

市販のコラーゲンおよびゼラチンの、熱遷移 (4-60°C) に伴う CD スペクトル (224 nm) の変化の計測を行う。

・ゲル化および繊維化の条件検討

組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖の凍結乾燥物に 5% になるよう水を加えて室温で溶解し、その後水中に静置することでゲル化させ、市販ゼラチン (Sigma 社 bovine type A gelatin) においても同様に 5% になるよう水を加え、37°C で温めながら溶解させた後、冷却してゲルを調製し、これらのゲルを 1°C ずつ温度を上昇させながら観察を行い、ゲルの溶解が始まる融点を解析する。続いて溶解した 5% 溶液を融点の場合とは逆に 1°C ずつ温度を下降させながら観察を行い、ゲル化が始まる点、すなわち凝固点を求める。

コラーゲンは塩の存在下で 37°C でインキュベーションすることによって繊維化 (ゲル化) が起こる。組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖において繊維化の解析を行う。市販ウシ I 型コラーゲン ((株) 高研 AteloCell I-PC)、市販ゼラチン (Sigma 社 bovine type A gelatin)、および組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖の 0.5% 酸性溶液をそれぞれ 8 ml 準備し、10 x PBS 1 ml、および 50 mM NaOH, 260 mM NaHCO₃, 200 mM HEPES 溶液 1 ml と、水中において混合した後シャーレに展開し、37°C で 30 分間インキュベーションした。インキュベーション後、それぞれのシャーレにおけるゲル化の有無を観察する。

7) 組換えヒトヒト I 型コラーゲン a1 鎖の霊長類 ES 細胞特性保持に関する解析

上記工程により精製・凍結乾燥した組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖の 0.1% 溶液を作成する。通常の ES 細胞培養工程では、フィーダー細胞を播種する前段階としてブタ由来のゼラチンが使用されているが、その代替として 0.1% 組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖を用いてカニクイサル ES 細胞の培養を行う。培養継代を行い、ES 細胞の特性解析を行う。すなわち、形態学的観察、未分化特異的マーカー解析、多分化能解析、細胞核型解析を行う。形態学的評価は、種々の培養環境に対して、
a) 霊長類 ES 細胞の特徴; 3-4 層の平坦で辺縁が明瞭な細胞コロニーを形成する。
b) 未分化特異的マーカー; OCT3/4、SOX2、SSEA4、TRA1-60、TRA-1-81 の発現をモノクローナル抗体を用いた免疫組織学的により検定する。
c) 多分化能解析; 良好に培養維持された

ES 細胞を免疫不全マウスの皮下及び腎皮膜下へ移植し腫瘍形成後、三胚葉への分化を確認するために Tuj-1、MF-20、AFP の抗体を用いた免疫組織学的解析を行う

倫理面への配慮

ヒト乾燥羊膜作成にあたり、ヒト検体を使用するため、その採取とその後の検体管理にあたり以下の点に留意する。

インフォームドコンセント: 研究用の検体提供に際し、十分な説明を行い、本人からの文書による同意をうける。この同意は検体が被験者本人と連結できる限り、撤回することができ、非同意や同意撤回により、不利益をうけることのないようにする。

個人情報の保護: 患者の個人情報を最大限に保護するために、患者の個人識別情報を検体より取り除いて符号化・番号化を行う匿名化を、患者検体採集時に行い、患者個人識別情報と検体との対応表を、「個人識別情報管理者」が厳重に管理する。

富山大学医学部・承認番号 44、平成 17 年 6 月 24 日

国立成育医療センター・受付番号 55、平成 16 年 11 月 15 日

C. 研究結果

安定的に Hyper-Dry 乾燥羊膜を提供・保存できるシステムが構築できた。実体顕微鏡下では生羊膜には不透明な白色を呈し、HYPER-DRY 乾燥羊膜には透明感があったが、凍結乾燥は生羊膜羊膜よりもさらに不透明な白色となり、HYPER-DRY 乾燥羊膜と顕著な差が観られた。生羊膜では敷石状に見える上皮が観察でき、HYPER-DRY 乾燥羊膜でも生羊膜と同様に、敷石状の上皮が観察できた。凍結乾燥には小さな穴が観られ、細胞の区別が難しいものとなった。生羊膜には上皮・間葉系細胞と結合組織がよく保存されていた。HYPER-DRY 乾燥も同様によく保存されていた。凍結乾燥では上皮細胞は濃縮し、結合組織に細胞を認めず、膠原繊維が強く結びついていた。HYPER-DRY 乾燥の方が、凍結乾燥よりも形態をよく保持した。

ウエスタン・ブロッティング法によりタンパク質の変性を生羊膜と比較したところ、乾燥羊膜で、 α antitrypsin と Oct3/4 の抗原性が保持されていた。HYPER-DRY 乾燥羊膜と凍結乾燥には顕著な差が観られたが、細胞の保存状態によるものと考えられた。HYPER-DRY 乾燥羊膜内の蛋白質の

変性は抗体による認識に耐えうる程度には保持されていた。

細胞選択増殖活性を持ち、ミネラルの吸収促進効果が認められる乳糖の酸化生成物であるラクトビオン酸を HPLC シングルピークで作製することができた。他の糖鎖に関しても同様の操作で精製が可能であった。合成ポリマー糖鎖はポリ塩化ビニル、ポリエステル、ポリウレタン、ポリスチレン、SUS、ポリプロピレンなどの医療素材にコーティングが可能である。これらの医療素材は、ゲル、不織布、ファイバー、シート、フィルムなどの形状に加工し、細胞培養に使用することが可能である。従って、このような医療素材からできた培養デバイスに糖鎖ポリマーをコーティングすることでより効率の良い培養基材を作成することが可能になる。他に、0.01W/V%の水溶液にフラーレン、CoQ10、アスタキサンチンなどの疎水性薬物を添加すると、ポリマー内に疎水性薬物を包接し、超音波処理などによりクリアな水溶液を与えることがわかった。

細胞認識性に重点をおいた糖鎖ポリマーを多数、改良開発することができ、B16メラノーマ細胞、CHO 細胞、HepG2 細胞、NIH3T3 細胞などの様々な性質の細胞が培養できること、さらに、糖鎖や共重合した化合物の性質に応じて細胞の接着・増殖がコントロールされることができた。

糖鎖ポリマーは、糖鎖や共重合した化合物により細胞に対する認識性が異なることが明らかになり、疎水性薬物を水中にナノレベルで分散できる可能性があることが示唆された。これらのことから、HYPER-DRY 乾燥羊膜は上皮細胞の保存が良いのに対し、凍結乾燥では悪いことがわかった。

Hyper-Dry ヒト乾燥羊膜は高い組織親和性等から人工器官（部分補填型）として非常に有用性が高いことが示せた。更に、膜への修飾が可能でドラッグデリバリーシステム（DDS）の基材となりうる可能性を示し、ステロイド剤、コラゲナーゼ抑制因子等の膜への含浸と薬品の徐放を行えることが判明し、DDS としの基材として開発を行う。

移植結果：

創傷作成後 4 日目で上皮組織により覆われ、その状態は、対象群に比し乾燥羊膜群で上皮反応が顕著であった。上皮形成された長さを測定し生物検定を行った結果、4 日目の乾燥羊膜移植部位では有意に

増長していた。表皮上皮の促進効果は 4 日目の羊膜移植群で $296.51(\pm 44.71)\mu\text{m}$ 、コントロール群で $150.20(\pm 23.17)\mu\text{m}$ であった ($p<0.05$)。

