

1 研究課題名:

ヘリコバクター・ピロリの空胞化致死毒素の作用機序解析と新しい治療戦略

2 研究者氏名:和田 昭裕

研究員:山崎 栄樹 (研究期間 H.15.10.1~H.18.3.31)

技術員:前田 香代 (研究期間 H.14.12.1~H.18.3.31)

3 研究のねらい:

世界人口の半数以上の人々がヘリコバクター・ピロリに感染しており、現在では、胃炎、消化性潰瘍、MALT リンパ腫、胃癌の病因は、本菌なしでは論じられなくなっている。胃潰瘍や十二指腸潰瘍の患者において VacA 毒素を産生するヘリコバクター・ピロリが高率に分離されることなどから、本菌感染による病態成立に VacA 毒素が重要な役割を担うと考えられた。本研究では、VacA 毒素の初期効果の解析として、VacA 毒素とその受容体との相互作用をしらべる。その結果生じる細胞内での空胞化形成とミトコンドリア障害から細胞死に至る病原メカニズムを明らかにする基礎的研究を展開し、本菌感染症の新たな予防・治療法の開発につながる基盤構築を目指すことを目的とした。

4 研究成果:

VacA によるヒトの胃の病変形成を防御するためには、VacA が最初に結合する VacA 受容体との結合を阻止すること、もしくは胃の病変形成に至る情報伝達の流れを遮断する必要がある。VacA が VacA 受容体と結合するのを阻害するためには VacA が認識する構造を明らかにし、その構造を基にした結合阻害剤の開発が考えられる。

従って、VacA が認識する受容体の構造を明らかにすることを最初の研究として試みた。VacA は以前に我々が明らかにした RPTPβ を受容体とするのみならず、VacA の結合する受容体として 140kDa 蛋白質(p140)を免疫沈降をおこなった際に見出した。p140 の発現量が多く認められた G401 細胞においては RPTPβ の mRNA および蛋白質の発現は認められなかった。この p140 をピーナツツレクチンカラムなどを用いて分離精製し、酵素消化およびアミノ酸配列の解析をおこなった結果、p140 は RPTPα に一致した。リコンビナントの RPTPα を Cos-7 細胞に発現させ解析してみると、RPTPα は VacA との結合が認められた。以上の結果より、VacA は RPTPβ のみならず RPTPα とも結合することがわかった。

RPTPα と RPTPβ はいずれも O-リンクの糖鎖結合部位を持ち、どちらも共通して MAA, PNA, DSA レクチンにより認識される。これらレクチンのうち、MAA のみが VacA の AZ-521 細胞における空胞化活性を阻害したことから、VacA は MAA の認識する末端糖鎖の α(2-3)結合したシアル酸を認識すると示唆された。この MAA の認識する構造はガングリオシドが持っている構造であり、種々のガングリオシドをアッセイ系に添加すると VacA の空胞化活性の阻害が認められ、なかでも GM1 が最も強い空胞化阻害を示した。GM1 のリソ体を樹脂に固相化して VacA との結合を調べてみたところ、VacA との結合が確認された。さらには、ヘリコバクター・ピロリの培養上清中で GM1 と結合する蛋白質を解析したところ、VacA が顕著に結合する蛋白質として認められた。以上の結果より、VacA はガングリオシドとも結合することがわかり、VacA の認識する構造として末端糖鎖の α(2-3)結合したシアル酸および O-リンクの糖鎖結合が重要であることがわかった。

次に、VacA による RPTPβ を介したシグナル伝達、そしてそれに続く胃の病変形成機構を明らかにする目的で、RPTPβ の siRNA を恒常的に発現した RPTPβ のノックダウン AZ-521 細胞を作製した。細胞増殖に与える影響に違いは認められなかった。VacA による空胞化活性は、RPTPβ のノックダウン細胞においては AZ-521 細胞に比べて空胞化形成が弱くなっていた。また、VacA によるチャネルの活性も弱くなっており、RPTPβ は VacA によるチャネル形成および空胞化形成に関与する事が示唆された。一方、VacA は AZ-521 細胞において MAP キナーゼである p38 や Erk1/2 の活性化を引き起こすが、RPTPβ をノックダウンしても VacA による MAP キナーゼの活性化が認められ、これら MAP キナーゼの活性化に RPTPβ が関与していないことが示唆された。

VacA による胃潰瘍形成には、VacA による細胞死や細胞剥離等が関わってくると思われる。また、VacA による細胞死には VacA がミトコンドリアに局在することによりチトクローム C の放出する経路が関与することが指摘されている。そこで、VacA の経時変化に伴う細胞内局在を AZ-521 細胞において調べてみた結果、まず VacA は細胞表面上の RPTPβ に結合し、RPTPβ を介してラフトに集まり、細胞内への侵入が認められた。しかしながら、細胞内の VacA の局在に関しては、ほとんどの VacA はミトコンドリアに局在することなく、空胞上に局在していた。主として VacA は空胞上に存在するにもかかわらず、チトクローム C の放出が認められたことより、VacA による細胞死にはシグナル伝達が関与していることが考えられた。そこで、チトクローム C 遊離に関与することが指摘されている Bax および Bak を調べてみた結果、VacA による Bax および Bak の活性化が認められた。VacA による Bax の活性化を AZ-521 細胞および RPTPβ のノックダウン細胞において比較してみた結果、AZ-521 細胞のほうが有意な Bax

の活性化が認められ、Bax の活性化に RPTP β の関与が示唆された。

5 自己評価:

