

# Deregulation of $\beta$ -catenin signal by *Helicobacter pylori* CagA requires the CagA-multimerization sequence

(ヘリコバクターピロリ病原因子 CagA は CagA 多量体化配列を介して  $\beta$ -catenin シグナルを脱制御する)

## 学位論文内容の要旨

### 【背景と目的】

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) は胃炎、消化性潰瘍の病原因子として知られる。なかでも CagA 陽性 *H. pylori* は強い胃粘膜障害を引き起こし、多くの臨床疫学的研究から萎縮性胃炎、さらには胃癌発症への関与が強く示唆されてきた。したがって CagA により引き起こされる細胞内シグナル伝達異常の解析は、胃癌発症機構の解明のみならず、臨床的にも萎縮性胃炎、胃癌発症の予防、治療の発展において大きな意義を有すると考えられる。申請者らは最近、CagA が細胞増殖・癌化に強く関与しているとされている  $\beta$ -catenin シグナルを活性化することを報告した。本研究では *H. pylori* 臨床株間で種々の分子多型を示す CagA のチロシンリン酸化領域(=EPIYA 含有領域)に着目し、EPIYA 含有領域のバリエーションによる  $\beta$ -catenin シグナルへの影響を検討し、胃粘膜病変、胃癌発症のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

### 【方法】

発現ベクターの作製法：欧米型 *H. pylori* NCTC11637 株および東アジア型 *H. pylori* F32 株由来の野生型 CagA より、EPIYA 含有領域にバリエーションを有する複数の変異型 CagA を作成した。 $\beta$ -catenin シグナル活性化能を検討するルシフェラーゼアッセイでは、レポーターとして T cell factor (TCF) 結合配列を有するレポータープラスミド TOPtkLuciferase、および TCF 結合配列に変異を有する FOPTkLuciferase を使用した。また  $\beta$ -catenin シグナルの標的遺伝子の一つである *cyclinD1* の転写活性化能の検討には、*cyclinD1* プロモーターを有するレポータープラスミド pGL2-944 を使用した。

細胞培養及び遺伝子導入法：本研究で使用したヒト胃上皮細胞株 MKN28 は 10%FBS を含む RPMI1640 培地にて培養された。遺伝子導入には Lipofectamine reagent, PLUS reagent (Invitrogen) を使用した。

*H. pylori* 感染実験：*H. pylori* NCTC11637 株とその変異株を MKN28 へ感染させ、その影響を検討した。

免疫ブロット法：遺伝子導入 24 時間後に MKN28 より細胞液を抽出し、8%SDS-PAGE 及びウエスタンブロットを施行した。

ルシフェラーゼアッセイ：MKN28 へレポータープラスミド TOPtkLuciferase, FOPTkLuciferase または pGL2-944 と同時に発現ベクターを一過性導入した。遺伝子導入効率を補正するコントロールとして pRL-TK Renilla レポータープラスミドを使用した。導入 24 時間後に dual luciferase assay kit (Promega) を用い、ルシフェラーゼ活性を測定した。

細胞免疫染色：野生型および変異型 CagA 発現による  $\beta$ -catenin の細胞内局在変化を、抗  $\beta$ -catenin 抗体に

よる細胞免疫染色後、共焦点顕微鏡(Fluoview, OLYMPUS)にて観察した。

## 【結果】

### 1. EPIYA 領域を含む CagA が $\beta$ -catenin シグナルを脱制御する

野生型 CagA(ABCCC-欧米型 CagA), リン酸化耐性型 CagA, EPIYA 含有領域を欠失させた変異型 CagA, N 端側 612 アミノ酸のみからなる変異型 CagA を MKN28 に一過性発現させたところ、前者 2 つの CagA 変異体は野生型と同様に細胞膜への局在を示し、さらにルシフェラーゼアッセイにて $\beta$ -catenin シグナルを活性化することが示された。一方、EPIYA 含有領域を欠く後者 2 つの CagA は細胞膜に局在し $\beta$ -catenin シグナルを活性化しなかった。従って、CagA による $\beta$ -catenin シグナルの活性化には EPIYA 含有領域が必要であるが、CagA のリン酸化には依存しないことが示された。