新規組換えヒトヒト I 型コラーゲン a1 鎖と霊長類 ES 細胞特性保持について

a) BmNPV 由来転写調節因子 IE1 の導入とトランスジェニックカイコの確立

トランスジェニックカイコ COL1A1 と IE1 合成トランスジェニックカイコを交配し、得られた卵よりふ化した幼虫を約 8 日間飼育した時点で、蛍光顕微鏡下での蛍光観察によってハイブリッドカイコのスクリーニングを行った結果、ハイブリッドカイコ COL1A1/IE1 が得られた。得られた幼虫は、成虫となった後、繭を正常に形成した。

b) 組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖の合成量の確認

SDS-PAGE 法により組換えコラーゲン a1 鎖の予想分子量である 120 kDa 付近にバンドが見られた。このバンドは野生型カイコ (w1-pnd) が形成した繭の抽出液認められなかった。

c) 組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖と市販コラーゲンあるいはゼラチンとの比較

組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖、市販コラーゲンおよび市販ゼラチンとの CD スペクトルの測定を行った結果、すべてのサンプルにおいてコラーゲンタンパク質典型的な 198-200 nm の負のピークが確認できた。コラーゲン三重らせん構造の存在を表す 220-225 nm の正のピークは市販コラーゲンにおいて最も顕著に見られた。また、市販ゼラチンにおいても若干のピークが確認でき、変性されずに残った三重らせん構造がわずかに残っていると考えられた。一方、組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖においては 224 nm のピークはほとんど見られなかった。このことは組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖には三重らせん成分が含まれていないことを示唆している。市販コラーゲンを 50°C で熱処理したところ、224 nm のピークが完全に消失し、組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖の波形とほぼ一致した。このことから組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖の二次構造は熱変性させた天然コラーゲンの状態に近いことが強く示唆された。

組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖を用いて 5%ゲルを作製し、その融点および凝固点を調べたところ、それぞれ 17°C、10°C になった。対照として同時に調べた市販

ウシゼラチンにおいては、融点 30°C、凝固点 26°C であった。市販ゼラチンに比べると組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖の融点、凝固点は共に 10°C 以上低く、市販ゼラチンに比べ溶けやすく固まりにくい性質を持つことが判明した。

コラーゲンは塩の存在下で 37°C でインキュベーションすることによって繊維化（ゲル化）が起こる。同条件でウシ I 型コラーゲン、組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖、市販ゼラチンにおいて繊維化が起こるかどうかを調べた結果、コラーゲンにおいてのみゲル化が起こった。このことから組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖は生理的条件下でゲル化（繊維化）は起こらないことが判明した。

d) 組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖の霊長類 ES 細胞特性保持に関する解析
凍結乾燥された組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖体より 0.1%溶液を作成しカニクイサル ES 細胞培養へ用いた。

・霊長類 ES 細胞の形態的特徴を保ったまま 20 継代数以上良好に培養維持可能であった。

・未分化特異的マーカーである OCT3/4、SOX2、SSEA4、TRA1-60、TRA1-81 の発現を免疫組織学的解析を行ったところ、明瞭な発現が認められ、対象で行っている標準化されている方法での ES 細胞と何ら異なることはなかった。

・多分化能解析について良好に培養されたカニクイサル ES 細胞を免疫不全マウスの皮下及び腎皮膜下へ移植し、1.5 ヶ月経過観察し腫瘍の形成を認め、多分化能解析を行った結果、外胚葉・中胚葉・内胚葉マーカーである Tuj1、MF-20、AFP が陽性であり多分化能も問題なく保持されていることが確認できた。

D. 考察

HYPER-DRY 乾燥羊膜がいずれの凍結乾燥羊膜よりも生羊膜に近い形態学的構造を示したことから、1) 必要時に利用できる 2) 管理保管に手間とコストのかからない乾燥羊膜が作製できたと考えた。将来の人工器官に向けた基盤研究では、糖鎖ポリマーはナノレベルで分散でき、乾燥羊膜にこれらポリマーを塗布することで、細胞のよりよい培養環境を提供できると共に、疎水性の細胞活性化因子を包接し、細胞培養時に徐放させることで、人工器官へのより確実なアプローチが可能になると考えられた。この糖鎖ポリマーによる細胞の認識性と反応の違いがど

のようなメカニズムで引き起こされているのかを詳細に検討していくことで、より高度な細胞培養システムの構築が可能になる。

本研究課題における新規の乾燥羊膜はマウス創傷治癒モデルにおいて、有意に上皮形成促進作用が認められたことから、創傷を早期に治癒する効果があると考えられた。

本研究において、細胞の足場接着タンパク質の 1 つであるヒト I 型コラーゲンの合成を試みた。第一段階として、すでに作出していた組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖を含む繭を作るトランスジェニックカイコを改良することによって、組換え a1 鎖合成量の増加を試みた。続いて第二段階として、得られた繭から組換え a1 鎖の抽出・精製を行った。第三段階として、得られた組換え a1 鎖を天然のコラーゲンあるいはゼラチンと比較した。最終的に獲得できた良質な凍結乾燥された組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖の霊長類 ES 細胞の特性保持への効果を検定した。ホモ接合体のトランスジェニック体を作製することで、導入遺伝子は 1 コピーから 2 コピーへ増加する事になり、組換えタンパク合成量が 1.5 倍以上の産物量を獲得することが可能であった。今回得られたホモ接合体化ハイブリッドカイコ (COL1A1/IE1)² を大量飼育することによって、組換えコラーゲン a1 鎖を大量生産することが可能である。得られた組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖の物性解析より、その性質は熱変性させたコラーゲンに近く、「組換えヒトゼラチン」と呼ぶことが適当と思われる。一般的なゼラチンは、ウシやブタの骨・皮などをアルカリで処理した後、温水で抽出することにより得られるコラーゲンの変性産物であるため、このような操作で得られたゼラチンは安価であるが、アルカリや熱による分解を受けるため低分子化している。一方、今回得られた組換えヒトゼラチン（組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖）は分子量が均一であることが大きな相違点であり、加えて、ヒト型であるため抗原となる可能性低いこと、ウィルス等への感染リスクが低いこと、などが従来の動物由来ゼラチンに比したメリットになると考えられる。純度の高いヒト I 型コラーゲン a1 鎖を生産するシステムを確立できた。

その良質に精製できたヒト I 型コラーゲン a1 鎖を用いた霊長類（カニクイサル）ES 細胞培養においては、その特性が長期

にわたって保持されていることが確認でき、今後再生医療対応の培養システムを構成する重要な要素となりうる事が判明した。

E. 結論

将来の安全的な再生医療マテリアルを供給するために、我々が開発してきた HYPER-DRY 乾燥羊膜はヒト由来生羊膜に非常に近似した形質を保持し、長期保存が可能な組織を作成できた。新規に開発した糖鎖ポリマーは細胞と共培養する中で、細胞を特異的に認識し反応性の違いをみせ、機能性マトリックス構築することができた。ヒト由来の長期保存で安定的な人工羊膜の足場を応用すれば、より安全で高度な細胞培養システムの構築が可能になり人工器官開発の重要な基盤づくりができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Sato B, Katagiri Y, Miyado K, **Akutsu H**, Miyagawa Y, Horiuchi Y, Nakajima H, Okita H, Umezawa A, Hata J, Fujimoto J, Toshimori K, Kiyokawa N. Preferential localization of SSEA-4 in interfaces between blastomeres of mouse preimplantation embryos. *Biochem Biophys Res Commun.* 364:838-843. 2007

Sullivan S, Ichida JK, Umezawa A, **Akutsu H**. Nuclear reprogramming and the control of differentiation in mammalian embryos. Elucidating nuclear reprogramming mechanisms: taking a synergistic approach. *Reprod Biomed Online.* 2007; Epub ahead of print.

