

平成 21 年 4 月 25 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790312
 研究課題名 (和文) ヘリコバクター・ピロリ菌 CagA 蛋白による β -カテニンシグナル活性化機構の解明
 研究課題名 (英文) Investigation of the activation mechanism of the β -catenin signal by *Helicobacter pylori* CagA
 研究代表者
 紙谷 尚子 (KAMIYA NAOKO)
 北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教
 研究者番号：40279352

研究成果の概要：*cagA* 遺伝子を保有するヘリコバクター・ピロリ菌 (ピロリ菌) 感染は、胃癌発症の危険率を有意に高める。これまでに、CagA が β -catenin シグナルを活性化することを報告している。本研究では、CagA が結合する新規細胞内標的分子を明らかにし、 β -catenin シグナルを活性化する分子機構を解明した。また、 β -catenin シグナル活性化に必要な CagA の責任領域を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学 (含真菌学)

キーワード：病原性

1. 研究開始当初の背景

(1) 胃癌は日本を含む東アジア諸国において特に罹患率が高く、胃癌による死亡は全世界ならびに日本における部位別癌死亡の第2位を占める。

(2) 胃癌は病理組織学的に、正常胃粘膜-表在性胃炎-腸上皮化生-異形成-分化型胃腺癌という過程を経て発症すると考えられている。これまでの疫学的研究から、ヘリコバクター・ピロリ菌 (ピロリ菌) 感染は表在性胃炎以降の胃発癌過程の進行に関与することが示唆されている。

(3) *cytotoxin-associated antigen A*

(*cagA*) 遺伝子を保有する *cagA* 陽性ピロリ菌は *cagA* 陰性ピロリ菌と比較して胃癌発症の危険率を有意に高める。

(4) ① ピロリ菌体内で産生された CagA 蛋白は、ピロリ菌の IV 型分泌機構を介して胃上皮細胞内に直接注入された後、細胞内の Src ファミリーチロシンキナーゼによりリン酸化される。CagA のチロシンリン酸化部位は Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) 配列で特徴づけられる。

② EPIYA 配列を含む繰り返し領域は EPIYA 配列周辺のアミノ酸配列の違いにより EPIYA-A、-B、-C、-D の4種に分類される。興味深いこ

とに、胃癌発症率が比較的低い欧米諸国と高い胃癌発症率を示す東アジア諸国では、採取された菌株間でEPIYA周辺配列に特徴的な違いがみられる。欧米型CagAはABCサイトにより構成されるのに対し、東アジア型CagAはABDサイトにより構成される。

(5) CagAはリン酸化依存的にSHP-2及びCskに結合する一方、リン酸化非依存的にGRB2及びc-Metに結合することが報告されている。よって、CagAは自身のリン酸化の有無によっても異なった生物活性を発揮することが予想される。

(6) これまでに研究代表者は、ヒト胃上皮細胞由来のMKN28細胞及びMKN45細胞においてCagAがリン酸化非依存的に β -cateninシグナルを活性化することを明らかにしている。

(7) β -cateninシグナルの脱制御は細胞癌化に深く関連することが知られている。また、 β -cateninシグナルの恒常的活性化により、肺上皮細胞が腸上皮の形質を獲得する異常な分化を示すことが報告されている。

従って、*cagA*陽性ピロリ菌感染による腸上皮化生の誘導において、 β -cateninシグナル活性化が関与している可能性が考えられる。CagAによる β -cateninシグナル活性化の分子機構を解明することは、ピロリ菌感染から胃癌発症に至る分子機構の解明に貢献するものと期待される。

2. 研究の目的

(1) CagAが β -cateninシグナルを活性化する分子機構を解明する。CagAはリン酸化非依存的に β -cateninシグナルを活性化することから、CagAの標的分子であるSHP-2及びCskは β -cateninシグナル活性化に関与しないと予想される。一方、CagAがリン酸化非依存的に結合することが報告されている分子については、 β -cateninシグナル活性化に関与しないことを既に確認している。従って、CagAが結合する新規細胞内標的分子が存在すると予想されることから、本研究において明らかにする。

(2) *cagA*陽性ピロリ菌感染による腸上皮化生の誘導はCagAの生物活性に起因することを証明する。具体的には、CagAが β -cateninシグナル活性化を介して、胃上皮細胞を腸上皮細胞へ分化誘導する可能性を明らかにする。

(3) CagA発現及び非発現細胞における遺伝子発現を比較することにより、 β -cateninシグナルの標的遺伝子のみならず細胞周期・細胞増殖に関連する遺伝子の発現変化を網羅的に解析する。

