博士論文（要約）

ピロリ菌 CagA がんタンパク質と Jak-Stat 経路による協調的な細胞がん化促進機構

備　後　充　博

論文の内容の要旨

論文題目　ピロリ菌 CagA がんタンパク質と Jak-Stat 経路による協調的な細胞がん化促進機構

氏名　備後充博

胃がんは世界におけるがんの部位別死亡者数の第３位を占め、毎年 70 万人がこの悪性腫瘍で死亡している。 ヘリコバクター・ピロリ（ピロリ菌）の持続的感染は、胃がん発症の最大のリスク因子である。胃がんや肝細胞がんを始めとする多くのヒトがんは、発がん臓器に慢性炎症を伴うことから、かねてより慢性炎症の存在ががん発症・進展に寄与している可能性が示唆されてきたが、その具体的な機構に関しては未だ十分解明されていない。

ピロリ菌には CagA タンパク質を産生する *cagA* 陽性株と産生しない *cagA* 陰性株が存在するが、このうち *cagA* 陽性株の感染が胃がん発症に決定的に重要な役割を担うことが疫学調査により明らかにされている。さらに CagA を全身性に発現するトランスジェニックマウスは消化器がんおよび血液がんを引き起こすことから、CagA はバクテリア由来のがんタンパク質という極めて特徴的な性質を有する。CagA はピロリ菌が保有するミクロの注射針（Ⅳ型分泌機構）により、宿主胃上皮細胞内に注入される。胃細胞内に侵入した CagA は C 末側領域に存在する EPIYA モチーフがチロシンリン酸化された後、がんタンパク質 SHP2 と結合・脱制御する。また、CagA は EPIYA モチーフ近傍に存在する CM 配列を介して極性制御キナーゼ Par1b と結合し、その機能を不活化する。こうして複数の宿主細胞内シグナル伝達経路を攪乱することで CagA は宿主細胞をがん化に導くと考えられている。 一方、CagA を培養系の胃上皮細胞に発現させると、CagA 依存的な発がんストレスによるサイクリン依存性キナーゼ阻害因子 $p21^{Cip1}$ の蓄積が誘導され（早期細胞老化）、細胞周期の進行は著しく妨げられる。この現象は正常細胞が保有する細胞自律的ながん抑制機構と考えられている。

一方、 CagA トランスジェニックマウスを用いた実験からピロリ菌がんタンパク質 CagA の存在は宿主の炎症応答を悪化させるという知見が明らかになっている。慢性炎症は、発症したがんの進展を促進する重要な基盤環境であると考えられている。従って、「ピロリ菌感染による炎症」と「ピロリ菌がんタンパク質 CagA の宿主細胞への侵入」は協調して胃発がんプロセスを増強していると考えられる。 具体的には、当研究室を始めとする研究において、胃上皮細胞内に侵入した CagA あるいは胃上皮細胞に感染した *cagA* 陽性ピロリ菌は NF-κB シグナルを促進することやインフラマソームを活性化することが明らかにされている。 一方で、 NF-κB 以外の炎症関連シグナル伝達経路と CagA の機能的関連や、如何なるがん抑制遺伝子の機能不全

あるいはがん遺伝子の脱制御が CagA によるがん化の起始イベントとなるのかなど、*cagA* 陽性ピロリ菌が促す胃がん発症メカニズムに関しては未だ多くが解明されていない。

IL-6 に代表される炎症性サイトカインが活性化する Jak-Stat3 経路は胃がんを含む多くの固形がんや血液がんにおける脱制御が知られている。また、*cagA* 陽性ピロリ菌を実験的に感染させたスナネズミの胃粘膜では *cagA* 陰性ピロリ菌感染胃粘膜に比べてより顕著な Stat3 活性化が報告されている。これらの知見から、慢性胃炎の存在下で CagA は Jak-Stat3 経路の活性化を亢進することで自身の発がんポテンシャルをより強化していると推察される。　そこで本研究では、CagA が Jak-Stat3 シグナル伝達経路に及ぼす影響を検討した。 さらに、正常細胞が保有するがん抑制機構と考えられる $p21^{Cip1}$ 等 CDK インヒビターの誘導を介する早期細胞老化の阻止が、CagA と IL-6 による協調的な発がん作用に及ぼす影響も検討した。

最初に、標的細胞内に侵入した CagA が Jak-Stat3 経路に及ぼす影響を検討するために、ヒト胃上皮細胞由来 MKN28 細胞株に CagA タンパク質を発現するレンチウイルスベクターを感染させた後、IL-6 を添加した。細胞を回収後、活性化型 Stat3 であるリン酸化型 Stat3 (Y705) の発現レベルをイムノブロッティング法により解析し、あわせて蛍光免疫染色を用いてリン酸化型 Stat3 の核移行の有無を観察した。さらに、ルシフェラーゼアッセイにより Stat 依存的な転写のレポーター活性を測定した。 その結果、IL-6 による Jak-Stat3 経路の活性化は CagA の存在により著しく増強することが明らかとなった。

次に、Jak-Stat3 経路の活性化を促す CagA の分子内責任領域を決定するために、一連の CagA 欠失変異体を作製した。 それらを発現するレンチウイルスベクターを MKN28 細胞に感染させた後、IL-6 を添加した。細胞を回収後、リン酸化型 Stat3 の発現レベルをイムノブロッティング法により解析した。その結果、 CagA の C 末側に存在する EPIYA 含有領域が Jak-Stat3 経路活性化に必要かつ十分な領域であることが示された。