Tanigawa M, Miyamoto K, Kobayashi S, Sato M, **Akutsu H**, Okabe M, Mekada E, Sakakibara K, Miyado M, Umezawa A, Miyado K. Possible involvement of CD81 in acrosome reaction of sperm in mice. *Mol Reprod Dev.* 75(1):150-155. 2008

Sullivan S, Egli D, **Akutsu H**, Melton D, Eggan K, Cowan CA. Derivation of human ES cells. *Human Embryonic Stem Cells: The Practical Handbook* Editors Stephen Sullivan, Chad A. Cowan and Kevin Eggan (Editors) John Wiley & Sons, Ltd., Chichester. 2007.

Takashima S, Yasuo M, Sanzen N, Sekiguchi K, Okabe M, Yoshida T, Toda A, **Nikaido T**. Characterization of laminin isoforms in human amnion. *Tissue Cell.* 40(2); 75-81. 2008.

Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, Bilic G,

Bühring HJ, Evangelista M, Hennerbichler S, Liu B, Magatti M, Mao N, Miki T, Marongiu F, Nakajima H, **Nikaido T**, Portmann-Lanz CB, Sankar V, Soncini M, Stadler G, Surbek D, Takahashi TA, Redl H, Sakuragawa N, Wolbank S, Zeisberger S, Zisch A, Strom SC. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Tissue Cell.* 26(2); 300-311. 2008.

Toda A, Okabe M, Yoshida T, , **Nikaido T**. The potential of amniotic membrane/amnion-derived cells for regeneration of various tissues.. *J Pharmacol Sci.* 105(3); 215-228. 2007.

Iijima K, Igawa Y, Imamura T, Moriizumi T, **Nikaido T**, Konishi I, Nishizawa O. Transplantation of preserved human amniotic membrane for bladder augmentation in rats. *Tissue Eng.* 13(3):513-524. 2007.

Honda A, Abe R, Makino T, Norisugi O, Fujita Y, Watanabe H, Nishihira J, Iwakura Y, Yamagishi S, Shimizu H, **Shimizu T**. Interleukin-1beta and macrophage migration inhibitory factor (MIF) in dermal fibroblasts mediate UVA-induced matrix metalloproteinase-1 expression. *J Dermatol Sci.* 49(1):63-72. 2008.

Asano Y, Makino T, Norisugi O, Watanabe H, Abe R, Shimizu H, **Shimizu T**. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) in bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci.* 49(1):95-7. 2008.

Makino T, Nagasaki A, Furuichi M, Matsui K, Watanabe H, Sawamura D, Shimizu H, **Shimizu T**. Novel mutation in a fumalate hydratase gene of a Japanese patient with multiple cutaneous and uterine leiomyomatosis. *J Dermatol Sci.* 48(2):151-3. 2007.

Nemoto I, **Shimizu T**, Fujita Y, Tateishi Y, Tsuji-Abe Y, Shimizu H. Tumour-like muscular sarcoidosis. *Clin Exp Dermatol.* 32(3):298-300. 2007.

Saito S, Sakai M, Sasaki Y, Nakashima A, Shiozaki A. Inadequate tolerance induction may induce pre-eclampsia. *J Reprod Immunol.* 76(1-2):30-9. 2007.

Saito S, Shima T, Nakashima A, Shiozaki A, Ito M, Sasaki Y. What is the role of regulatory T cells in the success of implantation and early pregnancy? *J Assist Reprod Genet.* 24(9):379-86. 2007.

Saito S, Shiozaki A, Sasaki Y, Nakashima

A, Shima T, Ito M. Regulatory T cells and regulatory natural killer (NK) cells play important roles in fetomaternal tolerance. *Semin Immunopathol.* 29(2):115-22. 2007.

Sasaki Y, Darmochwal-Kolarz D, Suzuki D, Sakai M, Ito M, Shima T, Shiozaki A, Rolinski J, **Saito S**. Proportion of peripheral blood and decidual CD4(+) CD25(bright) regulatory T cells in preeclampsia. *Clin Exp Immunol.* 149(1):139-45. 2007.

Saito S, Shiozaki A, Nakashima A, Sakai M, Sasaki Y. The role of the immune system in preeclampsia. *Mol Aspects Med.* 28(2):192-209. 2007.

Yoneda S, Sakai M, Sasaki Y, Shiozaki A, Hidaka T, **Saito S**. Interleukin-8 and glucose in amniotic fluid, fetal fibronectin in vaginal secretions and preterm labor index based on clinical variables are optimal predictive markers for preterm delivery in patients with intact membranes. *J Obstet Gynaecol Res.* 33(1):38-44. 2007.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

ヒト由来細胞・組織バンクの活用拡大のためのシステム構築と研究資源の高度化に関する研究

所属 国立精神・神経センター神経研究所
 研究者 後藤 雄一

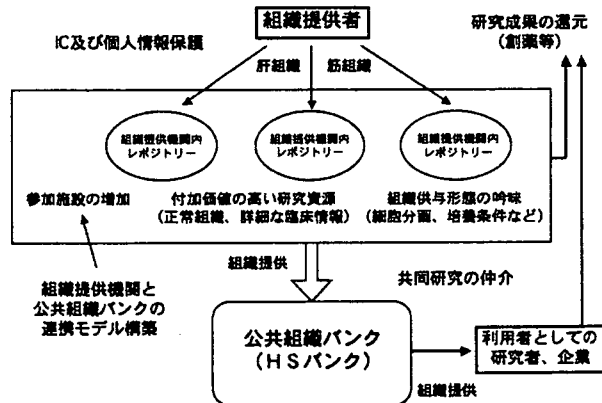
研究要旨 生検骨格筋及びそこから樹立した筋芽細胞と、手術により摘出されたヒト組織（主に肝）を、質の高い研究材料として公共バンクに提供し活用するためのシステム構築について検討する。特に骨格筋については、そのプロトタイプとして、研究者が必要とする形態での高品質な凍結骨格筋、筋芽細胞を提供できるように量・質ともに世界的に優れたリサーチ・リソースを確保している。しかし、このシステムを維持するためには、さらなる人的、経済的な支援が必須である。また、研究資源の高度化をはかり、より有効な研究資源とするために、筋芽細胞の高品質化（純粋化、不死化）、ヒト肝組織の原疾患による発現蛋白の相違解析を行うとともに、学内及びヒューマンサイエンスヒト組織公共バンクへの組織提供のシステムを検討した。肝組織については、従来通り HS バンクへの試料供与が順調に行われている。筋芽細胞については、今年度の純粋化と不死化の成功を踏まえて、HS バンクへの試料提供を行う準備が整った。

分担研究者

- (1) 西野一三 国立精神・神経センター神経研究所
- (2) 小林英司 自治医科大学分子病態治療研究センター
- (3) 小林真一 聖マリアンナ医科大学薬理学
- (4) 熊井俊夫 聖マリアンナ医科大学薬理学
- (5) 浅原利正 広島大学大学院先進医療開発科学講座外科学
- (6) 橋本有弘 国立長寿医療センター研究所
- (7) 清野 透 国立がんセンター研究所

A. 研究目的

本研究では、ヒト組織を外科的に採取し、適切にかつ十分量多くの研究者に研究用ヒト試料として提供できるよう公共バンクと連携した保存・管理するためのシステム構築の検討を行う。特に我が国で遅れている各科を横断的にまたがるシステムを検討し、将来わが国の各医療機関でも構築が可能なヒト組織提供機関としてのモデルシステムについて検討する。そのため、生検骨格筋及び摘出肝組織をモデルとしてシステム構築を行うことを目的としている。



B. 研究方法 及び C. 研究結果

1. 骨格筋及び筋芽細胞提供医療施設内（国立精神・神経センター）の試料と情報の管理システム整備

国立精神・神経センター神経研究所及び武蔵病院では、共同で神経筋疾患の診断システムと研究資料保存システムを構築し活動している。す

で1万件を超えた患者登録と凍結筋保存がある。このシステムを基盤にして、患者骨格筋から筋芽細胞を樹立し、また共同研究として研究者に供与した。来年度は、ヒューマンサイエンスヒト組織公共バンクへの提供を行い研究者への配布を広く行う。

