感染性炎症疾患に懸かる細胞内シグナル伝達機序の分子基盤解明と治療展開

炎症性疾患分子病態・治療開発チーム（課題番号：137105）

研究期間：平成 25 年 7 月 24 日～平成 28 年 3 月 31 日

研究代表者：白須直人

研究員：伊藤竜太、藤井　誠（平成 26 年 9 月 30 日まで）、堀江一郎（平成 25 年 9 月 30 日まで）

【研究成果】

＜研究開始当初の背景および目的＞

クラミジアやピロリ菌など特定の細胞内寄生菌感染により、炎症が惹起され、その後の動脈硬化の発症に関与していることが明らかになりつつある。炎症部位では、マクロファージなどの貪食細胞の活性化が見られるが、この活性化には特異な細胞内シグナル伝達機序（情報伝達分子、Ca^{2+}シグナル）が重要であることが知られている。これには種々のチャネル分子やカルシウム依存性プロテアーゼなどの分子群が主要な役割を果たしていることが推定されているが、その詳細な分子機構は未だ不明な点が多い。そこで本研究では、クラミジア等の細菌感染による炎症反応、並びにマクロファージ活性化における特異な細胞内シグナル伝達の分子機序を解明し、その知見をもとにした治療展開を目的として研究を開始した。

他方、抗炎症性の細胞外分泌小胞・エクソソームを比較的多量に分泌する間葉系幹細胞（MSC）は、その治療有効性が盛んに議論されており、標的細胞におけるインテグリンなどのシグナリング経路の活性調節が報告されている。このMSC由来エクソソームを直接的に、あるいは、抗炎症性薬剤を送達するドラッグデリバリー担体として炎症性疾患の治療に用いるべく、抗体修飾型エクソソームの開発を目指した。

【各研究者による成果と業績】

＜伊藤 竜太：カルパイン阻害剤によるクラミジア感染症治療の分子基盤解明＞

クラミジアは細胞内寄生性細菌の一種であり、性感染症、トラコーマ、クラミジア肺炎などの疾患の原因として知られており、最近では動脈硬化などにも関与することが示唆されている。クラミジアは宿主細胞へ感染後、封入体と呼ばれる膜構造物を形成し、その内部で増殖活動を行う。その際、様々なエフェクター分子の放出などにより、宿主細胞内部をクラミジア自身の増殖に適した環境に改変していると考えられる。通常、クラミジア感染症の治療には抗菌薬の投与などが行われるが、クラミジアはしばしば代謝不活性型の状態に変化して（遷延性感染）治療を長期かつ困難なものにする。

カルパインは真核生物に広く存在するカルシウム依存性プロテアーゼである。カルパインは基質タンパク質を特異的かつ限定的に切断することで、基質の活性や構造、局在およびその寿命を調節する「モジュレーター」として機能する。これまでに15のカルパインファミリーが同定されており、それぞれが厳密に特異的な基質の分解を行う。そのため、カルパインの活性不全は疾患および病態に強く関連すると考えられており、これまでに筋ジストロフィーおよび糖尿病との直接的な関与が、さらにはアルツハイマー病、神経変性、がん転移、白内障への関連性も報告されている。その一方で、カルパインの特異的な阻害剤は上記疾患における臨床治療薬としての可能性が示唆されており、ここ数年動物モデルを中心に積極的な実験および検証がなされている。

本研究に先立ち、我々は肺炎クラミジア*C. pneumoniae*が「宿主細胞における炎症反応を担う複合体inflammasomeを栄養素の獲得に利用しながら増殖する」という、新規の仮説モデルを提唱している。その一連の研究のなかで、クラミジア感染細胞に対し、カルパインの阻害剤を処理すると、感染細胞の炎症性サイトカイン産生を強く抑制し、さらにクラミジアの増殖が著しく抑制されることを見出した。これまでにクラミジアの増殖におけるカルパインの関連性を指摘した報告は皆無であり、これは新規性の高い、重要な知見と考えられた。カルパイン阻害剤のクラミジア増殖抑制に対する分子機構を解明できれば、クラミジア感染症の新規な治療薬とし

ての応用展開の可能性が開ける。そこで、カルパイン阻害剤が肺炎クラミジアの増殖を抑制するという新知見に着目し、培養細胞に対する*in vitro*感染系を用いてクラミジア感染時におけるカルパイン阻害剤の役割および増殖抑制のメカニズムの解明を目指した。

まず、クラミジアが比較的容易に感染し増殖が可能な上皮系細胞であるHeLa細胞をモデルとして用い、クラミジア増殖に対するカルパイン阻害剤の作用について調べた。肺炎クラミジア*C. pneumoniae*、性感染症クラミジア*C. trachomatis*およびマウスクラミジア*C. muridarum*をそれぞれHeLa細胞に感染させ、カルパイン阻害剤であるMDL28170の存在下および非存在下において、24および48時間後におけるクラミジア封入体の大きさ、増殖した菌の量などを観察した。その結果、MDL28170はクラミジアの種を問わず著しい増殖抑制効果を認めた。MDL28170処理を受けた感染細胞ではクラミジアの封入体はカルパイン阻害剤の濃度依存的に小さく、また増殖に伴うクラミジア菌数も有意に低い結果が得られた。また、カルパイン阻害剤がクラミジア増殖サイクルのどの段階に影響をあたえるのかを検討するため、HeLa細胞にクラミジアを感染後、12時間および24時間経過した後にMDL28170を培養上清中に添加し、48時間後に細胞内の封入体の大きさおよび菌数を比較した。その結果、12時間後よりカルパイン阻害剤を添加したサンプルでは封入体の有意な生育の抑制が見られまた菌数も低かったのに対し、感染24時間後よりカルパイン阻害剤処理を施したサンプルではカルパイン阻害剤未添加群とほぼ同等の生育を示した、このことから、カルパイン阻害剤はクラミジア感染後12 ～ 24時間という限られた期間に強い影響を与えることが示唆された。

次に、MDL28170以外のカルパイン阻害剤においてもクラミジア増殖の抑制効果が見られるかを検討した。HeLa細胞に肺炎クラミジアを感染させ、６種類のカルパイン阻害剤MDL28170、カルペプチン、ALLN、カルパスタチン、E64dおよびPD150606をそれぞれ50μMの濃度にて培養上清中に添加し、48時間後におけるクラミジア封入体の大きさ、増殖した菌の量などを比較した。その結果、MDL28170、カルペプチンおよびALLNについてはクラミジア増殖抑制効果が認められたのに対し、残るカルパスタチン、E64dおよびPD150606の３種については有意なクラミジア増殖抑制効果を示さなかった。クラミジア増殖抑制効果を示すMDL28170、カルペプチンおよびALLNの化学構造を検討した結果、疎水性アミノ酸２残基から構成される特徴的な構造を有していたことから、この疎水性の２アミノ酸構造がクラミジアの増殖に何らかの影響をあたえることが推測された。

次いで、クラミジア以外の細胞内寄生菌に対するカルパイン阻害剤の増殖抑制効果について調べるため、*Listeria monocytogens*を用い、クラミジアの時と同様に、感染後のMDL28710およびカルペプチンの処理によって細胞内増殖に影響が現れるかどうかを検討した。その結果、MDL28170およびカルペプチン処理のいずれもリステリアの細胞内増殖に影響は認められず、これらカルパイン阻害剤の効果はクラミジアに高選択的であることが判明した。

マウス骨髄由来マクロファージに肺炎クラミジアを感染させることで、炎症性サイトカインの産生が誘発させられること、そしてカルパイン阻害剤の処理により、炎症性サイトカイン産生を有意に低下させることは先の研究により明らかとなっている。本研究では同様の実験系において、特に細胞内シグナル伝達に着目し、カルパイン阻害剤がサイトカイン産生を抑制する分子メカニズムの解明を試みた。まず肺炎クラミジア感染に伴う炎症性サイトカインのmRNA発現を検討した結果、IL-1βおよびIL-6のmRNA発現が、MDL28170処理により有意に低下していることが明らかとなった。mRNA発現の低下は、シグナル伝達の低下によるものと推測し、IL-1βおよびIL-6発現の典型的なシグナル経路であるNF-κB経路に関して検証を行った。マウス骨髄由来マクロファージのNF-κB経路を活性化させるためリポポリサッカライド（LPS）処理を行ったところ、120分後をピークとしてNF-κB経路の最終ステップであるp65タンパク質の核内移行が認められた。これに対し、MDL28170処理を行うとp65の核内移行が強く阻害された。このことから、カルパイン阻害剤がクラミジア感染に伴うNF-κB経路の活性化を抑えることにより、クラミジア感染に伴うサイトカイン産生を抑制することが強く示唆された。