(4) CagAの分子多型が β -cateninシグナル活性化に及ぼす影響を解析し、胃癌発症率

と β -cateninシグナル活性化能の関連性について検討する。

3. 研究の方法

(1) ① CagAが結合する新規細胞内標的分子の同定：研究代表者は、ヒト胃上皮細胞由来のMKN28細胞を用いて、tet-offシステムで野生型CagAもしくはリン酸化耐性CagAを誘導発現する安定発現株を樹立している。これらの安定発現株を用いて、免疫沈降法によりCagAが結合する細胞内標的分子を探索する。CagAのC末端にはHA-tagを付加していることから、HA-tagを認識する抗体を用いてCagAの免疫沈降を行い、免疫沈降物に対して種々の抗体を用いてイムノプロットを行う。標的分子の候補として、 β -cateninシグナル関連分子であるAPC、Axin、GSK-3 β 、E-cadherin等を考えている。しかしながら、目的の標的分子が予想した候補分子に含まれない可能性も考えられる。その場合は、CagAに対する免疫沈降と質量分析を併用した方法によりCagA結合蛋白の網羅的解析を行う。

② 細胞内 β -cateninの解析：通常 β -cateninはE-cadherin結合蛋白として細胞膜近傍に局在しているが、 β -cateninシグナルが活性化された細胞においては細胞質及び核内に蓄積することが知られている。 β -cateninシグナル活性化の分子機構として次の2つの経路が考えられる。(i) β -catenin分解経路の阻害による細胞質内 β -cateninの安定化(ii) β -cateninの細胞膜から核内への移行。前者の経路によれば、細胞質 β -cateninの蓄積が認められる。一方、後者の経路によれば、 β -cateninの局在変化は観察されるものの細胞内 β -catenin量の変化は認められない。そこで、CagA安定発現株を用いてCagA誘導及び非誘導細胞での β -cateninの細胞内局在を免疫染色により観察するとともに、細胞内 β -catenin量をウェスタンブロット法により解析する。

(2) ① 腸上皮分化マーカーの解析：CagA安定発現株を用いて*cagA*陽性ピロリ菌の長期持続感染をin vitroで再構成し、CagAにより腸上皮化生が誘導される可能性を明らかにする。具体的には、CagA誘導及び非誘導条件下でMKN28胃上皮細胞を長期間培養し、腸上皮分化マーカーの発現を解析する。腸上皮分化マーカーとして、Cdx1、Cdx2、Villin、MUC2、Carbonic anhydrase 1、Sucrase等の検討を計画している。

② 腸上皮分化マーカー誘導における β -cateninシグナルの関与：胃上皮細胞において恒常的に β -cateninシグナルが活性化されることにより腸上皮分化マーカーの発現が誘導されることを示す。MKN28胃上皮細胞を用いてtet-offシステムで安定型 β

-catenin (S33Y)を誘導発現する安定発現株を樹立する。樹立した安定発現株を用いて、 β -catenin 誘導及び非誘導条件下で長期間培養し、腸上皮分化マーカーの発現を解析する。尚、実験に用いる β -catenin (S33Y)は、 β -cateninの分解過程でGSK3 β によりリン酸化される 33 番目のセリンをチロシン残基に置換した分解耐性型の変異体である。

(3) 研究代表者は、CagA 安定発現株を用いた解析により、CagA が β -catenin シグナルの標的遺伝子の一つである *cyclin D1* の発現を誘導することをウェスタンブロット法及びノーザンブロット法により明らかにしている。CagA は β -catenin シグナル以外にも複数の細胞内シグナル伝達系を脱制御すると考えられることから、細胞周期・細胞増殖に関連する遺伝子の発現変化について cDNA マイクロアレイ (GeneChip) を利用して網羅的に解析する。具体的には、CagA 誘導及び非誘導条件下で培養した細胞より total RNA を抽出し、Affymetrix 社の human genome U133A Plus 2.0 Array GeneChip を用いて遺伝子発現を解析し、CagA 誘導・非誘導細胞間で比較する。

(4) CagA の分子多型により β -catenin シグナル活性可能に差がみられるか否かを明らかにする。臨床検体から分離同定された CagA 分子多型に基づき、EPIYA サイトの数及び組み合わせにバリエーションを有する複数の変異型 CagA 発現ベクターを作製し、レポーターアッセイにより β -catenin シグナル活性化能を調べる。レポーターベクターとして、TCF 結合配列をルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだ TOPtkLuciferase 及び TCF 結合配列に点変異を導入したコントロールベクター-FOPtkLuciferase を用いる。

