

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名 : (日本語) 次世代がん医療創生研究事業
(英語) Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution
- 研究開発課題名 : (日本語) ピロリ菌感染微小環境が誘導する発がんシグナルとその遮断による胃がんの制圧
(英語) Carcinogenic signal induction by *Helicobacter pylori* infection-assisted microenvironment and its alteration to control the gastric cancer development
- 研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人東京大学 教授 畠山 昌則
所属 役職 氏名 : (英語) The University of Tokyo, Professor, Masanori Hatakeyama
- 実施期間 : 平成 28 年 5 月 25 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) CagA-SHP2 結合を阻害する低分子化合物の探索と生物学的機能解析
開発課題名 : (英語) Development and biological functional analysis of the small compounds inhibiting CagA-SHP2 interaction
- 研究開発代表者 (日本語) 国立大学法人東京大学 教授 畠山昌則
所属 役職 氏名 : (英語) The University of Tokyo, Professor, Masanori Hatakeyama
- 分担研究 (日本語) CagA-SHP2 結合阻害の構造情報を基にした低分子化合物の最適化
開発課題名 : (英語) Structure-based optimization of small compound inhibitors for CagA-SHP2 interaction
- 研究開発分担者 (日本語) 大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構 教授 千田俊哉
所属 役職 氏名 : (英語) High Energy Accelerator Research Organization, Professor, Toshiya Senda

II. 成果の概要（総括研究報告）

和文

ピロリ菌病原因子 CagA タンパク質がヒトがんタンパク質 SHP2 を脱制御する構造生物学的メカニズムを明らかにするため、千田俊哉教授（高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所）らのグループとともに CagA-SHP2 相互作用部位の構造-機能連関解析を行った。胃がんが多発する東アジア諸国に蔓延する東アジア型 CagA とその他の地域で単離される欧米型 CagA の間で SHP2 に対する結合様式の違いを検討し、CagA-SHP2 複合体の X 線結晶構造の比較から SHP2 結合部位における東アジア型 CagA に特異的な構造を見出した。この構造形成に関与するアミノ酸残基に変異を導入することで、東アジア型 CagA の試験管内における SHP2 結合活性および SHP2 活性亢進能が著しく低下することを明らかにした。さらに培養細胞を用い CagA による SHP2 の異常活性亢進を介して惹起される細胞形態変化を比較したところ、構造的知見に基づいた CagA 変異体では顕著に生物活性が低下した。したがってこれらの構造-機能解析から東アジア型 CagA に特徴的な SHP2 相互作用様式を阻害することは東アジア型 CagA の生物活性の抑制につながるものが強く示唆された。そこで東アジア型 CagA と SHP2 との複合体形成を特異的に阻害する低分子化合物を探索するため、タンパク質-タンパク質間相互作用 (PPI) をハイスループットに検出可能な Amplified luminescence proximity homogenous assay (Alpha) 法を用いた CagA-SHP2 結合実験系の構築を行った。Alpha スクリーンに用いるドナータンパク質として大腸菌発現系ならびに無細胞合成系の異なる 2 つの方法を用いて部位選択的に化学修飾した SHP2 の N-SH2 ドメインを調製した。アクセプター分子として N 末端にエピトープタグを付加したチロシンリン酸化 CagA ペプチドを合成した。はじめに、大腸菌発現系にて調製した N-SH2 ドメイン (N-SH2^{E.coli}) を用いて Alpha 法により CagA-SHP2 複合体の再構成を行った。その結果、CagA ならびに SHP2 の濃度依存的な Alpha シグナルを検出し、エピトープタグを有しないチロシンリン酸化 CagA ペプチドにより競合的にシグナルが阻害されたことから、Alpha 法により CagA-SHP2 複合体を特異的に検出可能であることが示された。本ハイスループットスクリーニング系を用いて行った化合物ライブラリーによる一次化合物探索では約 300 の一次ヒット化合物が得られたが、その後の二次検討からいずれの化合物も偽陽性であることが判明し、N-SH2^{E.coli} を用いた Alpha スクリーンは再現性を欠くことが明らかになった。そこで次に無細胞合成系を用いて調製した N-SH2 ドメイン (N-SH2^{cell-free}) を用いて再度 Alpha 法による PPI 検出系を構築した。新たに構築した Alpha スクリーニング系では Z' 因子が 0.8 を越える良好な安定性を示した。またエピトープタグを有しないチロシンリン酸化 CagA ペプチドによる競合阻害実験では良好な阻害感度を示した。一方、SHP2 のホスファターゼ活性試験をハイスループット化し、CagA による SHP2 の活性亢進を阻害する化合物のスクリーニング系を新たに樹立した。平成 29 年度早期にこれらの PPI ならびに酵素活性を基盤としたスクリーニング系を併用し再度化合物一次探索を実行する。

英文

To obtain the structural biological insights into the complex formation of *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein with pro-oncogenic protein tyrosine phosphatase SHP2, we performed the structure-function relation analysis in collaboration with Prof. Toshiya Senda at the High Energy Accelerator Research Institute. Comparing the SHP2-binding mode of East Asian CagA with that of Western CagA based on the crystal structures, we found a unique structure that is specific to

East Asian CagA at the CagA-SHP2 binding interface. Single amino-acid substitution at the East Asian CagA-specific residue demonstrated the biochemical relevance of the unique structure in East Asian CagA-SHP2 complex formation. The CagA mutant also showed a decreased CagA activity to induce cell morphological change, which is known as an indicator of aberrant activation of SHP2 by CagA in cultured cells. These data collectively support the idea that inhibition of the unique structure formation at the East Asian CagA-SHP2 binding interface leads to suppression of the CagA oncogenic activity. Given this, to explore and develop the small compounds that specifically inhibit the complex formation of *Helicobacter pylori* virulence factor CagA with pro-oncogenic protein tyrosine phosphatase SHP2, we employed the Amplified luminescence proximity homogenous assay (Alpha), a protein-protein interaction (PPI) detection technique that can be applied to a high-throughput screening, to establish the *in vitro* CagA-SHP2 binding assay system. For an Alpha donor, chemically-modified N-SH2 domain of SHP2 was prepared using *E. coli* expression system or cell-free protein synthesis. N-terminally epitope-tagged tyrosine-phosphorylated CagA peptide was synthesized and used as an Alpha acceptor. First, the N-SH2 domain prepared by using the bacterial expression (N-SH2^{*E.coli*}) was subjected to reconstitution of CagA-SHP2 interaction in an Alpha experiment. The result showed that the Alpha signals were detected in a dose-dependent manner and competitively inhibited in presence of untagged tyrosine-phosphorylated CagA peptide, indicating the specific CagA-SHP2 interaction was observed in the Alpha system. A chemical library was subjected to this high-throughput primary screening system and we obtained approximately 300 candidates of hit compounds. However, secondary screening indicated that the hit compounds were all false positives and Alpha screening using N-SH2^{*E.coli*} lacks reproducibility. Next we improve the Alpha screen system using N-SH2 domain prepared by cell-free protein synthesis (N-SH2^{cell-free}). The modified Alpha system showed high *Z'* factor (>0.8) and a favorable sensitivity in competitive inhibition by untagged tyrosine phosphorylated CagA peptide. In addition, we constructed a high-throughput system detecting enzymatic activation of SHP2 by CagA. The improved Alpha and newly established enzymatic systems will be subjected to primary compound screening in 2017.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 9 件)

1. Shoichiro Kameoka, Takeshi Kameyama, Takaya Hayashi, Seiichi Sato, Naomi Ohnishi, Takeru Hayashi, Naoko Murata-Kamiya, Hideaki Higashi, Masanori Hatakeyama and Akinori Takaoka. *Helicobacter pylori* induces IL-1 β protein through the inflammasome activation in differentiated macrophagic cells. Biomedical Research. 2016, vol. 37, No. 1, pp.21-27.
2. Ben J. Lang, Rebecca J. Gorrell, Mona Tafreshi, Masanori Hatakeyama, Terry Kwok and John T. Price. The *Helicobacter pylori* cytotoxin CagA is essential for suppressing host heat shock protein expression. Cell Stress and Chaperones. 2016, vol. 21, No. 3, pp.523-533.

3. Rony K. Roy, Michal M. Hoppe, Supriya Srivastava, Animesh Samanta, Neel Sharma, Kar Tong Tan, Henry Yang, Dominic C. Voon, Brendan Pang, Ming Teh, Naoko Murata-Kamiya, Masanori Hatakeyama, Young-Tae Chang, Wei Peng Yong, Yoshiaki Ito, Khek Yu Ho, Patrick Tan, Richie Soong, Phillip H. Koeffler, Khay Guan Yeoh and Anand D. Jeyasekharan. CEACAM6 is upregulated by *Helicobacter pylori* CagA and is a biomarker for early gastric cancer. *Oncotarget*. 2016, vol. 7, No. 34, pp.55290-55301.
4. Yoshie Senda, Naoko Murata-Kamiya and Masanori Hatakeyama. C-terminal Src kinase-mediated EPIYA phosphorylation of Pragmin creates a feed-forward C-terminal Src kinase activation loop that promotes cell motility. *Cancer Science*. 2016, vol. 107, No. 7, pp.972-980.
5. Dorothee Liebschner, Yusuke Yamada, Naohiro Matsugaki, Miki Senda and Toshiya Senda. On the influence of crystal size and wavelength on native SAD phasing. *Acta Crystallogr.*, 2016, D72, pp.728-741.
6. Hiroko Nishikawa, Takeru Hayashi, Fumio Arisaka, Toshiya Senda and Masanori Hatakeyama. Impact of structural polymorphism for the *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein on binding to polarity-regulating kinase PAR1b. *Scientific Reports*. 2016, vol. 6, Article No. 30031
7. Masayuki Nakano, Kinnosuke Yahiro, Eiki Yamazaki, Hisao Kurazono, Junko Akada, Yoshio Yamaoka, Takuro Niidome, Masanori Hatakeyama, Hidekazu Suzuki, Taro Yamamoto, Joel Moss, Hajime Isomoto and Toshiya Hirayama. *Helicobacter pylori* VacA, acting through receptor tyrosine phosphatase a□ is crucial for CagA phosphorylation in human duodenum carcinoma cell line AZ-521. *Disease Models & Mechanisms*. 2016, vol. 9, pp.1473-1481.
8. Ippei Kikuchi, Atsushi Takahashi-Kanemitsu, Natsuki Sakiyama, Chao Tang, Pei-Jung Tang, Saori Noda, Kazuki Nakao, Hidetoshi Kasai, Toshiro Sato, Atsu Aiba and Masanori Hatakeyama. Dephosphorylated parafibromin is a transcriptional coactivator of the Wnt/Hedgehog/Notch pathways. *Nature communications*. 2016, vol. 7, Article No. 12887.
9. Takeharu Shiroki, Misa Yokoyama, Nobuhiro Tanuma, Ryuhei Maejima, Keiichi Tamai, Kazunori Yamaguchi, Tomoyuki Oikawa, Tetsuya Noguchi, Koh Miura, Tsuneaki Fujiya, Hiroshi Shima, Ikuro Sato, Naoko Murata-Kamiya, Masanori Hatakeyama, Katsunori Iijima, Tooru Shimosegawa and Kennichi Satoh. The enhanced expression of PKM2 is involved in the gastric cancer development via regulating cancer specific metabolism. *Cancer Science*. 2017, in press.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. ピロリ菌がんタンパク質 CagA～「胃がん」から「全身病へ」～, 口頭発表, 島山昌則, 島根大学医学部セミナー, 2016/7/5, 国内.
2. [特別講演] ピロリ菌がんタンパク質 CagA による胃発がん機構, 口頭発表, 島山昌則, 第27回三河感染・免疫研究会, 2016/7/16, 国内.

3. Oncogenic collaboration between *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr virus in gastric carcinogenesis, Oral presentation, Masanori Hatakeyama, Singapore Gastric Cancer Consortium 9th Annual Scientific Meeting, 2016/7/21, 国外.
4. Structure and function of the C-terminal ID region of onco-protein CagA, Oral presentation, Toshiya Senda, Structural Biology 2016, 2016/8/23, 国外.
5. SHP1 links *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr virus in gastric carcinogenesis, Oral presentation, Masanori Hatakeyama, The 15th Awaji International Forum of Infection and Immunity, 2016/9/8, 国内.
6. Collaboration between *Helicobacter pylori* CagA and EBV in gastric carcinogenesis, Oral presentation, Masanori Hatakeyama, XXIXth International Workshop on the European Helicobacter & Microbiota in Inflammation and Cancer, 2016/9/16, 国外.
7. [シンポジウム] SHP1 ホスファターゼを介したピロリ菌 CagA の発がん抑制活性と EB ウイルスによるその解除, 口頭発表, 嶋山昌則, 第 89 回日本生化学会大会, 2016/9/25, 国内.
8. [Symposium] Inactivation of the *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein – A potential strategy for prevention of gastric cancer -, Oral presentation, Masanori Hatakeyama, The 75th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2016/10/7, 国内.
9. *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, ポスター発表, 林剛瑠, 千田美紀, 千田俊哉, 嶋山昌則, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/7, 国内.
10. 細菌感染と発がん, 口頭発表, 嶋山昌則, 2016 年度東京大学医科学研究所セミナーシリーズ, 2016/10/17, 国内.
11. ピロリ菌による胃発がん機構とその予防的介入, 口頭発表, 嶋山昌則, 翻訳後修飾プロテオミクス医療研究拠点の形成」第 7 回公開シンポジウム, 2016/10/26, 国内.
12. 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, ポスター発表, 鈴木喜大, 林剛瑠, 千田美紀, 長瀬里沙, 嶋山昌則, 千田俊哉, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/11/30, 国内.
13. 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, ポスター発表, 長瀬里沙, 林剛瑠, 千田俊哉, 嶋山昌則, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/12/2, 国内.
14. Parafibromin, a substrate of SHP2, is a transcriptional platform that integrates morphogen signaling pathways , Oral presentation, Masanori Hatakeyama, 12th International Conference on Protein Phosphatase, 2016/10/27, 国内.
15. [特別講演] ピロリ菌感染を基盤とする胃癌発症機構, 口頭発表, 嶋山昌則, 日本消化器病学会関東支部回第 342 回例会, 2016/12/3, 国内.
16. Wnt, Hedgehog, Notch シグナルを細胞内で統合制御する機構, 口頭発表, 嶋山昌則, 北海道大学遺伝子病制御研究所セミナー, 2017/1/20, 国内.
17. Collaboration between *Helicobacter pylori* CagA and Epstein-Barr virus in gastric carcinogenesis, Oral presentation, Masanori Hatakeyama, 19th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim, 2017/2/8, 国外.
18. [Lecture Series1] Role of the *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein in gastric carcinogenesis, 口頭発表, 嶋山昌則, 第 89 回日本胃癌学会総会, 2017/3/9, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし

(4) 特許出願
該当なし