本研究はヘリコバクター・ピロリの空胞化致死毒素(VacA)による胃の病変形成の機構を明らかにし、さらに治療・予防につながる情報集積を目指して基礎的研究を遂行した。特に、VacA の最初のターゲットとなる宿主分子およびその構造を明らかにすることと VacA の作用機序を分子レベルで明らかにすることを目指して研究をおこなった。

成果として、VacA の宿主ターゲット分子は RPTP β のみならず、RPTP α やガングリオシドにも結合すること、さらには Jurkat 細胞においてはまだ未知の受容体蛋白質にも結合することを明らかにした。また、VacA は末端糖鎖の $\alpha(2-3)$ 結合を持つシアル酸および O-リンクの糖鎖が結合に重要であることがわかった。VacA の相互作用する宿主ターゲット分子およびその構造に関しては一定の成果はあげられたものの、VacA の認識する構造の詳細な解析は今後も継続して研究すべき課題のひとつであると思われる。これらの成果は VacA と受容体との結合を遮断するための重要な意義を持つと思われる。

一方、VacA の作用機序に関しては、VacA が MAP キナーゼの活性化を引き起こすこと、加えて Bax の活性化を介したチトクローム C の遊離がアポトーシスを引き起こすこと、これらの VacA の活性は空胞化活性とは独立して起こることを J. Biol. Chem. にそれぞれ報告した。しかしながら、これらの VacA の生物活性が上記の VacA 受容体のいずれと関係するかは不明であり、今後継続して明らかにする必要がある。

本研究で得た知見が、ヘリコバクター・ピロリ感染による多岐な疾患の治療・予防に役立つ分子基盤を構築することには未だ不完全ではあるが、初期効果を担う VacA 受容体の機能解析と正確な理解は今後の治療戦略の新たな立案に役立つものと考えられる。

6 研究総括の見解:

本研究は、ヘリコバクター・ピロリが産生する VacA 毒素の初期効果を解析し、VacA 毒素とその受容体との相互作用を調べ、その結果生じる細胞内での空胞化形成とミトコンドリア障害から細胞死に至る病原メカニズムを明らかにすることを目的とした。その結果、VacA の宿主ターゲット分子を明らかにするとともに VacA の結合に重要な糖鎖を同定した。さらに、VacA が MAP キナーゼの活性化を引き起こすこと、Bax の活性化を介したチトクローム C の遊離がアポトーシスを引き起こすこと、これらの活性は空胞化活性とは独立して起こること等を示した。以上の成果は今後のヘリコバクター・ピロリ感染とそれによる胃炎、胃潰瘍、胃ガン発症の機構解明の研究と治療戦略の研究に重要な情報を提供するものである。

7 主な論文等:

原著論文

1. Yahiro, K., Wada, A., Nakayama, M., Kimura, T., Ogushi, K., Niidome, T., Aoyagi, H., Yoshino, K., Yonezawa, K., Moss, J., and Hirayama, T., Protein-tyrosine phosphatase α , RPTP α , is a *Helicobacter pylori* VacA receptor., J. Biol. Chem., 278(21), 19183–19189, 2003.
2. Nakayama, M., Kimura, M., Wada, A., Yahiro, K., Ogushi, K., Niidome, T., Fujikawa, A., Shirasaka, D., Aoyama, N., Kurazono, H., Noda, M., Moss, J., and Hirayama, T., *Helicobacter pylori* VacA activates the p38/ATF-2-mediated signal pathway in AZ-521 cells., J. Biol. Chem., 279(8), 7024–7028, 2004.
3. Yahiro, K., Wada, A., Yamasaki, E., Nakayama, M., Nishi, Y., Hisatsune, J., Morinaga, N., Sap, J., Noda, M., Moss, J., and Hirayama, T., Essential domain of receptor tyrosine phosphatase β , RPTP β , for interaction with *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin., J. Biol. Chem., 279(49), 51013–51021, 2004.
4. De Guzman, B., Hisatsune, J., Nakayama, M., Yahiro, K., Wada, A., Yamasaki, E., Nishi, Y., Yasazaki, S., Azuma, T., Ito, Y., Ohtani, M., van der Wijk, T., den Hertog, J., Moss, J., and Hirayama, T., Cytotoxicity and recognition of receptor-like protein tyrosine phosphatase, RPTP α and RPTP β , by *Helicobacter pylori* m2VacA., Cell. Microbiol., 7(9), 1285–1293, 2005.
5. Yamasaki, E., Wada, A., Kumatori, A., Nakagawa, I., Funao, J., Nakayama, M., Hisatsune, J., Kimura, M., Moss, J., and Hirayama, T., *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin induces activation of the proapoptotic proteins Bax and Bak, leading to cytochrome c release and cell death, independent of vacuolation., J. Biol. Chem., in press.

総説

- (1) Wada, A., Yamasaki, E., and Hirayama, T., *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, VacA, is responsible for gastric ulceration., J. Biochem., 136(6), 741–746, 2004.

特許

- (1) 和田昭裕、長谷川慎、平山壽哉、山崎栄樹、前田香代、ヘリコバクター・ピロリの空胞化毒素に対する結合剤
(出願番号2005-241771)
- (2) 和田昭裕、長谷川慎、平山壽哉、山崎栄樹、ヘリコバクター・ピロリの空胞化毒素の検出試薬および検出方法
(出願番号2005-241772)

招待講演等

- (1) Akihiro Wada, and Toshiya Hirayama, Effect of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) on gastric epithelial cells., The 3rd stage surface barrier immunology study group (SBARIS) 2nd meeting & Infectious disease study group 3rd meeting., Nov., 2005, Okinawa.

学会発表 国内 20 件、国際 10 件