

平成18年度

若手研究者奨励研究報告書

目 次

政策創薬総合研究

課題番号

| | | |
|---------|---|--------------|
| KH13302 | 再生医療を目的としたアデノウイルスベクターによるES細胞への効率的な遺伝子導入・発現系の開発 | 川端健二 …… 1 |
| KH23303 | 腎不全の進展・増悪因子の解明と腎機能保護法の開発に関する研究 | 増田智先 …… 12 |
| KH23304 | Toll様受容体 (TLR3) を介したミクログリア活性化機序の解明と脳炎治療薬開発のためのハイスループット試験系への応用 | 中道一生 …… 26 |
| KH23306 | 吸血昆虫唾液腺生理活性物質の特性解明と創薬への応用に関する研究 | 伊澤晴彦 …… 37 |
| KH23307 | アポトーシス関連分子EATの機能制御によるES細胞の増殖・分化培養法の開発 | 大喜多 肇 …… 50 |
| KH23331 | 寄生性原虫の生育に必須な脂質成分の代謝と輸送ならびに創薬探索に関する基礎的研究 | 中野由美子 …… 60 |
| KH33308 | 向精神薬のSNPs解析による有効性・安全性に関する研究 | 橋本亮太 …… 66 |
| KH33309 | ヒトの薬物体内動態の予測向上を目指した薬物代謝酵素および薬物トランスポーターの誘導に関するインシリコ予測 | 小林カオル …… 79 |
| KH33310 | 薬剤排出トランスポーターの基質輸送メカニズムに関する研究 | 田辺公一 …… 92 |
| KH33332 | 制癌分子標的療法の創薬と開発にかかわるブリッジングスタディーの基礎的および応用的研究 | 川上浩司 …… 101 |
| KH53312 | LEE遺伝子群非保有型腸管出血性大腸菌の疫学マーカーおよび新規治療薬の標的となる病原性遺伝子に関する基礎的研究 | 伊豫田 淳 …… 105 |
| KH53313 | 遺伝子修飾による樹状細胞の機能強化に基づいた新規癌免疫療法の開発 | 岡田直貴 …… 116 |
| KH53314 | PET検査を用いた癌二次予防の診断アルゴリズムの開発、PET検診施設間のネットワーク構築および死亡率低下の検証研究 | 小島伸介 …… 126 |
| KH53315 | 網羅的遺伝子破壊による真菌症病原性発現の分子機構の解明と新規抗真菌剤開発への応用に関する研究 | 梅山 隆 …… 136 |
| KH53333 | 治療ターゲットとしてのFcγ受容体を介した Dengue 出血熱の病態形成機序の解析 | 林 昌宏 …… 150 |
| KHC3361 | C型肝炎ウイルス粒子産生制御による新規治療法の萌芽的研究 | 村上恭子 …… 156 |
| KHC3362 | 高齢化社会に適応する歯の延命化を目指した歯髄・象牙質再生による新しい抜髄治療法の開発 | 庵原耕一郎 …… 162 |
| KHC3363 | HDL形成責任タンパク質ABCA1の代謝制御をターゲットとした新規動脈硬化治療法に関する研究 | 奥平桂一郎 …… 167 |

エイズ医薬品等開発研究

| | | |
|---------|---|------------|
| KA13701 | ヘルペスウイルス感染症の新規制御法の確立と潜伏感染機構の 解明 | 藤室雅弘 ……173 |
| KAC3761 | 論理的創薬手法によるHIV-1プロテアーゼニ量体化を阻害す る低分子化合物の探索 | 中村寛則 ……186 |
| KAC3762 | HIV治療用合成siRNAの新規デリバリーシステムの開発 | 児玉耕太 ……191 |

寄生性原虫の生育に必須な脂質成分の代謝と輸送ならびに創薬探索に関する基礎的研究

所 属 国立感染症研究所・寄生動物部
研究者 中野 由美子

研究要旨 赤痢アメーバの生育には外界からコレステロールエステルを取込むことが必要である。細胞内では遊離コレステロールがリソソームに蓄積しているなど、赤痢アメーバのコレステロールの細胞内動態は特異であることが分かった。また、非病原株と病原株のリソソームを比較し、赤痢アメーバの病原性発揮にコレステロールが重要であることを示した。

