

ヘリコバクターピロリ *cag* pathogenicity island の機能解析

●東 健 ◆吉田 優
神戸大学医学部

<研究の目的と進め方>

Helicobacter pylori (*H.pylori*) のゲノムには、本来 *H.pylori* のものではない外来性の遺伝子群が存在している。これは病原性大腸菌など多くのグラム陰性細菌に共通した現象で、これらの細菌では、この外来性遺伝子群を持つことで病原性を発揮することが認められており、この遺伝子群を pathogenicity island (PAI) と呼んでいる。*H.pylori* では、病原因子の一つである細胞空胞化毒素関連蛋白 (CagA) の遺伝子 *cagA* がこの PAI 内に位置しており、*cag*PAI と呼ばれている。*H.pylori* の *cag*PAI 内には IV 型分泌装置の遺伝子が存在している。我々は、*H.pylori* が胃粘膜上皮細胞に接着すると、IV 型分泌装置が上皮細胞膜へ針をさすように突き刺さり、その内腔を通して CagA が *H.pylori* から上皮細胞内へと注入されることを明らかにした。また、上皮内に注入された CagA は、胃粘膜上皮細胞内でチロシンリン酸化を受け、細胞の分化や増殖に重要な役割を担う細胞質内脱リン酸化酵素 Src homology phosphatase-2 (SHP-2) と特異的に結合し、細胞の異常増殖に作用することを発見した。これまで *H.pylori* を *cag*PAI を持つ type I 株と、*cag*PAI を持たない type II 株に分類し、type I 株は胃粘膜の炎症反応が強く、病原性が強いと考えられてきた。本研究は、*H.pylori* の *cag*PAI 遺伝子群の機能を解析し、*H.pylori* 感染の病態を解明することを目的とした。

<2007 年度の研究の当初計画>

a) *H.pylori* 感染における *cag*PAI 遺伝子発現の解析：ヒト胃癌細胞株 AGS 細胞を用いた *in vitro* 感染実験において *cag*PAI 遺伝子の発現機序を解析する。*cag*PAI 内に菌-宿主細胞相互作用に関与する重要な遺伝子群が存在すると考えられている。そこで、*H.pylori* が AGS 細胞に感染する際に発現レベルが変化する遺伝子を同定する。AGS 細胞に *H.pylori* 各臨床分離株を感染させた後、経時的に (1,2,5,10 時間後) RNA を抽出、*cag*PAI 内の遺伝子の発現を定量的 TaqMan RT-PCR 法で検出する。未感染 *H.pylori* から抽出した RNA と比較し、感染から経時的に変化する遺伝子を同定する。この際、同時に得られたヒトの RNA は、宿主反応解析の cDNA マイクロアレイ解析に使用する。b) *H.pylori* 感染におけるリン酸化蛋白質の網羅的解析：シグナル伝達系を構成するチロシンリン酸化蛋白質に関して、感染時からの活性変動を効率的・網羅的に解析することにより、感染に伴うシグナル伝達の“乱れ”を明らかにし、計算機上におけるネットワーク解析を通して疾患発生機序が統合的に理解出来るようになる。本研究計画においては、近年の技術進展が目覚ましい定量プロテオミクス解析法により、シグナル伝達関連因子の包括的なデータの取得を行う。SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture) による相対変動解析法に基づいて、ヒト胃癌細胞株である AGS 細胞を、互いに質量の異なる 3 種類の安定同位体 (アルギニン) を含む培地中で継代培養することにより、細胞中の全タンパク質に代謝標識を導入する。異なる質量を持つアルギニンでラベルされた 3 種類の AGS 細胞を異なる時間 (0, 1, 5 時間及び 0, 2, 10 時間) 感染させ、細胞抽出液を取得する。得られた抽出液は等比で混合し、抗リン酸化チロシン抗体による免疫沈降後、独自

に開発したチロシンリン酸化蛋白質特異的溶出法により、高速かつ効率的なシグナル伝達因子の回収を行う。得られたチロシンリン酸化蛋白質の混合物は、電気泳動により分離展開することなく、直接トリプシン消化をして質量分析の測定サンプルを作成する。測定には nanoLC-Q-ToF システムを用い、サンプル中に含まれる全蛋白質に関してショットガン式に MS/MS スペクトルを取得する。代表的な検索エンジンである Mascot によって包括的に蛋白質の同定を行うと同時に、精度の高い相対定量プロテオーム解析をハイスループットに行う為に独自に開発したソフトウェアを用いて、感染前の状態に対する各感染時間におけるシグナル伝達因子群の相対的なリン酸化変動データを取得する。