以上の結果は、カルパイン阻害剤がクラミジアの細胞内増殖および宿主側免疫反応を抑制することを明確とし、その仕組の一端を解明したものと考えられる。カルパインの阻害がどのようにしてクラミジアの増殖に影響を与えるかは未だ不明な点が多いが、カルパイン阻害剤のクラミジアに対する効果は先行する論文や知見等は今なお報告されておらず、きわめて独創的な研究であるといえる。今後、阻害剤の改良や選別、感染経路の変更などを検討し、マウス感染系を用いた実験へと発展させることにより、カルパインの関与する細胞内シグナリングがクラミジアの増殖に果たす役割のさらなる解明を達成できるものと期待される。

（研究業績）

Itoh R, Murakami I, Chou B, Ishii K, Soejima T, Suzuki T, Hiromatsu K. Chlamydia pneumoniae harness host NLRP3 inflammasome-mediated caspase-1 activation for optimal intracellular growth in murine macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 452

（3）: 689-694, 2014.

＜藤井　誠・堀江一郎：カチオン透過性チャネル・輸送体を標的とした炎症性疾患の病態解明＞

免疫反応を担うマクロファージは、様々な生活習慣病の病態にも関与することが明らかになり、新しい創薬標的として注目されている。近年、マクロファージ活性化のCa^{2+}シグナル機序に関してCa^{2+}透過型TRPチャネルの研究が目覚ましく進展し、単球・マクロファージのケモカイン産生にはTRPM2を介したCa^{2+}流入が必須であること（*Nat. Med.* 14：738-747, 2008; *PNAS* 109：6745-6750, 2012）、またマクロファージの貪食機能にはTRPV2を介するCa^{2+}シグナル（脱分極シグナル）が重要な役割を果たすことが明らかにされた（*Nat. Immunol.* 11：232-239, 2010）。特に、TRPM2では、活性酸素（一部、ADPリボースを介する）やTLRリガンドによる活性化機構や温度制御機構の仕組みが詳細に解明されている。しかしながら、マクロファージ活性化に関わるCa^{2+}シグナル機序の全容はまだ完全に解明されていない。そこで、本研究では、マクロファージ活性化におけるカチオン透過性チャネル・輸送体の役割を明らかにすることを目的とした。

まず、マクロファージにおけるカチオン透過性チャネル・輸送体分子群の発現パターンを定量的RT-PCR法により解析し、マクロファージ機能に寄与度の高いと思われるカチオン透過性チャネル・輸送体分子の同定を試みた。その結果、TRPM2＞TRPV2＞TRPC3＞＞other TRP channelsの順で発現量が高いことが確認できた。この結果は、これまでの論文報告の知見を支持している。同様に、カチオン輸送体群について発現パターンを解析する計画である。次に、野生型マウスおよび遺伝子改変マウスから調整した腹腔マクロファージおよび骨髄由来マクロファージ、またマクロファージ細胞株（RAW264.7、J774.1、THP-1）を用いて、real-time PCR、western blotおよび免疫染色によりカチオン透過性チャネル・輸送体分子群の発現・局在を解析する実験系の確立を検討した。これらのマクロファージ細胞を用いて、過酸化水素、TLRリガンド（LPS、zymosan）、TRPV2アゴニスト、温度などで刺激したマクロファージの免疫機能（貪食、遊走、ケモカイン遊離、活性酸素産生）におけるカチオン透過性チャネル・輸送体分子群の役割を解析する計画である。また、蛍光イオンプローブを用いた細胞内イオン濃度測定法やイオンアイソトープを用いたイオンフラックス法により、マクロファージのカチオン透過性チャネル・輸送体機能について活性評価する手法の確立を検討した。さらに、生体免疫反応におけるカチオン透過性チャネル・輸送体分子群の生理的病態的意義を解明する目的で、各種遺伝子改変マウスを用いて、DSS誘導性大腸炎モデルおよび2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸（TNBS）誘導性大腸炎モデルの病態形成（炎症反応、粘膜傷害）における標的分子群の役割を*in vivo*で解析する実験系の確立を検討した。まず、DSS誘導性大腸炎モデルの実験条件を検討した。その結果、週齢（８～12週齢）、ケージ飼育数（５匹）、DSS（デキストラン硫酸ナトリウム）濃度（３％）、DSS適用期間（７日目に普通水に戻す）の条件が最適であることを確認した。また、マウスのモニタリング項目として、体重測定、便中の血液混入（目視）、便の固さ（下痢の程度）、チップ交換頻度（毎日）を確認した。大腸炎病態部位の採取は、血便・下痢が認められた直後、もしくは、体重減少が著明に認められた時期に、遠位結腸を採材し、各試験項目に供することにした。