A. 研究目的

赤痢アメーバ症は、赤痢アメーバによって引き起こされる、下痢、大腸炎、肝膿瘍を主症状とする感染症である。国内では年間700例の患者が報告され、毎年患者数の上昇傾向が続いているだけでなく、近年では性感染症対策としての対応が迫られている。国内だけでなく世界では、熱帯地域を中心に世界人口の1%が赤痢アメーバ症により毎年死亡していると報告されている。これまで抗赤痢アメーバ症の薬剤としては、嫌気的呼吸鎖をターゲットとしたメトロニダゾールが広く用いられているが、催奇性などの副作用、薬剤耐性株の出現の報告、腸管内シストキャリアーに効きにくいなどの点から新たな薬剤開発が望まれている。

本研究では新規の抗薬剤開発のためのターゲットとして、赤痢アメーバの生育の必須成分のひとつであるコレステロールの取込み機構に着目する。ヒトでは、コレステロールは小胞体上に存在するメバロン酸経路によって *de novo* での合成が可能であるとともに、外界から LDL-リセプターを介するエンドサイトーシス経路によっても取込めるという2重の調節経路を有する。一方で、赤痢アメーバでは *de novo* で合成することはできず、専ら外界からの取込みに依存して生育していることを前年度の研究で報告した。さらに、主要な病原因子のひとつであるシステインプロテアーゼ (CP) はコレステロールによって活性化されることを発見した。本年度で

は、赤痢アメーバにおけるコレステロールの重要性をさらに詳細に解析し、細胞内でコレステロールの動態を可視化することを試みた。

B. 研究方法

a. 培地中ならびに細胞内コレステロール量の定量
現行の赤痢アメーバの世界標準での実験室株 (HM1:IMSS cl6) を BIS-33 培地 (BI 基礎培地、15%ウシ成牛血清、2%ビタミン混合液) に 98 ウエルタイタープレートに 5×10^3 cell/ウエルに播種し、1日ならびに2日後の細胞の増殖数を WST 試薬の吸収 (415/655) で測定した。また培養後の培地のコレステロール量は AmplexRed cholesterol assay kit (Molecular Probe 社) を用いて定量した。遊離コレステロールまたはコレステロールエステルの必要性を調べるために、コレステロールエステル添加培地として、15%ウシ成牛血清に代えてウシ胎児血清を用い、添加するコレステロール成分には cholesterol/lipoprotein 混合液 (Sigma 社) を 5% 添加した。遊離コレステロール添加培地は cholesterol/lipoprotein 混合液に変えて、water-soluble cholesterol 液 (Sigma 社) を 5% 添加したものを使用した。

b. 宿主細胞におけるコレステロールの役割

宿主細胞のコレステロールがアメーバの病原性

に及ぼす影響を調べるために、宿主のコレステロールをコレステロール結合試薬である Methyl- β -cyclodextrin (M β CD) 5 mM で 5 または 20 分処理することにより除去し、赤痢アメーバの CHO 細胞への障害性と食効率を検討した。CHO 細胞への障害性は以下のように測定した。まず、CHO 細胞を 24 ウエルタイタープレートの底面に 80% confluent になるよう培養し、40 μ M CellTracker blue (Molecular Probe 社) で 2 時間ラベルした。その後、細胞を PBS で洗浄し、培地を加えて 2 時間培養した。1.5 \times 10⁵ 個の赤痢アメーバを 300 μ l の Opti-MEM 培地 (Invitrogen-Gibco、137 mM L-システイン、19 mM アスコルビン酸、pH 6.8) に懸濁し、CHO 細胞を培養したウエルに添加した。37°C で 1 時間培養した後、細胞を PBS (100 mM グルコース、100 mM ガラクトース、4°C) で洗浄し、底面に残った CHO 細胞は 200 μ l 0.05% トリプシン処理で回収した。CHO 細胞中の蛍光は 353 nm の励起波長と 465 nm の吸収波長で測定した。また、反応後のアメーバ細胞を回収し、青色に光る CHO 細胞を貪食したアメーバ数を計測することにより、貪食活性を示した。

