雅美, (渡邊達郎), 発がん因子 Tip $\alpha$  に対する胃粘膜上皮細胞の特異的結合タンパク質の解析. 第31回日本分子生物学会、第81回日本生化学会合同大会. 2008, Dec., Kobe, Japan

10. Suganuma, M. Cancer Chemoprevention with green tea in humans: from its beginning to clinical applications. International Symposium of Oral Cancer Research Institute. 2008, Oct., Seoul, Korea
11. Suganuma, M. Carcinogenic mechanisms of TNF-alpha inducing protein (Tip-alpha) secreted from *H. pylori*. 67<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 2008, Oct., Nagoya, Japan
12. Suganuma, M. New approach to lung cancer prevention mediated through up-regulation of GADD153 gene. 99<sup>th</sup> Annual Meeting of American Association for Cancer Research. 2008, Apr., San Diego, U.S.A
13. Suganuma, M. TNF- $\alpha$  inducing protein (Tip $\alpha$ ), a unique carcinogenic factor secreted from *H. pylori*, as a new molecular target for gastric cancer prevention. 6<sup>th</sup> Annual AACR International Conference. Frontiers in Cancer Prevention Research. 2007, Dec. Philadelphia, U.S.A.
14. Suganuma, M. Significance of Tip $\alpha$ , a carcinogenic factor of *H. pylori* in inflammation and cancer microenvironments in the stomach. 66<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 2007, Oct., Yokohama, Japan
15. Suganuma, M. Significance of Tip $\alpha$ , a unique carcinogenic factor of *H. pylori* in gastric cancer development. The 8<sup>th</sup> Japan-Korea Joint Symposium on Cancer and Ageing Research. 2007, Aug. Gifu, Japan
16. Suganuma, M. The unique carcinogenic factor Tip $\alpha$  in cancer microenvironment of *H. pylori* infection. 98<sup>th</sup> Annual Meeting of American Association for Cancer Research, 2007, Apr., Los Angeles, U.S.A

〔図書〕 (計 1 件)

1. Suganuma, M., (Fujiki, H.) Springer-Verlag. Carcinogenic aspects of protein phosphatase 1 and 2A inhibitors. In: Marine Toxins as Research Tools (N., Fusetani and W. Kem eds) 2009, pp. 221-254

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

菅沼 雅美 (SUGANUMA MASAMI)

埼玉県立がんセンター臨床腫瘍研究所・主幹

研究者番号：20196695