

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19121

研究課題名(和文)ピロリ菌CagAによる細胞内シグナル攪乱を抑制する分子標的阻害剤の探索

研究課題名(英文) Exploring the small molecule inhibitors that specifically block the intracellular signal perturbation induced by Helicobacter pylori CagA oncoprotein

研究代表者

林 剛瑠 (Hayashi, Takeru)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教

研究者番号：10722209

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：X線結晶構造解析ならびに生化学的解析を通じ、ピロリ菌病原因子CagAが引き起こすヒトがんタンパク質SHP2の異常活性化の構造基盤を原子レベルで解明した。タンパク質構造情報に基づきCagA-SHP2相互作用を特異的に遮断する低分子化合物の探索を行った。化合物ライブラリーを用いたスクリーニングの結果、数十の阻害剤候補化合物を取得した。本成果は、CagA-SHP2結合を分子標的とすることによりピロリ菌感染を背景とした胃発がんの予防あるいは早期胃がんの治療のための新たな創薬展開の基盤となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：X-ray crystal structure analysis and biochemical analysis revealed the structural mechanism underlying the deregulation of human pro-oncogenic phosphatase SHP2 by Helicobacter pylori virulence factor CagA at the atomic level. Based on the structural information, I then explored small-molecular inhibitors that can specifically block CagA-SHP2 interaction. Chemical screening using multiple compound libraries identified several candidates of the inhibitor for CagA-mediated SHP2 deregulation. This study is expected to be a research base leading to the innovative clinical application for prevention and early intervention of gastric cancer caused by H. pylori infection.

研究分野：生化学、分子腫瘍学

キーワード：ヘリコバクター・ピロリ CagA 胃発がん

1. 研究開始当初の背景

胃がんは世界で毎年 95 万人が新たに発症し、その殆どがヘリコバクター・ピロリ (ピロリ菌) の慢性感染に起因することが一般に認知されつつある。ピロリ菌の除去により胃がんリスクを大幅に低減することが可能となってきたが、一方で除菌率の低下の問題や除菌が逆流性食道炎および食道がんを誘発する等の報告もある。したがってピロリ菌関連疾患の予防・治療には現行の除菌法によるアプローチだけでなく今後の改善が課題となる。種々の胃粘膜病変の中でも胃がん発症にはピロリ菌の産生する CagA タンパク質が深く関与する。

CagA はピロリ菌の保有する IV 型分泌機構を介して宿主細胞内に侵入後、細胞膜内面に局在し、様々な細胞内分子と相互作用することによりその病原作用を発揮する。CagA の C 末端領域には Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala から成る EPIYA モチーフが複数繰り返し存在し、このモチーフ内のチロシン残基が宿主の Src family kinases (SFKs) および Abl kinase によりリン酸化修飾を受ける。チロシンリン酸化 CagA は SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 2 (SHP2) と結合し、その酵素活性を異常亢進させる。SHP2 は Ras-MAP キナーゼ経路および Wnt/ β -catenin 経路の細胞運動・増殖シグナルに関連した二大経路を促進するがんタンパク質として認知され、多くのヒト悪性腫瘍で機能獲得型の点変異が多数同定されている。SHP2 は自己阻害型の“閉”構造からチロシンリン酸化リガンドタンパク質との結合に起因した“開”構造への構造変化によって活性化すると考えられており、CagA はリガンドとして SHP2 を異常活性化することで、がんタンパク質に準じた生物活性を発揮する。このことは、全身に CagA を発現する遺伝子改変マウスが消化器がんを発症する一方、EPIYA モチーフ中の Tyr 残基を Phe 残基に置換したリン酸化耐性型 CagA を発現するマウスでは全く病変が見られないことから強く裏付けられる。加えて、患者から単離されたピロリ菌が産生する CagA について、EPIYA モチーフ周辺の配列多型ならびに EPIYA モチーフの繰り返しの数が胃がんの発症と密接に関連していることが明らかになっている。CagA の標的分子の中で、その結合能がチロシンリン酸化部位の分子多型に依存することが知られているタンパク質は SHP2 だけである。これらのことから CagA が有する SHP2 活性化能の強弱が、発がん素地の形成に直結すると考えられる。SHP2 は全身の細胞に広く発現するチロシン脱リン酸化酵素で、その機能は生命活動に必須であることから、SHP2 の活性を完全に阻害することは重大な副作用を招きうる。したがって、CagA に