4. 研究成果

(1) ① CagA が結合する新規細胞内標的分子の同定：免疫沈降法を用いて CagA 結合蛋白の探索を進めた結果、CagA がリン酸化非依存的に E-cadherin と複合体を形成することを見いだした。

② 細胞内 β -catenin の解析：CagA 安定発現細胞における細胞内 β -catenin の解析を行った。免疫染色により β -catenin の細胞内局在を調べたところ、CagA 非発現細胞では β -catenin が細胞膜に局在しているのに対し、CagA 発現細胞では細胞質及び核内に移行していることが観察された。一方、ウェスタンブロットの結果から、CagA 発現細胞における細胞内 β -catenin の蓄積は認められなかった。

③ CagA が E-cadherin/ β -catenin 複合体に及ぼす影響を調べたところ、CagA 発現細胞では E-cadherin に結合する β -catenin 量が減少していることが認められた。

従って、CagA は E-cadherin との結合を介して E-cadherin/ β -catenin 複合体形成を不安定化する結果、 β -catenin を細胞膜から細胞質及び核内へ移行を促し β -catenin シグナルを活性化することが明らかになった。

(2) ① 腸上皮分化マーカーの解析：ヒト胃上皮細胞由来の CagA 安定発現株を用いて、CagA 誘導及び非誘導条件下で 14 日間細胞を培養し、腸上皮分化マーカーの発現をノーザンブロット法もしくは免疫染色により解析した。その結果、CagA を長期間発現させた MKN28 胃上皮細胞において、Cdx1 及び MUC2 の発現が誘導されていることを見いだした。② 腸上皮分化マーカー誘導における β -catenin シグナルの関与：MKN28 胃上皮細胞を用いて tet-off システムで安定型 β -catenin (S33Y) を誘導発現する安定発現株を樹立した。 β -catenin 誘導及び非誘導条件下で 14 日間培養し、免疫染色により MUC2 発現の有無を解析したが、MUC2 発現は認められなかった。

既に研究代表者は、胃上皮細胞において CagA が $p21^{WAF1/Cip1}$ を誘導することをウェスタンブロット法ならびにノーザンブロット法により明らかにしていた。 $p21^{WAF1/Cip1}$ の発現は細胞分化においても重要な役割を担うことから、CagA による腸上皮分化マーカーの誘導に関与している可能性が考えられた。そこで、CagA による腸上皮分化マーカーの誘導において、 β -catenin シグナル及び $p21^{WAF1/Cip1}$ が関与している可能性を検証した。解析の手段として、先に樹立していた tet-off システムで安定型 β -catenin (S33Y) を単独に発現する安定発現株に加えて、 $p21^{WAF1/Cip1}$ を単独発現する安定発現株ならびに安定型 β -catenin (S33Y) と $p21^{WAF1/Cip1}$ を二重発現する安定発現株を樹立した。樹立した安定発現株を用いて、 β -catenin (S33Y)/ $p21^{WAF1/Cip1}$ 誘導及び非誘導条件下で 14 日間培養し、免疫染色により MUC2 発現の有無を解析した。その結果、安定型 β -catenin (S33Y) と $p21^{WAF1/Cip1}$ を二重発現する安定発現株においてのみ MUC2 発現が観察された。

以上のことから、CagA は β -catenin シグナルの活性化及び $p21^{WAF1/Cip1}$ の誘導を介して、胃上皮細胞を腸上皮細胞に異常分化させることが示された。

(3) CagA 発現細胞における遺伝子発現変化に関する網羅的解析：cDNA マイクロアレイを用いて CagA 誘導及び非誘導細胞における遺伝子発現を解析・比較したところ、CagA 発現により複数の遺伝子の発現に変化がみられた。CagA 発現により発現亢進が認められた遺伝子には、細胞形質転換に関わる遺伝子群 (Matrix metalloproteinase 1, CD26 等) や腸で発現が認められる遺伝子群 (Intestinal cell kinase 等) が含まれていた。また、既

にノーザンブロット法を用いて CagA による発現誘導を明らかにしていた Cdx1 及び p21^{WAF1/Cip1} の発現亢進も確認された。

(4) CagA の分子多型と β -catenin シグナル活性化能の関連性の解析：

① 欧米型 CagA (CagA-ABC) と東アジア型 CagA (CagA-ABD) では、 β -catenin シグナル活性化能に差は認められなかった。

② CagA-ABC と CagA-ABCCC 間で β -catenin シグナル活性化能に差がみられなかったことから、C サイトの数には依存しないことが示された。

