

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08436

研究課題名(和文)ピロリ菌病原因子CagAの宿主細胞内新規結合ホスファターゼの解析

研究課題名(英文) Analysis of the phosphatase that is a novel binding target for the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA in the host cells

研究代表者

藤井 裕美子 (FUJII, Yumiko)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：30722334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：胃上皮細胞におけるチロシンリン酸化CagAの新規結合標的として、SH2ドメイン含有イノシトールホスファターゼSHIP2を同定した。CagAは宿主細胞の細胞膜近傍にSHIP2を集積させ、SHIP2のリン脂質ホスファターゼ活性を亢進することでピロリ菌が接着する細胞膜のホスファチジルイノシトール組成を変化させることを示した。さらに、SHIP2がピロリ菌から宿主細胞へのCagAの侵入を促進することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SHIP2はCagAと結合することで胃上皮細胞内へのCagAの取り込みを促進し、その働きによりCagAが示す発がん活性の亢進に寄与していることが強く示唆された。本研究から、SHIP2は特に欧米に広く分布するピロリ菌が持つCagAへの結合が強いことが示され、欧米型のcagA陽性ピロリ菌感染を起点とした胃発がんに関わることが推察された。SHIP2によるCagA取り込み促進のメカニズムをさらに詳細に明らかにすることで、胃がん発症予防に関わる重要な知見が得られる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The SH2 domain-containing inositol phosphatase SHIP2 was identified as a novel binding target for tyrosine-phosphorylated CagA in gastric epithelial cells. It was shown that CagA recruits SHIP2 to the plasma membrane of the host cells and enhances the phospholipid phosphatase activity of SHIP2 to change the phosphatidylinositol composition of the plasma membrane to which *H. pylori* adheres. Furthermore, it was revealed that SHIP2 increases the delivery of CagA from *H. pylori* into the host cells.

研究分野：分子腫瘍学、感染腫瘍学

キーワード：ヘリコバクター・ピロリ CagA 脂質ホスファターゼ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヘリコバクター・ピロリ (ピロリ菌) は世界人口の約半数が感染しているとされる細菌で、その慢性感染は胃炎や胃潰瘍、さらには胃がんの発症と強く関連する。とりわけ *cagA* 遺伝子を持つピロリ菌の感染は、*cagA* 陰性菌の感染より激しい萎縮性胃炎を誘発し胃がん発症ともより強い相関を示す。CagA タンパク質はピロリ菌体内で産生される病原因子で、ピロリ菌が持つIV型分泌機構により宿主の胃上皮細胞内に直接注入される。注入された CagA は、C 末端側に複数存在する EPIYA セグメントと呼ばれる領域内のチロシン残基にリン酸化を受け、そのリン酸化依存的にプロテインホスファターゼ SHP2 の SH2 ドメインと結合して SHP2 のホスファターゼ活性を亢進する。SHP2 は RAS-ERK シグナル経路活性化に関わる分子であり、その活性異常が CagA に起因する胃発がんにも関わると考えられている。

SHP2 は免疫細胞において、リガンド結合によりチロシンリン酸化を受ける表面受容体内の ITIM と呼ばれるモチーフに SH2 ドメインを介して結合し、免疫シグナルを制御する。このチロシンリン酸化 ITIM には、SHP ファミリー(SHP1 および SHP2)の他に、SHIP という SH2 ドメイン含有イノシトールホスファターゼも結合することが知られる。SHIP は、ホスファチジルイノシトール 3,4,5-三リン酸 (PI(3,4,5)P₃) を脱リン酸化してホスファチジルイノシトール 3,4-二リン酸 (PI(3,4)P₂) に変換するリン脂質ホスファターゼである。SHIP ファミリーには SHIP1 と SHIP2 が存在し、SHIP1 が血球系の細胞に限定して発現するのに対し、SHIP2 は全身の細胞にユビキタスに発現している。ホスファチジルイノシトールは細胞膜の構成成分である一方、シグナル伝達のセカンドメッセンジャー産生や各種タンパク質との結合を介して、細胞増殖、細胞内物質輸送、細胞骨格制御など様々な機能に関わる分子で、ホスファチジルイノシトールホスファターゼの一つである PTEN の異常とがんとの関係に代表されるように、ホスファチジルイノシトールの代謝異常は様々な疾患の原因になると考えられている。