よって引き起こされる SHP2 の異常活性化を特異的に遮断することができれば、ピロリ菌感染による胃疾患の発症を抑制できると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、ピロリ菌感染を背景とした胃がん発症において重要な役割を果たす CagA による SHP2 脱制御の分子機構を原子レベルで明らかにし、得られた構造情報に基づいて CagA-SHP2 相互作用を特異的に遮断する低分子阻害剤の候補化合物を取得することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) CagA は単離される地域に強く関連した分子多型が見られ、特に、東アジア諸国で単離される東アジア型 CagA と東アジア以外の全世界で単離される欧米型 CagA に大別される。この 2 つの CagA 分子種の間で SHP2 結合強度が異なることが示唆されている。この CagA-SHP2 相互作用の構造基盤を明らかにするため、チロシンリン酸化 CagA ペプチドと SHP2 の SH2 ドメインとの複合体の X 線結晶構造解析を行った。

(2) CagA-SHP2 結合強度を表面プラズモン共鳴法により検討し、CagA との複合体形成の強さと SHP2 の酵素活性との関連をチロシン脱リン酸化試験により検証した。

(3) CagA による SHP2 の活性化が細胞に与える影響を、細胞伸長、細胞運動、細胞浸潤性を指標とした生物学的アッセイにて検証した。

(4) CagA による SHP2 の活性化を特異的に阻害する分子標的薬開発のため、化合物ライブラリーを用いたハイスループットスクリーニングを実施した。

4. 研究成果

(1) 東アジア型 CagA に由来するチロシンリン酸化 CagA ペプチド (EPIpYA-D: ASPEIIPYATIDFD) ならびに欧米型 CagA に由来するチロシンリン酸化 CagA ペプチド (EPIpYA-C: VSPEIIPYATIDDL) を用いて、SHP2 のタンデム SH2 ドメインとの共結晶を作製した。高エネルギー加速器研究機構フロンティアのビームラインにて X 線回折実験を行い、EPIpYA-D-SH2 複合体結晶からは 2.60 Å 分解能、EPIpYA-SH2 複合体結晶からは 2.45 Å 分解能の回折データをそれぞれ取得し、複合体の結晶構造の決定に成功した (図 1)。決定した EPIpYA-D-SH2 複合体の結晶構造では、東アジア型 CagA に特異的に存在するリン酸化チロシン残基より 5 残基下流 (pY+5 位) のフェニルアラニン (Phe) 残基の芳香族側鎖が、SH2 ドメインのリガンド結合溝に嵌り込み、広い範囲で相互作用することが明らかになった。特に、N-SH2 ドメイン中の Gly-67 と Gly-68 を繋ぐペプチド結合と EPIpYA-D の

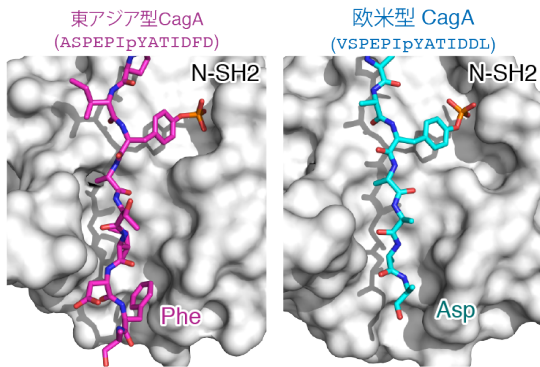


図1 CagA-SHP2 複合体の結晶構造

Phe 残基との間に π - π 相互作用様の結合様式が観察され、この相互作用が東アジア型 CagA-SHP2 結合を増強すると考えられた (図2)。一方、欧米型 CagA は pY+5 位に Phe 残基ではなく酸性のアスパラギン酸 (Asp) 残基を有しており、EPIpYA-C-SH2 複合体の結晶構造では、その Asp 残基側鎖を示す顕著な電子密度は観測されなかった。また、SH2 ドメインのリガンド結合溝は静電的に負に帯電し易い表面であることから、EPIpYA-C の pY+5 位の Asp 残基側鎖は SH2 表面に対して外側に配向し、CagA-SHP2 相互作用に関与しない或いは相互作用形成に対して抑制的に働くことが強く示唆された。

