

平成 22 年 6 月 3 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790118

研究課題名 (和文) 新規ペプチド性志賀毒素阻害薬の生体内作用機構の解明

研究課題名 (英文) An orally applicable Shiga toxin neutralizer functions in the intestine to inhibit the intracellular transport of the toxin.

研究代表者

高橋 美帆 (TAKAHASHI MIHO)

同志社大学・生命医科学部・助教

研究者番号：00446569

研究成果の概要 (和文)：

本研究では Stx に対する感受性が高いウサギ腸管およびその摘出腸管片を用いた実験から、PPP-tet は、Stx2 による腸管内の体液貯留、組織破壊を効率よく阻害すること、また Stx2 の腸管上皮細胞への侵入は阻害せず、むしろ Stx2 と複合体を形成し細胞内へ蓄積することを見出した。そこで、培養 Caco2 細胞を用いてさらに検討したところ、PPP-tet は Stx2 と複合体を形成して細胞内に取り込まれるが、その後 Stx2 のゴルジ体から小胞体への小胞輸送が完全に阻害されていることが明らかとなった。この阻害機構は、すでに我々が明らかにしている Vero 細胞での PPP-tet の Stx2 阻害機構と一致している。

本研究より、個体における PPP-tet の作用部位は腸管上皮細胞であり、この細胞で Stx2 と複合体を形成し、Stx2 の細胞内輸送異常を誘導することによってその毒性発現を阻害していること、その結果 Stx2 の循環血中への侵入を阻害することにより致命的な全身障害を抑制していること、が明らかとなった。本研究により得られた知見は、PPP-tet の臨床応用に向けて、重要な情報を提供するものである。

研究成果の概要 (英文)：

We found that PPP-tet, a peptide-based Stx2 inhibitor, completely inhibited fluid accumulation in the rabbit ileum caused by the direct injection of Stx2. We also found that PPP-tet accumulated in the ileal epithelial cells only through its formation of a complex with Stx2. The complex in cultured epithelial cells blocked the intracellular transport of Stx2 from the Golgi apparatus to the endoplasmic reticulum, the process that is essential for Stx2 cytotoxicity. Our results reveal that PPP-tet functions as a potent Stx neutralizer in the intestine by altering the intracellular transport of Stx2 in epithelial cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学
キーワード：微生物・感染症学

1. 研究開始当初の背景

大腸菌 O157: H7 に代表される腸管出血性大腸菌 (STEC) による感染は、下痢や出血性大腸炎ばかりでなく時に溶血性尿毒症候群(HUS)や脳症等の重篤な合併症を併発し、死に至ることもある。本感染症の主要な病原因子は、STEC が産生するペロ毒素(Shiga toxin; Stx)である。血中に侵入した Stx が腎臓や脳等の標的臓器の血管内皮細胞を障害し、上記合併症を引き起こすと考えられている。このことから Stx の毒性を阻害する Stx 阻害薬は本感染症の有効な治療薬になると期待される。

Stx は Stx1 と Stx2 のファミリーからなるが、Stx2 の方が症状の重篤化と深く関係している。Stx は AB5 型の毒素で、A サブユニットが毒素活性をもち、B サブユニット 5 量体は標的細胞への結合を担っている。このとき各 B サブユニットは細胞膜上に存在する糖脂質 Gb3 のグロボ 3 糖部を特異的に認識する。さらに B サブユニット 5 量体では最大 15 分子のグロボ 3 糖を結合し、結合親和性を著しく亢進させている(クラスター効果)。このことから、これまでにグロボ 3 糖を Stx 結合ユニットとして用い、種々の核構造に集積させた Stx 阻害薬が開発されてきた。これら Stx 阻害薬は Stx と強く結合し、その標的細胞内への侵入を阻害する。しかしながら、グロボ 3 糖の化学合成は極めて困難であり、これら阻害薬の臨床応用の大きな障害となっていた。

最近我々は、それ自体がクラスター効果を発揮する多価型ペプチドライブラリーを開発し、本ライブラリーをスクリーニングする

ことにより新規ペプチド性 Stx 結合ユニットを同定することに成功した (特願 2004-295405、国際出願 PCT/JP2005/012286; 特願 2004-189801, K. Nishikawa et al., FASEB J., 2006)。同定したペプチドはグロボ 3 糖よりも Stx2 に対する結合親和性が高く、かつそれを 4 価としクラスター効果を発揮させたペプチド性 Stx 阻害薬 (PPP-tet; 下図)は、Stx2 の細胞毒性を強力に阻害した。さらに PPP-tet は、マウスを用いた O157 感染実験において、経口投与で極めて高い治癒効果を示した。また PPP-tet はペプチド合成装置を用いて簡便に合成することができる。以上のことから、PPP-tet は現在最も臨床応用に近い治療薬として期待されている。

興味深いことに、PPP-tet の Stx2 阻害作用メカニズムを詳細に検討したところ、PPP-tet は Stx2 の標的細胞への侵入を全く阻害しないこと、PPP-tet は Stx2 と複合体を形成したまま細胞内に取り込まれ、その結果 Stx2 の細胞内輸送異常を誘導することによって Stx2 阻害作用を発揮していることが明らかになった。このことは、PPP-tet の作用メカニズムが従来 of Stx 阻害薬とは全く異なっていることを意味している。しかしながら以上の知見は細胞レベルでの知見であり、マウス個体での作用メカニズムについては未だ明確になっていない。