以上の実験系の確立に約１年を要した。その後、カチオン透過性チャネル・輸送体分子群の各種遺伝子改変マウスを用いて、各種機能解析を行う予定であったが、諸事情により、本推奨研究プロジェクトを離れることとなり、ここまでの研究成果となった。

（研究業績）

Gotoh Y, Kita S, Fujii M, Tagashira H, Horie I, Arai Y, Uchida S, Iwamoto T. Genetic knockout and pharmacologic inhibition of NCX2 cause natriuresis and hypercalciuria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 456（2）: 670-675, 2015.

Kita S, Tagashira H, Gotoh Y, Fujii M, Iwamoto T. Phosphoinositide analysis using the HPLC system equipped with a fraction collector and the TSKgel SAX column. *Med. Bull. Fukuoka Univ.* 42（1）: 175-181, 2015.

Sakai Y, Hashimoto M, Enkhjargal B, Mitsuishi H, Nobe H, Horie I, Iwamoto T, Yanagimoto K. Effects of Krill-derived phospholipid-enriched n-3 fatty acids on Ca^{2+} regulation system in cerebral arteries from ovariectomized rats. *Life Sci.* 100（1）: 18-24, 2014.

Fujii M, Kita S, Gotoh Y, Horie I, Iwamoto T. Quantitative analysis and cell distribution imaging of phosphoinositides. *Med. Bull. Fukuoka Univ.* 40（3/4）: 209-217, 2013.

＜白須 直人：抗体エクソソーム・AbExの開発とDDSへの展開＞

薬剤の過剰投与や副作用を抑え、より安全かつ効果的

に治療を行う手段として、必要最小限の薬剤を、必要な時に、必要な場所に集中して供給できるようなドラッグデリバリーシステム（DDS）の開発が盛んに行われている。今日まで、高分子ミセルやリポソーム、あるいは膜透過性ペプチド等に薬効物質を担持させたDDSについて数多くの報告がなされているが、用いる担体自体の免疫原 性や、標的細胞への選択性が低いことによる 非特異的な細胞毒性によって副作用が生じることが判明しており、臨床適用への大きな 障壁となっている。また、細胞に対する RNA 干渉薬や外来遺伝子の導入による遺伝子治療には、主として機能性ウイルスベクターがデリバリーに使用されるが、同様の抗原性や標的特異性の問題に加え、ホストゲノムの不適切な部位に外来遺伝子が挿入されることに起因する細胞がん化のリスクが懸念される。したがって、これらの問題点を克服した高効率かつ高選択的な標的部位への薬効物質デリバリーシステムの開発が切望されている。また近年、生体内や培養細胞系において、種々の細胞によって分泌されることが明らかとなっている直径 30 〜 100 nmの膜小胞・エクソソームが注目されている。エクソソームは、その膜上や内包するタンパク質、さらにはmRNAやmiRNAなどの核酸分子を他の細胞へと送達することで、細胞間情報伝達を担う重要な生体物質であるが、エクソソームの生体内における機能解析は未だ黎明期にあり、これを直接DDSに応用した報告は、現在まで数報に留まっている。一方、特に再生医療の分野でその応用が期待されている間葉系幹細胞（MSC）は、自身の多分化能もさることながら、免疫抑制作用・抗炎症作用を発揮するエクソソームを多量に分泌するという特性が注目されている。そこで、本研究ではMSC由来のエクソソームをDDSの担体として用いるべく、抗体分子をエクソソーム膜上に提示させることで標的への特異性と集積性とを付与・増強したAbEx（抗体提示エクソソーム）の開発を目指すこととした。これは、MSC由来エクソソームがintrinsicに有する抗炎症作用に加え、有効な薬理作用を発揮する低分子化合物やタンパク質、あるいは核酸医薬を内包させることによって相加相乗的な治療効果を企図したものである。

本研究では、まずAbEx自体のPOCを目的として、エクソソームのマーカータンパク質であるCD63の細胞外ループに、腫瘍関連抗原として知られる癌胎児性抗原（CEA）に対する単鎖型抗体（scFv）を挿入したキメラタンパク質をコードする遺伝子を作製・クローニングしてAbEx発現コンストラクトとした。これをHEK293FT細胞に遺伝子導入し、培養上清中に分泌されるAbExの単離を試みたところ、低収量ながらも抗体分子を提示したエクソソームが得られることを確認した。単離したAbExを蛍光色素DiOにより染色し、これをヒト胃癌細胞株MKN45の培地中に添加して検鏡した結果、AbExが細胞内に顆粒状に分布する像が観察され、AbExの細胞内への取り込みが認められた。フローサイトメトリーによる解析から、他の様々なCEA発現細胞へのAbExの結合も確認されたが、一方で、その結合性は十分とはいえず、CEA陰性細胞への非特異的結合も相当程度認められた。これは、エクソソームあたりの抗体提示量が少ないこと、あるいは抗体融合タンパク質の抗原親和性が低いことが一因であると考えられた。これらの結果とAbEx の産生量自体も少ないことを鑑みて、抗体提示に用いる融合タンパク質のデザインの大幅な見直しに着手した。種々の検討の結果、腫瘍標的化に用いる分子種として完全長抗体を用いることとし、これをエクソソーム上に提示させるために、抗CEA抗体遺伝子をIgD型、すなわち膜結合型抗体遺伝子へと改変させた発現コンストラクトを作製した。併せて、間接的な抗体分子提示法の試みとして、単離エクソソームをアビジン修飾し、ビオチン化抗CEA抗体をこれに結合させたAbExの調製も行った。いずれの新規フォーマットのAbExも、CD63融合型よりも優れた標的特異性と親和性を発揮することが確認されたが、安定的な収量と抗体提示量の高いAbExの調製はやはり困難であった。現在、これらの問題を解決すべく、MSCに対するAbEx遺伝子導入とAbEx単離・精製の条件最適化を試行している。

（研究業績）

Shirasu N, Yamada H, Shibaguchi H, Kuroki M, Kuroki M. Potent and specific antitumor effect of CEA-targeted photoimmunotherapy. *Int. J. Cancer,* 135(11): 2697-2710, 2014.

Kuroki M, Shirasu N. Novel treatment strategies for cancer and their tumor-targeting approaches using antibodies against tumor-associated antigens. *Anticancer Res.* 34（8）: 4481-4488, 2014.

Shirasu N, Yamada H, Shibaguchi H, Kuroki Mo, Kuroki M. Tumor-selective near-infrared photoimmunotherapy using a human anti-CEA monoclonal antibody. *Mol. Tumor Marker Res.* 28: 27-28, 2013.

Shirasu N, Num SO, Kuroki M. Tumor-targeted photodynamic therapy. *Anticancer Res.* 33（7）: 2823-2831, 2013.

Nam SO, Yotsumoto F, Miyata K, Shirasu N, Miyamoto S, Kuroki Ma. Possible therapeutic targets among the molecules involved in the warburg effect in tumor cells. *Anticancer Res.* 33（7）: 2855-2860, 2013.