③ 変異型 CagA-AB は β -catenin シグナル活性化能を示さなかった。一方、AB サイトを保有しない CagA-C と CagA-D では β -catenin シグナル活性化能が認められた。従って、CagA の AB サイトは β -catenin シグナル活性化に関与しないことが明らかになった。

④ 研究代表者らは、CagA の C サイト及び D サイト近傍に共通に存在する 16 アミノ酸配列が CagA の多量体形成ならびに CagA-PAR1b 複合体形成の責任領域であることを見だし、CagA-multimerization (CM) 配列として報告している。CagA-C 及び CagA-D より CM 配列のみを除去したところ、 β -catenin シグナル活性化能の消失が確認された。

従って、CagA の CM 配列が β -catenin シグナル活性化に必要な責任領域であることが示されたことから、CagA による E-cadherin/ β -catenin 複合体の不安定化の分子機構に PAR1b が関与している可能性が示唆された。また、CagA による β -catenin シグナルの活性化は欧米型 CagA と東アジア型 CagA に共通に認められることから、CagA の β -catenin シグナル活性化能は CagA の基本的生物活性であり、すべての CagA 分子種が前癌病変とされている腸上皮化生を引き起こす能力を保有していることが示唆された。

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 7 件)

① H. Lu, Y. Saito, M. Umeda, N. Murata-Kamiya, H. Zhang, H. Higashi and M. Hatakeyama. Structural and functional diversity in the PAR1b/MARK2-binding region of *Helicobacter pylori* CagA. *Cancer Sci.* **99**, 2004-2011 (2008) 査読有り.

② 齊藤康弘, 紙谷尚子, 畠山昌則. ヘリコバクター・ピロリ CagA による細胞がん化メカニズム. *実験医学* **26**, 2445-2452 (2008) 査読無し.

③ 齊藤康弘, 紙谷尚子, 畠山昌則. 胃がん発症における *Helicobacter pylori* CagA の意義. *血液・腫瘍科* **56**, 219-225 (2008) 査読

無し.

④ Y. Kurashima, N. Murata-Kamiya, K. Kikuchi, H. Higashi, T. Azuma, S. Kondo and M. Hatakeyama. Deregulation of β -catenin signal by *Helicobacter pylori* CagA requires the CagA-multimerization sequence. *Int. J. Cancer* **122**, 823-831 (2008) 査読有り.

⑤ 紙谷尚子, 畠山昌則. *Helicobacter pylori* CagA は PAR1b/MARK2 キナーゼを標的として上皮細胞の極性を破壊する. *分子消化器病* **4**, 392-396. (2007) 査読無し.

⑥ N. Murata-Kamiya, Y. Kurashima, Y. Teishikata, Y. Yamahashi, Y. Saito, H. Higashi, H. Aburatani, T. Akiyama, R. M. Peek Jr., T. Azuma and M. Hatakeyama. *Helicobacter pylori* CagA interacts with E-cadherin and deregulates the β -catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells. *Oncogene* **26**, 4617-4626. (2007) 査読有り.

⑦ I. Saadat, H. Higashi, C. Obuse, M. Umeda, N. Murata-Kamiya, Y. Saito, H. Lu, N. Ohnishi, T. Azuma, A. Suzuki, S. Ohno and M. Hatakeyama. *Helicobacter pylori* CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial polarity. *Nature* **447**, 330-333. (2007) 査読有り.

[学会発表] (計 3 件)

① 紙谷尚子. Elucidation of *Helicobacter pylori* CagA structure involved in deregulation of the β -catenin signal. 第 67 回日本癌学会学術総会, 2008 年 10 月 28-30 日, 名古屋国際会議場.

② 紙谷尚子. Destabilization of the E-cadherin/ β -catenin complex by the *Helicobacter pylori* CagA protein. Cell polarity 2007 -International Symposium on Cell Polarity and Future Medicine-, 2008 年 12 月 9-10 日, 湘南国際村.

③ 紙谷尚子. The role of PAR1/MARK polarity kinase in the interaction between *Helicobacter pylori* CagA and SHP-2 oncoprotein. 第 66 回日本癌学会学術総会, 2007 年 10 月 3-5 日, パシフィコ横浜.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

紙谷 尚子 (KAMIYA NAOKO)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教

研究者番号：40279352

(2) 研究分担者

無し

(3)連携研究者
無し