### 2. 欧米型および東アジア型 CagA による $\beta$ -catenin シグナルの脱制御

CagA の EPIYA 含有領域を構成するアミノ酸配列は、個々の EPIYA モチーフ周辺のアミノ酸配列の違いにより分類される A, B, C, D という 4 つのセグメントがモザイク状に組み合わされて形成される。もっとも代表的な欧米型 CagA では AB に引き続き C セグメントが、もっとも代表的な東アジア型 CagA では D セグメントが存在する。そこでこれら EPIYA セグメントの違いによる $\beta$ -catenin シグナルへの影響を検討した。変異型 CagA-AB, ABC ならびに CagA-ABC, ABD のリン酸化耐性型 CagA を作製し、ルシフェラーゼアッセイを用いて $\beta$ -catenin のシグナルへの影響を検討した。その結果、CagA-AB 以外の変異型 CagA はいずれも $\beta$ -catenin シグナルを活性化した。従って、CagA による $\beta$ -catenin シグナル活性化には C または D セグメントの存在が重要である一方、C セグメントのリピート数には依存せず、またリン酸化非依存的であることが示された。これらの結果は、*cyclinD1* 転写活性化能の検討からも支持された。

### 3. CagA による $\beta$ -catenin シグナルの脱制御は $\beta$ -catenin の核内移行と関係している

先の転写活性の検討で使用した CagA-AB, CagA-ABC, CagA-ABD を MKN28 細胞に一過性発現させ、 $\beta$ -catenin の核内移行を免疫染色法にて検討した。その結果 CagA-AB 発現細胞では $\beta$ -catenin の核内移行は認められなかったが、CagA-ABC, CagA-ABD においては $\beta$ -catenin の核内移行が認められた。従って $\beta$ -catenin の核内移行には C または D セグメントの存在が必要であることが示唆された。

### 4. $\beta$ -catenin の核内移行およびシグナル脱制御は CagA の C または D セグメントに依存する

先の結果をもとに C または D セグメント依存的に $\beta$ -catenin シグナルの活性化能を有するかを検討するため、C または D セグメントのみ有する変異型 CagA-C, CagA-D を作製し、ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、CagA-C, CagA-D は $\beta$ -catenin シグナルを活性化させ、*cyclinD1* を転写誘導した。また細胞免疫染色では $\beta$ -catenin の核内移行を認めた。さらに、相同組み換えを用いてゲノムの野生型 *cagA* 遺伝子を CagA-C, CagA-D をコードする変異型 *cagA* 遺伝子に置換した isogenic *H. pylori* 株を作製し、MKN28 細胞への感染実験を行ったところ、 $\beta$ -catenin の核内移行を認めた。従って CagA は C, D セグメント単独で $\beta$ -catenin シグナルの活性化能を有することが示された。

### 5. $\beta$ -catenin シグナルの脱制御には CagA の多量体化配列が関与している

申請者らは以前、CagA の C 及び D セグメント周辺領域に含まれる 16 アミノ酸配列が CagA の多量体化に関与することを見だし、その配列を CM 配列として報告した。そこで次に C, D セグメント周辺領域から CM 配列を欠失させた変異型 CagA を作製しルシフェラーゼアッセイを施行した。その結果 CM 配列を欠失した CagA では $\beta$ -catenin シグナルの活性化能は認められなかった。この結果から CagA による $\beta$ -catenin シグナルの活性化には CM 配列が必要であると結論された。

### 【考察】

*Helicobacter pylori* *cagA* 陽性臨床株間で著しい構造多型を示す EPIYA 含有領域のうち欧米型 CagA に特有の C セグメント、東アジア型に特有の D セグメントが  $\beta$ -catenin シグナルを活性化し、その活性化には CM 配列が重要な役割を果たしていることが示された。

