

令和 4 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21516

研究課題名(和文)生物資源としてのリーシュマニア原虫：免疫制御機構に着目した創薬シードの探索

研究課題名(英文)Leishmania parasites as biological resources for immunomodulatory molecules

研究代表者

後藤 康之(Goto, Yasuyuki)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：50553434

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：リーシュマニア原虫は、哺乳類の体内ではマクロファージ(M ϕ)を宿主細胞とし、その効率的な生存のためにM ϕ の活性化抑制を引き起こす。本研究では、リーシュマニア原虫が持つM ϕ 制御能力に着目して、その制御を担う原虫因子を同定することを目的とした。2020年度は主に因子同定アッセイの確立に注力して、2021年度はその系を用いて原虫由来活性物質の同定を目指した。スクリーニングの結果、複数の酵素分子を同定したが、それらの組換え体を作製したところ、必ずしも当初目的としていた酵素活性が得られなかった。そのため、系の再構築を行い、再び候補因子のスクリーニングを行ったが、2021年度内に分子同定まで出来なかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

寄生虫は宿主体内での生存のために宿主免疫応答を制御することが知られている。その分子機構を明らかにすれば、寄生虫疾患の対策はもちろんのこと、それ以外の疾患、つまりがんやアレルギーなど免疫関連疾患を制御可能な薬剤の開発に貢献することも期待できる。本研究を通して、リーシュマニア原虫には宿主免疫応答を修飾する物質が複数あること、そしてそれらはスクリーニングで同定可能であることを示した点で、将来への発展性も期待できる成果と言える。

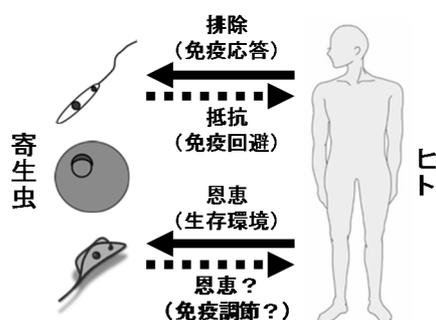
研究成果の概要(英文)：Leishmania parasites proliferate within macrophages (M ϕ) in the mammalian host, and they need to manipulate M ϕ to ensure its efficient survival. In this study, we focused on the ability of Leishmania to regulate M ϕ and aimed to identify the protozoan factors responsible for this regulation. We conducted our research by establishing screening methods, fractionating protozoan extracts, and identifying active substances. In FY2020 we succeeded to establish various screening assays, and in FY2021 fractionation-based search of active compounds were performed using the mentioned assay systems. As a result of screening, several candidate molecules were identified, but when recombinant forms of them were produced, they did not show desired activities. Therefore, we decided to improve the assays for further screening. Some active fractions were determined by the new assay, whereas we could not reach to identification of active molecules.

研究分野：免疫寄生虫学

キーワード：リーシュマニア 生物資源 免疫制御

1. 研究開始当初の背景

急性感染症を引き起こすウイルスや細菌と異なり、概して慢性的な感染を特徴とする寄生虫は、宿主適応が生存の必須条件である。例えば、赤血球に寄生するマラリア原虫は、栄養源であるヘモグロビンの代謝で生じる有毒なヘムを重合し無毒化する仕組みを獲得してきた。一方、ヒトの生体防御機構も寄生虫感染という選択圧によって形成されてきた。マラリア原虫感染に対する鎌状赤血球は代表的な例である。つまり、ヒトと寄生虫は共進化を遂げたパートナーであり、もはや寄生虫が宿主から一方的に恩恵を受けるのではなく、宿主も寄生虫から恩恵を受けていると考えられる。実際、衛生環境の改善など社会の成熟に伴い、寄生虫症が世界的に減少している一方、がんやアレルギー、自己免疫疾患といった疾患が増加している。この二者の関係について、寄生虫感染症の減少がアレルギーや自己免疫疾患の増加につながったという「衛生仮説」は、多くの論文によって裏付けられている(ペラスケス・マノフ『寄生虫なき病』)。以上のことから、『現代社会において「寄生虫がある状態」を再現すれば免疫バランスの調節がうまくいくのでは』という考え方が出てきたのは妥当である。しかしながら、免疫バランスの改変を狙った寄生虫の人工感染は、リスク・ベネフィットの観点から現実的ではない。ただし、その分子機構を明らかにすれば、がんやアレルギーなど免疫関連疾患を制御可能な薬剤の開発に貢献することが期待できる。