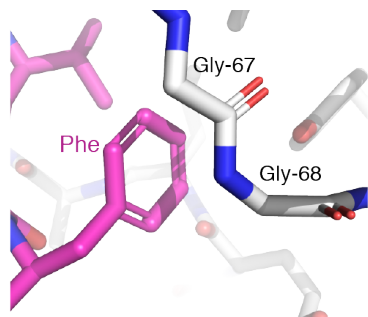


図2 東アジア型 CagA-SHP2 間の π - π 相互作用様の結合様式

(2) EPIpYA-D ならびに EPIpYA-C と SHP2 の N-SH2 ならびに C-SH2 ドメインとの結合の強さを、表面プラズモン共鳴 (SPR) により定量的に解析した。EPIpYA-D は N-SH2 に対して $0.185 \mu\text{M}$ 、C-SH2 に対して $1.43 \mu\text{M}$ の解離定数で結合した。一方、EPIpYA-C は N-SH2 に対して、 $22.7 \mu\text{M}$ 、C-SH2 に対して $60.5 \mu\text{M}$ の解離定数で結合した。N-SH2 に対する結合強度を指標とすると、EPIpYA-D は EPIpYA-C に比較し 100 倍以上強い SHP2 親和性を示すことが定量解析から明らかになった (図3)。結晶構造解析から pY+5 残基の芳香族側鎖構造が CagA-SHP2 結合に重要であることが示唆されたことから、点変異の導入により機能と構造との関連を解析した。その結果、EPIpYA-D の pY+5 位の Phe 残基をアラニン (Ala) 或いは

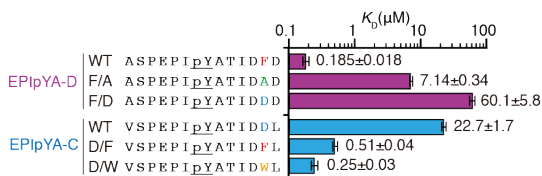


図3 CagA ペプチドと SHP2 の N-SH2 ドメイン間の結合解離定数

アスパラギン酸 (Asp) に置換すると、N-SH2 との親和性は大きく低下した。一方、EPIpYA-C の pY+5 位の Asp 残基を Phe あるいはトリプトファン (Trp) に置換すると、N-SH2 との親和性が顕著に増大した (図3)。さらに、CagA 結合が SHP2 の酵素活性に与える影響を生化学的に検討し、CagA-SHP2 結合親和性の強さが SHP2 の酵素活性に相関することを明らかにした。これら結果から、東アジア型 CagA における pY+5 位の Phe 残基の側鎖が、SHP2 との結合ならびに SHP2 活性化において重要であることを示す構造基盤を見出した。EPIpYA-C は SHP2 との結合が極めて弱いことが示されたが、欧米型 CagA には 1 つの EPIpYA-C セグメントを保有する分子種と EPIpYA-C セグメントを 2 つ以上直列に繰り返して保有する分子種が存在する。近年の数々の報告から、この EPIpYA-C セグメントの繰り返しは、欧米型 CagA の中でもより発がんとの相関が示されている。そこで、EPIpYA-C セグメントが直列につながったチロシンリン酸化 CagA ペプチド (EPIpYA-CC) を作製し、SPR 解析ならびに SHP2 酵素活性解析を実施したところ、EPIpYA-CC は N-SH2、C-SH2 の 2 つの SH2 ドメインを介した二価の結合により SHP2 と強く相互作用し、SHP2 を強く活性化することを見出した。

(3) 組み換えタンパク質を用いた上記の試験結果の病態生理学的意義を探索するため、培養細胞を用いて CagA による SHP2 活性化がもたらす生物学的影響を検討した。野生型の東アジア型 CagA ならびに欧米型 CagA に加え、それぞれ pY+5 位に点変異を導入した CagA 発現ベクターを AGS 細胞に導入し、細胞の向発がん性の指標となる細胞伸長、細胞浸潤、細胞運動能を検討した。その結果、CagA-SHP2 相互作用の結合親和性に相関して CagA 発現細胞は、細胞伸長、細胞浸潤能、細胞運動能がいずれも著しく亢進することが明らかになった。これらのタンパク質立体構造と生化学的、生物学的解析から CagA の発がん生物活性は CagA-SHP2 相互作用の強さに依存し、その相互作用の背景には CagA の pY+5 位の残基構造が極めて重要な影響を及ぼしていることが明らかになった。これらの成果をまとめ、米科学誌 Cell Reports に論文を報告した。

(4) 解明した構造と機能との関連情報に基づき、CagA-SHP2 相互作用を特異的に遮断する低分子化合物の探索を行った。はじめに、Amplified luminescence proximity homogeneous assay (Alpha) スクリーンを用いて CagA-SHP2 結合を阻害する化合物探索を実施したが、高感度である一方、偽陽性が極めて多く再現よく阻害活性を示す化合物は得られなかった。このため、代替案として予定していた SHP2 の酵素活性を比色定量する実験系によるハイスループットスクリーニングを実施した。東京大学創薬機構コアライブラリー (9,600 化合物)、既存薬・既知薬理活性試薬ライブラリー (3,520 化合物) ならびに市