c. *in vivo* におけるコレステロールの局在

赤痢アメーバのリソソームは 0.5 μ M LysoTracker Red (Invitrogen) で一昼夜染色し、3.7% パラホルムアルデヒド/PBS で細胞を 10 分間固定した。その後、0.1 mg/ml filipin で 45 分間室温でインキュベートすることにより遊離コレステロールを染色した。LysoTracker Red と filipin の蛍光は、共焦点レーザー顕微鏡 LSM510 で観察した。

生細胞におけるコレステロールの動態は NBD-cholesterol (Invitrogen) を用いてパルスチェイスを行うことにより観察を行った。まず LysoTracker Red でリソソームを染色した細胞を、Opti-MEM 培地 (Invitrogen-Gibco、137 mM L-システイン、19 mM アスコルビン酸、pH 6.8) で洗浄し、1 μ g/ml NBD-cholesterol で 30 分、35°C でインキュベートした後、細胞を Opti-MEM 培地で洗浄し、チェイスを行った。その後、パラホルムアルデヒドで細胞を固定した後に LysoTracker Red と NBD-cholesterol の蛍光を共焦点レーザー

顕微鏡 LSM510 で観察した。

(倫理面への配慮)

バイオセーフティレベル 2 の赤痢アメーバを扱う実験、動物を用いた感染実験は申請者の研究組織における研究委員会で承認されている。

C. 研究結果

a. アメーバの生育における遊離コレステロールとコレステロールエステルの役割

昨年度の解析によって、赤痢アメーバの培地に使用する ABS を FCS に代えることにより、コレステロール依存的な培養条件を作製したことを報告した。本年度はそれをさらに発展させ、赤痢アメーバが遊離コレステロールとコレステロールエステルのどちらに要求性があるかを解析した。昨年度使用したのはコレステロール/リポプロテイン混合液 (図 1 に cholesterol mix と示す) であり、Amplex Red Cholesterol Assay Kit により遊離コレステロールとコレステロールエステルが 4:6 の割合で混合されていることを確認した。この cholesterol mix 存在下では ABS を使用した時と同様に細胞の生育を相補することができた (図 1)。次に、cholesterol mix を遊離コレステロールのみが含まれる free cholesterol に代えたところ、生育を相補することはできず、むしろ細胞増殖にとって有害であった。よって、赤痢アメーバはコレステロールエステルを生育に必要とすることが分かった。

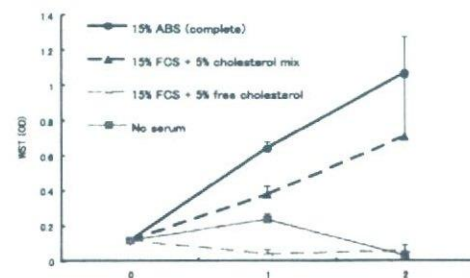


図 1、コレステロールエステル依存的な生育

上記の結果をさらに確認するために、アメーバを 2 日間培養した後の BIS-33 培地 (ABS 使用) を用いてコレステロール量を定量した。その結果、総コ

レステロール量は 87.3 ± 4.24 mg/ml から 81.3 ± 2.81 mg/ml に有為に減少し、その減少はコレステロールエステルの減少が原因であった (図2)。遊離コレステロール量に減少は見られなかった。よって、図1の実験とともに赤痢アメーバは遊離コレステロールを代謝できないことが分かった。

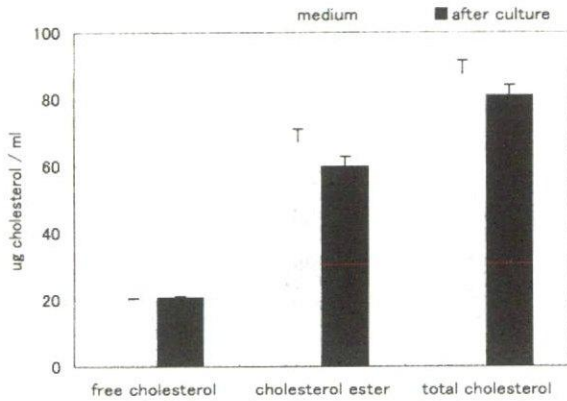


図2、培地中のコレステロール量

b. 宿主細胞のコレステロールに対する役割

他の寄生性原虫のリーシュマニアでは宿主への細胞侵入に宿主のコレステロールが必要であることが報告されている。そこで赤痢アメーバが宿主細胞を障害する際に、宿主のコレステロールが担う役割を検討した。CHO 細胞をあらかじめコレステロール結合試薬である MβCD で処理し、食効率を計測したところ、未処理のものは $44 \pm 3.5\%$ の赤痢アメーバが CHO 細胞を食食していたのに対し、MβCD を 5 分、20 分間処理した CHO 細胞では $26 \pm 7.1\%$ 、 $24 \pm 3.3\%$ と食効率が有為に低下していた。これまで、赤痢アメーバはコレステロール含量の高い赤血球を好んで食食するという報告があるが、本結果は *in vivo* での現象を再現したものと思われる。

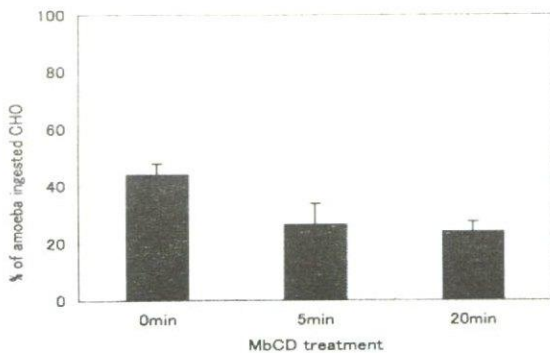


図3、MβCD 処理した CHO 細胞の食効率

次に、MβCD 処理した CHO 細胞への障害性を調べた。昨年度の解析では、赤痢アメーバの主要な病原因子の一つである CP はコレステロールによって活性化されたため、MβCD 処理により CHO の細胞障害性は回復するはずである。しかしながら、MβCD 未処理の CHO に対して赤痢アメーバが 29.4% の細胞に障害を与える条件で、MβCD を 5、20 分処理したものではさらに 35.2%、51% の CHO 細胞に障害を与えられた。このことは、赤痢アメーバの細胞障害には CP の分泌、食食以外にも宿主のコレステロール (膜マイクロドメイン) が関与する機構が存在することを示唆している。

c. 赤痢アメーバにおけるコレステロールの局在

ヒトや酵母では、コレステロールは主に細胞膜に蓄積していることが報告されている。赤痢アメーバにおいて細胞内のコレステロールを遊離コレステロール結合試薬である filipin で染色したところ、細胞膜に僅かな染色が見られるものの、多くの遊離コレステロールは細胞内の大きな空胞内に存在していた (図4)。酸性化コンパートメントを特異的に染色する LysoTracker Red を用いて二重染色を行ったところ、filipin の染色は LysoTracker と一致した。

同様な実験を水溶性の蛍光マーカーである FITC-dextran を 60 分間取り込ませ、エンドソームを染色した後に filipin との共局在を観察したが、エンドソームとの共局在は観察されなかった。よって、赤痢アメーバではコレステロールはリソソームに蓄積されていることが分かった。

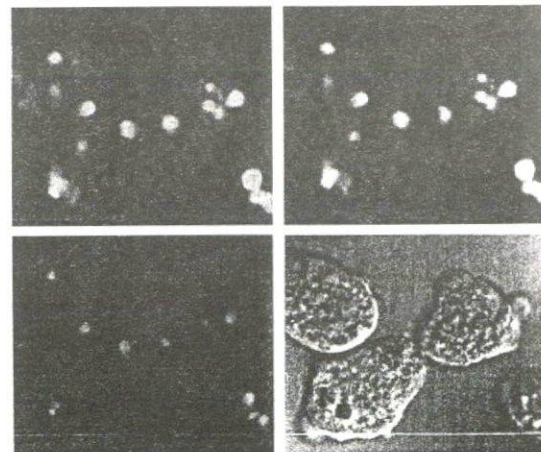


図4、filipin (緑) で染色した遊離コレステロールの LysoTracker (赤) で示すリソソームへの局在

d. 病原株におけるリソソームとコレステロール

肝臓癌から単離された病原性を高めた株や臨床単離株では、しばしば実験室株に比べてリソソーム酵素である CP の発現ならびに細胞外への分泌が上昇していることが報告されている。そこで、実験室株 HM1:IMSS cl6 (図 5、非病原株) をハムスターの肝臓に播種し、病原性を高めた HM1:IMSS cl6 (図 5、病原株) を用いて LysoTracker Red によるリソソームの細胞内染色を行った。その結果、病原株では細胞内にリソソームが数多く存在しているのが観察された。リソソームの染色数の多さは、FACS によって細胞分画を行った際に、病原株ではピークが実験室株に比べて右にシフトすることによっても確かめられた。

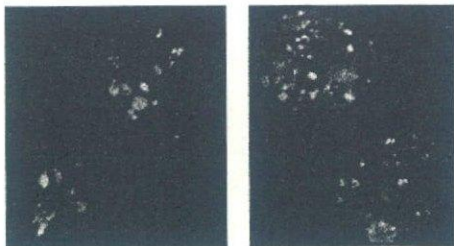


図 5、非病原株 (左) と病原株 (右) におけるリソソーム

さらにリソソームの数だけでなく、そこに蓄積するコレステロール量も増大していることを確認するために、実験室株と病原株の細胞内コレステロール量の定量を行った。その結果、実験室株では細胞内総コレステロール量が $6.03 \pm 0.61 \mu\text{g cholesterol/mg lysate}$ であったのに対し、病原株では $7.04 \pm 0.23 \mu\text{g cholesterol/mg lysate}$ と有為に増大していた。よって、病原株ではリソソームの数だけでなく、細胞内総コレステロール量も増大していることが明らかになった。

e. コレステロールの細胞内動態

ヒトではコレステロールは外界から LDL と結合した形で、LDL リセプターを介して細胞膜からエンドサイトーシスによって取り込まれることが明らかとなっている。赤痢アメーバには LDL リセプターに相当する遺伝子は存在しない。しかし細胞膜からのクラスリン被覆小胞の形成に参与するクラスリン軽鎖ならびにアダプタータンパク質 AP2 がゲノムに存在することはエンドサイトーシスが活

発に行われていることを示している。そこで外界からのコレステロールの取込みの動態を可視化するために、NBD-cholesterol を用いてパルスチェイス実験を行った。1 $\mu\text{g/ml}$ で 30 分間パルスを行った段階で (図 6、0h)、80% の LysoTracker 陽性のリソソームに NBD-cholesterol が共局在しているのが観察された。一方で矢頭に示すように、リソソームに局在しない NBD-cholesterol が細胞内に存在するのが観察された。その割合は、全 NBD 陽性構造体の 35% であった。しばしば NBD-cholesterol 陽性/LysoTracker 陰性の構造体はリソソームに近接しているのが観察された。次に、細胞を洗浄し、Opti-MEM 培地中で 1 または 2 時間 (図 5、2h) チェイスを行ったところ、NBD-cholesterol 陽性/LysoTracker 陰性の構造体は全 NBD 陽性構造体のうち 18%、0% と時間の経過とともに減少していく様子が観察された。また、30 分間パルス後の細胞質内 (0h) は 2 時間チェイス後 (2h) よりもバックグラウンドが高く、非常に小さな小胞に組み込まれた NBD-cholesterol が次第に凝集し、矢頭で示される直径 1 μm のエンドソーム様の構造体となり、最終的にリソソームに融合するというモデルが考えられた。