2. 筋芽細胞の純粋化、不死化の成功

分担研究者の国立長寿医療センター研究所の橋本有弘博士、国立がんセンター研究所の清野透博士により、筋芽細胞の純粋化と延命・不死化に成功した。

まず、橋本博士により、デスミン免疫染色から比較的筋細胞が少ないと考えられる筋芽細胞2種に対して、クローニング法で不死化に適した細胞を分離し、拡大培養を行った。

2種の筋芽細胞集団から分離した11クローン中の10クローン及び11クローン中の11クローンで筋管細胞形成が確認でき、それぞれの代表として1クローンずつを国立がんセンター研究所に送付した。

清野博士は、すでに筋芽細胞で不死化に成功しているhTERTとHPV16 E7を発現させた筋芽細胞が不死化でき、さらに分化能を良く保持していることを明らかにしていた。そこで、HPV16 E7とhTERTとを同時に発現するレトロウィルスベクターを作製した。さらに不死化後にE7を除外できるようにE7遺伝子をlox P配列で挟んだベクターも作製し、Creにより除去できなかった細胞を排除できるようにHSV-TK遺伝子を不死化遺伝子の下流にIRES配列を介して繋いだ構築をもつベクターも作製した。

これらのベクターを筋芽細胞に導入した。その結果、いずれのベクターでも50世代を超える延命を得た。

3. 肝組織提供医療施設の試料と情報の管理システムの整備（聖マリアンナ大学病院）

1) 組織摘出から保存までのシステム構築

聖マリアンナ大学でのヒト肝細胞のバンク化のシステムとして、昨年度、手術で切除された肝組

織を病理検査に影響を与えず、かつ有効に採取するシステムについて外科医、病理医、内科医と検討した。本年度はこのシステムについて検証し、見直しを図った。

本年度はCRCと組織採取にかかわる人員をそれぞれ1名ずつ増員して、各倫理指針、検体の取り扱い、院内の各システム、各部門との連携状況などについて教育・研修を行った。

昨年度から組織採取システムに参加協力してもらっている消化器・肝臓内科の医師もに本年度も引き続き組織採取スタッフとして協力してもらった。その結果、消化器・肝臓内科の医師のヒト組織バンクへの理解がさらに深まり手術室内での作業に余裕が生まれ、組織保存がさらにスムーズに行えるようになった。しかし一方で診療業務との時間的重複なども問題点として挙げられ、今後の検討課題とされた。

2) ヒト組織多元的調整法至適化と効率化の検討

原疾患別の肝組織蛋白発現の比較として、本学病院で外科手術により摘出された良性腫瘍、大腸癌の転移性腫瘍、原発性肝臓癌患者の肝組織について蛋白発現を比較検討した。各群5例の組織を等量ずつ合わせてプール検体とし、電気泳動にて展開した。これをサイプルルビーで染色、蛋白発現パターンを比較した。

その結果、良性腫瘍と大腸癌の転移性腫瘍を原疾患とする肝組織中の蛋白発現は大きな差はなかったが、原発性肝臓癌を原疾患とする肝組織では良性腫瘍や大腸癌の転移性腫瘍を原疾患とする肝組織よりも5本のバンドで発現が多く、1本のバンドで逆に発現の少ないことが明らかとなった。現在、このバンドを質量解析にて分析中である。

また、脂肪肝の蛋白調整法として、生後4ヶ月齢の雄性SDラットに高脂肪食と15%蔗糖を2ヶ月間負荷し、脂肪肝ラットを作成した。正常群と脂肪肝群をそれぞれ可溶化剤を組み合わせた市販の細胞質・細胞膜・核同時調整キット(Subcellular Proteome Extraction kit, Calbiochem)でそれぞれの分画を調整した。

正常群の肝臓では細胞質分画、細胞膜分画、核分画でそれぞれプロトコールどおりの収率で調整できた。一方で脂肪肝群の肝臓では細胞質分画抽出段階で上清の 1/3 以上に肝の脂質分が抽出された。さらに沈渣の細胞膜部分、核分画をそれぞれの抽出バッファで抽出しても、沈渣内の脂肪分が析出し、収率はそれぞれ著しく低下した。

3) 臨床試験コーディネーターによる同意説明のためのシステム整備

広島大学病院でのヒト肝細胞バンクのシステム化については、これまで正常ヒト肝細胞を利用した研究を進めてきた当科は、その経験を活かし、手術等で摘出されたヒト肝組織から肝細胞への分離、保存、培養を行う。一方、従来の当大学での研究利用の説明に加えて、公的なヒト組織バンク（ヒューマンサイエンス研究資源バンク、HSRRB）への組織提供へ向けた新たな説明、並びに IC を取得する。承諾を得た症例に関し、肝組織及び肝細胞として提供可能であったヒト肝組織 4 検体、ヒト肝細胞 7 検体を大阪泉南市の HSRRB へ送付した。

4. ヒト組織の研究資源化における倫理的研究

HS バンクへの細胞株の提供に関して、①品質管理をして出すのか、②データベースをどのようにするか、③どこまで処理を行ってから HS に出すのかという三点に大きな問題がある。癌細胞バンク実績がすでにある、東北大学加齢研究所付属医療用細胞資源センターの視察を行い、その現状と問題点に考察を加えた。

D. 考察、結論

1. 骨格筋及び筋芽細胞提供医療施設内（国立精神・神経センター）の試料と情報の管理システム整備

骨格筋バンクの登録数は順調に伸びており、さらに充実したリサーチ・リソースとなりうる。既に保存されている筋芽細胞を、利用希望の研究者に供与することを推進させる必要があり、ヒューマンサイエンス研究資源バンクへの分譲を積極的に進める。来年度には具体的に主要な筋疾患の筋芽細胞を分譲する。

2. 筋芽細胞の純粋化、不死化

hTERT と HPV16 E7 を発現させることで筋芽細胞の不死化に成功した。今後は、TRAP アッセイによるテロメラーゼ活性の確認、分化能の維持、染色体異常の有無を確認する必要があるとともに、研究上で優先度の高い筋芽細胞に対して、この方法を応用した不死化細胞パネルを樹立する予定である。同時に、ヒューマンサイエンス財団への細胞提供を行う。

3. 肝組織提供医療施設の試料と情報の管理システムの整備

聖マリアンナ大学病院、広島大学病院におけるシステムの具体的な改善例が、今後の組織バンク化の参考になる。

4. ヒト組織の研究資源化における倫理的研究

もっとも問題なのは、人的資源とランニングコストの確保であった。また、倫理的手順の煩雑さから、確保できる検体数が頭打ちになっている現状があきらかとなった。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 中谷祥子. 臨床研究の支援～ヒト組織バンク事業にかかわって～. 臨床薬理, 38: (3) 23S-24S, 2007
- 2) 前川貴子, 中谷祥子, 熊井俊夫, 松本直樹, 大坪毅人, 田所衛, 小林真一. ヒト組織を研究利用するために—ヒト組織バンク事業に対する一般生活者の意識調査—. 臨床薬理, 38:349-354, 2007
- 3) Yuko Takeba, Toshio Kumai, Naoki Matsumoto, Sachiko Nakaya, Toshimitsu Tsuzuki, Yohei Yanagida, Shinichi Kobayashi. Irinotecan Activates p53 With Its Active Metabolite, Resulting in Human Hepatocellular Carcinoma Apoptosis. Pharmacol Sci. ; 104(3):232-42, 2007
- 4) Yuko Takeba, Susumu Sekine, Toshio Kumai, Naoki Matsumoto, Sachiko Nakaya, Yoshimitsu Tsuzuki, Yohei Yanagida, Hiroshi Nakano, Takeshi Asakura, Takehito Ohtsubo, Shinichi Kobayashi. Irinotecan-induced apoptosis is