生物資源としてのリーシュマニア原虫 免疫制御機構に着目した創薬シードの探索

1. 貪食抑制受容体SIRPαの発現抑制因子
 - 貪食を逃れるがん細胞の排除に貢献
2. B細胞活性化因子BAFFの分泌促進因子
 - Th1型自己免疫疾患の治療やウイルス・細菌ワクチンのアジュバントとして貢献

2. 研究の目的

リーシュマニア症を引き起こすリーシュマニア原虫は、哺乳類の体内ではマクロファージ(Mφ)を宿主細胞とする。Mφは侵入した病原体を貪食・消化する働きを持つが、Mφ内で生きるリーシュマニア原虫は、その効率的な生存のためにMφの活性化抑制を引き起こす。その方法は、感染したMφに直接的に影響を及ぼすこともあれば、B細胞や制御性T細胞の活性化を通してTh1免疫応答を低下させるといった間接的なものもあり、多彩である。しかし、近縁の原虫ではB細胞マイトジェンなどが同定されているのに対して、リーシュマニア原虫が持つ免疫制御因子については明らかになっていない。本研究では、リーシュマニア原虫が持つMφ制御能力に着目して、その制御を担う原虫因子を同定し、他疾患に対する医薬品への応用を目指す。ここでは以下の2つに焦点をあてた。

貪食抑制受容体SIRPαの発現抑制因子：SIRPαはミエロイド細胞に発現し、自己細胞のCD47分子と会合することで自己細胞の貪食を抑制する受容体である。一方、がん細胞はこの仕組みを介して免疫回避を行う。抗SIRPα抗体を用いてこの「Don't-eat-me」経路を遮断するとがん細胞の排除が亢進するため、新たながん治療の標的として注目されている(Murata Y et al., Cancer Sci, 2018)。我々は原虫感染MφのSIRPα発現が抑制されることを明らかにしており(Morimoto et al., PLOS NTD, 2019; 右図)。抗体とは異なる新たな「Don't-eat-me」経路遮断法の開発が期待できる。本研究ではその抑制に関わる原虫因子を同定することを目的とした。

B細胞活性化因子BAFFの分泌促進因子：BAFFは、B細胞の活性化ならびに形質細胞の維持に重要なサイトカインである。特に細菌多糖など非タンパク性抗原に対する抗体産生に重要な役割を果たすため、BAFF誘導因子は非タンパク性抗原に対するワクチンのアジュバントとして期待できる。リーシュマニア原虫感染時には、高ガンマグロブリン血症を伴う強いB細胞の活性化が引き起こされるが、その活性化を担うのがBAFFである(Omachi et al, BBRC, 2017)。事実、内臓型リーシュマニア症患者の血中BAFF濃度は、BAFFの関与が知られる他の疾患よりも高い上昇を示す(Goto et al., AJTMH, 2014; 右表)。そこで、本研究ではBAFFの発現を誘導する原虫因子を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

マウス M ϕ 細胞株の RAW264.7 は細胞膜上に SIRP α を発現し、刺激に応じて発現を低下させる。そこでまず、RAW264.7 における SIRP α の発現低下を評価するハイスループットスクリーニング (HTS) システムの確立を目指した。細胞上の SIRP α 発現は免疫染色で解析できることから、マイクロプレートを用いた顕微鏡撮影システムもしくはフローサイトメトリーを用いることで、試験の高速化を目指した。加えて、ウェスタンブロットティングによる評価系の構築や、切断型 SIRP α を sandwich ELISA で定量する方法の検討も行った。一方、BAFF は通常時には膜結合型として M ϕ や樹状細胞、T 細胞など脾臓に多数含まれる細胞に発現している。BAFF の分泌は Furin プロテアーゼによっておこることが知られており、Furin 活性の評価には蛍光標識ペプチド Boc-RVRR-AMC の切断活性試験によって行うことが一般的である。そのため、Furin 様活性物質の探索にはまず Boc-RVRR-AMC を用いた評価を行った。加えて、BAFF 発現細胞から分泌される切断型 BAFF を sandwich ELISA で定量する方法や、蛍光タンパク質 2 種類を RVRR 配列でつないだタンパク質を用いた FRET 法の開発も行った。

本研究では将来の製品開発も視野に入れて、比較的合成の容易なタンパク質および低分子化合物を中心に探索を行った。タンパク質分画については、超音波破砕と高速遠心分離により可溶性画分と膜画分に分けた後に、各種クロマトグラフィーによる分画を行った。低分子化合物については、過去に海洋天然資源物から抗原虫活性を持つ分子を同定したように (Ishigami et al., J Org Chem, 2012) 溶媒分画により水溶性画分、脂溶性画分に分けた後に、各種クロマトグラフィーを行うことで、活性化化合物の精製を行った。

4. 研究成果

SIRP α の切断活性評価法として、まず自動撮影機能を有する蛍光顕微鏡を用いた 96-well アッセイの開発を試みた。蛍光標識の抗 SIRP α 抗体を用いて RAW264.7 細胞を染色して、自動撮影を行ったところ、細胞表面の SIRP α の発現が低下する報告のある LPS 刺激時に蛍光アッセイでも発現の低下をモニターすることができた。しかし、自動撮影ではウェル内のバラツキを十分に追うことができず、自動化 HTS への応用が難しいことが考えられた。ウェスタンブロットティングによる評価系も構築することに成功したが、これも HTS には向いていないため、活性因子の詳細な解析のための手法とすることとした。次に、切断型 SIRP α を sandwich ELISA で定量する方法の検討を行った。市販のキットを用いて切断型 SIRP α を定量したところ、LPS 刺激細胞において上清中の SIRP α が増加することを確認でき、またリーシュマニア原虫感染マウスの血清においても切断型 SIRP α が増加していることが明らかとなった。本手法は HTS に応用可能なフォーマットであるが、この市販キットは 1 プレートあたり 8 万円程度するため、大量スクリーニングをする際に予算の制約が出てくる。そこで、現在独自の ELISA を確立中である。

BAFF 切断活性試験について、前述のとおり Boc-RVRR-AMC を用いたアッセイを最初に検討した。原虫粗抽出物を硫酸沈殿により分画したところ、50-80% 画分に高い活性が見られた (図 1 左)。その画分を陽イオン交換クロマトグラフィーでさらに分画したところ、flow through 画分で高い活性が見られたため (図 1 左)、次に陰イオン交換クロマトグラフィーを行い、最も高い活性を持つ画分 (Fraction 9) を得た (図 1 右)。

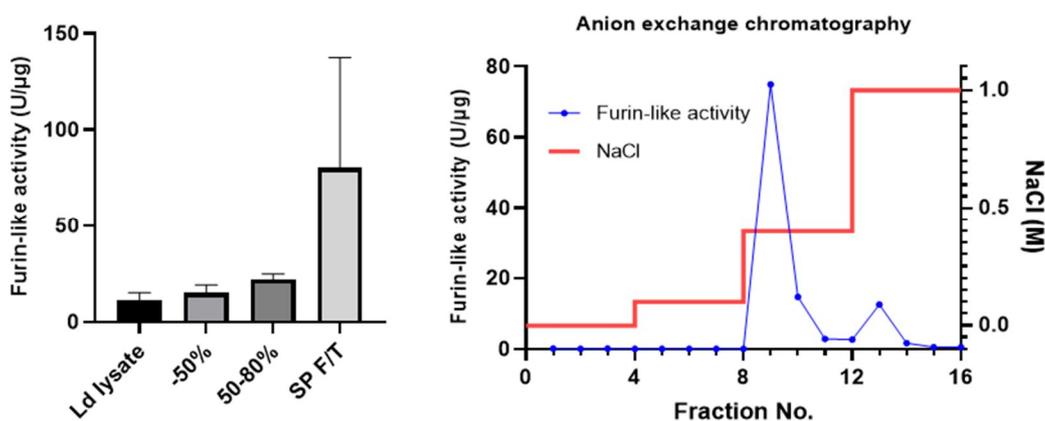


図 1. RVRR 切断活性試験を用いた Furin 様酵素活性物質の分画

そこで、Fraction 9 を SDS-PAGE に供して、ゲル切り出しを行い、複数のバンドを質量分析することで標的タンパク質の同定を試みたところ、以下に示す酵素由来と思われるペプチド配列が複数検出できた。そのため、次にこれらの酵素の組換えタンパク質を作製して、Furin 様活性があるかを検討することとした。結果、oligopeptidase b (OPB) が Fraction 9 よりも高い RVRR 切断活性を有すること、そして RVRR 認識にある程度の選択性があることが明らかとなった (図 2)。

