

令和元年5月21日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08773

研究課題名(和文) 胃癌発症におけるピロリ菌CagAとEBウイルスの機能関連

研究課題名(英文) Functional relationship between Helicobacter pylori CagA and Epstein-Barr virus in gastric carcinogenesis

研究代表者

紙谷 尚子 (Kamiya, Naoko)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・講師

研究者番号：40279352

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：日本における胃癌患者のほぼ全てがcagA陽性ピロリ菌感染者であり、その約10%はEpstein-Barrウイルス陽性である。ピロリ菌CagAタンパク質は胃上皮細胞内でチロシンリン酸化される。CagAはチロシンリン酸化依存的に発がんホスファターゼSHP2に結合しSHP2を異常活性化する結果、細胞がん化を促す。本研究では、CagAのチロシン脱リン酸化を担う発がん抑制ホスファターゼとしてSHP2ホモログであるSHP1を同定した。さらに、EBウイルスがSHP1のエピジェネティックな発現抑制を介してピロリ菌CagAの発がん活性を増強することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ピロリ菌の病原因子であるCagAタンパク質は、胃上皮細胞内でチロシンリン酸化されて発がん活性を発揮する。本研究では、CagAをチロシン脱リン酸化する酵素としてSHP1を同定した。SHP1は胃癌抑制酵素として位置づけられることから、本研究結果の医学的意義は極めて大きい。さらに、Epstein-Barrウイルスとピロリ菌が重感染した細胞では、EBウイルス感染によりSHP1発現が低下する結果、ピロリ菌CagAの発がん活性が増強することを明らかにした。発がんにおける細菌とウイルスの連携作用を世界で初めて示した研究成果である。

研究成果の概要(英文)：In Japan, most gastric cancers are associated with chronic infection of the stomach mucosa with Helicobacter pylori cagA-positive strains. Approximately 10% of cancers also have Epstein-Barr virus (EBV) in the cancer cells. CagA protein undergoes tyrosine phosphorylation in gastric epithelial cells. Tyrosine-phosphorylated CagA binds to the pro-oncogenic phosphatase SHP2 and thereby deregulates the phosphatase activity, which has been considered to play an important role in gastric carcinogenesis. In this study, we found that the SHP2 homologue SHP1 dephosphorylates CagA. Infection of gastric epithelial cells with EBV induced SHP1 promoter hypermethylation, which strengthened phosphorylation-dependent CagA action via epigenetic downregulation of SHP1 expression.

研究分野：感染腫瘍学

キーワード：ピロリ菌 CagA EBウイルス 胃癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

(1) ピロリ菌は *cagA* 遺伝子を保有する菌株と保有しない菌株に大別されるが、日本で検出されるほぼ 100% のピロリ菌は *cagA* 陽性株である。ピロリ菌の菌体内で産生される CagA タンパク質は、菌が保有する注射針様の IV 型分泌機構を介して胃上皮細胞内に注入される。CagA は胃上皮細胞内でチロシンリン酸化された後、発がんホスファターゼ SHP2 に結合し SHP2 を異常活性化する。研究代表者が所属する研究室では、ピロリ菌 CagA を全身性に発現する *cagA* トランスジェニックマウスを樹立し、CagA がチロシンリン酸化依存的に消化管腫瘍と血液がんを発症することを示している。

(2) 日本は胃がんの多発国であり、毎年 5 万人近くの方が胃がんで命を落としている。少なくとも日本では、ほぼ全ての胃がん患者がピロリ菌感染者であり、*cagA* 陽性ピロリ菌の慢性感染は胃がん発症の最大の危険因子と考えられている。さらに、胃がん患者の約 10% では、*cagA* 陽性ピロリ菌に加えて Epstein-Barr (EB) ウイルスが胃がん細胞に感染していることが報告されている。しかしながら、ピロリ菌と EB ウイルスの重感染が胃がん発症に与える効果は解明されていない。

(3) EB ウイルス陽性胃がんの特徴として、感染した胃上皮細胞のゲノム DNA に広範囲かつ高度のメチル化が誘導されるエピジェネティック異常が報告されている。研究代表者は、ヒト胃上皮細胞由来の MKN7 細胞に *in vitro* で EB ウイルスを感染させた細胞において、SHP1 の発現が低下することを見出している。SHP1 は哺乳動物細胞における唯一の SHP2 ホモログであり、両者ともに N 末端側に 2 つの SH2 ドメインと C 末端側にチロシンホスファターゼドメインを保有する。CagA はリン酸化チロシン残基を介して SHP2 の SH2 ドメインに結合することから、CagA が SHP1 にも結合する可能性が考えられた。そこで、免疫沈降法により CagA と SHP1 の相互作用を解析した結果、CagA-SHP1 複合体形成が検出されたのみならず、SHP1 の共発現により CagA のチロシンリン酸化レベルが低下するという予想外の現象が見られた。この事実は、SHP1 が CagA のチロシン脱リン酸化を担うホスファターゼである可能性を示唆している。

