氏　　名	渡邉　達郎
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学位記号番号	博理工甲第 769 号
学位授与年月日	平成 22 年 3 月 24 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	ピロリ菌が分泌する TNF-α inducing protein (Tipα) とがん細胞ヌクレオリンとの相互作用の発見、ならびに発がん機構におけるその重要性について
論文審査委員	委員長　連携教授　金子安比古
	委　員　教　授　井上　金治
	委　員　教　授　坂井　貴文
	委　員　准教授　西垣　功一
	委　員　主　幹　菅沼　雅美(埼玉県立がんセンター臨床腫瘍研究所)

論文の内容の要旨

ヘリコバクターピロリ（*Helicobacter pylori,* ピロリ菌）は、慢性胃炎や胃潰瘍の原因菌としてノーベル賞受賞者 J. R. Warren と B. J. Marschall によって発見されたグラム陰性桿菌であるが、フランス・リヨンにある WHO International Agency for Research on Cancer (IARC) でのヒト発がんリスク評価会議は、ピロリ菌を「胃がんリスク確実 Group 1」と分類し、一躍その重要性が注目されている。　一方、私が在籍している研究室は、ヒト発がんに腫瘍壊死因子（TNF-α）が発がんプロモーターとして関与することを見出した立場から、ピロリ菌の発がん機構の解明を進めている。

ピロリ菌のゲノムからクローニングされた *TNF-α inducing protein* 遺伝子 (*Tipα*) は , ピロリ菌特有の Tipα タンパク質を産生し、これはホモ二量体の分泌タンパク質である。Tipα タンパク質をマウス胃がん細胞 MGT-40 に処理すると、NF-κB の活性化と *TNF-α* 遺伝子の発現を誘導し、細胞のがん化が促進される。さらに、胃がん患者から分離したピロリ菌は胃炎患者からのピロリ菌に比較し、より多くの Tipα タンパク質を分泌する。この結果から、Tipα はヒトの胃がん発症に深く関与する発がん因子であり、Tipα の発がん機構を解明することは、ピロリ菌感染による胃がんの治療や予防に役立つ研究成果をもたらすと考える。

本研究は、Tipα の細胞内取り込み機構や Tipα による *TNF-α* 遺伝子の発現機構を解明するために、Tipα と相互作用するタンパク質の探索に着手した。相互作用因子の探索にあたって、Tipα の C 末端に FLAG タグを融合した Tipα-FLAG を調整した。続いて、Tipα-FLAG と MGT-40 細胞の抽出液を用いて FLAG プルダウン解析を行い、Tipα-FLAG と共沈したが、不活性型の del-Tipα-FLAG と共沈しないポリペプチドを見出し、質量分析からヌクレオリンと同定した。次に、Tipα をヒト胃がん細胞 MKN-1、あるいはヒト白血病細胞 THP-1 に処理した後、ヌクレオリン抗体を用いて免疫沈降を行うと、細胞内に取り込まれた微量な Tipα は、ヌクレオリンと複合体を形成した。さらに、Tipα はリコンビナントヌクレオリンフラグメント His-NUC284 と直接結合することを *in vitro* で確認し、Tipα の相互作用因子がヌクレオリンであることを証明した。