- inhibited by increased P-glycoprotein expression and decreased p53 in human hepatocellular carcinoma cells. *Biol. Pharm. Bull.* ; 30(8):1400-1406, 2007
- 5) T. Itamoto et al: Repeat hepatectomy for recurrent hepatocellular carcinoma. *Surgery* 141(5):589-597, 2007
- 6) S. Fukuda et al : Clinicopathologic features of hepatocellular carcinoma patients with compensated cirrhosis surviving more than 10 years after curative hepatectomy. *World J Surg.* 31(2):345-352, 2007
- 7) N. Masumoto et al : GH enhances proliferation of human hepatocytes grafted into immunodeficient mice with damaged liver. *Journal of Endocrinology* 194:529-537, 2007
- 8) 浅原利正他：再生医療。「消化器外科学レビュー2007」（監修：門田守人、跡見 裕、炭山嘉伸）、243-248, 総合医学社, 東京, 2007
- 9) 小林英司：アジア諸国の脳死移植への取り組みから—タイ Organ Donation Center の活動—。『移植』42(6):558-560, 2007.
- 10) Ura S, Hayashi YK, Goto K, Astejada M, Murakami T, Nagato M, Ohta S, Daimon Y, Takekawa H, Hirata K, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: Limb-Girdle Muscular Dystrophy Due to Emerin Gene Mutations: *Archives of neurology* 64(7): 1038-1041, 2007
- 11) Okada M, Kawahara G, Noguchi S, Sugie K, Murayama K, Nonaka I, Hayashi YK, Nishino I: Primary collagen VI deficiency is the second most common congenital muscular dystrophy in Japan: *Neurology* 69: 1035-1042, 2007
- 12) Kawahara G, Okada M, Morone N, Ibarra CA, Nonaka I, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I: Reduced cell anchorage may cause sarcolemma-specific collagen VI deficiency in Ullrich disease: *Neurology* 69: 1043-1049, 2007
- 13) Malicdan MCV, Noguchi S, Nonaka I, Hayashi YK, Nishino I: A Gne knockout mouse expressing human GNE D176V mutation develops features similar to distal myopathy with rimmed vacuoles or hereditary inclusion body myopathy: *Human Molecular Genetics* 16(2): 2669-2682, 2007
- 14) Sato I, Wu S, Ibarra MCA, Hayashi YK, Fujita H, Tojo M, Oh SJ, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: Congenital neuromuscular disease with uniform type 1 fiber and RYR1 mutation: *Neurology* 70: 114-122, 2008 (Selected for Editorial and Highlights)
- 15) Takano K, Nakagawa E, Inoue K, Kamada F, Kure S, Goto Y: Japanese Mental Retardation Consortium. Loss-of-function mutation in the *FTSJ1* gene causes nonsyndromic X-linked mental retardation in a Japanese family. *Am J Med Genet.* (in press) DOI: 10.1002/ajmg.b.30638
- 16) Hashimoto N, Kiyono T, Wada MR, Umeda R, Goto YI, Nonaka I, Shimizu S, Yasumoto S, Inagawa-Ogashiwa M. Osteogenic properties of human myogenic progenitor cells. *Mech Dev.* 125:257-269, 2008.
- 17) Kiyono T. Molecular mechanisms of cellular senescence and immortalization of human cells. *Expert Opin Biol Ther.*, 11:1623-37, 2007.

2. 学会発表

- 1) 熊井俊夫, 中谷祥子, 武半優子, 都築慶光, 柳田洋平, 田中政巳, 朝倉武士, 渡邊泰治, 田中圭一, 大坪毅人, 小林真一：肝疾患におけるCYPs及びMDR-1の遺伝子多型について。第28回日本臨床薬理学会年会
- 2) 天野尋暢 他：生体肝移植ドナーの周術期安全性向上のための工夫。第43回日本移植学会総会, 仙台, 2007.11.22-24
- 3) 大下彰彦 他：生体肝移植における移植グラフトとドナー残存肝の再生。第69回日本臨床外科学会総会, 東京, 2007.11.29-12.1
- 4) 板本敏行 他：肝細胞癌切除後残肝再発に対する再肝切除と生体肝移植の意義。第69回日本臨床外科学会総会, 東京, 2007.11.29-12.1
- 5) 小林英司： 渡航移植の現状と問題点、第132回日本医学会シンポジウム「我が国の臓器移植—現状と問題点—」 東京、 2007年8月2日（日本医師会雑誌 136(7):1381-1382, 2007)

6) Goto Y: Mitochondrial dysfunction inducing neuromuscular disorders known as mitochondrial encephalomyopathies. Neuro 2007, Yokohama, 9. 11, 2007

F. 知的財産権の出願・登録状況
なし

若手研究者奨励研究

寄生性原虫の生育に必要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

研究期間 平成17年4月～平成20年3月

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を取込むことが必要であった。赤痢アメーバ内でコレステロールは病原因子 CP の活性制御を担い、宿主細胞のコレステロール量と食食活性には高い相関が認められた。このことは、肝膿瘍の形成の原因であると考えられた。またエンドサイトーシスによって取り込まれるコレステロールは、食食に必要なと報告されていた EhRab5 GTPase の機能を介していた。よって、EhRab5 とその調節経路をさらに解析することが、新規抗アメーバ症薬剤開発のための基盤を提供するものと考えられる。

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、嫌氣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、赤痢アメーバの病原因子であるアメーバポアの活性を左右する脂質成分の代謝と細胞内輸送に着目する。アメーバポアは古くから赤痢アメーバで研究されて来た膜穿孔ペプチドであり、近年コレステロール依存性サイトリンのファミリーであることが報告された。そして赤痢アメーバにとってコレステロールは生育に必要な脂質であることが報告されているが、その細胞内における機能、取り込みに関する分子生物学的研究は全く行われて

いなかった。

そこで、近年終了した赤痢アメーバのゲノムデータベースを基に、コレステロールの合成、外界からの取り込み、代謝に関する遺伝子群の探索をすることをはじめとし、赤痢アメーバの病原性にとってコレステロールがどのような役割を果たすのかを解析した。さらにアメーバ細胞内へのコレステロール取り込みの特殊性を明らかにすることで、薬剤開発のための基盤を提供することを目的とした。

B. 研究方法

a. ゲノム情報による赤痢アメーバのコレステロール生合成ならびに代謝関連遺伝子の探索

コレステロールの *de novo* の合成ならびに外界からのサルベージ経路に関する遺伝子群を、近年終了した赤痢アメーバのゲノムデータベース TIGR (<http://www.tigr.org>) の情報を基に、他種生物で報告されている遺伝子情報を prey とし、blastp アルゴリズムによって探索した。

b. コレステロール依存的な *in vitro* 培養系の確立

現在世界的に広く用いられている実験室株 (HM1:IMSS cl6) がコレステロール依存的に培養

が可能であるかを検討した。現行の純培養では BIS-33 培地 (BI 基礎培地、15%成牛血清、2%ビタミン混合液) を使用している。15%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には cholesterol/ lipoprotein 混合液 (Sigma 社) を使用した。培地中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。細胞の生育は 96 ウエルタイタープレートに 5×10^3 cell/ウエルに播種し、1、2 日後の細胞の増殖変化を WST 試薬の吸収 (415 nm/655 nm) で測定した。

