

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月3日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390084

研究課題名（和文）ヘリコバクター・ピロリ VacA 毒素受容体の多機能解析

研究課題名（英文）Analysis on multifunctional receptors for *Helicobacter pylori* VacA

研究代表者

平山 壽哉（HIRAYAMA TOSHIYA）

長崎大学・熱帯医学研究所・教授

研究者番号：50050696

研究成果の概要（和文）：

ピロリ菌の空胞化毒素（VacA）の多様な作用は、上皮細胞膜のいくつかの受容体（受容体型チロシンホスファターゼおよびフィブロネクチンなど）を介する。我々は胃由来株化細胞から機能不明な VacA 結合蛋白 p500 を精製して、p500 が低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質（LRP1）であることを認めた。VacA は LRP1 との結合を介してオートファジーを誘導した。LRP1 がオートファジー誘導に関与する初めての知見であり、過剰なオートファジー誘導はアポトーシス誘導を引き起こすことを証明した。

研究成果の概要（英文）：

The pleiotropic effects of vacuolating cytotoxin (VacA) produced by *Helicobacter pylori* appear to result from activation of different signal transduction pathways through binding to several epithelial cell receptors, e. g., receptor protein tyrosine phosphatase (RPTP) β and α , and fibronectin. Here we purified from AZ-521 cells, a human gastric epithelial cell line, a surface membrane protein, p500, which binds VacA, and identified it as low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP1). LRP1 binding of VacA was shown to be specifically responsible for VacA-induced autophagy and apoptosis, but not activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. Similar to RPTP α and RPTP β , LRP1 mediates VacA internalization in AZ-521 cells, but in contrast to RPTP α and RPTP β , LRP1 targeted downstream pathways leading to autophagy and apoptosis. VacA-induced autophagy via LRP1 binding precedes apoptosis suggesting that an excessive autophagic activity can also lead to cell death. This is the first study to provide evidence that LRP1 mediates autophagy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2011年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2012年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：(1) ヘリコバクター・ピロリ (2) VacA (3) 細菌毒素 (4) 細菌毒素受容体

1. 研究開始当初の背景

胃粘膜に特定の細菌は存在しないというそれまでの考えを覆して1983年に発見されたヘリコバクター・ピロリは胃炎、消化性潰瘍、MALTリンパ腫、胃癌など各種消化器疾患の原因菌であることが知られている。1997年に本菌のゲノム解析が完了し、本菌がゲノムレベルできわめて多型性に富むことが明らかにされた。すなわち、本菌は個々の臨床分離株間でその形質が大きく異なるという特徴を有し、この差異が菌株間の病原性の差として反映される可能性が大きい。事実、最近の分子疫学的解析を通して、本菌の有する複数の遺伝子と病原性との関連が指摘され、なかでも *cagA* 遺伝子、*vacA* 遺伝子は胃癌との関連が強く示唆されている。*cagA* 遺伝子は欧米分離株の60-70%、日本分離株のほとんどが保有する。*cagA* 陽性株は陰性株にくらべ高度の萎縮性胃炎を惹起し、この萎縮性胃炎を素地として腸上皮化生さらには分化型腺癌が発症すると推察されている。*vacA* 遺伝子はすべての菌株が保有するが、その産物であるVacAを産生・分泌する菌は全体の50%程度にとどまる。VacA毒素 (vacuolating cytotoxin: 空胞化毒素)は菌体から分泌され、胃上皮細胞に空胞変性を引き起こし、死滅させる。興味深いことに *cagA* 遺伝子と *vacA* 遺伝子はゲノム上まったく独立して存在するにもかかわらず、VacA毒素産生菌株はほぼすべて *cagA* 陽性であり、「CagAとVacA毒素の共存が本菌感染において菌側に何らかの有利な状況を作り出す」可能性が考えられた。

我々はこれまで本菌が産生する VacA の受容体が受容体型チロシンフォスファターゼ RPTP⁺ であることを示した (*J. Biol. Chem.* 1999, 2000)。さらに、RPTP⁺ KO マウスを用いて VacA が胃粘膜上皮細胞の RPTP⁺ に結合してその細胞接着能を減少させ、その結果、上皮細胞が基底膜から剥離し、胃酸の逆拡散などに曝されて胃炎、潰瘍の病態が形成される機序を報告した (*Nat. Genet.* 2003)。この作用は RPTP⁺ の Natural ligand であるヘパリン結合性成長因子 Pleiotrophin (PTN) と酷似していた。加えて、VacA が宿主細胞の転写活性の攪乱を引き起こすこと (*J. Biol. Chem.* 2003)、中でも p38MAPK/ATF-2 経路を介した ATF-2 の活性化 (*J. Biol. Chem.* 2004, *Infect. Immun.* 2006) が胃上皮細胞では COX-2 (*Infect Immun.* 2007)、単球系細胞では IL-8 (*J. Immunol.* 2008) の発現を亢進させることを明らかにした。さらに 2009 年 1 月には、