ヌクレオリンは核小体に豊富に存在するタンパク質であり、クロマチンリモデリングやリボソーム RNA

の成熟等、多様な機能を有している。近年、ヌクレオリンの発現量はがん細胞で増加していることが見出され、その上、核の他に、細胞膜表面にヌクレオリンが局在することが注目されている。そこで、蛍光標識したTipα が MGT-40 細胞表面に結合することから、細胞表面に局在するヌクレオリンが、Tipα の受容体として機能するか研究を進めた。細胞分画、ヌクレオリン抗体を用いた免疫染色、並びに、フローサイト解析によって、ヌクレオリンが MGT-40 細胞の表面に局在することを証明した。さらに、細胞表面のヌクレオリンを認識するヌクレオリン抗体 (anti-NUC295) で、細胞を前もって処理しておくと、Tipα は結合できず Tipα 生物活性は阻害されるか検討した。しかし、予想に反して anti-NUC295 の前処理は Tipα の細胞内への取り込みを増加し、*TNF-α* 遺伝子の発現を亢進した。この興味ある結果は、anti-NUC295 処理によって細胞表面のヌクレオリンがエンドサイトーシスを起こし、それに伴いヌクレオリンに結合した Tipα が効率よく細胞内に取り込まれたためと考える。また、N 型糖鎖修飾の阻害剤であるツニカマイシンで細胞を処理すると、細胞表面のヌクレオリンが減少したため、Tipα の取り込みとそれに続く *TNF-α* 遺伝子の発現亢進が阻害された。さらに、レンチウイルスベクターを用いて sh-RNA を導入し、RNA 干渉によってヌクレオリンを特異的にノックダウンすると、THP-1 細胞の増殖が著しく抑制され、Tipα の取り込みと *TNF-α* 遺伝子の発現亢進が有意に阻害された。すなわち、この結果は、細胞表面のヌクレオリンが Tipα の受容体として機能し、Tipα を細胞表面から細胞内に輸送し、*TNF-α* 遺伝子の発現を誘導することを示している。

正常な細胞では、ヌクレオリンは本来核小体に局在し、細胞表面には局在しない。しかし、発がん過程のため、ヌクレオリンが細胞表面に局在する状態となった細胞には、Tipα が作用して発がんを促進すると考えられる。そこで、５種類の胃がん細胞についてヌクレオリンの表面局在性をフローサイトで解析した。局在量は細胞によってそれぞれ異なるが、胃がん細胞では明らかにヌクレオリンが細胞表面に局在していることを発見した。その発現量はヌクレオリンを特異的に認識する DNA アプタマー AS1411 の抗腫瘍活性と相関していた。興味深いことに、Tipα によりがん化が促進される潜在的腫瘍細胞（いわゆる前がん細胞）のモデルである Bhas 42 細胞（v-H-*ras* 遺伝子導入 BALB/3T3）は、正常なマウス線維芽細胞 BALB/3T3 に比べて、明らかに細胞表面のヌクレオリン量が多く、AS1411 に対しても高感受性を示した。

本研究は、ピロリ菌の発がん因子である Tipα が、直接結合する相互作用因子としてヌクレオリンを発見した。その結果、細胞表面に局在するヌクレオリンが Tipα と直接結合することにより、内因性発がんプロモーター遺伝子 *TNF-α* を発現させ、産生された TNF-α タンパク質が、胃がんの発症を促進するという複雑な胃発がん機構を解明することができた。

論文の審査結果の要旨

渡邉達郎氏（申請者）の提出した学位論文について、審査委員会は平成 22 年 2 月 17 日に理工学研究科棟国際セミナー室において、公開で口頭発表会を開催し、詳細な質疑応答を行って内容を審査した。以下に、審査結果の要約を示す。

ヘリコバクターピロリ（ピロリ菌）は慢性胃炎や胃潰瘍の原因としてノーベル賞受賞者 J. R. Warren と B. J. Marshall によって発見された螺旋桿菌である。その後、ピロリ菌は胃がん発生リスクが確実な因子としてその重要性が注目されている。ピロリ菌の発がん因子として CagA, VacA 等様々な因子が報告されているがその発がん機構は明らかではない。申請者が所属する研究室では、ピロリ菌感染によって誘導される炎症性サイトカイン腫瘍壊死因子 (TNF-*α*) が発がんを促進するという立場から、ピロリ菌が分泌する TNF-*α* inducing protein (Tip*α*) をクローニングした。申請者は、新しいピロリ菌の発がん因子 Tip*α* タンパク質の作用機構の解明を目的に、Tip*α* の結合因子を探索し、その受容体がヌクレオリンであることを発見した。さらに、正常細胞では、核小体に局在するヌクレオリンが胃がん細胞では細胞膜表面に局在していることを見出し、ピロリ菌の発がん機構におけるヌクレオリンの重要性を明らかにした。本論文に述べられている主要な成果は以下の通りである。

第一章では、Tip*α* の結晶化と X 線構造解析について論じられている。本結果は徳島文理大学津下利明教授との共同研究の成果である。申請者はリコンビナントタンパク質の提供及び、結晶化の条件検討に携わった。本解析で明らかになった Tip*α* の 6 アミノ酸欠失変異体 (del-Tip*α*) の立体構造は、これまで報告されたタンパク質と類似性がなくユニークな二量体構造であることを始めて見出した。特徴的な立体構造から Tip*α* の発がん促進機構について考察した。

