

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：72801

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07019

研究課題名（和文）ピロリ菌感染による胃発がん分子機構を標的とした創薬研究

研究課題名（英文）Research on drug discovery targeting the molecular mechanism of gastric carcinogenesis caused by *H. pylori* infection

研究代表者

林 剛瑠（Hayashi, Takeru）

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・主任研究員

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）：本研究では、ピロリ菌病原因子CagAの標的分子として知られる発がん性チロシンホスファターゼSHP2を分子標的とした新規の阻害剤開発を目指した研究を推進した。阻害剤開発の種となる低分子化合物を網羅的にふるいにかけるスクリーニング実験を実施し、有機合成による分子改変を進めてSHP2阻害剤として新規の分子骨格を有する化合物Xを取得することに成功した。さらに、化合物XとSHP2との立体構造解析を通して、化合物Xが新規の作用機序でSHP2を阻害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

本研究では、がんの発症機構に関わる発がん性チロシンホスファターゼSHP2を分子標的とした阻害剤探索を実施し、SHP2阻害剤として新規の分子骨格を有し、また新規の作用機序で阻害効果を発揮する化合物を取得することに成功した。SHP2はがん細胞の増殖シグナルを促進する重要な分子であることから、その阻害剤となりうる化合物の取得は新規抗がん剤開発へ向けた重要な成果と考えられる。

研究成果の概要（英文）：We promoted research aimed at developing novel inhibitors of SHP2, an oncogenic tyrosine phosphatase known as an intracellular target molecule of CagA, a pathogenic factor of *H. pylori*. We conducted screening experiments to comprehensively sift out low-molecular-weight compounds that would serve as seeds for the development of inhibitors, and succeeded in obtaining Compound X, which has a novel molecular skeleton as an SHP2 inhibitor, upon molecular modification by organic chemistry. Furthermore, through structural analysis of Compound X and SHP2, it was clarified that Compound X inhibits SHP2 through a novel mechanism of action.

研究分野：分子生物学

キーワード：化合物スクリーニング 抗がん剤 SHP2

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、研究者個人に帰属します。

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低減することが可能となってきたが、一方で耐性菌や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・治療には現在行われている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 (Hatakeyama, Nat Rev Cancer, 2004)。ピロリ菌の菌体内で産生された CagA は細胞壁に存在する IV 型分泌機構を介して宿主細胞内へ注入される。細胞内へ侵入した CagA は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 (Murata-Kamiya, Hayashi et al. Cell Host Microbe, 2010; Hayashi et al. Cell Host Microbe, 2012)。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 はチロシンホスファターゼである SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 2 (SHP2) と結合し、その酵素活性を亢進させる (Higashi et al. Science, 2002)。SHP2 は Ras-MAP キナーゼ経路および Wnt/ -catenin 経路 (Tsutsumi, Hayashi et al. Dev Cell, 2013) 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知られ、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 (Mohi and Neel, Curr Opin Genet Dev, 2007)。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調節機構を有し、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胃がんを含む悪性腫瘍を発症する一方、EPIYA モチーフ中の Tyr 残基を Phe 残基に置換し SHP2 との結合能を喪失させた変異型 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 (Ohnishi et al. PNAS, 2008)。加えて、患者から単離されたピロリ菌が産生する CagA の解析から、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 (Higashi et al. PNAS, 2002; Nagase, Hayashi et al. Sci Rep, 2015)。特に、我々は X 線結晶構造解析により CagA と SHP2 との相互作用表面の立体構造を解明している (Hayashi et al. Cell Reports, 2017)。CagA の中でも生物活性の強いサブタイプである東アジア型 CagA と東アジア以外に広く蔓延する欧米型 CagA との比較から、東アジア型 CagA の強い SHP2 活性化能を明らかにしている。加えて、CagA のリン酸化依存的な結合標的分子の中で、その結合能が EPIYA モチーフ周辺の分子多型に依存することが知られるタンパク質は SHP2 だけである。これらの一連の研究から、CagA による SHP2 の異常活性化が細胞のがん化に寄与することが示される。

2. 研究の目的

上記の背景のもと、本研究ではピロリ菌 CagA による SHP2 の異常活性化を阻害する低分子化合物ベースの分子標的薬の開発を目指した。

3. 研究の方法

研究代表者は化合物ライブラリーを用いた一次化合物探索を実施済みであり、生成タンパク質を用いた酵素反応測定系において CagA による SHP2 の活性化を阻害する未公表のヒット化合物群を既に得ていた。本研究課題の目的を達成するため、候補化合物の分子骨格を基本とした類縁化合物・周辺化合物を取得ならびに構造生物学的解析と生化学から生体レベルに至る一連の解析を実施した。

はじめに、現有のヒット化合物ならびに新たに取得した周辺化合物について、本研究で標的とする CagA-SHP2 複合体形成への阻害効果ならびに SHP2 のホスファターゼ活性に対する阻害効果を検討した。次に、現有のヒット化合物ならびに新たに取得した周辺化合物について精製 SHP2 との共結晶化を試み、X 線結晶構造解析に複合体結晶構造解析を行った。続いて、培養細胞における SHP2 阻害効果を検討するため、MAPK の賦活化レベルならびに増殖阻害効果を検討した。生体レベルにおける薬効を評価するため、SHP2 の活性に依存した細胞増殖を示すヒトがん細胞株を用いたヌードマウス皮下への Xenograft モデルを採用し、化合物投与群と非投与群における腫瘍の増殖阻害効果を検討した。