CagA による  $\beta$ -catenin シグナルの脱制御が欧米型と東アジア型 CagA に共通の生物活性であり、EPIYA 含有領域 C セグメントのリピート数に依存しないという結果は、 $\beta$ -catenin シグナルの脱制御が CagA の病原性発現にとって必要不可欠な基本的生物活性であることを示すとともに、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を示唆している。近年、細胞増殖・分化に関わる様々な分子が CagA の標的分子として同定され、CagA は複数の細胞内シグナルを脱制御することが明らかになってきた。 $\beta$ -catenin シグナルの脱制御は、病原因子 CagA を有する *H. pylori* が多段階発癌過程を進行させる上で重要な役割を果たしている可能性を示唆している。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 今 村 雅 寛  
副 査 教 授 秋 田 弘 俊  
副 査 教 授 畠 山 昌 則 (遺伝子病制御研究所)  
副 査 教 授 近 藤 哲

学位論文題名

## Deregulation of $\beta$ -catenin signal by *Helicobacter pylori* CagA requires the CagA-multimerization sequence

(ヘリコバクターピロリ病原因子 CagA は CagA 多量体化配列を介して  
 $\beta$ -catenin シグナルを脱制御する)

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) は胃炎, 消化性潰瘍の病原因子として知られる。なかでも CagA 陽性 *H. pylori* は強い胃粘膜障害を引き起こし, 多くの臨床疫学的研究から萎縮性胃炎, さらには胃癌発症への関与が強く示唆されてきた。申請者らは最近, CagA が細胞増殖・癌化に強く関与しているとされている  $\beta$ -catenin シグナルを活性化することを報告した。本研究では *H. pylori* 臨床株間で種々の分子多型を示す CagA のチロシンリン酸化領域 (=EPIYA 含有領域) に着目し, EPIYA 含有領域のバリエーションによる  $\beta$ -catenin シグナルへの影響を検討し, 胃粘膜病変, 胃癌発症のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

欧米型 *H. pylori* NCTC11637 株および東アジア型 *H. pylori* F32 株由来の野生型 CagA より, EPIYA 含有領域にバリエーションを有する複数の変異型 CagA を作成した。  $\beta$ -catenin シグナル活性化能を検討するルシフェラーゼアッセイでは, レポータープラスミド TOPtkLuciferase, FOPtkLuciferase を使用し, *cyclinD1* の転写活性化能の検討には, レポータープラスミド pGL2-944 を使用した。ルシフェラーゼ活性の測定は遺伝子導入 24 時間後に dual luciferase assay kit (Promega) を用いて行った。細胞免疫染色は野生型および変異型 CagA 発現による細胞内  $\beta$ -catenin 局在変化を, 抗  $\beta$ -catenin 抗体による細胞免疫染色後, 共焦点顕微鏡 (Fluoview, OLYMPUS) にて観察した。

野生型 CagA (ABCCC-欧米型 CagA), リン酸化耐性型 CagA, EPIYA 含有領域を欠失させた変異型 CagA, N 端側 612 アミノ酸のみからなる変異型 CagA を MKN28 に一過性発現させたところ, 前者 2 つの CagA 変異体は野生型と同様に細胞膜への局在を示し, さらにルシフェラーゼアッセイにて  $\beta$ -catenin シグナルを活性化することが示された。一方, EPIYA 含有領域を欠く後者 2 つの CagA は細胞膜に局在し  $\beta$ -catenin シグナルを活性化しなかった。従って, CagA による  $\beta$ -catenin シグナルの活性化には EPIYA 含有領域が必要であるが, CagA のリン酸化には依存しないことが示された。

CagA の EPIYA 含有領域を構成するアミノ酸配列は, 個々の EPIYA モチーフ周辺のアミノ酸配列の違いにより分類される A, B, C, D という 4 つのセグメントがモザイク状に組み合わせられて形成される。そこで EPIYA セグメントの違いによる  $\beta$ -catenin シグナルへの影響を検討した。変異型 CagA-AB, ABC ならびに CagA-ABC, ABD のリン酸化耐性型 CagA を作製し, ルシフェラーゼアッセイを用いて  $\beta$ -catenin のシグナル

への影響を検討した。その結果、CagA-AB 以外の変異型 CagA はいずれも  $\beta$ -catenin シグナルを活性化した。従って、CagA による  $\beta$ -catenin シグナル活性化には A, B セグメントは必要なく C, D セグメント周辺領域の存在が重要である一方、C セグメントのリピート数には依存せず、またリン酸化非依存的であることが示された。これらの結果は、*cyclinD1* 転写活性化能の検討からも支持された。

転写活性の検討で使用した CagA-AB, CagA-ABC, CagA-ABD を MKN28 細胞に一過性発現させ、 $\beta$ -catenin の核内移行を免疫染色法にて検討したところ、CagA-AB 発現細胞では  $\beta$ -catenin の核内移行は認められなかったが、CagA-ABC, CagA-ABD においては  $\beta$ -catenin の核内移行が認められた。従って  $\beta$ -catenin の核内移行は A, B セグメントに依存しないことが示唆された。

先の結果をもとに A, B セグメントの存在しない C または D セグメント周辺領域のみの存在下に、 $\beta$ -catenin シグナルの活性化能を有するかを検討するため、C または D セグメント周辺領域のみ有する変異型 CagA-C, CagA-D を作製し、ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、CagA-C, CagA-D は  $\beta$ -catenin シグナルを活性化させ、*cyclinD1* を転写誘導した。また細胞免疫染色では  $\beta$ -catenin の核内移行を認めた。さらに、相同組み換えを用いてゲノムの野生型 *cagA* 遺伝子を CagA-C, CagA-D をコードする変異型 *cagA* 遺伝子に置換した同質遺伝子系統 *H. pylori* 株を作製し、MKN28 細胞への感染実験を行ったところ、 $\beta$ -catenin の核内移行を認めた。従って CagA は A, B セグメントを含まない C または D セグメント周辺領域のみで  $\beta$ -catenin シグナルの活性化能を有することが示された。

申請者らは以前、CagA の C 及び D セグメント周辺領域に含まれる 16 アミノ酸配列が CagA の多量体化に関与することを見だし、その配列を CagA 多量体化配列 (CM 配列) として報告した。そこで次に C, D セグメント周辺領域から CM 配列を欠失させた変異型 CagA を作製しルシフェラーゼアッセイを施行した。その結果 CM 配列を欠失した CagA では  $\beta$ -catenin シグナルの活性化能は認められなかった。この結果から CagA による  $\beta$ -catenin シグナルの活性化には CM 配列が必要であると結論された。

CagA による  $\beta$ -catenin シグナルの脱制御が欧米型と東アジア型 CagA に共通の生物活性であり、EPIYA 含有領域 C セグメントのリピート数に依存しないという結果は、 $\beta$ -catenin シグナルの脱制御が CagA の病原性発現にとって必要不可欠な普遍的生物活性であることを示唆している。また CagA による  $\beta$ -catenin の活性化には C, D セグメント周辺領域に存在する CM 配列が重要な役割を果たしていることが示された。

近年、細胞増殖・分化に関わる様々な分子が CagA の標的分子として同定され、CagA は複数の細胞内シグナルを脱制御することが明らかになってきた。 $\beta$ -catenin シグナルの脱制御は、病原因子 CagA を有する *H. pylori* が多段階発癌過程を進行させる上で重要な役割を果たしている可能性を示唆している。

口頭発表に引き続き、副査秋田弘俊教授より CagA のリン酸化依存的、非依存的なシグナル脱制御の互いの影響についての質問があった。続いて副査近藤 哲教授より、欧米型 CagA と東アジア型 CagA 間で今回の  $\beta$ -catenin シグナル脱制御に差を認めなかった理由についての質問があった。次に主査今村雅寛教授より、E-cadherin と CagA の相互作用に関する質問があった。最後に副査畠山昌則教授より、胃癌における  $\beta$ -catenin 遺伝子の変異の頻度について、CagA 多量体化配列の数と今回の  $\beta$ -catenin シグナル活性化の相関性の有無についての質問があった。

いずれの質問に対しても申請者はその主旨をよく理解し、自らの研究内容と文献的考察を混じえて適切に回答した。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有すると判定した。