VacA が PI3K/Akt 経路を活性化して Wnt/ β -catenin シグナル伝達経路を活性化して、細胞周期や増殖、遺伝子発現に大きく影響していることを示した (*J. Biol. Chem.* 2009)。こうした一連の反応は VacA 毒素が受容体に結合し細胞内に取り込まれることなく惹起されるのに対し、VacA 毒素が細胞内に取り込まれると Bax や Bak を活性化してミトコンドリアからのチトクローム C 遊離を惹起してアポトーシスを引き起こす (*J. Biol. Chem.* 2006)。ここに至って、我々は VacA 毒素の作用を二つに分けて考えた。すなわち、VacA が受容体に結合した後に細胞内に取り込まれるか否かを境にして、細胞の「生と死」といった相反する現象を促す作用を VacA が示すことであった。

興味深いことに、本菌の病原遺伝子群 (CagPAI) の産物で、4 型分泌装置で胃上皮細胞に直接注入され「細胞増殖と発癌」に関連する CagA は、VacA の細胞内への取り込みを阻害することが判明した (開始当初は投稿中であつたが *Dis. Model. Mech.* 2010 に掲載済み)。我々の初期の研究では、細胞内への取り込みとは無関係に細胞を「生」に促す VacA 毒素の作用は、増殖因子である PTN の「細胞増殖」に関わる反応と似ていることも分かってきた (*J. Biol. Chem.* 2009)。しかも、これまでに得た知見、すなわち CagA によってもたらされる NFAT-3 の活性化とその活性化を介して細胞の細胞周期を G1 期で停止させる p21 の発現を促す作用を VacA が阻害すること (*Proc Natl Acad Sci USA* 2005) は、「VacA が細胞増殖を促進する」という考えとも一致していた。従って、本菌が付着定着して持続感染の部位を胃に確保してゆくためには VacA による細胞死の誘導はそのまま菌の定着場所を失うことであり、菌にとって必ずしも好ましいものではないと考えた。

2. 研究の目的

我々の当初の基礎的研究により、細胞の増殖に関わる情報伝達は、これまで VacA 受容体として報告したいずれの PRPT (RPTP⁺ と RPTP⁻) をも介しているのではないことが判明していたことから、本研究により、細胞増殖に関わる新たな VacA 受容体を同定し、細胞増殖に関わる VacA 受容体の活性化分子メカニズムを究明することを目的とした。とくに VacA 毒素の抗体を用いた免疫沈降実験の成績では、RPTP⁺ と RPTP⁻ との間にあるバンド

はRPTP・抗体と反応することからその分解物と推察しているため、研究対象とする候補蛋白はより高分子のVacA毒素結合蛋白である分子量約500kDaの糖蛋白質 (p500) を研究の焦点に当てて研究を進めた。

3. 研究の方法

これまで VacA 受容体の同定に用いた方法をスケールアップして、VacA 抗体による免疫沈降によって得られる VacA と結合する蛋白質の解析を進めた。すなわち、p500 の精製と同定は、既報 (*J. Biol. Chem.* 1999, 2000) と同様にレクチンカラムを用いる可能性を調べたところ、p500 は MAA レクチンと反応する糖タンパクであるが、RPTP・と反応する PNA レクチンとは反応しないことが判ったので、大量培養した胃由来株細胞 AZ-521 から MAA レクチンカラムを用いて精製し、LC/Mass で構造解析した。その結果認められたスコアの高い蛋白質をあらたな VacA 毒素受容体として、細胞増殖に関わる可能性を究明した。

そのために p500 抗体を用いた、免疫沈降法や共焦点顕微鏡などでの染色・蛍光画像解析による VacA との結合を調べた。また p500siRNA を用いて p500 が発現抑制した細胞を用いて、VacA が惹起する p38MAP kinase などの MAPK や PI3k/Akt 経路の活性化、さらにはその下流で細胞生存に関わる Wnt/ β -catenin 経路のキーエンザイムである GSK3 β に及ぼす影響を調べた。

p500 がオートファジーやアポトーシス誘導に関与しているかを、LC3B の発現、細胞内における蓄積、LysoTracker による小胞の酸性化の有無、アポトーシスマーカー蛋白質の切断などを調べて解析した。