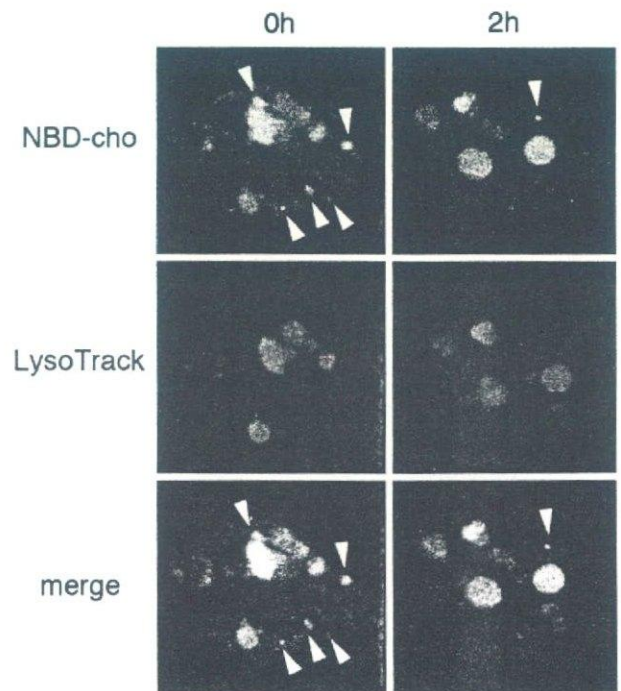


図 6、NBD-cholesterol の取り込み

D. 考察

本年度は昨年度の結果をさらに発展させ、赤痢アメーバが総コレステロールのうちコレステロールエステルを外部から取込むことに依存して生育し（図1、2）、その細胞内の局在と輸送機構が赤痢アメーバ特異的なものであることを示した。ヒトでもコレステロールエステルはエンドサイトーシスによって取込むことが解明されているが、赤痢アメーバにはLDL-リセプターに相同性を示す遺伝子はゲノム中に存在せず、アメーバ独自のレセプター/取込み機構を有していると考えられる。アメーバ独自の取込み機構の存在は、コレステロールの細胞内動態をNBD-cholesterolによって追跡することによっても示された（図6）。つまり、NBD-cholesterolの取込み開始30分間の間は、細胞全体に散在する小胞状の構造が凝集し直径1 μmの非酸性化の構造体に蓄積する。そして、その非酸性化構造体が2時間以内にリソソームに融合するのが観察された。

コレステロールがリソソームに蓄積するのも赤痢アメーバ独自の現象であり（図4）、また病原性発揮に深く関与しているものと考えられた。つまり、1) 病原因子の一つであるCPはリソソームに局在し、濃度依存的に活性化される（昨年度の報告）。2) 病原株では細胞当たりのリソソーム数とコレステロールが増大する（図5）。3) また、CPと並ぶ主要な病原因子である膜穿孔活性ペプチドのアメーバポアはコレステロール依存的な活性化を示すことが以前に報告されているからである（Leippe, 1991）。近年ではシストキャリアーや肝膿瘍の患者では正常人よりも血中コレステロール値が低いという報告もある（Bansal, 2005）。よって、本研究は新規抗アメーバ症薬剤開発のための基盤を提供するだけでなく、患者の病態予測にも応用可能であると考えている。

E. 結論

赤痢アメーバの生育には外界からコレステロールエステルを取込むことが必要であった。しかし、遊離コレステロールがリソソームに蓄積していたことなどにより、赤痢アメーバのコレステロールの細胞内動態は特異であることが分かった。よって、