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 $0.5 \mu\text{M}$ 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。

d. システインプロテアーゼ (CP) 活性におけるコレステロールの役割

CP 酵素は $1 \mu\text{g}$ タンパク量のアメーバライゼートを使用した。このライゼートに $80 \mu\text{M}$ の基質 (z-Arg-Arg-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin) を添加し、反応バッファー (0.1 M KHPO_4 , pH 6.1, 1 mM EDTA , 2 mM DTT) 下での発色を室温下で 400 nm の励起波長と 505 nm の吸収波長を測定した。

e. 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 10 分処理することにより除去し、赤痢アメーバの CHO 細胞の食効率を検討した。CHO 細胞への食効率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、 $40 \mu\text{M}$ 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。 1.5×10^5 個の赤痢アメーバを $300 \mu\text{l}$ 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、CHO を取り込んだ赤痢アメーバを顕微鏡下で観測した。ハムスターの初代培養肝細胞は (株) プライマリーセルより購入した。初代培養肝細胞は CellTracker blue の染色に毒性を示したため、PKH26 (Sigma) を用いて染色した。

f. *in vitro*におけるコレステロールの取り込み機構

生細胞におけるコレステロールの取り込みは NBD-cholesterol (Invitrogen) を用いてラベルした。まず 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) で洗浄した細胞を、 $1 \mu\text{g/ml}$ NBD-cholesterol を用いて一定時間 37°C 下でインキュベートし、余分な NBD-cholesterol を BIS-33 培地でキレートした後、PBS で細胞を洗浄し、DTX-880 蛍光光度計 (Beckman) で蛍光強度を測定した。Rab5 形質転換株の作製と間接蛍光抗体法は前報に記した (Saito-Nakano, J. Biol. Chem. 2004)。

(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、組み換え DNA 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. 赤痢アメーバにおけるコレステロールのサルベージならびにコレステロール代謝関連遺伝子の同定

ヒトではコレステロールは細胞外から LDL リセプターを介するエンドサイトーシスによって取り込む経路と共に、小胞体で *de novo* の合成経路を有することが分かっている。小胞体でアセチル CoA からメバロン酸が合成され、その後、炭素数 5 のイソペンテニルニリン酸 (IPP)、ジメチルアリルニリン酸

ン酸 (DMAPP)、ファルネシルニリン酸 (FPP) が合成される。この合成経路 (メバロン酸経路) に関わる合成酵素のうち、他種生物と相同性のあった赤痢アメーバ遺伝子は IPP から DMAPP を触媒するイソペンテニルニリン酸イソメラーゼ (TIGR での ID 番号 46.m00229, *Pyrococcus* の酵素と同一性 $P = 2.5e^{-51}$)、ならびに DMAPP から FPP を触媒するファルネシルニリン酸シンターゼ (68.m00243, 325.m00053, $P = 0.0011$) が存在した。しかしながら、その他のステロール合成酵素はゲノム情報中に存在しなかった。

寄生性原虫マラリアにはメバロン酸を介さずにピルビン酸から IPP を合成する系 (非メバロン酸経路) が色素胞の中に存在する。しかしながら、赤痢アメーバゲノムには非メバロン酸経路に相当する遺伝子は存在しなかった。

サルベージ経路に関しては、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。しかしながら、蛍光色素である FITC-dextran が赤痢アメーバでエンドサイトーシスによって取り込まれること、細胞膜からのクラスリン被覆小胞の形成に関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 がゲノム中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。さらにヒトのコレステロール代謝異常遺伝病 (ニューマンピック症候群 C 型; NPC) の原因遺伝子が赤痢アメーバに存在することを示した。定量 PCR により、AP2 と EhNpc1 が実際に発現していることを示した。

b. コレステロール依存的な *in vitro* 培養系の確立

コレステロールが赤痢アメーバの細胞培養に必要であることは以前、海外のグループによって別の臨床単離株をもちいて報告されていた。しかしながら用いた培養系が現行の純粋培養ではなく細菌共生の培養系であったこと、株間の違いによって発現する遺伝子に違いがあることが近年の DNA マイクロアレイの技術によって明らかにされている。そこで培養標準株 HM1 がコレステロール依存的な生育を示すかどうかを確認した。現行の培養培地 BIS-33 培地 (BI 基礎培地/ビタミン混合液/15% 成牛血清) 中の血清をコレステロール量の低いウシ胎児血清に代えたところ赤痢アメーバは増殖でき

なかった。胎児血清にさらに 1%コレステロール懸濁液を添加することで、赤痢アメーバの増殖は回復した。よって赤痢アメーバは外界からのコレステロールの取り込みに依存して生育することを示した。また、2 日後の培養培地中からは遊離のコレステロールでなくコレステロールエステルが減少することを示した。

c. 赤痢アメーバにおけるコレステロールの局在

他種生物ではコレステロールの細胞内局在は主に細胞膜である。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。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。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。また、病原株では非病原株よりもリソソーム数と細胞内コレステロール量が多いことを示した。

d. CP 活性に対するコレステロールの役割

CP は赤痢アメーバが細胞外に分泌する主要な病原因子であるとともに、貪食によって取り込んだものの分解をファゴソーム内で完了させる因子として非常に重要である。CP の細胞内局在はリソソームであるため、CP の活性にコレステロールが関与しているかどうかを調べた。反応液中に脂質成分を添加しないときの CP 活性を 100%とした場合、2.5%コレステロールを添加すると約 2.2 倍の CP 活性の活性化が観察された。コレステロールによる CP 活性の活性化は低濃度で高く、0.05%—1%コレステロール添加下では 4 倍以上の活性化が見られたが、0.01%以下ではその効果は消失した。また高濃度の 10%—15%コレステロール下では CP 活性を抑制的に調節した。コレステロールによる CP の活性化と抑制活性は赤痢アメーバの CP に特異的であり、哺乳類細胞のライセートのプロテアーゼ活性

ではこのような活性化作用は観察されなかった。

e. 宿主細胞のコレステロールに対する役割

赤痢アメーバは貪食の際に CP を分泌し、宿主細胞に障害を与えることが分かっている。CP の活性にコレステロールが必要であることから、宿主細胞のコレステロール量と貪食活性に相関があるかどうかを調べた。まず、CHO 細胞とハムスターの初代肝培養細胞の細胞内コレステロール量を測定したところ、肝細胞 ($24 \pm 4.8 \mu\text{g cholesterol/mg protein}$) は CHO 細胞 ($4.6 \pm 0.1 \mu\text{g cholesterol/mg protein}$) の 5.2 倍コレステロール量が多いことが分かった。M β CD で 10 分間処理した後は細胞内のコレステロール量は肝細胞では 62% ($15 \pm 2.0 \mu\text{g cholesterol/mg protein}$)、CHO 細胞では 93% ($4.3 \pm 0.01 \mu\text{g cholesterol/mg protein}$) 減少していた。

次に図 1 の細胞に対する赤痢アメーバの貪食活性を測定した。その結果、赤痢アメーバは CHO 細胞 (25%) よりも肝細胞 (75%) に 3 倍高い貪食活性を示した。M β CD 処理後の細胞においては、肝細胞は 84%、CHO 細胞では 80% の貪食活性の低下が観察された。よって、赤痢アメーバの貪食効率と宿主細胞のコレステロール量には高い相関が観察された ($r = 0.97$)。

f. 赤痢アメーバにおける取り込み経路

コレステロールの取り込みを NBD-cholesterol を用いて生細胞で観察した結果、NBD-cholesterol は赤痢アメーバ内で非常に細かな小胞に組み込まれた後に次第に凝集し、直径 1 μm のエンドソーム様の構造体となって 2 時間後にはリソソームに局在することを示した。この NBD-cholesterol のリソソームまでの輸送は他の可溶性因子 (FITC-dextran) がリソソームに到達する (4 時間以上) よりも速い。よって、可溶性因子とコレステロールの取り込み経路は赤痢アメーバでは異なっていることが推測された。

他種生物ではエンドサイトーシスの初期過程を調節するのは Rab5 というエンドソームとクラスリン被覆小胞に局在する低分子量 GTPase である。これまで、赤痢アメーバには Rab5 のホモログが 1 つゲノムにコードされているが、その機能は他種生