2. 研究の目的

SHP2 と SHIP のそれぞれの SH2 ドメインが共に ITIM 配列に結合可能であることから、両者は部分的に結合標的分子を共有すると予想した。そこで、CagA がチロシンリン酸化依存的に SHIP2 と結合することでそのイノシトールホスファターゼ活性を脱制御して細胞機能に影響を与える可能性を考えた。この仮説を検討するため、本研究では以下の3点を明らかにすることを目的とした。

- (1)CagA-SHIP2 の結合可能性の検討とその結合メカニズム
- (2)胃上皮細胞における CagA-SHIP2 複合体形成の病態生理学的意義
- (3)SHIP2 の異常と発がんとの関連

3. 研究の方法

(1)CagA と SHIP2 の結合の可能性を検討するため、ヒト胃がん由来細胞株 AGS と非形質転換ヒト胃上皮細胞株 GES-1 に、Flag タグを付加した CagA ベクターを導入して CagA タンパク質を一過性に発現させ、抗 Flag 抗体を用いて免疫沈降を行った。さらに結合のメカニズムを明らかにするため、CagA のリン酸化部位となるチロシンをフェニルアラニンに置換したチロシンリン酸化耐性型 CagA、様々な組み合わせの EPIYA セグメントを持つ CagA、SH2 ドメイン欠損型 SHIP2 の発現ベクターを用いて、COS7 細胞株で免疫沈降実験を行った。

(2)細胞内での CagA-SHIP2 複合体の存在とその局在を観察する目的で、Flag タグを付加した CagA ベクターを導入した AGS 細胞および GES-1 細胞において抗 Flag 抗体と抗 SHIP2 抗体を用いた Proximity Ligation Assay を行った。ピロリ菌 NCTC11637 株、*cagA* 遺伝子またはIV型分泌機構を構成する遺伝子を欠損したアイソジェニックピロリ菌株をそれぞれ感染させた AGS 細胞において、抗 SHIP2 抗体を用いた蛍光免疫染色を行った。CRISPR-Cas9 システムを用いて SHIP2 をノックアウトした2種類の AGS 細胞株を樹立し、これら SHIP2-KO AGS 細胞、各種ピロリ菌に感染した AGS 細胞、CagA またはチロシンリン酸化耐性型 CagA を一時的に発現した AGS 細胞および GES-1 細胞を用いて、PI(3,4)P₂ に対する蛍光免疫染色を行った。CagA-SHIP2 複合体形成の病態生理学的意義を調べるため、AGS 細胞および SHIP2-KO AGS 細胞、SHIP2 過剰発現 AGS 細胞にピロリ菌 NCTC11637 株を感染させて、細胞内に侵入した CagA 量を抗チロシンリン酸化抗体を用いた western blotting 法で検出した。さらに、CagA の発がん活性に関わる SHP2 と CagA の相互作用に依存する「ハミングバード表現型」と呼ばれる伸長した細胞の誘導率を、AGS 細胞および SHIP2-KO AGS 細胞、SHIP2 過剰発現細胞のそれぞれにピロリ菌 NCTC11637 株を感染させて比較した。

(3) SHIP2 の異常と発がんの関与を検討するため、肝がん患者の手術検体において SHIP2 を免疫

組織化学的に解析した。非形質転換ヒト肝内胆管細胞株 MMNK-1 を用いて、SHIP2 の局在を蛍光免疫染色で解析した。この細胞株を用いて、CRISPR-Cas9 システムにより SHIP2 ノックアウト細胞株を複数樹立した。この SHIP2 欠損 MMNK-1 細胞および SHIP2 阻害剤を処理した MMNK-1 細胞において、リン酸化ヒストン H2A.X に対する蛍光免疫染色を行った。

4. 研究成果

(1) CagA と SHIP2 の結合の可能性を検討するため、細胞に強制発現した CagA に対する免疫沈降実験を行ったところ、内因性 SHIP2 が CagA と結合することが明らかになった。CagA-SHIP2 相互作用が CagA のチロシンリン酸化に依存するかを確かめるためチロシンリン酸化耐性型 CagA を用いて免疫沈降をしたところ、SHIP2 の共沈が観察されず、SHIP2 との結合には CagA のチロシンリン酸化が必須であることが示された。一方、SHIP2 の結合責任領域を同定するため SH2 ドメインを欠損した変異体 SHIP2 を用いて免疫沈降実験を行ったところ、SHIP2 の SH2 ドメインがチロシンリン酸化 CagA との結合に必須な領域であることが明らかになった。