さらに、CagA 発現により細胞内に急速に蓄積する $p21^{Cip1}$ の誘導メカニズム解明を試みた。$p21^{Cip1}$ 誘導に必要な CagA 分子内領域を特定するために、変異体 CagA を用いて MKN28 細胞における $p21^{Cip1}$ 誘導活性の有無をイムノブロッティング法により検討した。 その結果、野生型 CagA は強い $p21^{Cip1}$ 誘導活性を有する一方、CM 配列を欠損した CagA は $p21^{Cip1}$ を誘導出来ないことが明らかになった。 従って CagA による $p21^{Cip1}$ 誘導には CM 配列が必要であることが示された。

CagA 分子内の CM 配列は上皮細胞の極性を制御する Par1b と結合し、そのキナーゼ活性を

阻害することが知られている。Par1b のキナーゼ活性阻害が $p21^{Cip1}$ 誘導に必要か否かを明らかにすることを試みた。 Par1b 特異的 si-RNA の導入に加えて、si-RNA 抵抗型野生型 Par1b ならびに si-RNA 抵抗型キナーゼ不活性型 Par1b を発現するレンチウイルスベクターを感染させた MKN28 細胞を作製し、$p21^{Cip1}$ の発現レベルをイムノブロッティング法にて解析した。その結果、Par1b の発現抑制によって $p21^{Cip1}$ が誘導された。 一方で、野生型 Par1b のレスキューにより $p21^{Cip1}$ の誘導は阻止されたが、キナーゼ不活性型 Par1b のレスキューでは $p21^{Cip1}$ の誘導は阻止されなかった。 従って、$p21^{Cip1}$ の誘導には Par1b のキナーゼ活性阻害が必要であることが明らかにされた。

そこで次に、Par1b のキナーゼ活性維持が CagA による $p21^{Cip1}$ 誘導を阻止するか否かを検討した。 Tet-off システムにより CagA タンパク質を誘導発現する WTA-10 細胞に Par1b を発現するレンチウイルスベクターを感染させた後に CagA を誘導発現し、イムノブロッティング法により $p21^{Cip1}$ の発現レベルを検討した。 その結果、異所性 Par1b のキナーゼ活性が CagA による $p21^{Cip1}$ 誘導を阻止することが示された。以上より、CagA 発現による $p21^{Cip1}$ の誘導は Par1b キナーゼ活性の阻害によって引き起こされることが示された。

本論文では、IL-6 依存的な CagA による Jak-Stat3 シグナル伝達経路の活性化を明らかにした。 しかしながら、CagA 発現が同時に引き起こす $p21^{Cip1}$ の誘導は、Stat3 活性化では阻止出来ず、結果として、 CagA+IL-6 では細胞増殖は誘起できないことが明らかにされた。 そこで、$p21^{Cip1}$ の発現抑制による CagA と IL-6 による相乗的な Jak-Stat3 シグナル脱制御とそれに伴う細胞増殖能に及ぼす影響を検討した。shRNA を発現するレンチウイルスベクターを用いて $p21^{Cip1}$ を人為的に発現抑制した MKN28 細胞に CagA を異所性発現するレンチウイルスベクターを感染させ、次いで IL-6 を添加した。細胞増殖能を測定する MTS アッセイを行った結果、$p21^{Cip1}$ の発現抑制により、CagA と IL-6 の共刺激が細胞増殖を促進することが解明された。以上より、$p21^{Cip1}$ の発現が抑制される環境下において、ピロリ菌 CagA は IL-6 と協調して Jak-Stat3 経路を脱制御することで自身の発がん性を亢進することが示唆された。この観察からさらに、ジェネティックあるいはエピジェネティックな $p21^{Cip1}$ の発現抑制が胃がん発症の実質的な起始イベントとなることが推察された。

胃上皮細胞由来培養細胞に CagA を長期間にわたり発現させると NF-κB シグナル伝達経路が活性化することと IL-1βの誘導が観察されることが示されている。 そこで、Tet-off システムにより CagA タンパク質を誘導発現する WTA-10 細胞に CagA を長期発現させることによって、炎症性サイトカインの誘導や Jak-Stat3 シグナルの活性化が観察されるか否かを検討した。

まず CagA の長期発現により IL-1、IL-6 ファミリー、TNF-αに代表される炎症性サイトカイ

ンが誘導されるか否かを検討した。 WTA-10 細胞を用い Tet-off システムにより CagA を誘導発現し、8 日間培養した後 IL-1α、IL-6、IL-11、TNF-αの遺伝子発現を qRT-PCR により検討した。 その結果、CagA の長期発現によって炎症性サイトカインの mRNA レベルは約 10~30 倍程度上昇した。以上の結果から、胃上皮細胞における CagA の長期発現は炎症性サイトカインを誘導することが明らかになった。

次に、CagA の長期発現が Jak-Stat3 シグナルに及ぼす影響を検討した。まず、WTA-10 細胞に CagA を誘導発現し 8 日間培養した後、活性化型 Stat3 であるリン酸化型 Stat3 の発現レベルをイムノブロッティング法により解析した。 その結果、CagA の長期発現によって Stat3 のリン酸化レベルは顕著に上昇した。以上より胃上皮細胞における CagA の長期発現は Jak-Stat3 シグナルを活性化することが明らかになった。

これらの結果より、CagA は長期発現によって炎症性サイトカインの遺伝子発現を誘導し、Jak-Stat3 シグナルを活性化することが明らかになった。 従って長期発現することで CagA は IL-6 を必要とせず単独でも炎症を誘導しうることが示唆された。

以上本研究において、$p21^{Cip1}$ 発現抑制下における CagA と IL-6 が誘導する協調的な異常増殖の促進を明らかにした。 今後、慢性胃炎を基盤とした CagA による発がん機構の理解を深化させてゆくことは、胃がんのみならず慢性炎症の持続によって発症する様々ながんの予防・診断・治療につながると考えられる。