4. 研究成果

VacA 抗体を用いた免疫沈降物に認められた蛋白質 p500 を Mass 解析した結果、数種類の膜蛋白を候補蛋白として同定した。この中でとくに LRP1 (低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質 1, low-density lipoprotein receptor-related protein 1) は膜 1 回貫通蛋白であり、LDL と結合するほかに、他の細菌毒素である緑膿菌 Exotoxin A を含む 30 以上のリガンドと結合し広範多岐な生理機能に関わる情報の伝達に細胞、組織特異的に機能していることが知られていた。興味深いことに LRP1 は細胞外マトリックス蛋白トロンボスポンジン 1 (TSP1) と結合し PI3K/Akt 情報伝達経路を活性化し抗アポトーシス作用と線維化の促進に寄与することが報告されていて、VacA と同様に PI3K/Akt 経路の活性化が LRP1 を介して生じていることが示されていた。そこで LRP1 が VacA と結合することを免疫化学的、細胞化学的、分子生物学的に証

明を試みた。

LRP1 の発現を siRNA を用いて抑制した細胞では、VacA の空胞化活性が阻害されたが、目的とする VacA による Akt や GSK3 β のリン酸化亢進には影響しなかった。しかし、LRP1 は VacA と共に細胞内に取り込まれ、LC3B の集積するオートファジー酸性領域に共局在した。興味深いことに、VacA による空胞とは異なる小胞であった。また、陰イオントランスポーター阻害剤処理により VacA 誘導性のオートファジー誘導が阻害されることから、この事象は陰イオンの細胞内変化が関与することが示唆された。さらに、LRP1 あるいは Atg5 の発現抑制は VacA によるオートファジー誘導のみならず、アポトーシスをも部分的に阻害した。

以上の結果は、VacA のオートファジー誘導に LRP1 が関与する初めての知見であり、過剰なオートファジー形成はアポトーシス誘導にも寄与していると考えられた。

一方、津川等との共同研究の結果は、ピロリ菌の発癌リスク因子であるエフェクター蛋白質 CagA が VacA 誘導性のオートファジーにより分解されるが、LRP1 抑制細胞では CagA のオートファジー分解が阻害されて細胞内蓄積することが明らかとなった。加えてピロリ菌によって細胞内に打ち込まれた CagA は、通常、オートファジーによって分解・排除されるが、CD44v9 を発現するいわゆる「がん幹細胞」では、細胞内に CagA を溜め込んでいくことも判明した。

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 10 件)

1. Tsugawa H, Suzuki H, Saya H, Hatakeyama M, Hirayama T, Hirata K, Nagano O, Matsuzaki J, Hibi T.: Reactive Oxygen Species-Induced Autophagic Degradation of *Helicobacter pylori* CagA Is Specifically Suppressed in Cancer Stem-like Cells. (2012) Cell Host Microbe. 12: 764-777. 査読あり
2. Yahiro K, Satoh M, Nakano M, Hisatsune J, Isomoto H, Sap J, Suzuki H, Nomura F, Noda M, Moss J, Hirayama T: Low-density Lipoprotein Receptor-related Protein-1 (LRP1) Mediates Autophagy and Apoptosis Caused by *Helicobacter pylori* VacA. (2012) J Biol Chem. 287: 3104-3115. 査読あり