物とは異なることが解明されている。つまり、EhRab5 は定常状態では小さな小胞に局在するが、貪食開始 5 分後に赤血球の貪食と共に形成される prephagosomal vacuole (PPV) 上に EhRab7A GTPase とともに局在することが分かっている。その後、貪食開始 10 分後には EhRab5 は PPV から遊離し、EhRab7A 陽性 PPV が赤血球を含むファゴソームに融合し、ファゴソーム内の分解に寄与することが解明されている。そして EhRab5 の優性変異型 (GTP 結合型) 発現株では、増殖遅延と貪食阻害を示したのにも関わらず、FITC-dextran のエンドサイトーシスには変化が観察されなかった。よって、EhRab5 を介する経路がコレステロールの取込みに関与しているかどうかを解析した。

まず、野生株 HM1 cl6 を用いてヒト赤血球を接触させることにより貪食シグナルを誘起し、5 分後と 10 分後に形成される PPV 上にコレステロールが局在するかを観察した。細胞内コレステロールの局在は filipin で染色し、PPV は野生株でも検出可能な抗体である抗 EhRab7A 抗体を用いて染色した。その結果、貪食開始 5 分後では EhRab7A で染色される PPV にコレステロールの共局在が観察されたが、10 分後では一部の PPV にしかコレステロールが局在していなかった。約 30 個の細胞について、コレステロールの共局在を測定した結果、5 分後では $80 \pm 18\%$ の PPV に、10 分後では $39 \pm 6.8\%$ の PPV にコレステロールが局在していた。よって、コレステロールは PPV 形成の初期段階のみに PPV 上に局在し、EhRab5 が PPV に局在する時間経過と同一であった。

g. EhRab5 優勢変異発現株における取り込み抑制

EhRab5 がコレステロール取り込みの初期に関与している可能性をより明確に示すために、EhRab5 の優勢変異発現株を用いて NBD-cholesterol の取り込み速度を測定した。その結果、EhRab5 変異発現株の NBD-cholesterol の取り込み速度はコントロール株の 50% であった。よって、赤痢アメーバのコレステロールの取り込みには EhRab5 を介する経路が関与していることが分かった。

D. 考察

赤痢アメーバは哺乳類細胞に保存したメバロン酸経路ならびに高等植物や一部の細菌が有する非メバロン酸経路のコレステロール合成系の遺伝子を欠失していた。一方で、外界からのサルベージならびに取り込んだコレステロールの代謝に関与する遺伝子を複数発見した。そして、今回はじめてウシ胎児血清をコレステロール欠損血清として使用し、コレステロール依存的に *in vitro* 培養する系を確立した。これによって、赤痢アメーバが確かにコレステロールを外界から取り込んで生育していることを証明した。

宿主への障害性の他に赤痢アメーバ内への取り込み経路においても特殊性が観察された。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、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。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。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。

赤痢アメーバはコレステロール含量の多い宿主細胞 (CHO 細胞よりも初代培養肝細胞) を好んで食した。宿主のコレステロールを M β CD により除去すると、食食活性も低下したことは宿主のコレステロール量と食食活性に強い相関があることを示している。このことは、赤痢アメーバが腸管から組織侵入を開始した後、門脈を介して肝臓に膿瘍を形成することを良く説明している。おそらく、肝臓よりもコレステロール量が高い細胞、組織が周囲に存在しないため、アメーバは専ら組織内では肝臓に寄生するものと考えられる。

赤痢アメーバは脂質成分を食食の他に、可溶性脂質の取り込み (エンドサイトーシス様経路) によっても接種している。その経路は EhRab5 が関与する経路であることが明らかになった。ヒトではコレステロールと可溶性因子ともに細胞膜から Rab5 を介するエンドサイトーシスによって取込んでいるが、赤痢アメーバが両者の経路を使い分けているという現象は特異である。また、これまで赤痢アメーバの EhRab5 優勢変異発現株は食食に必要な PPV 形

成に障害を示し、最終的に食食能が低下することが示されていた。それだけでなく、定常状態でも生育速度の低下を示し、食食に依存しない状態下で何故生育阻害を示すのか不明であったが、本研究によってコレステロールの取り込み能が半分に低下していることが原因であることが示された。哺乳類細胞や出芽酵母には Rab5 のアイソタイプが 3 種存在し、その機能は重複していることが報告されている。一方で、赤痢アメーバには Rab5 は 1 種しか存在せず、よって EhRab5 に調節される食食とコレステロールの取込み経路が赤痢アメーバの薬剤ターゲットとして有用であると考えられた。

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を取込むことが必要であった。赤痢アメーバ内でコレステロールは病原因子 CP の活性制御を担い、脂質成分取り込みのためにコレステロール含量の高い宿主細胞を食食することは、肝膿瘍を形成の原因であると考えられた。またエンドサイトーシスによって取り込まれるコレステロールは、食食に必要なと報告されていた EhRab5 の機能を介していた。よって、EhRab5 とその調節経路をさらに解析することが、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ものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Saito-Nakano, Y., Loftus, B.J., Hall, N., Nozaki, T. (2005) The diversity of Rab GTPases in *Entamoeba histolytica*. **Exp. Parasitol.** 110:244-252.
2. Mitra, B.N., Yasuda, T., Kobayashi, S., Saito-Nakano, Y., Nozaki, T. (2005) Differences in morphology of phagosomes and kinetics of acidification and degradation in phagosomes between the pathogenic *Entamoeba histolytica* and the non-pathogenic *Entamoeba dispar*. **Cell Motil. Cytoskeleton.** 62:84-99.
3. Nakada-Tsukui, K., Saito-Nakano, Y., Ali,

- V., Nozaki, T. (2005) A retromerlike complex is a novel Rab7 effector that is involved in the transport of the virulence factor cysteine protease in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biol. Cell.* 16:5294-5303.
4. 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.
 5. Saito-Nakano, Y., Mitra, B.N., Nakada-Tsukui, K., Sato, D., Nozaki, T. (2007) Two Rab7 isotypes, *EhRab7A* and *EhRab7B*, play distinct roles in biogenesis of lysosomes and phagosomes in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Cell. Microbiol.* 9:1796-1808.
 6. 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.* 9:2112-2125.
 7. 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, 65:51-190.
2. 学会発表
 1. 中野由美子、津久井久美子、Biswa N. Mitra、岡田麻美、ぬで島麻衣、徳丸文恵、繁田泰男、野崎智義 (2005) 赤痢アメーバのリソソーム形成における *EhRab7* アイソタイプの解析 (2005) 第 74 回日本寄生虫学会大会 April 8-9, 2005, 米子, 鳥取.
 2. 津久井久美子、中野由美子、Vahab Ali、野崎智義 (2005) 赤痢アメーバの病原機構における *Rab7A* の役割 (2005) 第 74 回日本寄生虫学会大会 April 8-9, 2005, 米子, 鳥取.
 3. Saito-Nakano, Y., Okada, M., Mitra, B. N., Nakada-Tsukui, K., Kobayashi, S., and Nozaki, T. (2005) Role of Rab7 isotypes on virulence in *Entamoeba histolytica*. 第 58 回日本細胞生物学会大会 2005 年 6 月 15-17 日, 埼玉.
 4. 中野由美子、岡田麻美、野崎智義 (2005) ゲノム情報から観る赤痢アメーバの膜輸送 第 13 回分子寄生虫学ワークショップ 2005 年 8 月 1-4 日 トムラ
 5. 中野由美子、岡田麻美、野崎智義 (2005) ゲノム情報から観る赤痢アメーバの膜輸送の複雑さ 第 4 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム 2005 年 11 月 5-6 日, 東京.
 6. 津久井久美子、中野由美子、Vahab Ali、野崎智義 (2005) レトロマー複合体は赤痢アメーバ病原因子であるシステインプロテアーゼの輸送に関与している 第 4 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム 2005 年 11 月 5-6 日, 東京.
 7. 中野由美子、Biswa N. Mitra、津久井久美子、岡田麻美、野崎智義 (2005) ゲノム情報から見る赤痢アメーバのメンブレントラフィックと *Rab7* アイソタイプの解析 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ー分子機構から高次機能への展開ー」第3回全体班会議 2005年11月16-19日, 草津.
8. Nakada-Tsukui, K., Saito-Nakano, Y., Ali, V., and Nozaki, T. (2005) A retromer-like complex is a novel Rab7 effector that is involved in the sorting of the virulence factor cysteine protease in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. 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ー分子機構から高次機能への展開ー」第3回全体班会議 2005年11月16-19日, 草津.
9. 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.
10. 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.
11. 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ー分子機構から高次機能への展開ー」第4回全体班会議 2006年11月22-25日, 小豆島.
12. 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 Form of Infectious Diseases. Jun 29-30, Bangkok, Invited speaker.
13. 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.
14. Saito-Nakano, Y. and Nozaki, T. (2007) Role of cholesterol for pathogenesis in protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. 第40回日本発生生物学会・第59回日本細胞生物学会合同大会 2007年5月28-30日, 福岡
15. 中野由美子, 岡田麻美, 野崎智義 (2007) 赤痢アメーバの病原機構におけるリソソーム形成とメンブレントラフィック 第6回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム 2007年10月27-28日, 松山
- 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