赤痢アメーバの病原性の理解と新規抗アメーバ症薬剤開発のための基盤を提供するためにもコレステロールの細胞内輸送の解析が有用であることを示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Mitra, B.N., Kobayashi, S., Saito-Nakano, Y., Nozaki, T. (2006) *Entamoeba histolytica*: Differences in phagosome acidification and degradation between attenuated and virulent. *Exp. Parasitol.* 114:57-61.
2. Clark, C.G., Hofer, M., Alsmark, U.C.M., Saito-Nakano, Y., Ali, V., Marion, S., Weber, C., Mukherjee, C., Bruchhaus, I., Tannich, E., Leippe, M., Sicheritz-Ponten, T., Foster, P.G., Noel, C.J., Hirt, R.P., Embley, T.M., Samuelson, J., Gilchrist, C.A., Mann, B.J., Singh, U., Ackers, J.P., Bhattacharya, S., Bhattacharya, A., Lohia, A., Guillen, N., Duchene, M., Nozaki, T., Hall, N. (2007) Structure and content of the *Entamoeba histolytica* genome. Clark, C.G., (ed.) *Advanced parasitology*. Review, in press.
3. Saito-Nakano, Y., Mitra, B.N., Nakada-Tsukui, K., Sato, D., Nozaki, T. (2007) Two Rab7 isoforms, *EhRab7A* and *EhRab7B*, play distinct roles in biogenesis of lysosomes and phagosomes in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Cell. Microbiol.* In press.
4. Mitra, B.N., Saito-Nakano, Y., Nakada-Tsukui, K., Sato, D., Nozaki, T. (2007) Rab11B small GTPase regulates secretion of cysteine proteases in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Cell. Microbiol.* In press.

2. 学会発表

1. 1. 中野由美子 (2006) 赤痢アメーバの生育に必要なコレステロールの細胞内動態 (Distribution and transport of cholesterol-rich membrane domains in *Entamoeba histolytica*) 第75回日本寄生虫学会大会 2006年5月19-20日, 弘前.
 2. Saito-Nakano, Y., Okada, M., Gilchrist, C. A., Petri Jr, W. A., Nozaki, T. (2006) Membrane traffic pathways associated with virulence in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress Jun 18-23, 2006, Kyoto.
 3. 中野由美子、亀井喜世子、石上盛敏、駒木-安田加奈子、河津信一郎、狩野繁之、田辺和祐、大前比呂思、遠藤卓郎 (2006) 東南アジアにおける2000年以前のクロロキン耐性遺伝子の多型と分布 第66回寄生虫学会東日本支部大会 2006年11月21日, 東京.
 4. 中野由美子、Biswa Nath Mitra、津久井久美子、野崎智義 (2006) 赤痢アメーバにおけるメンブレントラフィックの多様性と特殊性 第5回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム 2005年10月28-29日, 東京.
 5. 中野由美子、津久井久美子、Biswa Nath Mitra、野崎智義 (2006) 赤痢アメーバの病原性に関与する細胞内輸送 文部科学省科学研究費補助金特定領域研究「メンブレントラフィック-分子機構から高次機能への展開-」第4回全体班会議 2006年11月22-25日, 小豆島.
 6. Saito-Nakano, Y., Kamei, K., Iwagami, M., Komaki-Yasuda, K., Kawazu, S., Kano, S., Tanabe, K., Ohmae, H., Endo, T. (2007) Genetic polymorphisms of drug resistant gene in Southeast Asia through imported isolates of *Plasmodium falciparum*. The 1st Thailand-Japan Joint Forum of Infectious Diseases. Jun 29-30, Bangkok, Invited speaker.
 7. 中野由美子 (2007) 赤痢アメーバの病原性におけるコレステロールの役割 (Role of cholesterol for parasitic infection in *Entamoeba histolytica*) 第76回日本寄生虫学会大会 2007年3月29-30日, 大阪.
- G. 知的所有権の出願・登録状況
- 1 特許取得
なし
 - 2 実用新案登録
なし
 - 3 その他
なし

平成18年度

政策創薬総合研究事業
若手研究者奨励研究報告書

平成19年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社