第二章では、Tip*α* の結合因子の探索を行い、見出したヌクレオリンについて Tip*α* との結合性について *in vitro* 及び、細胞内での結合を詳細に解析している。Tip*α* の C 末端側に FLAG タグを付加した Tip*α*(Tip*α*-FLAG) と不活性型の del-Tip*α*(del-Tip*α*-FLAG) を新たに構築し、マウス胃がん細胞 (MGT-40) の細胞抽出液中に Tip*α*-FLAG と特異的に結合するポリペプチドを初めて見出した。質量分析により、その中から Tip*α* の結合因子としてヌクレオリンを同定し、リコンビナントタンパク質を用いた pull-down 解析からヌクレオリンの中間ドメインあるいは C 末端ドメインに Tip*α* が結合することを明らかにした。

第三章では、Tip*α* の結合因子として同定したヌクレオリンが Tip*α* の生物活性を担う受容体であることを様々な実験手法で証明した。ヌクレオリンは正常な細胞では核小体に局在るタンパク質であるが、マウス胃がん細胞 MGT-40 では、ヌクレオリンが細胞表面に局在することを細胞分画、免疫染色、及び、フローサイトメトリー解析により初めて明らかにした。次に、(1) 細胞表面のヌクレオリンに対する抗体 Anti-NUC295 処理が、Tip*α* の取り込みを促進し、*TNF-α* 遺伝子の発現を亢進すること、(2) ツニカマイシン処理による細胞表面に局在するヌクレオリンの減少、あるいは RNA 干渉によるヌクレオリンの特異的ノックダウンの結果、Tip*α* の細胞内への取り込みが阻害され、*TNF-α* 遺伝子発現が抑制されることを明らかにした。以上の結果から申請者は細胞表面に存在するヌクレオリンが標的細胞表面で Tip*α* の受容体として働き、Tip*α* の細胞内への取り込み及び、*TNF-α* 遺伝子発現の誘導に寄与することを証明した。

第四章では、胃発がんにおけるヌクレオリンの局在変化の重要性について研究を展開した。申請者はヒト胃がん細胞の細胞表面にヌクレオリンが局在することを初めて見出し、細胞表面のヌクレオリン量と細胞内の蓄積量との比較から、ヌクレオリンの細胞表面への局在は、単に蓄積量の増加によるものでなく、なんらかのシグナルや修飾等の特異的な機構が関与すると考えた。Tipα に応答しないマウス繊維芽細胞(BALB/3T3) と、Tipα により発がんが促進される Bhas42 細胞に注目し、ヌクレオリンの細胞表面における局在に Ras シグナルの活性化が関与することを発見した。さらに、胃がん細胞の表面のヌクレオリンが新しい抗がん剤の標的となることをヌクレオリン標的アプタマーにより示した。

以上をまとめると、本論文で得られた新たな知見は、(1) ヌクレオリンが Tipα の細胞内結合因子であること、(2) 細胞表面に存在するヌクレオリンが Tipα の受容体として働き、Tipα の細胞内移行と *TNF-α* 遺伝子発現の誘導に寄与すること、(3) 胃がん細胞表面にヌクレオリンが局在すること、(4) ヌクレオリンの細胞表面への局在変化に Ras シグナルの活性化が関与することの 4 点である。これらの結果は、ピロリ菌の感染による発がんにおけるヌクレオリンの重要性を始めて明らかにしたものであり、細胞表面に局在するヌクレオリン量が胃がん発症の危険度を左右することを示唆する。ピロリ菌感染者のうち胃がんを発症するヒトは 0.4%ほどであるという謎を解き明かし、ピロリ菌感染による胃がんの解明に寄与する新しい知見であり、高い意義を有すると判断する。また、申請者は本論文の内容を第 1 著者として査読付き英語論文に専門誌に 2 編、他に関連論文 1 編として発表している。これらの成果から、本審査委員会は、本学位論文を博士（理学）の学位を授与するに値するものと判断した。