3. Nakano M, Yamasaki E, Ichinose A, Shimohata T, Takahashi A, Akada JK, Nakamura K, Moss J, Hirayama T, Kurazono H: *Salmonella* enterotoxin (Stn) regulates membrane composition and integrity. (2012) Dis Model Mech. 5: 515-521. 査読あり
 4. Isomoto H, Matsushima K, Inoue N, Hayashi T, Nakayama T, Kunizaki M, Hidaka S, Nakayama M, Hisatsune J, Nakashima M, Nagayasu T, Nakao K, Hirayama T: Interweaving microRNAs and proinflammatory cytokines in gastric mucosa with reference to *H. pylori* infection. (2012) J Clin Immunol. 32:290-299. 査読あり
 5. Nakashima Y, Isomoto H, Matsushima K, Yoshida A, Nakayama T, Nakayama M, Hisatsune J, Ichikawa T, Takeshima F, Hayashi T, Nakao K, Hirayama T, Kohno S. Enhanced Expression of CXCL13 in Human *Helicobacter pylori*-Associated Gastritis. (2011) Dig Dis Sci. 56:2887-2894. 査読あり
 6. Matsumoto A, Isomoto H, Nakayama M, Hisatsune J, Nishi Y, Nakashima Y, Matsushima K, Kurazono H, Nakao K, Hirayama T, and Kohno S: *Helicobacter pylori* VacA reduces cellular expression of STAT3 and pro-survival Bcl-2 family proteins, Bcl-2 and Bcl-XL, leading to apoptosis in gastric epithelial cells. (2011) Dig. Dis. Sci. 56:999-1006. 査読あり
 7. Matsushima K, Isomoto H, Inoue N, Nakayama T, Hayashi T, Nakayama M, Nakao K, Hirayama T, Kohno S.: MicroRNA signatures in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. (2011) Int .J. Cancer. 128:361-370. 査読あり
 8. Saito Y, Murata-Kamiya N, Hirayama T, Ohba Y, Hatakeyama M: Conversion of *Helicobacter pylori* CagA from senescence inducer to oncogenic driver through polarity-dependent regulation of p21. (2010) J. Exp. Med. 207:2157-2174. 査読あり
 9. Akada JK, Aoki H, Torigoe Y, Kitagawa T, Kurazono H, Hoshida H, Nishikawa J, Terai S, Matsuzaki M, Hirayama T, Nakazawa T, Akada R, Nakamura K.: *Helicobacter pylori* CagA inhibits endocytosis of cytotoxin VacA in host cells. (2010) Dis. Model. Mech. 3:605-617. 査読あり
 10. Isomoto H, Moss J, Hirayama T: Pleiotropic actions of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, VacA. (2010) Tohoku J. Exp. Med. 220:3-14. 査読あり
- [学会発表] (計 10 件)
1. Toshiya Hirayama and Masayuki Nakano: Low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1) mediates autophagy and apoptosis caused by *Helicobacter pylori* VacA.. The 6th Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases & The 11th Nagasaki-Singapore Medical Symposium. Dec. 10-12, 2012, Nagasaki, Japan.
 2. Akazawa Y, H. Isomoto, K. Matsushima, K. Shiozawa, N. Yamaguchi, K. Ohnita, F. Takeshima, T. Hirayama, K. Nakao: ER STRESS CONTRIBUTES TO VAC A INDUCED GASTRIC EPITHELIAL CELL DEATH. UEGW 2012, Oct. 20-24, 2012, Amsterdam, Netherland.
 3. Kinno Suke Yahiro, Masayuki Nakano, Masatoshi Noda, Jan Sap, Joel Moss, Toshiya Hirayama: Low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1) mediates autophagy and apoptosis caused by *Helicobacter pylori* VacA.. EMBO 2012 meeting, Sep. 22-25, 2012, Nice, France.
 4. Masayuki Nakano, Eiki Yamasaki, Takaaki Shimamoto, Akira Takahashi, Hisao Kurazono, Toshiya Hirayama: Evaluation of the Function of Stn produced by salmonella. The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Sep. 11-14, 2012, Copenhagen, Denmark.
 5. Toshiya Hirayama: Pleiotropic action of VacA toxin of *Helicobacter pylori*. 2nd INTERNATIONAL SYMPOSIUM INFECTION-ASSOCIATED CANCERS. Mar. 12-13, 2012, Sapporo, Japan.

6. Kayoko Matsushima, Hajime Isomoto, Shigeru Kohno, Yuko Akazawa, Naoyuki Yamaguchi, Ken Ohnita, Tatsuki Ichikawa, Fuminao Takeshima, Kazuhiko Nakano, Toshiya Hirayama: Clinical significance of microRNAs in *H. pylori*-associated gastritis. The 8th Japan-Korea Joint Symposium on *Helicobacter* Infection. May 29, 2011, Seoul, Korea.
7. Hajime Isomoto, Kazuhiko Nakao, Kayoko Matsushima, Yuko Akazawa, Ayako Matsumoto, Toshiya Hirayama: Mechanisms of *H. pylori* vacuolating cytotoxin-induced apoptosis in gastric epithelial cells. The 8th Japan-Korea Joint Symposium on *Helicobacter* Infection. May 29, 2011, Seoul, Korea.
8. Junko K. Akada, Hiroki Aoki, Toshiya Hirayama, Teruko Nakazawa, Rinji Akada, Kazuyuki Nakamura: *Helicobacter pylori* CagA Inhibits Endocytosis of Cytotoxin VacA in Host Cells The American Society for Cell Biology 50th Annual Meeting. Dec. 11-15, 2010. Austin, USA
9. Hajime Isomoto, Nakashima Y, Nakao K., Hirayama T.: Enhanced expression of CCL20 and CXCL13 in *Helicobacter pylori*-associated gastritis in humans. XXIII International Workshop on *Helicobacter* and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. Sept. 16-18, 2010. Rotterdam, The Netherland
10. Toshiya Hirayama: Pleiotropic action of vacuolating cytotoxin, VacA, of *Helicobacter pylori*. The 10th Japan-Korea International Symposium on Microbiology. Mar. 25-26, 2010, Yokohama, Japan

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平山 壽哉 (HIRAYAMA TOSHIYA)

長崎大学・熱帯医学研究所・教授

研究者番号：5 0050696

(2) 研究分担者

磯本 一 (ISOMOTO HAJIME)

長崎大学・病院・准教授

研究者番号：90322304