<2007 年度の成果>

H.pylori が胃粘膜上皮細胞に接着すると、4 型分泌装置が *H.pylori* の細胞膜から上皮細胞膜へ針をさすように突き刺さり、その内腔を通して CagA が *H.pylori* から胃粘膜上皮細胞内へと注入される。上皮細胞内に注入された CagA は上皮内でチロシンリン酸化を受け、チロシンリン酸化された CagA が、細胞の増殖や分化に重要な役割を担う Src homology 2 domain (SH2 ドメイン) を有する細胞質内脱リン酸化酵素である Src homology phosphatase-2 (SHP-2) と結合することが認められた。CagA との結合により SHP-2 のチロシンフォスファターゼ活性は著しく増強される。これまでに、CagA によって脱制御された SHP-2 は Ras 非依存的に Erk MAP キナーゼの持続的活性化を引き起こすことが認められた。Erk の持続活性化は細胞の運動性ならびに細胞周期制御に重要な役割を果たすことが知られており、CagA-SHP-2 複合体による Erk の持続的活性化は異常増殖シグナル生成に関与することが推察される。また、CagA により活性化された SHP-2 が直接脱リン酸化する細胞内基質分子として focal adhesion kinase (FAK) が同定された。FAK は細胞-基質間相互作用の基盤となる細胞接着班を制御することにより、細胞運動を制御する。SHP-2 は FAK のキナーゼドメイン活性化ループ内に存在するチロシンリン酸化部位を脱リン酸化し、FAK キナーゼ活性を抑制する。FAK の活性低下に伴い細胞接着班の新生が抑制され、細胞-基質間相互作用の低下による細胞運動能の増大が引き起こされる。さらに、CagA はチロシンリン酸化非依存的に肝細胞増殖因子受容体 c-Met やアダプター分子 Grb2 に結合することが報告されており、細胞の増殖や分化に関わる NF- κ B や NFAT などの転写因子を活性化することも明らかにされている。CagA によるこれら分子の機能的脱制御も胃上皮細胞傷害に相乗的に作用する。一方、CagA はチロシンリン酸化非依存的に PAR1/MARK キナーゼと結合し、PAR1 キナーゼ活性は低下し、結果として PAR1 は細胞膜から遊離し、極性や細胞間結合が損なわれることも示された。さらに、CagA は E-cadherin の結合蛋白である β -catenin を脱制御することも示唆されており、細胞間接着装置の不活化を介して正常胃粘膜構造を破壊し、*H.pylori* 感染に伴う胃粘膜炎症を促進させることが示唆された。

我々は、*cagA* 遺伝子トランスジェニックマウス作製に成功し、同マウスが生後 3 ヶ月から過形成胃炎を生じ、72 週において胃

癌が生じたことを認めた。

H. pylori 感染におけるリン酸化蛋白質の網羅的解析については、*H. pylori* 感染において、met proto-oncogene、Integrin beta 4、Tyrosine-protein kinase、Catenin、Tight junction protein 2、Rho GTPase activating protein 12、Tubulin, alpha 8、Cell division cycle 2 protein isoform 1、Annexin A2 isoform 2などがリン酸化されることを認めた。今回経時的変化については解析が出来なかった。

<国内外での成果の位置づけ>

H. pylori 感染による細胞内シグナル伝達系の変化の解析や *cagPAI* 遺伝子の4型分泌装置や CagA の病態への関与しについての解析は、我々がリードしている。

H. pylori 感染による細胞間接着因子の変化や、*cagA* 遺伝子トランスジェニックマウスによる胃癌の発症については、世界初の発見である。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

H. pylori 感染による、感染上皮細胞内のリン酸化蛋白質の網羅的解析で、経時的変化をみる事が出来なかった。これは、培養細胞を3種類の安定同位体(アルギニン)を含む培地中で継代培養する際に、細胞の増殖が著しく抑制され、十分なサンプルを採取することが出来なかったためである。今後、使用する細胞を変えて検討することを考えている。

<今後の課題>

メタボローム解析による *H. pylori* 感染における、細胞内のリン酸化蛋白質の網羅的な解析については、培養細胞を AGS から KATO 3 など他の細胞株を使用して検討する。さらに、*cagA* 遺伝子トランスジェニックマウスを用いて、胃粘膜上皮細胞内のシグナル分子変化を検討する。