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 赤痢アメーバの宿主細胞に対する障害活性は、宿主細胞のコレステロール量と高い相関があった。よって肝膿瘍の形成は、肝細胞の細胞内コレステロールが高いことが原因であると考えられる。また、赤痢アメーバにおけるコレステロールの取り込みには、食食に重要だと示されていた EhRab5 GTPase が関与していた。一方で、赤痢アメーバの EhRab5 は他の可溶性因子の取り込みには関与せず、EhRab5 の調節経路の解析が病原性の理解に重要であった。

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り込み機構に着目する。昨年度までに、赤痢アメーバではコレステロールを *de novo* で合成することはできず、専ら外界からの取り込みに依存して生育していることを示した。コレステロールの取り込みを可視化したところ、微細な小胞に組み込まれた後、1 μm のエンドソーム様の構造体に凝集し、最終的にリソソームに送られることを示した。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制御が担われ、リソソーム内では

CP の抑制と、細胞外に CP が分泌された後は宿主細胞膜への活性化をコレステロールが担っていることを示した。本年度では、病原性におけるコレステロールの重要性をさらに追求し、赤痢アメーバ細胞への取り込みに関与する経路について解析した。

B. 研究方法

a. 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 10 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食効率を検討した。CHO 細胞への障害活性は以下 2 年目の報告書に記した。ハムスターの初代培養肝細胞は (株) プライマリーセルより購入した。肝実質細胞をハムスター肝臓よりコラゲナーゼ灌流法肝細胞を用いて調整した細胞である。初代培養肝細胞は CellTracker blue の染色に毒性を示したため、PKH26 (Sigma) を用いて染色した。細胞内のコレステロール量は Amplex Red Cholesterol Assay Kit (Mol Probe) によって測定した。

b. *in vitro*におけるコレステロールの取り込み機構

生細胞におけるコレステロールの取り込みは NBD-cholesterol (Invitrogen) を用いてラベルした。まず 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) で洗浄した細胞を、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ NBD-cholesterol を用いて一定時間 37 $^{\circ}\text{C}$ 下でインキュベートし、余分な NBD-cholesterol を BIS-33 培地でキレートした後、PBS で細胞を洗浄し、DTX-880 蛍光光度計 (Beckman) で蛍光強度を測定した。EhRab5 形質転換株の作製と間接蛍光抗体法は前報に記した (Saito-Nakano, J. Biol. Chem. 2004)。

(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. 宿主細胞のコレステロールに対する役割

昨年度までの解析で、CHO 細胞をあらかじめ M β CD で処理し、食食効率を計測したところ、食食効率が有為に低下したことを示した。これは CP の活性化による CHO 膜の障害と取り込みにコレステロールが必要であることを示す。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、今年度はコレステロール量のより高いハムスターの初代培養肝細胞を用いた。

まず、CHO 細胞と肝細胞の細胞内コレステロール量を測定したところ、肝細胞 (Hepatocyte-CD; $24 \pm 4.8 \mu\text{g cholesterol}/\text{mg protein}$) は CHO 細胞 (CHO-CD; $4.6 \pm 0.1 \mu\text{g cholesterol}/\text{mg protein}$) の 5.2 倍コレステロール量が多いことが分かった。M β CD で 10 分間処理した後は細胞内のコレステロール量は肝細胞では 62% (Hepatocyte+CD: $15 \pm 2.0 \mu\text{g cholesterol}/\text{mg protein}$)、CHO 細胞では 93% (CHO+CD: $4.3 \pm 0.01 \mu\text{g cholesterol}/\text{mg protein}$) 減少していた (図 1)。

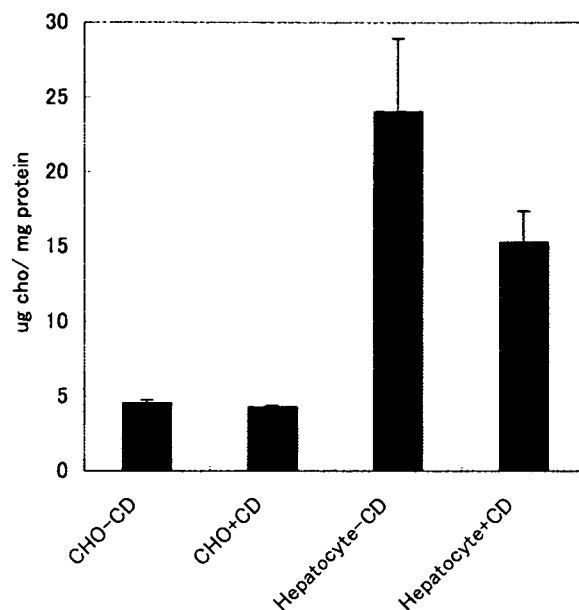


図 1、上皮細胞と肝細胞のコレステロール量

次に図 1 の細胞に対する赤痢アメーバの食食活性を測定した (図 2)。その結果、赤痢アメーバは CHO 細胞 (25%) よりも肝細胞 (75%) に 3 倍高い食食活性を示した。M β CD 処理後の細胞においては、肝細胞は 84% (Hepatocyte+CD)、CHO 細胞では 80% (CHO+CD) の食食活性の低下が観察された。よって、赤痢アメーバの食食効率と宿主細胞のコレステロール量には高い相関が観察された ($r=0.97$)。

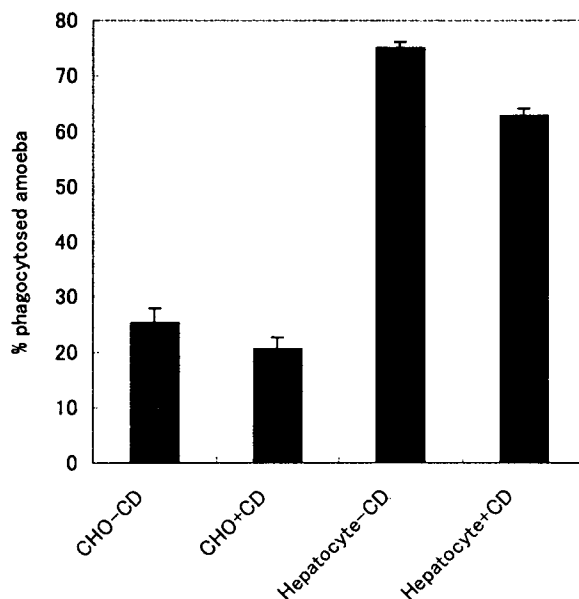


図 2、赤痢アメーバの食食活性