#### 2. 研究の目的

(1) SHP1 が CagA のチロシン脱リン酸化を担うホスファターゼである可能性を検証する。

(2) *cagA* 陽性ピロリ菌と EB ウイルスの重感染が胃がん発症に与える効果を解明する。特に、ピロリ菌 CagA と EB ウイルスの両者に関連することが判明した SHP1 に着目し、発がんにおけるピロリ菌と EB ウイルスの連携作用を研究する。

#### 3. 研究の方法

(1) SHP1 が直接的に CagA をチロシン脱リン酸化することを示すため、大腸菌のタンパク質発現系を用いて SHP1 およびチロシンリン酸化型 CagA の組換えタンパク質を作製し、*in vitro* ホスファターゼ試験を行う。

(2) ヒト胃上皮細胞由来の MKN7 細胞ならびに MKN74 細胞に *in vitro* で EB ウイルスを感染させ、定量的 RT-PCR 法により *SHP1* mRNA の発現レベルを解析し、ウェスタンブロット法によりタンパク質レベルでの SHP1 発現を解析する。さらに、ゲノムワイドな DNA メチル化解析を行う。

(3) ヒト胃上皮細胞由来の MKN7 細胞ならびに MKN74 細胞に *cagA* 陽性ピロリ菌と EB ウイルスを重感染させ、EB ウイルスが CagA の発がん活性に与える効果を解析する。

(4) 胃がん患者の摘出がん組織における SHP1 の発現を解析する。特に、EB ウイルス陽性胃がんにおいて SHP1 の発現低下が認められるか否かを検討する。

#### 4. 研究成果

(1) ヒト胃上皮細胞由来の AGS 細胞に CagA と SHP1 を共発現させると、CagA のチロシンリン酸化レベルが低下することを見出していた。一方、SHP1 特異的 siRNA の導入により SHP1 発現をノックダウンした細胞では、CagA のチロシンリン酸化レベルが上昇した。これらの結果は、SHP1 が CagA のチロシン脱リン酸化を担うホスファターゼである可能性を強く示唆している。そこで、SHP1 が直接的に CagA を脱リン酸化する可能性を検討するため、大腸菌のタンパク質発現系を用いて SHP1 およびチロシンリン酸化型 CagA の組換えタンパク質を作製した。ネガティブコントロールとして、ホスファターゼ活性を保有しない SHP1 変異体 (C453S) に加え、SHP1 ホモログである SHP2 の組換えタンパク質を作製した。精製した組換えタンパク質を用いて *in vitro* ホスファターゼ試験を行った結果、CagA は SHP1 によってチロシン脱リン酸化されることを示した。尚、SHP2 についてもホスファターゼ試験を試行したが、SHP2 による CagA のチロシン脱リン酸化は認められなかった。

これまで当該分野では、SHP2 は体細胞に普遍的に発現するのに対し、SHP1 は主に血液系細胞

に発現していると認識されていた。上皮細胞における SHP1 の発現は無視できる程度と考えられていたため、胃上皮細胞における SHP1 の機能に着目した研究はなかった。ところが、正常マウス (C57BL/6J) における SHP1 の発現をウェスタンブロット法と免疫染色法で解析した結果、血液系細胞のみならず胃上皮細胞でも SHP1 が発現していることが判明した。本研究は、胃上皮細胞における SHP1 の機能を初めて解明したものである。

(2) 発がんにおいて CagA のチロシンリン酸化依存的な SHP2 脱制御が重要な役割を担うことが明らかにされている。そこで、SHP1 が CagA のチロシンリン酸化依存的な生物活性を抑制するか否かを検討した。AGS 細胞に CagA を発現させると、CagA がチロシンリン酸化依存的に SHP2 を異常活性化する結果、hummingbird 表現型と呼ばれる特徴的な細胞形態変化が誘導される (Higashi et al. *Science* 295, 683-6, 2002)。そこで、hummingbird 表現型の誘導を指標として、CagA のチロシンリン酸化依存的な生物活性を免疫染色法により評価した。SHP1 を CagA と共発現させると、CagA による hummingbird 表現型の誘導が抑制された。一方、SHP1 特異的 siRNA の導入により SHP1 発現をノックダウンした細胞では、CagA による hummingbird 表現型の誘導が亢進した。これらの事実から、ピロリ菌 CagA 依存的な胃がん発症において、SHP1 は発がん抑制ホスファターゼとして機能すると考えられる。

(3) ヒト胃上皮細胞由来の MKN7 細胞ならびに MKN74 細胞に *in vitro* で EB ウイルスを感染させた細胞株を樹立した。Infinium HumanMethylation450 BeadChip (illumina 社) を用いて、樹立した EB ウイルス感染細胞株における DNA メチル化をゲノムワイドに解析した結果、EB ウイルス感染細胞では SHP1 遺伝子プロモーターが高度にメチル化されていることが明らかになった。さらに、メチル化に伴い、mRNA レベルならびにタンパク質レベルでも SHP1 の発現が抑制されていることを見出した。