<成果公表リスト>

1) 論文

- 0801291750 Ohnishi N, Yuasa H, Tanaka S, Sawa H, Miura M, Matsui A, Higashi H, Musashi M, Iwabuchi K, Suzuki M, Yamada G, Azuma T, Hatakeyama M. *Helicobacter pylori* CagA protein induces gastrointestinal carcinoma and leukemias in mice. Proc Natl Acad Sci USA (in press).
- 0801291756 Saadat I, Higashi H, Obuse C, Umeda M, Murata-Kamiya N, Saito Y, Lu H, Ohnishi N, Azuma T, Suzuki A, Ohno S, Hatakeyama M. *Helicobacter pylori* CagA targets PAR-1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. Nature 447:330-333, 2007.
- 0801291800 Matsumoto Y, Marusawa H, Kinoshita K, Endo Y, Kou T, Morisawa T, Azuma T, Okazaki I, Honjo T, Chiba T. *Helicobacter pylori* infection triggers aberrant expression of activation-induced cytidine deaminase in gastric epithelium. Nat Med 13:470-176, 2007.
- 0801291806 Murata-Kamiya N, Kurashima Y, Teishikata Y, Yamahashi Y, Saito Y, Higashi H, Aburatani H, Akiyama T, Peek RM Jr, Azuma T, Hatakeyama M. *Helicobacter pylori* CagA interacts with E-cadherin and deregulates the beta-catenin signal that promotes intestinal trans differentiation in

gastric epithelial cells. Oncogene 26:4617-4626, 2007.

- 0801291813 Mitani T, Shirasaka D, Aoyama N, Miki I, Morita Y, Ikehara N, Matsumoto Y, Okuno T, Toyoda M, Miyachi H, Yoshida S, Chayahara N, Hori J, Tamura T, Azuma T, Kasuga M. Role of metallothionein in *Helicobacter pylori*-positive gastric mucosa with or without early gastric cancer and the effect on its expression after eradication therapy. J Gastroenterol Hepatol 2007 Aug 27 [Epub ahead of print]
- 0801291822 Fu HY, Asahi K, Hayashi Y, Eguchi H, Murata H, Tsujii M, Tsuji S, Azuma T, Kawano S. East Asian-type *Helicobacter pylori* cytotoxin-associated gene A protein has a more significant effect on growth of rat gastric mucosal cells than the Western type. J Gastroenterol Hepatol 22:355-362, 2007.
- 0608012201 Naito M, Yamazaki T, Tsutsumi R, Higashi H, Onoe K, Yamazaki S, Azuma T, Hatakeyama M. Influence of EPIYA-repeat polymorphism on the phosphorylation-dependent biological activity of *Helicobacter pylori* CagA. Gastroenterology 130 :1181-1190, 2006.
- 0602221528 Tsutsumi R, Takahashi A, Azuma T, Higashi H, Hatakeyama M. Focal adhesion kinase is a substrate and downstream effector of SHP-2 complexed with *Helicobacter pylori* CagA. Mol Cell Biol 26:261-276, 2006.
- 0801291826 Kato M, Asaka M, Nakamura T, Azuma T, Tomita E, Kamoshida T, Sato K, Inaba T, Shirasaka D, Okamoto S, Takahashi S, Terano S, Suwaki K, Isomoto H, Yamagata H, Nomura H, Yagi K, Sone Y, Urabe T, Akamatsu T, Ohara S, Takagi A, Miwa J, Inatsuchi S. *Helicobacter pylori* eradication prevents the development of gastric cancer – results of a long-term retrospective study in Japan. Aliment Pharmacol Ther 24(Suppl 4):203-206, 2006.
- 0612281148 Satomi, S., Yamakawa, A., Matsunaga, S., Masaki, R., Inagaki, T., Okuda, T., Suto, H., Ito, Y., Yamazaki, Y., Kuriyama, M., Keida, Y., Kutsumi, H., Azuma, T. Relationship between the diversity of the *cagA* gene of *Helicobacter pylori* and gastric cancer in Okinawa, Japan. J. Gastroenterol 41, 668-673 (2006)
- 0612281216 Ren, S., Higashi, H., Lu, H., Azuma, T., Hatakeyama, M. Structural basis and functional consequence of *Helicobacter pylori* CagA multimerization in cells. J. Biol. Chem. 281(43), 32344-32352 (2006)