4. 研究成果

化合物 1 次スクリーニングより得られたヒット化合物の類縁体を取得し、酵素学的試験系において、既存のアロステリック SHP2 阻害剤として知られる SHP099 (Chen et al., Nature, 2016) よりも高い阻害活性を示す未公表の分子構造を有した低分子化合物 X を取得することに成功した。一方、化合物 X は CagA-SHP2 相互作用を阻害しなかったことから、タンパク質-タンパク質

間相互作用 (PPI) を阻害剤ではなく、リガンドの種類に依存しない SHP2 の活性化を抑制すると考えられた。したがって以降は、CagA 非依存的なアプローチから SHP2 阻害作用を解析し、SHP2 の異常活性化が関わるがんを全般的な対象とする創薬を目指した。培養細胞レベルにおいて、SHP2 が促進する Ras 経路の下流分子である Erk1/2 の賦活化レベルの変動を抗リン酸化 Erk1/2 抗体を用いて検出し、化合物処理による影響を検討した結果、化合物 X は複数のがん細胞株において濃度依存的に Erk1/2 分子のリン酸化レベルを低下させ、また細胞増殖を抑制した。この細胞増殖の抑制が、非特異的な細胞毒性による現象化否かを検討するため、LDH 漏出試験に細胞傷害性を試験したところ、少なくとも本試験系において化合物 X による急性の細胞毒性は確認されなかった。一方、酵素学的試験系で見られた阻害活性に比較し、培養細胞レベルで見られた阻害活性が相対的に低かったことから、化合物 X の安定性・膜透過性を検討した。結果、X は水溶液中で不安定であり加水分解を引き起こすことが明らかになった。この反応産物は SHP2 阻害活性を喪失していたことから、培養細胞を用いた実験では処理中に実効濃度が低下したことに起因して期待より低い阻害活性を示したと推察された。この不安定性の克服は今後の課題となる。一方、SHP2 との共存下において X の水溶液中での崩壊反応が抑制されたことから化合物 X は水から保護されるように SHP2 表面のポケットにはまり込むことが推察された。続いて、実際の結合部位ならびに作用機序を明らかにすることを目的とし、SHP2 と化合物 X との共結晶化による複合体の X 線結晶構造解析を実施した。構造決定に成功し、化合物 X が SHP2 の活性化機構を抑制するアロステリック阻害を示すメカニズムを明らかにした。また、興味深いことに結晶構造において化合物 X と SHP2 の間には共有結合が形成されていた。このことは MALDI-TOF-MS 解析において、SHP2 と X 混合物では X 分子量相当分の検出ピークシフトが見られたことから強く裏付けられた。SHP2 の共有結合阻害剤としてはこれまで 1 報のみ報告があるが、阻害活性は極めて弱く、また触媒ドメインを直接阻害する化合物であるため、アロステリック且つ sub- μ M オーダーの IC50 で SHP2 活性を阻害する共有結合阻害剤は初めての発見となる。続いて、結晶構造に基づき、化合物 X との結合に重要な SHP2 の 2 残基を Ala 置換した SHP2 変異体はホスファターゼ活性を維持したまま X による活性阻害を受けない薬剤耐性 SHP2 として機能することを確認した。野生型 SHP2 を発現するがん細胞では化合物 X 処理により ERK1/2 のリン酸化レベルが低下したが、薬剤耐性 SHP2 発現細胞では化合物 X 処理により ERK1/2 のリン酸化レベルが変化しなかった。このことから化合物 X は主作用である SHP2 の阻害に依存して ERK1/2 の賦活化を抑制することを実証した。

本研究の開始当初は CagA によって活性化された SHP2 のみを標的とする阻害剤開発を目指したが、CagA 依存的な SHP2 活性化機構の阻害剤の取得には至らなかった。一方、新規阻害剤のリードとなる化合物開発に成功し、SHP2 と共有結合を介してアロステリック阻害を引き起こすという点で独創性の高い成果を得た。これらのことから本研究成果を基盤とした新規創薬展開が見込まれ研究を継続していく。

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 1件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Hiroko Nishikawa, Priscillia Christiany, Takeru Hayashi, Hisashi Iizasa, Hironori Yoshiyama, Masanori Hatakeyama | 4. 巻 23 |
| 2. 論文標題 Kinase Activity of PAR1b, Which Mediates Nuclear Translocation of the BRCA1 Tumor Suppressor, Is Potentiated by Nucleic Acid-Mediated PAR1b Multimerization | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences | 6. 最初と最後の頁 6634 ~ 6634 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23126634 | 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 Takeru Hayashi, Masanori Hatakeyama | 4. 巻 2691 |
| 2. 論文標題 Exploring Allosteric Inhibitors of Protein Tyrosine Phosphatases Through High-Throughput Screening | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology | 6. 最初と最後の頁 235 ~ 245 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-3331-1_18 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 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 Takeru Hayashi, Miki Senda, Toshiya Senda, Daisuke Takaya, Teruki Homma, Wataru Ikeda, Keiji Tanino, Masanori Hatakeyama |
| 2. 発表標題 Screening and validation of a novel small chemical compound that inhibits pro-oncogenic signaling triggered by the Helicobacter pylori CagA oncoprotein |
| 3. 学会等名 12th AACR-JCA Joint Conference, Breakthroughs in Cancer Research - Translating Knowledge into Practice (国際学会) |
| 4. 発表年 2022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 |
|---------|---------|
|---------|---------|