(4) 樹立した EB ウイルス感染細胞および親株の MKN7 細胞に CagA を発現させ、hummingbird 表現型の誘導を解析した。その結果、EB ウイルス感染細胞では、CagA による hummingbird 表現型の誘導が亢進した。さらに、EB ウイルス感染細胞および親株の MKN7 細胞に *cagA* 陽性ピロリ菌を感染させ、hummingbird 表現型の誘導を解析した。その結果、EB ウイルス感染細胞では、*cagA* 陽性ピロリ菌感染による hummingbird 表現型の誘導が亢進した。これらの結果から、EB ウイルスは SHP1 の発現抑制を介してピロリ菌 CagA の発がん活性を増強することが示唆された。

(5) 培養細胞を用いた *in vitro* 実験で得られた研究成果の臨床的妥当性を検討するため、胃がん患者から摘出したがん組織の解析を行った。その結果、EB ウイルス陽性の胃がん組織では、SHP1 遺伝子のプロモーターがメチル化されていることに加え、SHP1 発現が低下していることが明らかになった。

## 5. 主な発表論文等

### [雑誌論文](計5件)

1. Ooki, T., Murata-Kamiya, N., Takahashi-Kanemitsu, A., Wu, W. and Hatakeyama, M. High-molecular-weight hyaluronan is a Hippo pathway ligand that directs cell density-dependent growth inhibition via PAR1b. *Dev. Cell*, (2019) 査読有り DOI: 10.1016/j.devcel.2019.04.018
2. Shiroki, T., Yokoyama, M., Tanuma, N., Maejima, R., Tamai, K., Yamaguchi, K., Oikawa, T., Noguchi, T., Miura, K., Fujiya, T., Shima, H., Sato, I., Murata-Kamiya, N., Hatakeyama, M., Iijima, K., Shimosegawa, T., Satoh, K. Enhanced expression of M2 isoform of pyruvate kinase is involved in the gastric cancer development by regulating cancer specific metabolism. *Cancer Sci.*, 108, 931-940 (2017) 査読有り DOI: 10.1111/cas.13211
3. Roy, R.K., Hoppe, M.M., Srivastava, S., Samanta, A., Sharma, N., Tan, K.T., Yang, H., Voon, D.C., Pang, B., Teh, M., Murata-Kamiya, N., Hatakeyama, M., Chang, Y.T., Young, W.P., Ito, Y., Ho, K.Y., Tan, P., Soong, R., Koeffler, P.H., Yeoh, K.G., Jeyasekharan, A.D. CEACAM6 is upregulated by *Helicobacter pylori* CagA and is a biomarker for early gastric cancer. *Oncotarget*, 7, 55290-55301 (2016) 査読有り DOI: 10.18632/oncotarget.10528
4. Senda, Y., Murata-Kamiya, N., Hatakeyama, M. Csk-mediated EPIYA phosphorylation of Pragmin creates a feed-forward Csk activation loop that promotes cell motility. *Cancer Sci.*, 107, 972-980 (2016) 査読有り DOI: 10.1111/cas.12962
5. Saju, P., Murata-Kamiya, N., Hayashi, T., Senda, Y., Nagase, L., Noda, S., Matusaka, K., Funata, S., Kunita, A., Urabe, M., Seto, Y., Fukayama, M., Kaneda, A., Hatakeyama, M. Host SHP1 phosphatase antagonizes *Helicobacter pylori* CagA and can be downregulated by Epstein-Barr virus. *Nat. Microbiol.* Article number: 16026 (2016) 査読有り DOI: 10.1038/nmicrobiol.2016.26

〔学会発表〕(計4件)

1. 先山奈津紀、紙谷尚子、畠山昌則「ピロリ菌 CagA による胃上皮細胞の分泌形質獲得が腫瘍微小環境構築に寄与する」第77回日本癌学会学術総会 2018年
2. 大木拓也、紙谷尚子、高橋昌史、畠山昌則「高分子量ヒアルロン酸によるがん抑制性 Hippo 経路の活性化と乳がんにおけるその破綻」第77回日本癌学会学術総会 2018年
3. 紙谷尚子「ヘリコバクター・ピロリの発がん活性を制御する宿主細胞機構」日本薬学会・第138年会(招待講演)2018年
4. Saju, P., Murata-Kamiya, N., Hataleyama, M. SHP1 is the *Helicobacter pylori* CagA-specific phosphatase that is dampened by Epstein-Barr virus. EHMSG XXIXth International Workshop on Helicobacter & Microbiota in Inflammation & Cancer (国際学会) Mardeburg (Germany) 2016年

〔図書〕該当無し

〔産業財産権〕該当無し

〔その他〕該当無し

## 6. 研究組織

(1)研究分担者 該当無し

(2)研究協力者

研究協力者氏名：瀬戸泰之

ローマ字氏名：Seto, Yasuyuki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。