販ライブラリー (1,708 化合物) を用い、チロシンリン酸化 CagA ペプチドによる組換え全長 SHP2 の酵素活性亢進を阻害する化合物を探索し 1 次ヒット化合物を取得した。再現性の確認と併行してこれらの化合物が SHP2 の触媒ドメインのみに対して及ぼす阻害活性を検討するカウンターアッセイを実施した。これらの結果、触媒ドメインに対する直接的作用が小さく、且つ CagA 存在下で亢進した SHP2 の酵素活性を特異的に低下させる 38 種の化合物を得ることに成功した。続いて、候補の中で比較的高い阻害率を示した化合物について培養細胞レベルで CagA の生物活性に及ぼす影響を検証した。しかしながら、培養細胞レベルにおけるこれらの化合物の阻害活性は顕著ではなかったことから、構造最適化による阻害活性改良を図るために今後 SHP2 と化合物の複合体結晶構造解析を進める。また、より大規模な或いは物理化学特性・構造特性の異なる複数の化合物ライブラリーを用いたスクリーニングの実施を通して候補化合物の数的拡大が必要である。

本研究はピロリ菌 CagA と SHP2 との相互作用の構造的メカニズムを明らかにし、その分子標的阻害薬の探索の基盤を築いたことで、今後の胃がん撲滅へ向けた基礎情報になることが期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Hayashi, T., Senda, M., Suzuki, N., Nishikawa, H., Ben, C., Tang, C., Nagase, L., Inoue, K., Senda, T., Hatakeyama, M., Differential mechanisms for SHP2 binding and activation are exploited by geographically distinct *Helicobacter pylori* CagA oncoproteins. *Cell Reports* 20(2): 2879-2890 (2017), 査読有
- ② Nishikawa, H., Hayashi, T., Arisaka, F., Senda, T., Hatakeyama, M., Impact of structural polymorphism for the *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein on binding to polarity-regulating kinase PAR1b. *Scientific Reports* 6, Article No. 30031 (2016), 査読有
- ③ Kameoka, S., Kameyama, T., Hayashi, T., Seto, S., Ohnishi, N., Hayashi, T., Murata-Kamiya, N., Higashi, H., Hatakeyama, M., Takaoa A., *Helicobacter pylori* induces IL-1b protein through the inflammasome activation in differentiated macrophagic cells. *Biomedical Research* 37(1): 21-27 (2016), 査読有

[学会発表] (計 9 件)

- ① 林剛瑠、ピロリ菌 CagA による細胞内シグナル攪乱の構造生物学的解析、マックスプランク・東京大学統合炎症学センタージュニアフェローセミナー、2017
- ② Senda, M., Hayashi, T., Suzuki, N., Nagase, L., Hatakeyama, M., Senda, T., Molecular mechanism of SHP2 activation by CagA from *Helicobacter pylori*. *Structural Biology* 2017, 2017
- ③ Hayashi, T., Senda, M., Suzuki, N., Inoue, K., Nagase, L., Nishikawa, H., Senda, T., Hatakeyama, M., Structural insights into the mechanism underlying activation of SHP2 by the *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein. *Europhosphatase* 2017, 2017
- ④ 長瀬里沙, 千田美紀, 鈴木喜大, 林剛瑠, 畠山昌則, 千田俊哉, ピロリ菌発がんタンパク質 CagA-宿主細胞内標的分子複合体の構造解析に向けた試験管内再構成系の確立, 第 17 回日本蛋白質科学会年会, 2017
- ⑤ Senda, M., Hayashi, T., Hatakeyama, M., Senda, T., Anaerobic crystallization for protein crystallography, *American Crystallographic Association (ACA)* 2017, 2017
- ⑥ 鈴木喜大, 林剛瑠, 千田美紀, 長瀬里沙, 畠山昌則, 千田俊哉, ピロリ菌 CagA EPIYA セグメントと複合体を形成した SHP2 の SAXS 解析、2016 年度量子ビームサイエンスフェスタ、2017
- ⑦ 林剛瑠, 千田美紀, 千田俊哉, 畠山昌則, *Helicobacter pylori* がんタンパク質 CagA によるチロシンホスファターゼ SHP2 活性化機構の構造学的考察, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016
- ⑧ 鈴木喜大, 林剛瑠, 千田美紀, 長瀬里沙, 畠山昌則, 千田俊哉, ピロリ菌 CagA EPIYA 領域と複合体を形成した SHP2 の溶液構造解析, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016
- ⑨ 長瀬里沙, 林剛瑠, 千田俊哉, 畠山昌則, EPIYA-C セグメントの重複が規定するピロリ菌 CagA タンパク質の胃発がんリスク, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

① UTokyo Research 記事

<https://www.u-tokyo.ac.jp/ja/utokyo-research/research-news/variation-in-single-amino-acid-impacts-incidence-of-gastric-cancer-among-japanese.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 剛瑠 (HAYASHI, Takeru)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10722209

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし