

「生体と制御」研究領域 領域活動・評価報告書

—平成17年度終了研究課題—

研究総括 竹田 美文

1. 研究領域の概要

本領域は、感染症、アレルギー、免疫疾患などの発症メカニズムを生体機能や病原微生物との関わりに着目して、分子レベル、細胞レベルあるいは個体レベルで解析することにより、これらの疾患の新しい予防法、治療法の基盤を築く研究を対象としている。

具体的には、病原微生物のゲノム解析によって明らかになった情報や、ヒトゲノム計画の進展によって得られたゲノム情報を利用したワクチンの開発や遺伝性疾患の解析、あるいは生体防御反応・免疫応答に関わる分子の生体レベルでの解析による免疫系疾患の病因解明、およびそれらに対する新しい治療方法の探索を目指す研究等が含まれる。

2. 研究課題・研究者名

別紙一覧表参照

3. 選考方針

- 1) 選考は「生体と制御」領域に設けた選考委員8名と研究総括で行う。
- 2) 選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とする。
 - ・ 書類選考では1提案につき3名の選考委員が査読評価を行う。
 - ・ 書類選考の査読評価にあたっては、選考委員が応募者と近い関係にある場合には査読担当とならないように配慮する。
 - ・ 面接選考では、書類選考の順位と関係なく、改めて評価を行う。
 - ・ 面接選考において選考委員が候補者と近い関係にある場合には、その候補者の評価は棄権する。
- 3) 選考の基本的な考えは以下の通り
 - ① 「生体と制御」領域の趣旨に合致していること。
 - ② 独創性に富む発想が含まれていること。
 - ③ 独立して研究を進めることができ、活力・統率力に富み、研究グループを構成して研究を推進できる研究者であること。
 - ④ 提案された研究が予算的にも、期間的にも実施可能であること。

4. 選考の経緯

上記選考方針に基づき、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補者を選定した。

選考	書類選考	面接選考	採用者
対象者数	83名	18名	7名

5. 研究実施期間

平成14年11月～平成18年3月

6. 領域の活動状況

研究総括は研究開始に際し、全研究者を訪問し、研究者の所属する部署の長に協力を要請すると共に研究環境の確認を行った。その後、研究期間内に研究者が研究実施場所を移った際には新たな研究実施場所を訪問し、所属長に協力を要請すると共に、研究環境の確認等を行った。

研究期間中は半年に一回ずつ、総計7回の研究発表会(領域会議)を開催し、領域アドバイザーならびに研究分野を異にする研究者同士が討論の中で交流を深め、個々の研究者の視野が広がり、新しい研究の着想が得られるように留意した。また、最終年度には公開の研究報告会を開催し(東海大学校友会館)、3年間の研究成果を広く公表し、一般の評価を受けた。

7. 評価の手続き

研究総括が研究者からの報告・自己評価を基に、必要に応じて領域アドバイザーの協力を得て行った。

(評価の流れ)

平成 18 年 2 月	研究報告会開催
平成 18 年 3 月	研究報告書及び研究課題別評価提出
平成 18 年 3 月	研究総括による評価
平成 18 年 3 月	研究終了

8. 評価項目

- (1) 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、その他公表に至っていない新しい知見の取得等の研究成果の状況
- (2) 得られた研究成果の科学技術への貢献度

9. 研究結果

本領域は平成 13 年度にスタートし、昨年 10 名の第一期生を送り出したが、本年は 7 名の第二期生が所定の研究期間を無事完了することとなった。第二期生は 83 件の応募の中から、研究の独創性、論理性、他にない優れた点、研究の進め方、目的が達成された時のインパクト、研究体制などの観点から、選考委員により厳選された研究者であり、提案研究課題はいずれも国際的にもレベルの高いものである。3 年間の研究期間を終えて、得られた研究成果を見ると、荒瀬、川口、西川ら数名の研究者は提案時の目標を大きく上回る成果を挙げ、今後の発展が更に期待される。中でも西川研究者の研究成果は O157 を代表とする腸管出血性大腸菌感染症の新しい予防・治療法として大変インパクトの大きいものであり、実用化に結びつくことが切に望まれる。一方、技術的、方法的な困難さに直面し、残念ながら最初の提案課題の目標に到達しなかった研究者もいるが、こうした研究者も研究発展の基盤となるものは蓄積しており、また研究を進めていく過程で新たな方向への展開も認められ、研究期間の終了後にその成果が現れてくるものと期待される。7 名それぞれの研究成果とその評価の詳細は、個々の研究結果、自己評価および研究総括の見解に示されているが、領域総体としては概ね当初の目的が達成されたものと評価できる。

10. 評価者

研究総括 竹田 美文 株式会社 シネ・サイエンス研究所 所長

領域アドバイザー氏名(五十音順)

笹川 千尋	東京大学医科学研究所 教授
鈴木 守	群馬大学 学長
竹田 泰久	中外製薬(株)がん領域部(戦略マーケティングユニット) 部長
光山 正雄	京都大学大学院医学研究科 教授
湊 長博	京都大学大学院医学研究科 教授
宮村 達男	国立感染症研究所ウイルス第二部 部長
山西 弘一	独立行政法人医薬基盤研究所 理事長
渡邊 武	理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センター ユニットリーダー

(参考)

(1) 外部発表件数

	国内	国際	計
論文	1	56	57
口頭	96	26	122
その他	24	4	28
合計	121	86	207

※平成 18 年 3 月 28 日現在

(2) 特許出願件数

国内	国際	計
6	1	7

(3) 受賞等

✿ 藤永 由佳子

日本細菌学会平成 15 年度黒屋奨学賞(H16 年 4 月)

✿ 松本 功

平成 14 年度難病医学研究財団 研究奨励賞(H15 年 1 月)

第 16 回日本内科学会 奨励賞(H15 年 4 月)

フラテ研究奨励賞(H17 年 2 月)

(4) 招待講演

国際 8 件

国内 25 件

「生体と制御」領域 研究課題名および研究者氏名

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職 (応募時所属)	研究費 (百万円)
荒瀬 尚 (兼任)	ウイルス感染を制御する特異的レセプター群の解明と新制御法の開発 (大阪大学微生物病研究所)	大阪大学微生物病研究所 助教授 (千葉大学大学院医学研究院 助教授)	86
川口 寧 (兼任)	新しいウイルスゲノム改変系を利用した難治性ウイルスの病原機構の解明 (東京大学医科学研究所附属感染症国際研究センター)	東京大学医科学研究所附属感染症国際研究センター 助教授 (東京医科歯科大学難治疾患研究所 助教授)	77
坂口 末廣 (兼任)	プリオン病の治療とワクチン開発のための基盤構築 (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科)	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 助教授 (同上 講師)	86
西川 喜代孝 (兼任)	新規な腸管出血性大腸菌感染症治療薬の創製 (国立国際医療センター研究所)	国立国際医療センター研究所 室長 (同上)	87
藤永 由佳子 (兼任)	細菌毒素の宿主細胞内輸送機構の解明と新規治療法開発の試み (大阪大学微生物病研究所附属感染症国際研究センター)	大阪大学微生物病研究所附属感染症国際研究センター 特任助教授 (岡山大学大学院医歯学総合研究科 助手)	85
松本 功 (兼任)	自己抗体誘導性関節炎のメカニズムとその制御機構の解明 (筑波大学大学院人間総合科学研究科)	筑波大学大学院人間総合科学研究科 講師 (同大学臨床医学系内科 講師)	80
和田 昭裕 (兼任)	ヘリコバクター・ピロリの空胞化致死毒素の作用機序解析と新しい治療戦略 (長崎大学熱帯医学研究所)	長崎大学熱帯医学研究所 講師 (同上 助手)	88

研究課題別評価

1 研究課題名:

ウイルス感染を制御する特異的レセプター群の解明と新制御法の開発

2 研究者氏名: 荒瀬 尚

研究員: 白鳥 行大 (研究期間 H.15.4.1~H.16.3.31)

研究員: 荒瀬 規子 (研究期間 H.16.4.1~H.18.3.31)

技術員: 坂元 亜矢子 (研究期間 H.14.12.1~H.16.3.31)

技術員: 廣畑 糧子 (研究期間 H.16.4.1~H.18.3.31)

技術員: 松本 麻紀 (研究期間 H.16.5.1~H.18.3.31)

3 研究のねらい:

本研究では、NK細胞やマクロファージ等の自然免疫細胞が発現する抑制化と活性化レセプターから成るいわゆるペア型レセプターに関して、それらがウイルス等の病原体と共に進化してきたのではないかとする新たな仮説を立て、それに基づいた病原体の認識機構の解明を目指してきた。特に、ペア型レセプターによる病原体認識を明らかにすることによって、病原体に対する宿主の感染抵抗性決定機構や病原体の宿主免疫逃避機構を明らかにし、感染症の制御方法の開発を目的とした。

4 研究成果:

① ペア型レセプターPILRとリガンドの解析

病原体の認識に関与する新たなペア型レセプターを同定する目的で、NK細胞のcDNAライブラリーより、私どもの開発したFlag-trap法を用いて、新たな活性化ペア型レセプターPILRをクローニングした。さらに、そのリガンドとして、新規分子PILR-L1をクローニングした。PILRとPILR-L1の機能について解析を進めた結果、活性化PILRのリガンドとしてクローニングしたPILR-L1は抑制化PILRによっても強く認識されること、また、細胞によって、活性化および抑制化PILRの発現パターンが異なることを明らかにした。さらに、活性化PILRはNK細胞ばかりでなく樹状細胞の活性化制御に関与しており、新たな免疫制御分子として重要であると考えられた(Shiratori et al. *J. Exp. Med.* 2004)。

PILRのリガンドは、正常細胞では主にT細胞に発現していることが判明したが、ヒトのT細胞やマウス一部のT細胞ではPILR-L1が発現していなくても、可溶性PILRに認識された。このことから、PILR-L1以外のリガンドがT細胞に発現している可能性が考えられた。そこで、cDNAライブラリーを用いた発現クローニングや可溶性PILRに会合する分子を精製し、質量分析によりその分子を同定することにより新たなリガンドPILR-L2、L3、L4をクローニングした。

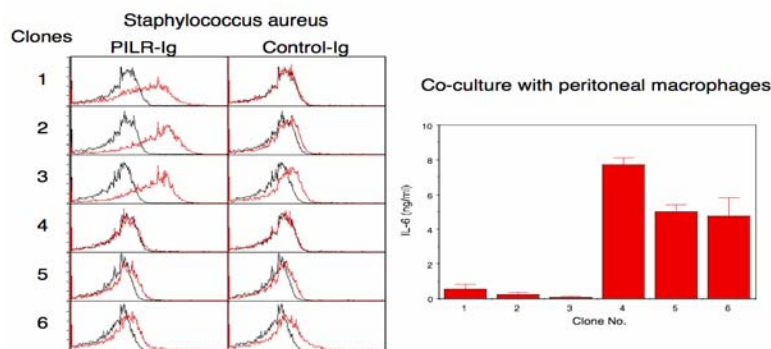
以上のようにPILRは4種類の分子を認識するが、それらにアミノ酸の相同性は全く認められなかった。さらに、いずれもO型の糖鎖修飾を受ける分子であることから、PILRのリガンド認識における糖鎖の機能を調べるために、O型糖鎖修飾阻害剤でリガンド発現細胞を処理すると、可溶性PILRに全く認識されなくなることが明らかになった。さらに、O型糖鎖修飾に関与する糖転移酵素について調べると、ある種の糖転移酵素存在下では全くPILRに認識されなくなった。実際悪性度の高い腫瘍細胞ではこの糖転移酵素の活性が低いことが知られており、PILRのリガンド認識には腫瘍細胞等に発現が認められる不完全な糖鎖構造が関与している可能性が考えられた。つまり、腫瘍細胞では、ある種の糖転移酵素を欠失することにより、PILRリガンドを発現させ免疫応答を抑制する腫瘍細胞による新たな免疫逃避機構の存在が考えられた。

② PILRによる細菌の認識

上記のように、PILRの認識に糖鎖が重要な機能を担っていることが判明した。一方、PILRがペア型レセプターであり、私どもの仮説により病原体の認識に関与している可能性が考えられた。そこで、PILRが細菌を認識するかどうかについて可溶性PILRを用いて検討した。その結果、黄色ブドウ球菌やリステリア菌が可溶性PILRによって認識されることが判明した。一方、大腸菌は可溶性PILRによって全く認識されなかった。さらに、黄色ブドウ球菌の種々のクローンを解析すると、その中に可溶性PILRに非常に良く認識されるクローンと認識され

ないクローンが存在することが明らかになった(右図)。そこで、抑制化 PILR を発現しているマクロファージと共培養すると、PILR リガンドを発現していない黄色ブドウ球菌は、マクロファージを活性化して IL-6 の産生を誘導するのに対し、PILR リガンドを発現している黄色ブドウ球菌は、ほとんどマクロファージを活性化しないことが明らかになった。以上より、ウイルスばかりでなく、ある種の細菌も、抑制化レセプターのリガンドを獲得することにより、免疫細胞の応答を制御しているという今までに知られていない細菌による全く新たな免疫制御機構が存在すると考えられた。

黄色ブドウ球菌におけるPILRリガンドの発現



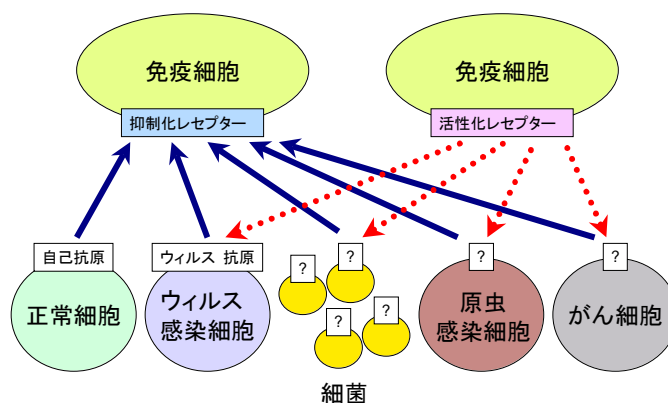
③ マラリア原虫によるペア型レセプターを介した新たな免疫逃避機構

ペア型レセプターがウイルス感染を制御する重要な分子であると言う当初の仮説に基づくと、ウイルスばかりでなく、原虫等の病原体も、免疫細胞の発現するペア型抑制化レセプターに対するリガンドを発現し、免疫応答を制御している可能性が考えられる。そこで、この仮説をウイルス以外の病原体に広げられるかどうかを検証するために、既存の 30 種類以上のペア型レセプターについて可溶性レセプターを作製し、それらのリガンドがマラリア原虫感染赤血球上に発現しているかどうかを解析した。その結果、そのうちの一つの可溶性抑制化レセプターでマラリア原虫感染赤血球が認識されることを明らかにした。さらに、細胞レベルで、抑制化レセプターが感染赤血球を認識できるかどうかを解析するために、抑制化レセプターの NFAT-GFP レポーター細胞を作製して、感染赤血球と共培養すると、レポーター細胞が活性化され GFP を発現することが明らかになった。以上より、ウイルスばかりでなく、原虫等の病原体もペア型レセプターのリガンドを獲得し、免疫応答を制御している可能性を初めて明らかにした。

5 自己評価:

本研究は、当初ウイルスを標的に研究を進め、新たなウイルスの免疫逃避機構等を解明したが(Shiratori et al. J. Immunol. 2005)、ウイルスばかりでなく、細菌や原虫そして癌細胞も、ペア型レセプターのリガンドを獲得することにより、病原体に対する免疫応答を制御している可能性が初めて明らかになった(下図)。本研究期間内に、これらの細菌や原虫の発現するリガンドの機能を解明することはできなかったが、それらの解明は、病原体に対する免疫応答を制御する上で重要な鍵となると考えられる。また、ペア型活性化レセプターに関しても、病原体を認識する活性化レセプターが、感染防御に重要な機能を担うかについて、今後明らかにする予定である。これらの研究により、ペア型レセプターとその病原体リガンドとの相互作用を制御することによる新たな感染防御法の開発が可能になると思われる。

ペア型レセプターによる病原体 認識



6 研究総括の見解:

本研究はNK細胞やマクロファージ等の自然免疫細胞が発現するペア型レセプターによる病原体認識を明らかにすることにより、病原体に対する宿主の感染抵抗性決定機構や病原体の宿主免疫逃避機構を明らかにすることを目的として行われた。その結果、まず新たなペア型レセプターとそのリガンド4種類をクローニングすることに成功した。さらにこれらレセプターとリガンドの解析により、黄色ブドウ球菌とマラリア原虫のペア型レセプター認識機構を明らかにした。これらの成果は当初の研究計画以上のものであり、関連研究領域に大きいインパクトを与えるものである。

7 主な論文等:

主要論文リスト(合計7件、*付論文は責任著者)

- 1.* Shiratori I, Yamaguchi M, Suzukawa M, Yamamoto K, Lanier LL, Saito T, Arase H. (2005) Down-Regulation of Basophil Function by Human CD200 and Human Herpesvirus-8 CD200. *J Immunol.* 175; 4441-4449.
2. Arase N, Takeuchi A, Unno M, Hirano S, Yokosuka T, Arase H, Saito T. (2005) Heterotypic interaction of CRTAM with Necl2 induces cell adhesion on activated NK cells and CD8⁺ T cells. *Int Immunol.* 17; 1227-1237.
- 3.* Shiratori, I., Ogasawara, K., Saito, T., Lanier, L. L. and Arase, H. (2004) Activation of natural killer cells upon recognition of a novel CD99-like ligand by paired immunoglobulin-like type 2 receptor. *J. Exp. Med.* 199; 525-533.
4. Ohtsuka, M., Arase, H., Takeuchi, A., Yamasaki, S., Shiina, R., Suenaga, T., Sakurai, D., Yokosuka, T., Arase, N., Iwashima, M., Kitamura, T., Moriya, H., Saito, T. (2004) NFAM1, an immunoreceptor tyrosine-based activation motif-bearing molecule that regulates B cell development and signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101; 8126-8131 (First two authors equally contributed).
- 5.* Ishikawa, S., Arase, N., Suenaga, T., Saito, Y., Noda, M., Kuriyama, T., Arase, H., Saito, T. (2004) Involvement of FcRγ in signal transduction of osteoclast-associated receptor (OSCAR). *Int. Immunol.* 16; 1019-1025.

招待講演(合計8回)

1. 荒瀬 尚 「NK細胞レセプターと微生物応答」生体防御学会シンポジウム 2003年7月
2. 荒瀬 尚 「自然免疫によるウイルス感染細胞認識機構」WAKO ワークショップ 2003年12月
3. 荒瀬 尚 「ペア型レセプターPILRによる自然免疫の活性化制御機構」炎症学会シンポジウム 2004年3月
4. Hisashi Arase 「Recognition of virus-infected cells by paired immune receptors」5th Awaji international forum on infection and immunity 2004年9月
5. 荒瀬 尚 「ペア型レセプターによる感染防御機構」阿蘇シンポジウム 2005年7月

研究課題別評価

1 研究課題名:

新しいウイルスゲノム改変系を利用した難治性ウイルスの病原機構の解明

2 研究者氏名: 川口 寧

研究員: 野沢直樹 (研究期間 H.15.4.1~H.16.4.30)

3 研究のねらい:

ヒトヘルペスウイルス群は現在までに8種類が同定され、それぞれのウイルスがヒトに多様な病態を引き起こす。単純ヘルペスウイルス(HSV: herpes simplex virus)は、ヘルペスウイルスのプロトタイプであり、ヒトに口唇ヘルペス、性器ヘルペス、脳炎、眼疾患、皮膚疾患、小児ヘルペス等を引き起こす。アメリカ合衆国では、年間1,000万人以上が再発性の性器ヘルペスに罹患し、HSV感染症単独の医療費でも、年間30億ドル(約3,500億円)であると試算されている。本研究では、HSVをモデルとし、ヘルペスウイルス研究における新しいテクノロジーの開発を試みた。また、それらを効率的に利用することによってウイルスの増殖機構および病原性発現機構を解明することを目的とした。

4 研究成果:

1. 大腸菌遺伝学とウイルス学の融合: 新しいヘルペスウイルス改変系の確立

ウイルス研究においてウイルス改変系は極めて重要な技術となる。ウイルスの増殖機構や病原性発現機構の解析には、標的ウイルス因子に改変を施した変異ウイルスの作製が必須となる。しかし、150kbp以上の巨大ゲノムを有するヘルペスウイルスの改変過程は煩雑であり、変異体の作製には熟練と長期間を要した。我々は、野生体の性状(培養細胞での増殖能、マウスでの病原性)を有した完全長のHSV感染性クローンを大腸菌に保持させることに成功した。また、様々な大腸菌のジェネティクスを利用することによって、簡便かつ迅速にウイルスゲノムに変異を導入することが可能であった。本系の確立によって、従来1~2ヶ月要した組み換えウイルスの作製が、最短1週間程度で作製することが可能になった。野生体の性状を保持した感染性HSVクローンをを用いた本改変系は、「全ての組み換え変異ウイルスおよび遺伝子治療ベクターは野生体に由来する」という事実を鑑むと、如何なるHSV研究にも利用可能であると考えられる。本系は、既に国内外30近くの研究室に分与され、HSVの基礎研究、ベクター開発に貢献している。

2. 新しいヘルペスウイルス改変系を利用したウイルス増殖機構の解明

(i) UL51 遺伝子産物

確立されたHSV改変系を利用して、機能が未同定なUL51遺伝子のノックアウトウイルスを作製・解析した。その結果、UL51ノックアウトウイルスの核内でのウイルス粒子形成は野生体と同等であったのに対し、細胞質や細胞外でのウイルス粒子形成は、野生体と比して著しく低下していた。よって、UL51遺伝子産物が、核外におけるウイルス粒子成熟過程に大きな役割を果たしていることが明らかになった。

(ii) UL13 遺伝子産物

UL13はHSVがコードするプロテインキナーゼ(PK: protein kinase)である。UL13ノックアウトウイルスの解析から、UL13はウイルス遺伝子の発現制御をしていることが報告されていた。しかし、UL13はウイルス粒子構成因子としても機能していることより、UL13ノックアウトウイルスの表現型が、PK活性によるものか、PK以外の機能によるものかは不明であった。本研究で確立したHSV改変系を利用することによって、UL13のタンパク質は発現するが、そのPK活性は消失している組み換えHSVを作製した。作製された組み換えウイルスは、ウイルス増殖能に関してはUL13ノックアウトウイルスと同様な表現系を示したが、ウイルス遺伝子発現制御に関しては異なる表現系を示した。以上の結果は、UL13のPK活性はウイルスの増殖に寄与しているが、ウイルス遺伝子の発現制御には関与していないことを示している。UL13は、PK以外の未同定な機能を有し、その機能がウイルス遺伝子の発現制御をしていることが明らかになった。

3. ウイルスプロテインキナーゼの試験管内アッセイ系の確立と機能発現機構の解明

(i) 全てのヘルペスウイルスで保存されているPKの機能: 宿主細胞PKcdc2の模倣

周知のように、PKによるタンパク質のリン酸化は、標的タンパク質の活性制御を司る最も一般的な修飾であり、様々な細胞機構(転写、翻訳、細胞周期、タンパク質分解系、アポトーシス、etc.)がリン酸化によって制御されている。増殖過程の大部分を宿主細胞に依存しているウイルスにとって、様々な細胞機構を制御するPKを保

持っていることは、好都合であると考えられる。また、ウイルス PK はウイルス特異酵素であることより、新しい抗ウイルス剤の理想的な標的であるともいえる。このように、ウイルス PK はウイルス増殖機構や抗ウイルス戦略を考える上で魅力的な研究対象であるにも関わらず、その機能発現機構は不明な点が多かった。我々は、従来困難であると考えられていた HSV PK UL13 の試験管内アッセイ系を確立し、UL13 の標的因子およびそのリン酸化部位を解析した。その結果、UL13 と宿主細胞 PK cdc2 が、標的因子の同一部位をリン酸化することが明らかになった。また、UL13 は全てのヘルペスウイルスで保存されているが、他のヘルペスウイルスの UL13 ホモログも標的因子の cdc2 認識部位をリン酸化した。つまり、ヘルペスウイルスで保存されている PK の存在意義が宿主 PK cdc2 の模倣であることが明らかになった。Cdc2 は、転写、翻訳、細胞骨格、核膜、クロマチンといった様々な細胞機構を制御している。Cdc2 様の活性をもつ PK をウイルスが保持することは、「宿主細胞機構をのっとり」というウイルスの目的遂行のためには、大きなメリットであると考えられる。また、確立された UL13 試験管内アッセイ系は、そのまま抗ヘルペスウイルス剤のスクリーニング系に応用可能である。

(ii) HSV PK Us3 の試験管内アッセイ系の確立

Us3 は HSV がコードする PK であり、UL13 と同様に古くから精力的に解析されてきたウイルス因子である。Us3 は、感染細胞におけるアポトーシスの制御、ウイルス粒子の核膜からの出芽、感染細胞における細胞骨格の制御に関与することが報告されてきた。しかし、UL13 同様に、試験管内アッセイ系の確立が困難であったために、標的基質の同定ができず、Us3 の機能発現機構は不明な点が多かった。我々は、Us3 の試験管内アッセイ系の確立に成功し、Us3 の基質を複数同定した。本アッセイ系は、今後の Us3 の機能発現機構の解明に大きく貢献するだけでなく、抗ヘルペスウイルス剤のスクリーニング系にも応用可能であると考えられる。

(iii) HSV PK UL13 と Us3 のクロストーク: UL13 は Us3 をリン酸化し、Us3 の下流で作用するウイルス粒子出芽因子を制御する。

感染細胞においてウイルス PK の活性がどのような機構で制御されているかはほとんど解明されていない。多くの PK は他の PK によってリン酸化されることによってその活性が制御されていることが知られている。Us3 をリン酸化する PK の同定を試みたところ、HSV UL13 が Us3 をリン酸化することが明らかになった。さらに、UL13 が Us3 の下流で作用し、ウイルス粒子の核膜からの出芽に関与しているウイルス因子 UL31 および UL34 の局在を制御していることが明らかになった。これらウイルス出芽因子の局在が、UL13 による Us3 のリン酸化によって制御される、すなわち、UL13 によるリン酸化によって Us3 の機能発現が制御されているかは仮説の域をでない。しかし、UL13 の新たな機能として、ウイルス粒子の核膜からの出芽を制御していることが明らかになった。

4. 光学顕微鏡によるウイルス粒子の可視化: 生細胞におけるリアルタイムイメージング系の確立

ウイルス粒子は微量であることより、電子顕微鏡での観察が必要であった。しかし、ダイナミックな挙動を示す HSV ウイルス因子の研究において、固定された試料を用いた解析から得られる情報は限られている。よって、同一の生細胞をリアルタイムで連続的に観察するといった動態解析が必要であった。我々は、HSV 粒子の各コンポーネントをそれぞれ異なる蛍光タンパク質で標識した組み換えウイルスを作製することにより、(i) 生きた感染細胞におけるウイルス粒子を光学顕微鏡で観察すること、(ii) 生きた感染細胞におけるウイルス粒子成熟過程の一部を可視化することに成功した。本系を利用して、テグメントタンパク質 UL47 の挙動を観察した結果、核全体に局在していた UL47 タンパク質が、カプシドタンパク質が局在する核内の点状凝集塊に集合することが明らかになった。さらに、ウイルス粒子レベルにおいても UL47 はカプシドタンパク質と核内で共局在していた。従来、HSV は主に細胞質でテグメントを獲得すると考えられていた。本研究の結果より、HSV 粒子は細胞質のみでテグメントを獲得するのではなく、核内で一部のテグメントをカプシドに付着させた後、核外へ移動し、細胞質でさらにテグメントを獲得すると考えられた。今後、生きた感染細胞におけるリアルタイムイメージングをさらに発展させることにより、あらゆるウイルスの生活環(細胞への侵入、ウイルス粒子の輸送、テグメントおよびエンベロープの獲得、出芽)の可視化が可能となると考えられる。また、リアルタイムイメージングと我々が本研究で確立したウイルス改変系を組み合わせることによって、ウイルス生活環における各イベントを制御するウイルス因子の同定も可能になると考えられる。

5 自己評価:

ヘルペスウイルス研究における新しいテクノロジーの開発に関しては、(i) 多目的に利用可能かつ簡便な新しい HSV 改変系の確立、(ii) 従来困難とされていた HSV PK UL13 および Us3 の試験管内アッセイ系の確立、(iii) 多色の蛍光タンパク質を利用した生細胞におけるウイルス粒子成熟過程の可視化といった複数の系の確立に成功した。いずれも世界に先駆けて確立したものであり、ヘルペスウイルス研究における新たなパラダイムの構築に繋がるものと考えられる。これらの系は、HSV の基礎研究だけでなく、新しい抗 HSV 戦略の構築にも貢献しうると考えられる。具体的には、(i) の HSV 改変系は、組み換えワクチンウイルスや遺伝子治療ベクター

開発の基礎となりうること、(ii)のウイルス特異 PK の試験管内アッセイ系の確立は、新たな抗ウイルス剤スクリーニングに応用可能であること、(iii) のウイルス粒子成熟過程の可視化は、抗ウイルス剤の作用機序の解明に利用可能であることなどが挙げられる。

本研究では、確立されたテクノロジーを効率的に利用して、HSV の増殖機構および病原性発現機構の一端を解明した。特に、ヘルペスウイルス PK が宿主細胞 PK を模倣するというコンセプトは、我々以外のヘルペスウイルス研究グループにも受け入れられ、これらコンセプトを支持する論文が複数報告されている。

以上、本研究においては、研究開始当初の目標に対して十分な成果を挙げたと考える。しかし、予想されたことではあるが、研究期間の約3年間で、80種類以上のウイルス因子をコードする HSV の増殖機構・病原性発現機構の全貌を明らかにすることはかなわなかった。今後は、より多面的な研究を、さらなる時間をかけて遂行する必要がある。本さきがけ研究で確立した新しいテクノロジーやコンセプトが、今後の我々の研究に大いに貢献することを信じている。

6 研究総括の見解:

本研究は単純ヘルペスウイルスをモデルとして、ヘルペスウイルス研究の為に新しいテクノロジーを開発し、それを効率的に利用することによってヘルペスウイルスの増殖機構および病原性発現機構を解明することを目的として行われた。その結果、野生株の性状を持った完全長の単純ヘルペスウイルスの感染性クローンを大腸菌に保持させることに成功した。この新しいヘルペスウイルス改変系を利用して、ウイルスの増殖機構と機能発現機構を解明した。さらに光学顕微鏡によってウイルス粒子を観察することに成功し、生きた細胞におけるウイルスのリアルタイムイメージング系を確立した。これらの成果は、当初の研究計画をはるかに超えるものであり、特に従来電子顕微鏡下で固定した試料でしか観察できなかったウイルスを光学顕微鏡下で可視化し、しかもウイルスの動きを観察できるようにした技術開発は、関連領域に極めて大きいインパクトを与えるものである。

7 主な論文等:

[論文]

1. A. Kato, M. Yamamoto, T. Ohno, M. Tanaka, T. Sata, Y. Nishiyama, and Y. Kawaguchi. (2006) Herpes Simplex Virus 1-Encoded Protein Kinase UL13 Phosphorylates the Viral Us3 Protein Kinase and Regulates Nuclear Localization of Viral Envelopment Factors UL34 and UL31. *J. Virol.* 80: 1476-1486.
2. A. Kato, M. Yamamoto, T. Ohno, H. Kodaira, Y. Nishiyama, and Y. Kawaguchi. (2005) Identification of proteins phosphorylated directly by the Us3 protein kinase encoded by herpes simplex virus 1. *J. Virol.* 79: 9325-9331.
3. N. Nozawa, Y. Kawaguchi, M. Tanaka, A. Kato, A. Kato, H. Kimura, and Y. Nishiyama. (2005) Herpes Simplex Virus Type 1 UL51 Protein Is Involved in Maturation and Egress of Virus Particles. *J. Virol.* 79: 6947-6956.
4. M. Kanamori, S. Watanabe, R. Honma, M. Kuroda, S. Imai, K. Takada, N. Yamamoto, Y. Nishiyama, and Y. Kawaguchi. (2004) Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen Leader Protein Induces Expression of Thymus and Activation-Regulated Chemokine in B Cells. *J. Virol.* 78: 3984-3993.
5. Y. Kawaguchi, K. Kato, M. Tanaka, M. Kanamori, Y. Nishiyama, and Y. Yamanashi. (2003) Conserved Protein Kinases Encoded by Herpesviruses and a Cellular Protein Kinase Cdc2 Target the Same Phosphorylation Site In Eukaryotic Elongation Factor 1 δ . *J. Virol.* 77: 2359-2368.

[招待講演]

1. Y. Kawaguchi: *In vitro* assay systems to analyze the activity of viral protein kinases encoded by HSV-1 tell us their direct substrates and role of the protein kinase activity in infected cells. 12th International Conference on Immunology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections. October 6-8, 2005, Osaka, Japan.
2. Y. Kawaguchi: Tactics of Epstein-Barr virus latent infection proteins to modify host cellular environment. シンポジウム(ウイルス感染症の病態生化学)、第 77 回日本生化学会大会、2004 年 10 月 13-16 日、横浜
3. 川口 寧: BAC システム: ヘルペスウイルスの医学的利用を加速する新しいウイルスゲノム改変法 ワークショップ(ウイルスの増殖戦略を利用したウイルス治療法、遺伝子治療法(ベクター)の開発と応用)、第 27 回日本分子生物学会年会、2004 年 12 月 8-11 日、神戸
4. 川口 寧: Epstein-Barr ウイルス潜伏関連因子による B 細胞の不死化機構、ワークショップ(見えてきたウイルス発がん)、第 137 回日本獣医学会学術集会、2004 年 4 月 2-4 日、藤沢
5. Y. Kawaguchi: Conserved protein kinases encoded by herpesviruses potentially share a function mimicking the cellular protein kinase cdc2. 11th International Conference on Immunology and Prophylaxis of Human

研究課題別評価

1 研究課題名: プリオン病の治療とワクチン開発のための基盤構築

2 研究者氏名: 坂口 末廣

研究員: 山中 仁木 (研究期間 H.15.4.1~H.18.3.31)

研究員: 石橋 大輔 (研究期間 H.15.4.1~H.18.3.31)

3 研究のねらい:

プリオン病は感染性神経変性疾患である。現在、有効な治療法及び予防法はない。本研究では、プリオン病の治療及びワクチン開発のための基盤構築を目標とした。そのための一つとして、正常プリオン蛋白(PrP^C)の生理学的機能を明らかにし、プリオン病の病態を解明することである。また二つ目は、プリオン蛋白特異抗体や siRNA による異常プリオン蛋白(PrP^{Sc})の産生抑制と治療法への応用の研究である。そして最後には、レコンビナント PrP(rPrP)を用いたプリオンワクチンの研究である。

4 研究成果:

PrP^Cの正常機能解析

我々は、独自に作製した PrP^C 欠損(Ngsk PrP^{-/-})マウスがプルキンエ細胞死を起こし、PrP^C がプルキンエ細胞の長期生存に必要であることを報告した。しかし、他の研究室で作製された Zrch I PrP^{-/-}ではこのような異常が認められなく、どうしてこのような違いが生じるのか長年謎であった。最近我々は、PrP の C 末領域と非常に高い類似性を有する PrP 類似蛋白(PrPLP/Dpl)が Ngsk PrP^{-/-}マウスの脳特異的に異所性に過剰に発現していることを見出した。そこで我々は、プルキンエ細胞死における PrP^Cと PrPLP/Dpl の役割について検討するために、Zrch I PrP^{-/-}マウスバックグランドに PrPLP/Dpl を発現するトランスジェニックマウスを作製した。その結果、これらのマウスは、PrPLP/Dpl の発現量に比例してプルキンエ細胞死をきたした。しかし、Zrch I PrP^{+/-}バックグランドではプルキンエ細胞は遅れて死に、Zrch I PrP^{+/+}バックグランドではプルキンエ細胞死がほとんど観察されなかった。これらの結果は、PrPLP/Dpl は神経変性作用を有し、PrP^C は PrPLP/Dpl の神経変性作用と機能的に拮抗しプルキンエ細胞の生存維持に関与していることを示した。

また我々は、一過性前脳虚血による海馬神経細胞の細胞死における PrP^Cと PrPLP/Dpl の役割について解析した。Zrch I PrP^{-/-}マウスに脳虚血を行うと、雄では強い神経細胞死が認められたが、雌では神経細胞死が認められなかった。このことは、PrP^C の機能が性差により異なることを示した。しかし、雄に女性ホルモンを投与しても神経細胞死は軽減されず、この性差は性ホルモンに関係ないことが示唆された。一方、Ngsk PrP^{-/-}マウスでは、性差による違いは認められず、雌も雄と同様に強い細胞死を示した。興味深いことに、Ca²⁺チャンネル拮抗薬の flunarizine を Ngsk PrP^{-/-}マウスに投与すると、雌では神経細胞死が緩和された。雄でもその傾向が認められたが有為な効果は認められなかった。これらの結果は、PrPLP/Dpl が Ca²⁺の負荷を増し神経細胞死を来していることを強く示唆した。また PrP^C は、PrPLP/Dpl の機能と拮抗することから、Ca²⁺の負荷を軽減することで神経細胞を保護していると考えられた。

siRNA 及び抗 PrP 抗体による PrP^{Sc}の産生抑制

我々は、PrP 翻訳領域内の異なる 5カ所の部位を標的にした PrP-siRNA#1~5 を作製し、プリオン感染神経芽細胞(ChN2a-58)を用いて、これらの PrP^{Sc} の産生抑制効果について検討した。その結果、PrP-siRNA#3 を除いて全ての PrP-siRNA において、PrP^{Sc} 産生の抑制が認められた。特に、PrP-siRNA#1 は最も強い抑制効果を示した。これらの効果は、異なるプリオン株に感染した細胞を用いても、同様であった。つまり、siRNA による PrP^{Sc} 産生の抑制は、全てのプリオン感染において有効であることを示した。次に、PrP-siRNA#1 をプリオン感染マウスの脳内また脾臓に導入し、*in vivo*における siRNA の効果を検討した。その結果、siRNA の脳内デリバリーの効率が悪く、脳内における PrP^{Sc} の減少は観察されなかった。しかし、感染脾臓では、コントロール siRNA と比較して、有意に PrP^{Sc} の減少が認められ、siRNA が *in vivo*でも効果的に PrP^{Sc} 産生を抑制できることを示した。

抗 PrP モノクロナル抗体 Sh3.9 をプリオン感染神経芽細胞(ChN2a-58)の培養上清に混入すると、その機序は不明であるが、PrP^{Sc} の産生を抑制する。そこで我々は、Sh3.9 抗体を感染マウスの脳室内に浸透圧ポンプを用いて持続投与を行い、その治療効果について検討した。感染後期の 13 週目から Sh3.9 抗体を投与しても、有意な治療効果は認められず、PrP^{Sc} の脳内蓄積の減少も認められなかった。しかし、感染中期の 8 週目から投与すると、潜伏期の延長は認められなかったが、脳内の PrP^{Sc} の蓄積は半分ほどに減少した。このことは、Sh3.9 抗体が脳内における PrP^{Sc} の蓄積を抑制するが、生命予後に重要な部位に到達出来ないために治療効果が認めら

れなかった可能性を強く示した。したがって、siRNA の場合と同様に、いかに効率良く Sh3.9 抗体を脳内にデリバリーするかが今後の課題である。

レコンビナントプリオン蛋白 (rPrP) によるプリオンワクチンの開発研究

我々は、マウス、ハムスター、ウシ、ヒツジ、ヒトのレコンビナントプリオン蛋白 (rPrP) を作製し、BALB/c マウスの腹腔内に免疫し、それぞれの抗原性について検討した。その結果、マウス rPrP は免疫寛容のため極めて弱い抗体反応を惹起したのみであったが、すべての異種の rPrP は高い抗原性を示し高い抗体産生を起こした。興味深いことに、異種 rPrP を免疫して得られたこれらの抗血清はマウス rPrP と程度の差はあるが交叉反応性を示した。このことは、異種 rPrP がマウスにおける PrP に対する免疫寛容を破綻させ、PrP に対する自己抗体を産生させる活性を有していることを示した。さらに興味深いことに、ウシとヒツジの rPrP を免疫したマウスにマウスプリオンを感染させると、マウス rPrP を免疫したマウスや非免疫のマウスと比べて、有意に潜伏期が延長することを見出した。これらの結果は、異種 rPrP が免疫寛容を破綻させるメカニズムを解明することにより、さらに強力なプリオンワクチンの開発が可能であることを示した。

プリオンの感染経路は不明であるが、最も有力なルートとして経口感染が考えられており、粘膜免疫によるプリオンワクチンの開発が重要である。そこで我々は、マウス及びウシ PrP の C 末領域 (121-231) を大腸菌のエンテロトキシンの易熱性毒素 (LT) の B サブユニットと融合したレコンビナント蛋白を作製し、マウスに経鼻接種することにより粘膜免疫の可能性について検討した。非融合のマウス PrP121-231 を経鼻接種しても自己抗体の産生は認められなかったが、LTB と融合すると僅かであるが有意に自己抗体を誘導した。このことは、LTB と融合することにより、抗原性が高められ免疫寛容を破綻させることができることを示した。また、異種 rPrP の腹腔内免疫と同様に、非融合のウシ PrP121-231 を経鼻免疫しても、マウス PrP と交叉反応性を示す抗体を誘導した。非融合のウシ PrP121-231 を免疫したときよりも、LTB 融合ウシ PrP121-231 は効率良く IgG 及び IgA を誘導した。しかし、自己抗体の産生能は増強されなかった。これらの結果は、LTB との融合が PrP の粘膜抗原性を高めることを示し、プリオン粘膜ワクチンの開発に役立つと考えられた。

5 自己評価:

PrP^C が PrPLP/Dpl や虚血による神経細胞死からの保護に重要であることを明らかにすることができ、PrP^C の正常機能の解明に貢献できたと考えている。またこれらの結果は、プリオン病でも PrP^C から PrP^{Sc} への変換による PrP^C の機能障害が、神経細胞死に関与していること示唆し、意義ある成果だと考えている。しかし、分子レベルにおける PrP^C の機能解析が進まず、プリオン病の病態と PrP^C の機能との関係に明確な解答を出すことが出来なかったことがこれからの課題として残された。

PrP^{Sc} の産生を抑制する siRNA を作製できたことはこの研究の成果の一つと考えている。また、感染マウスの脾臓に直接投与することにより、*in vivo* でも siRNA が PrP^{Sc} の産生抑制に効果があることを世界ではじめて示すことができた。しかし、脳内への効率良いデリバリーができず、siRNA の治療効果等について検討できなかったのは残念である。これからもこの研究をすすめ、ウイルスベクター等の脳内デリバリーシステムを検討していきたいと考えている。

siRNA と同様に脳内デリバリーの問題のため、抗 PrP 抗体による治療効果についても、最終的な結論が出せなかったのは残念である。現在、マイクログリアを用いた抗 PrP 抗体の脳内デリバリーシステムを開発中であり、今後ともこの研究は継続していきたいと考えている。

異種 rPrP を免疫することにより、PrP に対する免疫寛容が破綻し、高い抗体産生が得られ、プリオン病の発症を有意に遅延させることができた。この結果は、本研究の大きな成果の一つと考えている。異種 PrP が免疫寛容を破綻させたのは、分子擬態 (molecular mimicry) メカニズムによると考えられる。つまりこれらの結果は、もっと高い分子擬態性を示す分子やペプチドの開発または同定により、もっと有効なプリオンワクチンの開発が可能であることを示唆し、今後さらに発達させるべき分野だと考えている。

6 研究総括の見解:

本研究は正常プリオン蛋白の生理学的機能の解明と、プリオン蛋白特異抗体や siRNA による異常プリオン蛋白の産生抑制、およびレコンビナントを用いたプリオンワクチンの開発を目的として行われた。その結果、正常プリオンの生理学的機能として、虚血による細胞死から神経細胞を保護することに重要であることを明らかにした。また異常プリオンの産生を抑制する siRNA の作製に成功した。さらにレコンビナントを用いたプリオンワクチン開発の基礎データとして、異種レコンビナントプリオン蛋白を免疫することによって、プリオン蛋白に対する免疫寛容が破綻して高い抗体産生が得られプリオン病の発症を有意に遅延させることを証明した。これらの成果は、当初の研究目標を達成したとは言えないものの、今後の研究の発展の道筋を呈示した貴重なものである。

7 主な論文等:

論文

1. Yamanaka H, Ishibashi D, Yamaguchi N, Yoshikawa D, Nakamura R, Okimura N, Arakawa T, Tsuji T, Katamine S, Sakaguchi S: Enhanced mucosal immunogenicity of prion protein following fusion with B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Vaccine* (in press)
2. Sakurai-Yamashita Y, Sakaguchi S, Yoshikawa D, Okimura N, Masuda Y, Katamine S, Niwa M: Female-specific neuroprotection against transient brain ischemia observed in mice devoid of prion protein is abolished by ectopic expression of prion protein-like protein. *Neuroscience* 136, 281-287, 2005
3. Sakaguchi S: Prion protein, prion protein-like protein, and neurodegeneration. *Neurodegeneration and Prion Disease* edited by David R. Brown, 167-193, 2005, Springer
4. Arima K, Nishida N, Sakaguchi S, Shigematsu K, Atarashi R, Yamaguchi N, Yoshikawa D, Yoon J, Watanabe K, Kobayashi N, Mouillet-Richard S, Lehmann S, Katamine S: Biological and biochemical characteristics of prion strains conserved in persistently-infected cell cultures. *Journal of Virology*, 79, 7104-7112, 2005
5. Atarashi R, Sakaguchi S, Shigematsu K, Katamine S: The absence of prion-like infectivity in mice expressing prion protein-like protein. *EXCLI Journal*, 3: 82-90, 2004
6. Sakaguchi S: Antagonistic roles of prion protein and prion protein-like protein in neurodegeneration. *Recent Research Developments in Experimental Medicine* edited by S.G. Pandalai, 1: 47-61, 2004
7. Yamaguchi N, Sakaguchi S, Shigematsu K, Okimura N, Katamine S: Doppel-induced Purkinje cell death is stoichiometrically abrogated by prion protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 319: 1247-1252, 2004

特許

坂口末廣、石橋大輔、山中仁木: ワクチンと免疫方法 (出願番号 2005-157931)

招待講演等

1. Sakaguchi S: Roles of PrP and PrP-like protein (Doppel) in neurodegeneration. Keystone Symposium, Molecular Aspects of Transmissible Spongiform Encephalopathies (Prion Diseases). Colorado, USA 2003
2. Sakaguchi S, Ishibashi D, Yamanaka H: Efficient Induction of Prophylactic Antibodies against Prion Disease in Mice. 24th International Congress of Chemotherapy. Symposium 34: Emerging and re-emerging infectious diseases in the Western Pacific. Philippine International Convention Center, Manila, Philippine, 4-6 June, 2005
3. Sakaguchi S: Prion protein and prion diseases. 2005 Japan-America Frontiers of Engineering Symposium, November 3-5, 2005. San Jose, CA.
4. 坂口末廣: プリオン蛋白とプリオン病. 第20回日本環境感染学会総会 アフタヌーンセッション 11、神戸、2005年2月

研究課題別評価

1 研究課題名:新規な腸管出血性大腸菌感染症治療薬の創製

2 研究者氏名:西川 喜代孝

技術員:猪飼 桂 (研究期間 H.15.1.1~H.18.3.31)

3 研究のねらい:

O157:H7 などの腸管出血性大腸菌の感染は出血性大腸炎をひき起こすばかりでなく、時に溶血性尿毒症症候群 (HUS)や脳症を併発させ、むしろこれらの合併症が患者を死にいたらしめる大きな原因となっている。Shiga toxin (Stx; ベロ毒素)は腸管出血性大腸菌の産生する主要な病原因子であり、血中に侵入した Stx による腎や脳の微小血管内皮の障害が上記合併症の原因と考えられている。従って、腸管内で産生された Stx を強力に吸着して Stx の血中への侵入を阻害する Stx 吸着剤や、すでに血中に侵入したごく微量の Stx に結合してその作用を阻害する Stx 中和剤は、本感染症の有効な治療薬になると期待される。本研究では、Stx に対する結合ユニット、およびそれを集積させる核構造を独自に開発し、新規な Stx 吸着剤および Stx 中和剤を開発することを目的とする。

4 研究成果:

背景

Stx は Stx1, 2 の 2 つのファミリーに分類されるが、重篤な合併症を引き起こすのは Stx2 産生菌による場合がほとんどであり、臨床的には Stx2 のほうがより重要である。本研究では Stx2 に対する阻害活性を指標に開発を行った。Stx の B サブユニットペンタマーは、標的細胞上の受容体である糖脂質 Gb3 の糖鎖部(グロボ 3 糖)を特異的に認識する。B サブユニットモノマー上にはサイト 1-3 の 3 種のグロボ 3 糖結合サイトが存在しており、B サブユニットペンタマーはこれらのサイトを介して Gb3 とマルチバレントな結合を形成し、著しく結合親和性を高めている。従って、ある核構造にグロボ 3 糖を集積させた化合物は高親和性で Stx B-サブユニットに結合しその毒性を阻害する、Stx 阻害剤になると期待される。我々はこれまでに、カルボシランデンドリマーを核構造としてグロボ 3 糖部を集積させた一連の化合物、SUPER TWIG を用い、グロボ 3 糖を 6 個もつ SUPER TWIG が血中で Stx2 の毒性を強力に阻害することを見出し、SUPER TWIG(1)6 と名付けた。SUPER TWIG(1)6 は、マウスを用いた O157:H7 感染実験において有効性が証明された初めての Stx 中和剤である(K.Nishikawa, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99, 7669-7674, 国際出願 RTC/JP01/05717)。

結果と考察

1) SUPER TWIG の最適構造の決定

これまでにグロボ 3 糖を 12 個有する SUPER TWIG(1)12 を合成しているが、SUPER TWIG(1)12 は *in vitro* では SUPER TWIG(1)6 よりも強い Stx2 阻害活性を示すにもかかわらず、血中での Stx 中和剤としての作用は非常に弱い。このことは、血中で有効に働くためには何らかの最適構造が存在することを意味する。本研究では、末端のグロボ 3 糖数や核構造が異なる一連の SUPER TWIG を合成し、*in vitro* および *in vivo* での阻害作用を比較し、血中で有効に作用するため最適構造条件を決定した。この知見に基づき、SUPER TWIG(1)6 よりも優れた化合物、SUPER TWIG(2)18 を同定することができた(文献 2)。また、一連の Stx2 B-サブユニット mutant を用いて、これら SUPER TWIG は 3 種類あるグロボ 3 糖結合サイトのうち、サイト 3 にのみ特異的に結合していることを見出した。これまで Stx の標的細胞への結合にはサイト 1 あるいは 2 が重要な役割を果たしていると考えられていたが、この結果はサイト 3 が創薬の優れた標的になりうることを初めて示すものである。

2) Stx 吸着剤、Gb3 ポリマーの開発

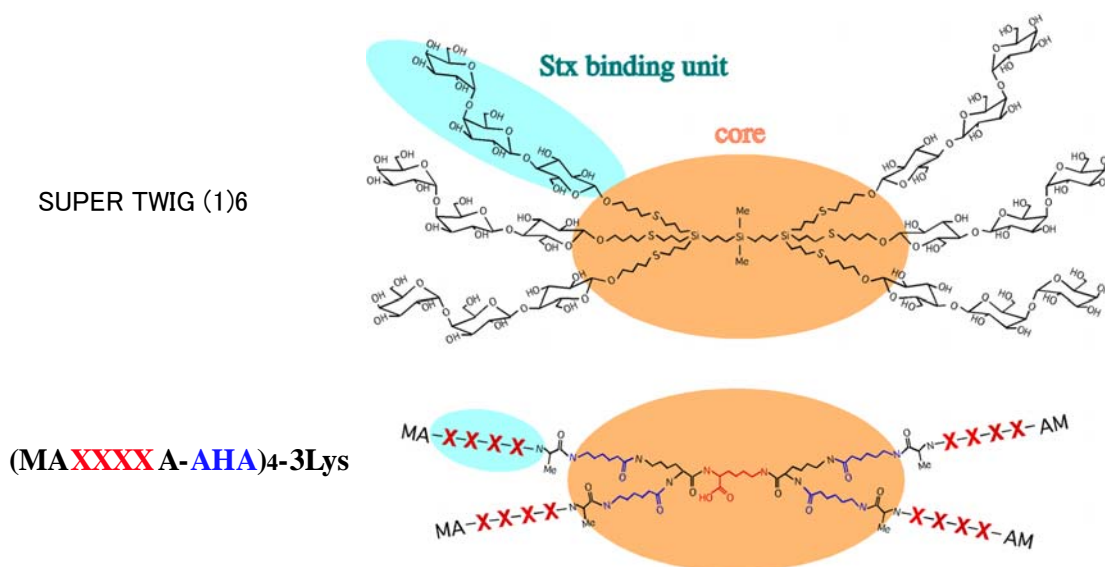
腸管内で作用することを目指した Stx 吸着剤は、経口投与が可能であることから治療的にはもちろん、予防的にも非常に重要な位置をしめており、その開発が待たれていた。しかしながら、これまで感染実験において有効性が確認された合成 Stx 吸着剤は開発されていなかった。我々は本研究において、ポリアクリルアミドポリマーを核構造としスパーサーを介してグロボ 3 糖を高密度に集積させた化合物、Gb3 ポリマーを開発した。Gb3 ポリマーは Stx に高親和性に結合し、Stx の細胞毒性を顕著に抑制した。また、Gb3 ポリマーはマウスを用いた O157:H7 感染実験において、経口投与で非常に高い治癒率を示した。Gb3 ポリマーは感染実験での有効性が確認された初めての合成 Stx 吸着剤である(文献 4; 特願 2004-108483)。また、Stx2 B-サブユニットは、Gb3 ポリマーの末端グロボ 3 糖と核構造をつないでいるスパーサー長を厳密に認識しており、スパーサー長が短くなると結合親和性が著しく低下すること、一方このような要求性は Stx1 では全く観察されないことが示された(文献 1)。本知見は、臨床的により重要な Stx2 を阻害するためには、特異的な構造が必要であることを明確に示している。

3) 新規ペプチド性 Stx 阻害剤の開発

上記 SUPER TWIG および Gb3 ポリマーの開発により、グロボ 3 糖集積型の合成化合物が本感染症の静脈投与型ならびに経口投与型治療薬となり得ることを初めて証明することができた。一方で、Stx 結合ユニットとしてグロボ 3 糖を用いることに関してはいくつかの問題点がある。すなわち、生理的リガンドとはいえグロボ 3 糖単独での Stx との親和性(Kd)は 10^{-3} M と必ずしも高くはないこと、またグロボ 3 糖ならびにグロボ 3 糖含有化合物の化学合成は非常に困難であること、の 2 点である。これらの問題がこれら化合物の臨床応用の大きな障害となっている。本研究では、臨床応用可能な Stx 阻害剤を開発するため、グロボ 3 糖よりも合成が容易で、かつ結合親和性に優れた新規 Stx 結合ユニットの同定を試みた。

3-1) マルチバレントペプチドライブラリー法

我々はこれまでに、protein kinase の触媒部位などの機能ドメインに対して直接基質モチーフあるいは結合モチーフを決定する方法、ペプチドライブラリー法を開発してきた(K.Nishikawa, et al., *J. Biol. Chem.* 272, 952-960, 1997; K.Nishikawa, et al., *J. Biol. Chem.* 273, 23126-23133, 1998; K. Nishikawa et al., *Mol. Cell*, 6, 969-, 2000; U.S. Patent Publication No. US-2003-0148377-A1)。本研究では、B サブユニットペンタマーと Gb3 との高親和性結合には糖鎖クラスター効果が存在することに着目し、ペプチドライブラリー自体を多価にするという全く新たな概念に基づいたマルチバレントペプチドライブラリーを開発した(特願 2004-295405、国際出願 PCT/JP2005/012286)。マルチバレントペプチドライブラリーの核構造は1)で決定した、Stx2 との高親和性結合に要求される SUPER TWIG の最適核構造条件を全て満たすようにデザインした(下図)。Stx2 B サブユニットペンタマーに対する高親和性結合を指標に本ライブラリーのスクリーニングを行い、4 種類の新規 Stx 結合モチーフを同定した(特願 2004-189801、国際出願 PCT/JP2005/012286)。得られたモチーフはすべて、Stx 結合ユニットとしてグロボ 3 糖よりも優れていることが Biacore を用いた結合実験から明らかとなった。



3-2) 多価型ペプチド性 Stx 阻害剤

得られたモチーフを、上記マルチバレントペプチドライブラリーの核構造に結合させて、以下の多価型ペプチド性 Stx 阻害剤を作製した(特願 2004-189801)。

PPR-tet; (MA-PPRRNRR-AU)₄-3Lys
 PPP-tet; (MA-PPRRRRR-AU)₄-3Lys
 KRR-tet; (MA-KRRNPRR-AU)₄-3Lys
 FRR-tet; (MA-FRRNRRN-AU)₄-3Lys

本 Stx 阻害剤は、いずれも Stx2 B-サブユニットおよび holo Stx2 に高親和性に結合すること、かつ Vero 細胞に対する Stx2 の細胞毒性を効率良く阻害することが示された。さらに、4 種のうち細胞毒性阻害活性が最も高かった PPP-tet, PPR-tet について、マウスを用いた O157 感染実験における効果を検討したところ、治療的に経口投与した場合にも非常に高い治癒効率を示すことが明らかとなった。これら多価型ペプチド性 Stx 阻害剤は、グロボ 3 糖集積型阻害剤の問題点をすべてクリアすることから、臨床応用への可能性が極めて高いと期待される。

5 自己評価:

本研究の目標は以下の2点である。

- 1) 糖鎖含有型 Stx 阻害剤の開発。
- 2) 糖鎖に代わる全く新しいタイプの Stx 阻害剤の開発。

1)については、我々がすでに世界にさきがけて開発した SUPER TWIG について、その最適構造を同定し、さらにその Stx 阻害メカニズムを分子論的に明らかにすることができた。また、経口投与可能な糖鎖含有型 Stx 吸着剤については、合成化合物としては世界で初めて感染実験において有効性が確認された、Gb3-ポリマーを開発することができた。Gb3-ポリマーについては *J. Infect. Dis.* 誌に掲載され、掲載号にトピックスとして紹介された。また Gb3-ポリマーの合成法、ならびにその作用に関し国内特許を申請した。以上から本項目の目的は十分に達成されたと考えられる。

2)については、1)で得られた成果を十分に活用し、糖鎖に代わる新しいペプチド性 Stx 結合ユニットを世界にさきがけて開発した。本ペプチド性 Stx 結合ユニットは糖鎖ユニットで大きな問題となっていた、結合親和性の低さ、高い合成コスト、の2つの問題点を解決する画期的なユニットである。また、この際開発した新しい技術、マルチバレントペプチドライブラリー法を、国内特許2件、国際特許1件として申請することができた。さらにこのユニットを用いた全く新しいタイプの Stx 阻害剤、多価型ペプチド性 Stx 阻害剤を開発し、本化合物が感染実験において極めて優れた作用を示すことを証明した。本阻害剤は現在もっとも臨床応用に近い化合物と考えられることから、本項目についても極めて高いレベルでその目標が達成できたと考えられる。

6 研究総括の見解:

本研究は、腸管出血性大腸菌(病原性大腸菌 O157)が産生する志賀毒素(Stx)に対する結合ユニットおよびそれを集積させる核構造を開発し、新しい Stx 吸着剤および中和剤を開発することを目的として行った。その結果、まず糖鎖含有型 Stx 阻害剤を開発しその最適構造を同定するとともに阻害メカニズムを分子論的に明らかにした。また、経口投与可能な糖鎖含有型 Stx 吸着剤を合成し感染実験においてその有効性を確認した。更に、糖鎖に代わる新しいペプチド性 Stx 結合ユニットの合成に成功し、このユニットを用いて多価型ペプチド性阻害剤を開発した。本化合物は感染実験において極めて優れた Stx 阻害作用を示すことを証明した。これらの成果は、当初の研究目標をはるかに超えるものであり、特に多価型ペプチド性 Stx 阻害剤は、臨床応用に大きな期待が持たれている。

7 主な論文等:

論文5件

1. Watanabe M., Igai K., Matsuoka K., Miyagawa A., Watanabe T., Yanoshita R., Samejima Y., Terunuma D., Natori Y., and Nishikawa K., Structural analysis of the interaction between Shiga toxin B-subunits and linear polymers bearing clustered globotriose residues., *Infect. Immun.*, in press.
2. Nishikawa K., Matsuoka K., Watanabe M., Igai K., Hino K., Hatano K., Yamada A., Abe N., Terunuma D., Kuzuhara H., and Natori Y., Identification of the optimal structure for a Shiga toxin neutralizer with oriented carbohydrates to function in the circulation., *J. Infect. Dis.*, 2005, 191, 2097-2105.
3. Yamamoto E. T., Mizuno M., Nishikawa K., Miyazawa S., Zhang L., Matsuo S., and Natori Y., Shiga Toxin-1 causes direct renal injury in rats., *Infect. Immun.*, 2005, 73, 7099-7106.
4. Watanabe, M., Matsuoka, K., Kita, E., Igai, K., Higashi, N., Miyagawa, A., Watanabe, T., Yanoshita, R., Samejima, Y., Terunuma, D., Natori, Y., and Nishikawa, K., Oral therapeutic agents with highly clustered globotriose for treatment of Shiga toxigenic *Escherichia coli* infections., *J. Infect. Dis.*, 2004, 189, 360-368.
5. Yamasaki, C., Nishikawa K., Zeng, X., Komatsu N, Oda T., and Natori Y., Induction of cytokines by toxins that have an identical RNA N-glycosidase activity: Shiga toxin, ricin, and modeccin., *Biochim. Biophys. Acta*, 2004, 1671, 44-50.

特許等4件

1. 国際出願番号:PCT/JP2005/012286, 発明人;西川喜代孝,名称;STX 阻害剤ペプチドとペロ毒素中和剤並びに毒素中和性ペプチドのスクリーニング方法, 出願日;2005年6月28日
2. 出願番号;特願 2004-295405, 発明者;西川喜代孝, 名称;毒素中和性ペプチドのスクリーニング方法, 出願日;2004年10月7日
3. 出願番号;特願 2004-189801, 発明者;西川喜代孝, 名称;STX2 阻害性ペプチドとペロ毒素中和剤, 出願日;2004年6月28日
4. 出願番号;特願 2004-108483, 発明者;西川喜代孝, 松岡 浩司、照沼 大陽、喜多英二、幡野 健、名取泰博、渡邊美帆, 名称;ペロ毒素中和剤, 出願日;2004年3月31日

招待講演等；海外1、国内3

- 1) Nishikawa, K., THERAPEUTIC AGENTS WITH CLUSTERED CARBOHYDRATES FOR TREATMENT OF STEC INFECTIONS., 5th International Symposium on 'Shiga Toxin (Verocytotoxin) – Producing *Escherichia coli* Infections', 2003, Symposium.
- 2) テーマ「細菌感染症と病原性」
演題名-新規 O157 感染症治療薬
西川喜代孝、特定領域研究「感染の成立と宿主応答の分子基盤」細菌領域若手部会、東京大学医科学研究所、2005/10/6-10/7
- 3) テーマ「多様化する感染症と立ち向かう基盤的研究」
演題名-抗腸管出血性大腸菌剤の創製。
西川喜代孝、第 15 回感染研シンポジウム、2005/5/23。
- 4) テーマ「病原因子の解明と医療への応用」
演題名-ベロ毒素阻害剤の開発-腸管出血性大腸菌感染症治療薬をめざして。
西川喜代孝、第 87 回日本細菌学会関東支部総会、2004/11、シンポジウム

研究課題別評価

1 研究課題名:細菌毒素の宿主細胞内輸送経路の解明と新規治療法開発の試み

2 研究者氏名:藤永由佳子

技術員:株本 祐子 (研究期間 H.15.4.1~H.17.12.31)

3 研究のねらい:

多くの細菌毒素は微量で宿主細胞の機能分子に特異的作用を及ぼし、結果的に宿主に致死など大きな影響を与える。細菌毒素がこのような強力な作用を発揮できる理由の一つとして一般的に考えられているのは、多くの細菌毒素が微量でも宿主の機能に影響を与えることができる酵素であるということである。もう一つ重要な細菌毒素の特質として、作用する基質に効率よくターゲティングする機構すなわち巧みな輸送機構をもつ場合が多いことが挙げられる。その輸送機構は、もともと細胞が基本的・生理的にもっている膜輸送系やオルガネラの機能をうまく利用している場合が多いと考えられる。従って細菌毒素の輸送経路の研究は、毒素による病態発現機構の解明という意義に加えて、従来知られていなかった宿主細胞の基本的で重要なしくみを明らかにできる可能性も秘めている。いずれにしてもこのような研究は外来病原因子の侵入に対する宿主の防御システムを理解し制御する上で重要である。

我々は腸管上皮細胞を場として毒素の輸送機構の研究を展開しているが、この細胞は多くの細菌毒素がその毒性を発揮するための標的となり、あるいは宿主動物へ侵入する際の門戸となっている。本 project では、前者の例として腸管上皮細胞に作用して細胞内 cAMP を上昇させるコレラ毒素、後者の例として腸管上皮細胞バリアを通過してボツリヌス食中毒を引き起こすボツリヌス神経毒素複合体の輸送経路の解明を目指す。

4 研究成果:

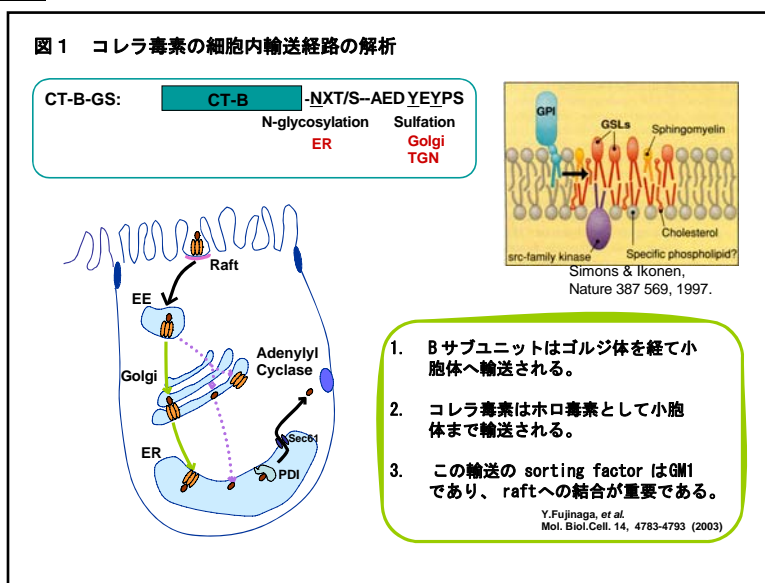
1) コレラ毒素の腸管上皮細胞内輸送経路の解明

コレラ毒素は、小腸上皮細胞の apical 側から取り込まれ、細胞質中の Gs タンパク質を ADP-リボシル化することにより cAMP の上昇を引き起こし、下痢を起こすことはよく知られているが、腸管上皮細胞内でどのように輸送されて Gs に到達するのかは不明であった。我々は、コレラ毒素の sulfation によりゴルジ体への移行と、glycosylation により小胞体への移行を検出することで、コレラ毒素の輸送経路を明らかにすることに成功した(図 1)。毒素はホロ毒素の状態で細胞膜から小胞体まで輸送されること、そしてその輸送は B サブユニットが主体となり、B サブユニットが脂質ラフト中の GM1 に結合することで行われていることが明らかになった。一方、脂質ラフトに存在していない糖脂質は毒素をゴルジ体や小胞体まで輸送しない。

コレラ毒素以外の毒素やウイルスでその病原性を発揮するために小胞体へ輸送されるものがいくつかある。最近その多くがガングリオシドに結合して小胞体へ輸送されることがわかってきた。したがって本経路は多くの病原因子が細胞質に到達しその病原性を発揮するために利用する共通の経路であることが明らかになってきた。(本研究の一部をさきがけ事業で行った。)

2) ボツリヌス毒素複合体の腸管上皮バリア通過機構の解析

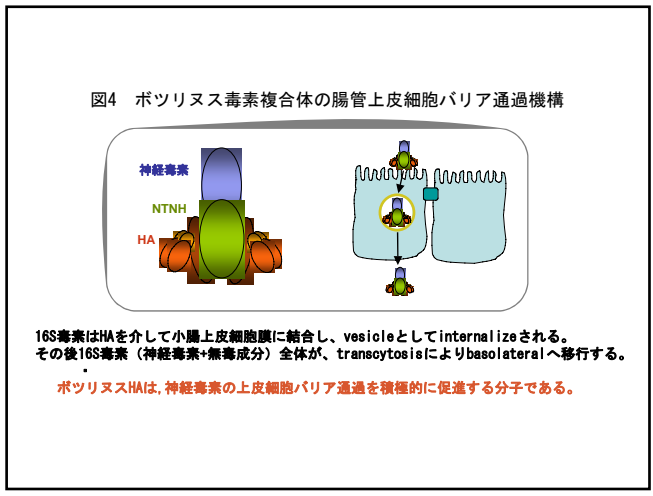
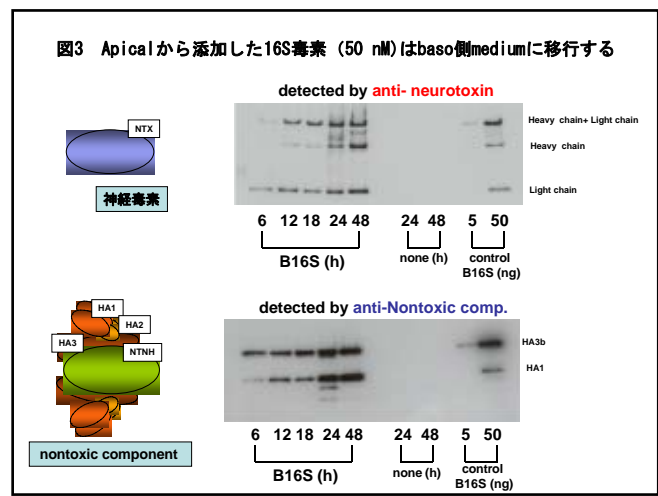
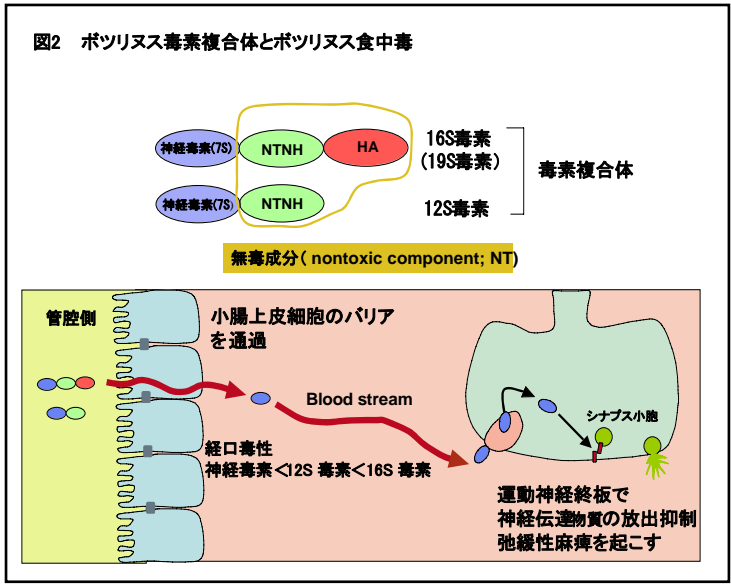
ボツリヌス食中毒は、ボツリヌス神経毒素(7S 毒素、約 150 kDa のタンパク質、A 型~G型)により引き起こされる(図 2)。本神経毒素はメタロエンドペプチダーゼであり、末梢神経細胞に取り込まれた場合シナプス小胞とシナプス前膜の fusion に関わる SNARE を特異的に切断することにより神経伝達物質の放出を抑制する。個体(ヒトあるいは動物)においては、末梢運動神経の弛緩性麻痺を引き起こし呼吸困難による致死をもたらす。本食中毒発症には、神経毒素が消化管から吸収され、血中に移行し末梢運動神経に到達することが必要である。このような巨大分子である神経毒素が体内に侵入する際の最初の重要な関門は消化管上皮細胞のバリア機能である。一方、本毒素は



常に無毒成分との複合体(12S 毒素および 16S 毒素など)として *C. botulinum* が産生する。12S 毒素は 7S 毒素に無毒性で赤血球凝集活性のないタンパク質である NTNH が結合したものであり、16S 毒素は 12S 毒素に無毒性で赤血球凝集活性をもつ Hemagglutinin (HA) が結合したものである。19S 毒素は 16S 毒素の二量体である。それらの経口毒性は 7S 毒素 < 12S 毒素 < 16S 毒素と、大きい分子量の複合体毒素の方が著しく強いことが知られているが、その理由については、無毒成分に神経毒素を消化液から保護する作用があること以外は不明であった。

我々は 16S 毒素が HA を介して小腸上皮細胞に特異的に結合することを以前に見出している。この結合様式の解析をさらに進め、HA の 4 つのサブユニットの中で HA1 と HA3b に腸管上皮細胞への結合活性があること、およびそれぞれが異なる糖鎖を認識することを本研究期間に明らかにした。

次に我々は HA などの無毒成分が神経毒素の腸管上皮細胞バリア通過を促進するのか、またどのような相互作用をするのかを分子レベルで検討する目的で、ヒト腸管上皮細胞株 Caco-2 および T84 を用いた *in vitro* 腸管上皮細胞バリアモデルで解析を行った。その結果、B 型 16S 毒素 50nM を apical から添加した場合は、細胞間のバリアである tight junction には変化が見られなかったが、basolateral の培地中には神経毒素および無毒成分(HA1 と HA3b) が移行していることが western blot によって確認された(図 3)。さらに蛍光ラベルした無毒成分を apical から添加した場合の局在を confocal 顕微鏡で観察した結果、無毒成分は小胞状で取り込まれた後、おそらく transcytosis によって basolateral 側へ移行していることが観察された。以上の結果より、16S 毒素は HA を介して腸管上皮細胞の apical 側へ結合した後、transcytosis により神経毒素を basolateral 側へ移行させることが示唆された(図 4)。



5 自己評価:

コレラ毒素の輸送系の研究は継続的な研究であったため、当初の目標をほぼ達成できた。ポツリヌス神経毒素の研究は、毒素の精製、抗体作製、*in vitro*、*in vivo* の assay 系の確立を行い、毒素の移行に関しての現象を発見することは期間内に行うことができたが、そのメカニズムについての研究は期間内の成果として公表するところまでには至らなかった。引き続き研究を行い、現象とそのメカニズムの解明を含めた形で、期間終了後一年以内に論文発表などにより公表していきたい。

6 研究総括の見解:

本研究は、腸管上皮細胞を毒性発揮の標的としているコレラ毒素と、腸管上皮細胞を宿主への侵入門戸としているポツリヌス毒素について、毒素の細胞内輸送経路を明らかにすることを目的として行った。その結果、コレラ毒素はホロ毒素の状態では細胞膜から小胞体まで輸送されること、その輸送は B サブユニットが脂質ラフト中の GM1 が

ングリオシドに結合することで行われていることを明らかにした。一方ボツリヌス毒素については、毒素の精製、抗体作製。*in vitro*, *in vivo* の assay 系の確立を行ったものの、毒素の移行に関しての現象の解析を行うには至らなかった。今後の研究に期待したい。

7 主な論文等:

論文

1. Fujinaga Y, Wolf AA, Rodighiero C, Wheeler H, Tsai B, Allen L, Jobling M, Rapoport T, Holmes RK, Lencer WI. Gangliosides that associate with lipid rafts mediate transport of cholera and related toxins from the plasma membrane to ER. *Mol. Biol. Cell.* 14(12): 4783-93 (2003).
2. Fujinaga Y, Inoue K, Watarai S, Sakaguchi Y, Arimitsu H, Lee J, Jin Y, Matsumura T, Kabumoto Y, Watanabe T, Ohyama T, Nishikawa A, Oguma K. Molecular characterization of binding subcomponents of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin for intestinal epithelial cells and erythrocytes. *Microbiology* 150:1529-1538 (2004).
3. Nishikawa A, Uotsu N, Miura Y, Fujinaga Y, Nakada H, Ohyama T, Sakano Y, Oguma K. The receptor and transporter for internalization of *Clostridium botulinum* Type C Progenitor Toxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319(2): 327-33 (2004).
4. Fujinaga Y.: Interactions of botulinum progenitor toxin and cholera toxin with host intestinal epithelial cells. *J. Toxicol.Toxin Rev.* (*in press*)
5. Fujinaga Y.: Transport of bacterial toxins into target cells: pathway followed by cholera toxin and botulinum progenitor toxin. *J.Biochem.* (*in press*)

受賞

日本細菌学会平成 15 年度黒屋奨学賞

招待講演

第 29 回阿蘇シンポジウム(2005 年 7 月)

研究課題別評価

1 研究課題名:

自己抗体誘導性関節炎のメカニズムとその制御機構の解明

2 研究者氏名: 松本 功

研究員: 安河内 孝徳 (研究期間 H.15.4.1~H.18.3.31)

技術員: 張 華 (研究期間 H.15.11.1~H.18.3.31)

3 研究のねらい:

K/BxN 関節炎モデルでは、解糖系 glucose-6-phosphate isomerase (GPI) に対する自己抗体が単独で関節炎を惹起する。これらのことより、関節特異的抗原に対する免疫応答とは別の、ユビキタスな抗原により誘導される関節炎が存在する。また、この抗原 GPI をある特定種のマウスに免疫することによって関節炎を惹起できる。これら 2 種のモデルマウスより得られた知見と、ヒト関節リウマチ (RA)、特に抗 GPI 抗体陽性患者と比較解析し、共通の pathway を探索統合することにより真の関節炎の病態解明、及び新規治療法の開拓を目指す。

4 研究成果:

I. ヒト RA での抗 GPI 抗体—病因性に関して

RA ではリウマトイド因子、抗 CCP 抗体など多くの自己抗体が頻出し、抗 CD20 抗体が奏功することより、病態に直接関与している可能性が指摘されている。マウスで関節炎原性が証明されている抗 GPI 抗体は、RA 患者において約 15% と頻度は低いが、陽性患者においては関節炎の病勢を反映しており、関節外症状を伴う重度の RA に陽性者が多い (Hayashi T, et al. Mod. Rheumatol. 2005)。ただし、その他関節炎でも同定できることがあり、病因性についていくつかの検討を行った。マウスに直接ヒト型抗 GPI 抗体を投与しても、今までのところ関節炎は惹起できていない。そこで、我々は抗 GPI 抗体を含む IgG を、遺伝的に我々に近いと考えられるサル指関節内に直接投与したところ、IgG の軟骨表面への沈着、C5a レセプターを保持する細胞群の流入に伴う滑膜炎が証明された。これらのことより抗 GPI 抗体を含む RA 患者血清 IgG 軟骨表面に直接沈着し、単独で弱い滑膜炎を起こすことができるが、関節炎を起こすには十分でないことが考えられた (Suzuki, et al. Autoimmunity Reviews 2005, Matsumoto I, et al. Int. J. Mol. Med 2005)。

自己抗体と炎症性サイトカイン、あまりつながりが無いように思われる 2 つの分子だが、RA ではどのような関係にあるのだろうか。関節炎原性がありうると考えられる抗 GPI 抗体を保持していても関節炎が起きない健康人 (HS) では、炎症性サイトカインにつなげる分子に異常があるのではないかと考え、抗 GPI 抗体 HS9 人 (158 人中) に着目した。ではなぜこれらの人は関節炎を起こさないのだろうか? K/BxN マウスの抗 GPI 抗体移入の遺伝子解析により、protective な因子は Fcγレセプター、C5 が推測されている。われわれはヒトでアフィニティーの変化が起こるポリモルフィズムがすでに同定されている 2 つの刺激性 Fcγレセプター (FcγRIIIa-158V/F、FcγRIIIa-131H/R) に注目し、そのポリモルフィズムを比較検討した。187 人の RA (うち 23 人が抗 GPI 抗体陽性)、158 人の HS (うち 9 人が抗 GPI 抗体陽性) のゲノムより RFLP 法を用いてポリモルフィズムを解析したところ、FcγRIIIa においては抗 GPI 抗体陽性 HS では 9 人中 8 人がアフィニティーの弱い 158F のホモであった。一方、抗 GPI 抗体陽性 RA 患者では 158V を持つ患者が 6 割をしめ、有意差をもって抗 GPI 抗体陽性健康人に 158F が多いことが検定された ($p=0.019$)。しかしながら、FcγRIIIa にはこのような傾向が全く認められなかった。さらに、高親和性の FcγRIIIa-158V/V の homozygous の RA 患者、HS に注目して比較解析すると、ヒト GPI、ウサギ GPI 両者に対して、明らかに反応性の違いが見られた ($p=0.0027$, $p=0.0015$)。一方抗 GPI 抗体陰性群の RA、HS の比較では差が認められなかった。これらのことより FcγRIIIa-158F は関節炎原性抗体の防御因子であることが考えられ、この遺伝子多系により関節炎原性抗体から逃れている可能性が示唆された。実際、FcγRIIIa はマウス抗 GPI 抗体の解析より、自己抗体の関節腔内への流入、及び関節内での免疫複合体の活性化に寄与していることが判明しているため、この遺伝子多系が 2 箇所関節炎に関与していることを示唆した (Matsumoto I, et al Arthritis Res. Ther. 2005)。

関節炎と自己抗体をつなげるその他の分子、特に獲得免疫を担う T 細胞はどのようなのであろうか。抗 GPI 抗体強陽性患者 (RA15 人、SLE4 人、HS4 人) に着目し、MACS サイトカイン分泌アッセイで GPI 反応性 Th1/Th2 細胞の同定を試みた。RA 患者では 15 人中 7 人より GPI 反応性 IFN γ 産生 T 細胞が、4 人より IL-4 陽性 T 細胞が同定され、それら患者は HLA-DR *0405 ないしは *0901 を保持していた。SLE や HS ではこれら GPI 反応性 T 細胞は殆ど同定できず、これらのことより HLA-DR *0405 ないしは *0901 RA 患者群において、関節炎原性抗体の産生に Th1/Th2 タイプの自己反応性 T 細胞が関与している可能性が示唆された。また、コントロール群で

の HLA-DR は一定の傾向がなく、抗 GPI 抗体産生に直接関わる要素は少ないと考えられた (Kori Y, et al. Ann. Rheum. Dis. in press)。

II. ヒト RA での抗 GPI 抗体—産生機序に関して

抗 GPI 抗体が認識する抗原 GPI は、すべての細胞内に存在する解糖系酵素であり、また細胞外サイトカイン AMF/neuroleukin/maturation factor として機能しており、自己免疫疾患や抗体産生への関与が報告されている。GPI には 24 の変異型が存在し、非球状赤血球溶血性症との関連が指摘されている。我々は、抗 GPI 抗体陽性者における抗原 GPI の変異について検討した。抗 GPI 抗体陽性および陰性 RA 患者、陽性および陰性 HS 各 5 名の末梢血単核球より GPI 全長 cDNA をクローニングし、塩基配列を比較した。すると、39 種類の欠損変異型 cDNA が得られ、欠損変異型 GPI cDNA の保持率は、抗 GPI 抗体陽性健康人において(31.5%:23/73)、陰性者(6.4%:5/78)と比較して有意に高かった($p < 0.001$)。また抗 GPI 抗体陽性 RA 患者(28.6%:22/77)では、陰性者(1.6%:1/63)と比べて有意に高かった($p < 0.0001$)。これらのことから、欠損変異型 GPI の存在により、epitope spreading などの機序により GPI に対する自己抗体が産生されている可能性が示唆された (Muraki Y, et al. Biochem. Biophys. Research. Commun. 2004)。

III. GPI 免疫モデルでの解析—B 細胞及び免疫グロブリンの重要性

ヒトリコンビナント GPI を DBA/1 マウスに免疫すると 100%関節炎を発症する。同様に native rabbit GPI 抗原を免疫しても関節炎が起きることから、GPI に対する免疫応答が DBA/1 マウスにおいて関節炎と関与しているのは確実である。RA における GPI に対する免疫応答の意義をさらに理解する為に、本研究ではもう 1 つの GPI 依存性モデルである DBA/1 マウスの GPI 免疫関節炎モデルを中心に検討を進めた。現在までの検討では、GPI 免疫関節炎マウスよりの血清や、IgG 成分だけでは関節炎が転移できていない。また、Fc γ R を欠損したマウスに GPI を免疫しても関節炎は発症しないが、抑制性の Fc γ RIIb を欠損したマウスでは関節炎が悪化する。この GPI 免疫マウスでの B 細胞の役割はどうなのだろうか？まず細胞移入により関節炎が転移できるかどうかを確認するために、SCID マウスに GPI 免疫マウス脾臓細胞を抗原 GPI とともに腹腔内投与した。すると関節炎がわずか 3 日で転移できることが明らかになった。さらにこれらの免疫担当細胞で関節炎に重要なものを同定するため CD19⁺B 細胞、CD4⁺陽性 T 細胞を MACS で depletion すると関節炎の発症が起きなくなる。これら行われてきた検討と関節炎を起こしているもの、起こしていないものの抗 GPI 抗体価で比較したところ、この自己抗体が存在するようになり関節炎が発症すること、また出現しないものでは関節炎は起きないことが明らかになり、同様にこれら欠損させた細胞群が関節炎発症に重要であることが明らかになった。

IV. GPI 免疫モデルでの解析—TNF α 依存性関節炎での制御機構

このモデルは TNF α 依存性が大変強く、TNF antagonist でほぼ完全に関節炎が抑制できる。厚生省研究班で、生物製剤で着目されている抗 TNF α 抗体の治療抵抗性 RA 患者では、IFN inducible gene の発現が亢進していることがつきとめられ、サイトカイン同士の相互関係に注目が集まっている。我々は GPI 免疫関節炎発症直後の脾臓細胞より CD4⁺細胞を分離し、マイトマイシン処理した抗原提示細胞と GPI とともに培養し、抗原特異的に産生されるサイトカインを Cytometric Beads Array (CBA) システムを用いて比較解析した。対照としては関節炎抵抗性 C57Bl/6 マウスを用いた。すると関節炎マウスの脾臓細胞を用いた検討では抗原特異的に TNF α 、IFN γ が産生された。これらのサイトカインは関節炎発症に重要な意味を持っていると考えられるが、これらのサイトカインの hierarchical な関係や、細胞内シグナルで重要な pathway はどうなのだろうか。抗原特異的な炎症性サイトカインを抗原刺激で誘導後、共刺激分子の抗体(抗 CD40L 抗体、抗 ICOS 抗体、CTLA-4Ig など)や抗サイトカイン抗体(抗 TNF α 抗体、抗 IFN γ 抗体、抗 IL-12 抗体など)を用いてこれらサイトカインの抑制実験を行った。すると共発現分子では CTLA-4Ig が TNF α 、IFN γ を抑制し、抗サイトカイン抗体では抗 TNF α 抗体のみが他のサイトカインを制御することが判明した。また、JAK inhibitor, SN50 (NF κ B inhibitor) を使って抑制実験を行ったところ、NF κ B inhibitor で劇的に全てのサイトカインを抑制することができた。しかし、JAK inhibitor はまったく無効であった。これらのことより、これら抗原特異的なサイトカインの制御は NF κ B を介して行われ、IFN γ レセプターを介するシグナルの関与は否定的と考えられた。またこのモデルで発現亢進する 1 つの TNF α 関連遺伝子 (TIF-X) に注目し、その分子が関節炎早期で RNA レベルでも蛋白レベルでも強発現すること、Exon3 を欠損した spliced variant がその関節炎時に出現すること、この分子に対するポリクローナル抗体が抗原特異的な IL-10 を誘導すること、さらに興味深いことに、ヒト RA 滑膜でもこの分子が同定されることを現在までに明らかにしている。今後この分子を介しての関節炎制御機構について深く検討していきたい。

5 自己評価:

ヒト抗 GPI 抗体の病因的意義の解析が第 1 の目標であったが、サルを使った解析や、媒介役としての Fc γ RIIIa の遺伝子多型の解析でやや全貌が見えたと感じている。また、もう 1 つの目標はヒトの細胞、及びヒト型抗体を用いた疾患モデルの作製であった。しかし、実際は他動物の生体内での反応をヒト細胞で再現する難しさ、例えば

非常に RA 自体が heterogeneity の高い疾患であること、自分たちが考えていた以上に抗 GPI 抗体の陽性率が低かったこと、サンプルの供給源、つまり RA 患者からの定期的採血が困難であったことなどの理由が、解析研究を進めるにつれはつきりし、それを遂行する上での意義にも乏しさが出たことがあげられ、自分自身深く反省している。今後は GPI 免疫モデルで得られた知見をもう 1 度ヒトに還元しなおし、さきがけ研究で得られた成果をもとに、RA 自身の自己免疫応答を制御する機構を明らかにしたい。

6 研究総括の見解:

本研究は、自己抗体誘導関節炎のメカニズムとその制御機構を解明することを目的とし、ヒト抗 GPI 抗体の病的意義の解析、ヒトの細胞およびヒト型抗体を用いた疾患モデルの作製を目標とした。結果としては一定の結論を得るに至らず、しかも他動物の生体内での反応をヒト細胞で再現することの難しさ、抗 GPI 抗体の陽性率が予想と違って高くなかったこと、サンプルの供給源が限定されていたこと等の理由から、今後は解析研究を遂行する意義が乏しいという考えに至った。今後は得られた成果について、もう一度作業仮説を立て直して研究を進めることを望む。

7 主な論文等:

1. Muraki Y, Matsumoto I, Chino Y, Hayashi T, Suzuki E, Goto D, Ito S, Murata H, Tsutsumi A, Sumida T. Glucose-6-phosphate isomerase variants play a key role in the generation of anti-GPI antibodies. Possible mechanism of autoantibody production. *Biochem. Biophys. Research. Commun.* 2004; 323:518-522.
2. Suzuki T, Muraki Y, Yasukochi T, Zhang H, Kori Y, Hayashi T, Wakamatsu E, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumichika H, Sumida T, Matsumoto I. Intraarticular injection of IgG from anti-glucose-6-phosphate isomerase antibodies positive patients with rheumatoid arthritis induces synovitis in cynomolgus monkeys. *Autoimmunity Reviews* 2005; 4: 475-478.
3. Hayashi T, Matsumoto I, Muraki Y, Takahashi R, Chino Y, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T.: Clinical characteristics of anti-glucose-6-phosphate isomerase antibodies positive Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 2005; 15; 258-263.
4. Matsumoto I, Muraki Y, Yasukochi T, Zhang H, Kori Y, Hayashi T, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Ikeda K, Sumichika H, Sumida T. The exploration of joint-specific immunoreactions on immunoglobulins G of anti-glucose-6-phosphate isomerase antibody-positive patients with rheumatoid arthritis. *Int. J. Mol. Med* 2005; 16: 793-800.
5. Matsumoto I, Zhang H, Muraki Y, Hayashi T, Yasukochi T, Kori Y, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T. A functional variant of Fcγ receptor IIIA is associated with rheumatoid arthritis in anti-glucose-6-phosphate isomerase antibodies-positive individuals. *Arthritis. Res. Ther.* 2005; 7: 1183-1188.
6. Kori Y, Matsumoto I, Zhang H, Yasukochi T, Hayashi T, Iwanami K, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T. Characterization of Th1/Th2 type, glucose-6-phosphate isomerase reactive T cells in the generation of rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*(in press)

受賞 3 件

平成 14 年度難病医学研究財団 研究奨励賞(平成 15 年 1 月)
第 16 回日本内科学会奨励賞(平成 15 年 4 月)
フラテ研究奨励賞(平成 17 年 2 月)

招待講演 10 件

1. 第 10 回自己抗体と自己免疫 シンポジウム 自己抗体誘導性関節炎のメカニズムと制御 平成 15 年 3 月 8 日 経団連会館 経団連ホール
2. 第 2 回 Osteoimmunology Forum Glucose-6-phosphate isomerase (GPI) を免疫して起きる関節炎—ヒト RA との接点 平成 17 年 3 月 12 日 東京ガーデンパレス
3. 21 世紀 COE プログラムシンポジウム 病態解明のフロンティア ユビキタスな蛋白に対する自己免疫関節炎—動物モデルとヒト関節炎との接点— 平成 17 年 3 月 19 日 京大会館
4. 第 49 回日本リウマチ学会総会 シンポジウム 自己免疫疾患発症の分子機構と制御 GPI 誘導性関節炎マウスの網羅的解析—ヒト抗 GPI 抗体陽性関節リウマチとの接点 平成 17 年 4 月 20 日 パシフィコ横浜
5. 第 33 回日本臨床免疫学会総会 シンポジウム 自己抗体の産生機序と病原性 関節リウマチにおける自己抗体の産生機序と病原性 平成 17 年 10 月 28 日 京都

1 研究課題名:

ヘリコバクター・ピロリの空胞化致死毒素の作用機序解析と新しい治療戦略

2 研究者氏名:和田 昭裕

研究員:山崎 栄樹 (研究期間 H.15.10.1~H.18.3.31)

技術員:前田 香代 (研究期間 H.14.12.1~H.18.3.31)

3 研究のねらい:

世界人口の半数以上の人々がヘリコバクター・ピロリに感染しており、現在では、胃炎、消化性潰瘍、MALT リンパ腫、胃癌の病因は、本菌なしでは論じられなくなっている。胃潰瘍や十二指腸潰瘍の患者において VacA 毒素を産生するヘリコバクター・ピロリが高率に分離されることなどから、本菌感染による病態成立に VacA 毒素が重要な役割を担うと考えられた。本研究では、VacA 毒素の初期効果の解析として、VacA 毒素とその受容体との相互作用をしらべる。その結果生じる細胞内での空胞化形成とミトコンドリア障害から細胞死に至る病原メカニズムを明らかにする基礎的研究を展開し、本菌感染症の新たな予防・治療法の開発につながる基盤構築を目指すことを目的とした。

4 研究成果:

VacA によるヒトの胃の病変形成を防御するためには、VacA が最初に結合する VacA 受容体との結合を阻止すること、もしくは胃の病変形成に至る情報伝達の流れを遮断する必要がある。VacA が VacA 受容体と結合するのを阻害するためには VacA が認識する構造を明らかにし、その構造を基にした結合阻害剤の開発が考えられる。

従って、VacA が認識する受容体の構造を明らかにすることを最初の研究として試みた。VacA は以前に我々が明らかにした RPTPβ を受容体とするのみならず、VacA の結合する受容体として 140kDa 蛋白質(p140)を免疫沈降をおこなった際に見出した。p140 の発現量が多く認められた G401 細胞においては RPTPβ の mRNA および蛋白質の発現は認められなかった。この p140 をピーナツレクチンカラムなどを用いて分離精製し、酵素消化およびアミノ酸配列の解析をおこなった結果、p140 は RPTPα に一致した。リコンビナントの RPTPα を Cos-7 細胞に発現させ解析してみると、RPTPα は VacA との結合が認められた。以上の結果より、VacA は RPTPβ のみならず RPTPα とも結合することがわかった。

RPTPα と RPTPβ はいずれも O-リンクの糖鎖結合部位を持ち、どちらも共通して MAA, PNA, DSA レクチンにより認識される。これらレクチンのうち、MAA のみが VacA の AZ-521 細胞における空胞化活性を阻害したことから、VacA は MAA の認識する末端糖鎖の α(2-3)結合したシアル酸を認識すると示唆された。この MAA の認識する構造はガングリオシドが持っている構造であり、種々のガングリオシドをアッセイ系に添加すると VacA の空胞化活性の阻害が認められ、なかでも GM1 が最も強い空胞化阻害を示した。GM1 のリソ体を樹脂に固相化して VacA との結合を調べてみたところ、VacA との結合が確認された。さらには、ヘリコバクター・ピロリの培養上清中で GM1 と結合する蛋白質を解析したところ、VacA が顕著に結合する蛋白質として認められた。以上の結果より、VacA はガングリオシドとも結合することがわかり、VacA の認識する構造として末端糖鎖の α(2-3)結合したシアル酸および O-リンクの糖鎖結合が重要であることがわかった。

次に、VacA による RPTPβ を介したシグナル伝達、そしてそれに続く胃の病変形成機構を明らかにする目的で、RPTPβ の siRNA を恒常的に発現した RPTPβ のノックダウン AZ-521 細胞を作製した。細胞増殖に与える影響に違いは認められなかった。VacA による空胞化活性は、RPTPβ のノックダウン細胞においては AZ-521 細胞に比べて空胞化形成が弱くなっていた。また、VacA によるチャネルの活性も弱くなっており、RPTPβ は VacA によるチャネル形成および空胞化形成に関与する事が示唆された。一方、VacA は AZ-521 細胞において MAP キナーゼである p38 や Erk1/2 の活性化を引き起こすが、RPTPβ をノックダウンしても VacA による MAP キナーゼの活性化が認められ、これら MAP キナーゼの活性化に RPTPβ が関与していないことが示唆された。

VacA による胃潰瘍形成には、VacA による細胞死や細胞剥離等が関わってくると思われる。また、VacA による細胞死には VacA がミトコンドリアに局在することによりチトクローム C の放出する経路が関与することが指摘されている。そこで、VacA の経時変化に伴う細胞内局在を AZ-521 細胞において調べてみた結果、まず VacA は細胞表面上の RPTPβ に結合し、RPTPβ を介してラフトに集まり、細胞内への侵入が認められた。しかしながら、細胞内の VacA の局在に関しては、ほとんどの VacA はミトコンドリアに局在することなく、空胞上に局在していた。主として VacA は空胞上に存在するにもかかわらず、チトクローム C の放出が認められたことより、VacA による細胞死にはシグナル伝達が関与していることが考えられた。そこで、チトクローム C 遊離に関与することが指摘されている Bax および Bak を調べてみた結果、VacA による Bax および Bak の活性化が認められた。VacA による Bax の活性化を AZ-521 細胞および RPTPβ のノックダウン細胞において比較してみた結果、AZ-521 細胞のほうが有意な Bax

の活性化が認められ、Bax の活性化に RPTPβ の関与が示唆された。

5 自己評価:

本研究はヘリコバクター・ピロリの空胞化致死毒素(VacA)による胃の病変形成の機構を明らかにし、さらに治療・予防につながる情報集積を目指して基礎的研究を遂行した。特に、VacA の最初のターゲットとなる宿主分子およびその構造を明らかにすることと VacA の作用機序を分子レベルで明らかにすることを目指して研究をおこなった。

成果として、VacA の宿主ターゲット分子は RPTPβ のみならず、RPTPα やガングリオシドにも結合すること、さらには Jurkat 細胞においてはまだ未知の受容体蛋白質にも結合することを明らかにした。また、VacA は末端糖鎖のα(2-3)結合を持つシアル酸および O-リンクの糖鎖が結合に重要であることがわかった。VacA の相互作用する宿主ターゲット分子およびその構造に関しては一定の成果はあげられたものの、VacA の認識する構造の詳細な解析は今後も継続して研究すべき課題のひとつであると思われる。これらの成果は VacA と受容体との結合を遮断するための重要な意義を持つと思われる。

一方、VacA の作用機序に関しては、VacA が MAP キナーゼの活性化を引き起こすこと、加えて Bax の活性化を介したチトクローム C の遊離がアポトーシスを引き起こすこと、これらの VacA の活性は空胞化活性とは独立して起こることを J. Biol. Chem. にそれぞれ報告した。しかしながら、これらの VacA の生物活性が上記の VacA 受容体のいずれと関係するかは不明であり、今後継続して明らかにする必要がある。

本研究で得た知見が、ヘリコバクター・ピロリ感染による多岐な疾患の治療・予防に役立つ分子基盤を構築することには未だ不完全ではあるが、初期効果を担う VacA 受容体の機能解析と正確な理解は今後の治療戦略の新たな立案に役立つものと考えられる。

6 研究総括の見解:

本研究は、ヘリコバクター・ピロリが産生する VacA 毒素の初期効果を解析し、VacA 毒素とその受容体との相互作用を調べ、その結果生じる細胞内での空胞化形成とミトコンドリア障害から細胞死に至る病原メカニズムを明らかにすることを目的とした。その結果、VacA の宿主ターゲット分子を明らかにするとともに VacA の結合に重要な糖鎖を同定した。さらに、VacA が MAP キナーゼの活性化を引き起こすこと、Bax の活性化を介したチトクローム C の遊離がアポトーシスを引き起こすこと、これらの活性は空胞化活性とは独立して起こること等を示した。以上の成果は今後のヘリコバクター・ピロリ感染とそれによる胃炎、胃潰瘍、胃ガン発症の機構解明の研究と治療戦略の研究に重要な情報を提供するものである。

7 主な論文等:

原著論文

1. Yahiro, K., Wada, A., Nakayama, M., Kimura, T., Ogushi, K., Niidome, T., Aoyagi, H., Yoshino, K., Yonezawa, K., Moss, J., and Hirayama, T., Protein-tyrosine phosphatase α, RPTPα, is a *Helicobacter pylori* VacA receptor., J. Biol. Chem., 278(21), 19183-19189, 2003.
2. Nakayama, M., Kimura, M., Wada, A., Yahiro, K., Ogushi, K., Niidome, T., Fujikawa, A., Shirasaka, D., Aoyama, N., Kurazono, H., Noda, M., Moss, J., and Hirayama, T., *Helicobacter pylori* VacA activates the p38/ATF-2-mediated signal pathway in AZ-521 cells., J. Biol. Chem., 279(8), 7024-7028, 2004.
3. Yahiro, K., Wada, A., Yamasaki, E., Nakayama, M., Nishi, Y., Hisatsune, J., Morinaga, N., Sap, J., Noda, M., Moss, J., and Hirayama, T., Essential domain of receptor tyrosine phosphatase β, RPTPβ, for interaction with *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin., J. Biol. Chem., 279(49), 51013-51021, 2004.
4. De Guzman, B., Hisatsune, J., Nakayama, M., Yahiro, K., Wada, A., Yamasaki, E., Nishi, Y., Yasazaki, S., Azuma, T., Ito, Y., Ohtani, M., van der Wijk, T., den Hertog, J., Moss, J., and Hirayama, T., Cytotoxicity and recognition of receptor-like protein tyrosine phosphatase, RPTPα and RPTPβ, by *Helicobacter pylori* m2VacA., Cell. Microbiol., 7(9), 1285-1293, 2005.
5. Yamasaki, E., Wada, A., Kumatori, A., Nakagawa, I., Funao, J., Nakayama, M., Hisatsune, J., Kimura, M., Moss, J., and Hirayama, T., *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin induces activation of the proapoptotic proteins Bax and Bak, leading to cytochrome c release and cell death, independent of vacuolation., J. Biol. Chem., in press.

総説

- (1) Wada, A., Yamasaki, E., and Hirayama, T., *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, VacA, is responsible for gastric ulceration., J. Biochem., 136(6), 741-746, 2004.

特許

- (1) 和田昭裕、長谷川慎、平山壽哉、山崎栄樹、前田香代、ヘリコバクター・ピロリの空胞化毒素に対する結合剤
(出願番号2005-241771)
- (2) 和田昭裕、長谷川慎、平山壽哉、山崎栄樹、ヘリコバクター・ピロリの空胞化毒素の検出試薬および検出方法
(出願番号2005-241772)

招待講演等

- (1) Akihiro Wada, and Toshiya Hirayama, Effect of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) on gastric epithelial cells., The 3rd stage surface barrier immunology study group (SBARIS) 2nd meeting & Infectious disease study group 3rd meeting., Nov., 2005, Okinawa.

学会発表 国内 20 件、国際 10 件