2. 研究の目的

PPP-tet の個体での作用部位並びにその作用機構を明らかにし、感染実験において PPP-tet が極めて強力な治癒効果を発揮する

詳細な分子メカニズムを明確にすることを目的とする。

3. 研究の方法

Stx に対する感受性が高いウサギを用いた腸管ループ実験により Stx2 の作用評価系を作成し、本系における PPP-tet の Stx2 阻害活性を評価する。確立した系を用いて、Stx2 ならびに PPP-tet 両者の組織局在性を検討する。さらに免疫組織化学的に PPP-tet の標的組織、細胞を同定する。その上で、摘出腸管系、さらに *in vivo* に近い状態での PPP-tet の活性評価を可能にする培養細胞評価系を作成する。本系を用いて、Stx2 の細胞内輸送機構、それに及ぼす PPP-tet の作用を細胞生物学的に検討する。また、標的細胞内における PPP-tet の動態・代謝機構についても検討を行う。さらに、確立した標的培養細胞系を用いて、PPP-tet の細胞内侵入性、安定性の最適化を行い、よりすぐれたペプチド性阻害薬の同定を行う。最終的に得られたペプチド性阻害薬の感染実験レベルでの活性評価を行う。

4. 研究成果

ウサギを用いた腸管ループ実験により、PPP-tet が、Stx2 による腸管内の体液貯留、組織破壊を効率よく阻害することが示された。また摘出腸管片を用いて Stx2 ならびに PPP-tet の組織局在性を検討したところ、両者は腸管上皮細胞内において共局在することがわかった。このことから PPP-tet は Stx2 の腸管上皮細胞への侵入は阻害せず、むしろ Stx2 と複合体を形成し細胞内へ蓄積することが明らかとなった。さらに詳細な PPP-tet 阻害メカニズムを明らかにするために、培養 Caco2 細胞を用いた検討をおこなった。その結果 PPP-tet は Stx2 と複合体を形成して細胞

内に取り込まれるが、その後 Stx2 のゴルジ体から小胞体への小胞輸送が完全に阻害されていることが明らかとなった。この阻害機構は、すでに我々が明らかにしている Vero 細胞での PPP-tet の Stx2 阻害機構とよく一致する。以上から、個体における PPP-tet の作用部位は腸管上皮細胞であり、この細胞で Stx2 と複合体を形成し、Stx2 の細胞内輸送異常を誘導することによってその毒性発現を阻害していること、その結果 Stx2 の循環血中への侵入を阻害することにより致命的な全身障害を抑制していること、が明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

著者名：Watanabe-Takahashi M., Sato T., Dohi T., Noguchi N., Kano F., Murata M., Hamabata T., Natori Y., and Nishikawa K.

論文標題：An orally applicable Shiga toxin neutralizer functions in the intestine to inhibit the intracellular transport of the toxin.

雑誌名：Infection and Immunity

査読の有無：有

巻：78

発行年：2010

最初と最後の頁：177-183

著者名：Kano F, Yamauchi S, Yoshida Y, Watanabe-Takahashi M., Nishikawa K, Nakamura N, Murata M.

論文標題：Yip1A regulates the COPI - independent retrograde transport from the Golgi complex to the ER

雑誌名：Journal of Cell Science

査読の有無：有

巻：122

発行年：2009

最初と最後の頁：2218-2227

[学会発表] (計 2 件)

発表者名：高橋美帆、佐藤寿男、土肥多恵子、野口範子、加納ふみ、村田昌之、濱端崇、名取泰博、西川喜代孝

発表標題：新規ペプチド性 Shiga toxin 阻害薬の生体内作用機構の解明

学会等名：第 83 回日本細菌学会総会

発表年月日：2010年3月28, 29日
発表場所：パシフィコ横浜（横浜）

発表者名：高橋美帆、佐藤寿男、土肥多恵子、
野口範子、加納ふみ、村田昌之、濱端崇、名
取泰博、西川喜代孝

発表標題：新規ペプチド性 Stx 阻害薬の生体
内作用機構の解明

学会等名：第 13 回腸管出血性大腸菌感染症
シンポジウム

発表年月日：2009年10月16日

発表場所：大阪府立大学りんくうキャンパス
獣医学舎多目的ホール（大阪）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 2 件）

名称：Stx 毒性阻害ペプチドおよび Stx に起
因する疾患の治療薬

発明者：西川喜代孝、高橋美帆、津々木一恵
権利者：学校法人同志社

種類：特許

番号：特願 2010-019728

出願年月日：2010年1月29日

国内外の別：国内

名称：ペプチドのスクリーニング法

発明者：西川喜代孝、高橋美帆、加藤美帆子
権利者：学校法人同志社

種類：特許

番号：特願 2010-019731

出願年月日：2010年1月29日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 美帆 (TAKAHASHI MIHO)
同志社大学・生命医科学部・助教
研究者番号：00446569

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し