CagA のチロシンリン酸化部位を含む EPIYA セグメントは、周辺のアミノ酸配列から 4 種 (EPIYA-A, EPIYA-B, EPIYA-C, EPIYA-D) に分類され、欧米で単離されるピロリ菌が産生する CagA は、EPIYA-A, EPIYA-B と 1-3 個の EPIYA-C を持つのに対し、東アジアのピロリ菌 CagA は、EPIYA-A, EPIYA-B と EPIYA-D を持つ。これらのセグメントの中で SHIP2 が結合するセグメントを同定する目的で、様々な組み合わせの EPIYA セグメントを持つ CagA を用いて免疫沈降実験をしたところ、SHIP2 は東アジア型 CagA に特徴的な EPIYA-D セグメントにも結合可能ではあるが、欧米型 CagA に特徴的な EPIYA-C セグメントに最も強く結合することがわかった。さらに、その結合量は EPIYA-C セグメントの数に依存して増加することが示された。欧米型 CagA は EPIYA-C の数が多いほど強い発がん活性を持つことが臨床学的に明らかにされており、CagA-SHIP2 相互作用が CagA 依存的な発がんを促進している可能性が考えられた。

(2) ヒト胃上皮細胞内における CagA-SHIP2 複合体形成を観察するため、細胞に CagA を異所性に発現させて Proximity Ligation Assay を行ったところ、チロシンリン酸化 CagA と内因性 SHIP2 の複合体は細胞膜近傍に局在していることが明らかになった。そこで、欧米型 CagA を細胞に注入するピロリ菌 NCTC11637 株を感染させた胃上皮細胞において、SHIP2 に対する蛍光免疫染色を行った。CagA が注入された AGS 細胞は、「ハミングバード表現型」と呼ばれる特徴的に伸長した細胞形態を示すことが知られる。このハミングバード表現型を示す CagA が注入された細胞では、SHIP2 の一部が細胞膜に集積していた。特に、ピロリ菌が密に付着している細胞膜の領域には SHIP2 が集中して存在している様子も観察された。CagA を注入しない *cagA* 遺伝子欠損または IV 型分泌機構の構成遺伝子欠損アイソジェニックピロリ菌株の感染では、SHIP2 の細胞膜への集積は観察されなかったことから、SHIP2 はリン酸化 CagA と複合体を形成することで細胞膜周辺に留め置かれていることが明らかになった。

各種ピロリ菌感染 AGS 細胞において、SHIP2 のホスファターゼ活性の産物である PI(3,4)P₂ に対する抗体で蛍光免疫染色を行ったところ、CagA が注入された細胞の細胞膜で PI(3,4)P₂ が蓄積していることが示された。CRISPR-Cas9 システムを用いて SHIP2 をノックアウトした AGS 細胞株 (SHIP2-KO AGS 細胞) を樹立して同様に感染実験を行った結果、SHIP2 欠損により細胞膜への PI(3,4)P₂ 蓄積は観察されなくなることがわかった。また、発現ベクターを用いて CagA を一過性に発現させた細胞の細胞膜でも PI(3,4)P₂ の蓄積が観られたが、チロシンリン酸化耐性型 CagA を発現させても PI(3,4)P₂ は蓄積しないことが明らかになった。これらの観察から、細胞内に侵入した CagA は複合体を形成することで SHIP2 を細胞膜近傍につなぎ止め、細胞膜に存在する PI(3,4,5)P₃ を SHIP2 のホスファターゼ活性で PI(3,4)P₂ に変換させると考えられた。

CagA の発がん活性における CagA-SHIP2 相互作用の病態生理学的役割を調べる目的で、SHIP2-KO AGS 細胞にピロリ菌 NCTC11637 株を感染させて細胞内のチロシンリン酸化 CagA の量を western blotting 法で定量した結果、SHIP2 を発現している AGS 細胞と比較して SHIP2 を欠損した AGS 細胞では細胞内のチロシンリン酸化 CagA が減少していた。一方、SHIP2 を過剰発現させた AGS 細胞ではチロシンリン酸化 CagA が増加した。SHIP2-KO AGS 細胞において、CagA をリン酸化する Src キナーゼ活性に変化はなく、発現ベクターにより一過性に発現させた CagA タンパク質の安定性も影響を受けなかったことから、CagA-SHIP2 相互作用はピロリ菌から胃上皮細胞への CagA の注入を促進していることが明らかになった。ハミングバード表現型の誘導は、CagA 依存的な発がん活性に関わるプロテインホスファターゼ SHP2 と CagA との相互作用に依存することが知られる。そこで、AGS 細胞および SHIP2-KO AGS 細胞、SHIP2 過剰発現 AGS 細胞にピロリ菌 NCTC11637 株を感染させてハミングバード表現型を示す細胞の割合を比較した。その結果、SHIP2 過剰発現 AGS 細胞ではハミングバード表現型の誘導が増加し、逆に SHIP2-KO AGS 細胞では有意に減少することがわかった。以上の結果は、CagA-SHIP2 相互作用が胃上皮細胞への CagA の侵入を促進し、その結果発がん活性を持つ CagA-SHP2 複合体形成を増加させ、細胞運動性の亢進を反映すると考えられるハミングバード表現型の誘導を促進していることを強く示唆している。今後 SHIP2 が CagA の細胞内への侵入を増加させるメカニズムが詳細に明らかになれば、*cagA* 陽性ピロリ菌感染を起点とした胃発がんの予防を考える上で重要な見解が得られる可能性がある。

(3)SHIP2 の異常がより直接的に発がんに関与するかを検討するため、肝がん患者の手術検体において SHIP2 を免疫組織化学的に解析したところ、SHIP2 は高分化型の肝細胞がんでは細胞膜近傍に集積していたのに対し、低分化型の肝細胞がんにおいては SHIP2 の発現が低下していることが明らかになった。一方、肝内胆管がんにおいては、正常の肝内胆管細胞に比べて細胞の核でより強い SHIP2 発現が観察された。非がん部の肝内胆管細胞の一部でも SHIP2 が核に集積していたことから、非形質転換ヒト肝内胆管細胞株 MMNK-1 において SHIP2 の局在を免疫蛍光法で解析したところ、細胞の核内にも SHIP2 が存在することが確認され、さらに分裂期の細胞で染色体の周辺部に特徴的な SHIP2 局在が観察された。SHIP2 が肝内胆管細胞の核内で果たす役割について解析するため、MMNK-1 細胞をもとに CRISPR-Cas9 システムを用いて SHIP2 ノックアウト細胞株を樹立した。DNA 障害を検出するリン酸化ヒストン H2A.X に対する蛍光免疫染色を行ったところ、SHIP2 の欠損によりリン酸化ヒストン H2A.X 陽性細胞が増加することが明らかになった。SHIP2 阻害剤の処理によってもリン酸化ヒストン H2A.X 陽性細胞の増加が観察されたことから、SHIP2 は肝内胆管細胞において、そのホスファターゼ活性依存的に染色体およびゲノムの安定性に寄与することが示唆され、この機能の異常が、がんの発生や悪性化に関与する可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fujii Yumiko, Murata-Kamiya Naoko, Hatakeyama Masanori	4. 巻 111
2. 論文標題 <i>Helicobacter pylori</i> CagA oncoprotein interacts with SHIP2 to increase its delivery into gastric epithelial cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1596 ~ 1606
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14391	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Meng Lingtong, Goto Masanori, Tanaka Hiroki, Kamikokura Yuki, Fujii Yumiko, Okada Yoko, Furukawa Hiroyuki, Nishikawa Yuji	4. 巻 191
2. 論文標題 Decreased Portal Circulation Augments Fibrosis and Ductular Reaction in Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 1580 ~ 1591
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajpath.2021.06.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yumiko Fujii, Naoko Kamiya, Masanori Hatakeyama
2. 発表標題 Helicobacter pylori CagA interacts with the lipid phosphatase SHIP2 to increase its delivery into gastric cells
3. 学会等名 The 79th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------