No.	Accession	Name	pI	MW (Da)	PL (aa)	Abbreviation
1	LdBPK_050960	dipeptidyl-peptidase III, putative	5.12	75,974	679	Lddip
2	LdBPK_367060	prolyl endopeptidase	5.88	78,194	697	Ldpro
3	LdBPK_090820	oligopeptidase b	6.08	83,103	731	LdOPB
4	LdBPK_332670	metallo-peptidase, Clan MA(E) Family M32	5.30	57,020	499	Ldmet1
5	LdBPK_130090	metallo-peptidase, Clan MA(E) Family M32	5.33	57,196	503	Ldmet2

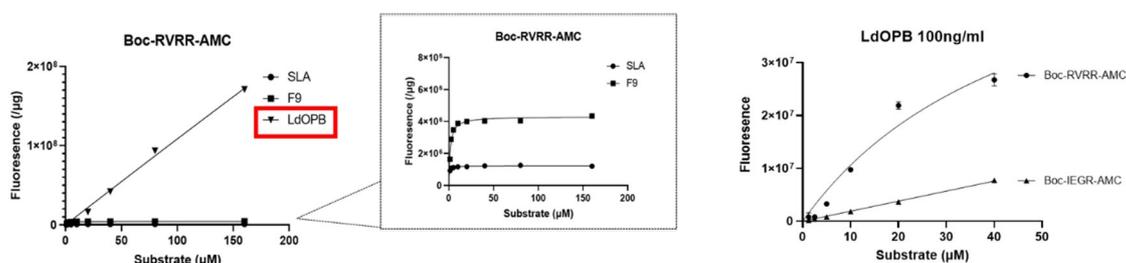


図 2 . 蛍光ポリペプチドを用いた LdOPB の RVRR 切断活性試験

RVRR 切断活性を持つ OPB であるが、異なる原虫種を用いた先行研究では「30 アミノ酸以上のポリペプチドは切断できない」という報告があったため、次にタンパク質内 RVRR 配列切断活性を調べるため、蛍光タンパク質である ECFP と Venus を RVRR リンカーでつなぐ組換え体を作成して、FRET の系を立ち上げた。その結果、OPB は Furin と異なり、タンパク質内の RVRR を切断する活性を有していないことが明らかとなった (図 3 左)。一方で、本システムを用いて原虫粗抽出物を再評価したところ、原虫粗抽出物にはタンパク質内 RVRR 配列を切断する酵素が存在することや、その切断活性は哺乳類体内での発育型である amastigote でより高いことが明らかとなった (図 3 右)。現在、前述のようにクロマトグラフィーによる分画ならびに活性評価を行っており、同様の手順でタンパク質内 RVRR 配列切断活性をもつ酵素の同定が可能であると考えている。

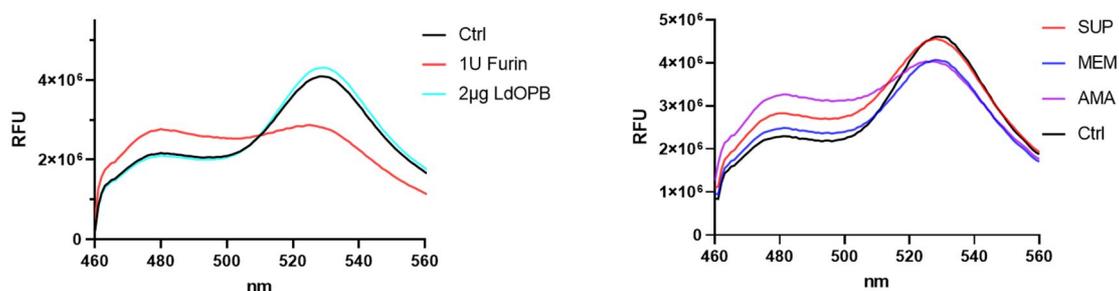


図 3 . RVRR 配列含有蛍光タンパク質を用いた RVRR 切断活性試験

SIRP α や RVRR の切断活性試験の開発に加えて、原虫感染が LPS 刺激 RAW264.7 における IL-10 産生を増強することを明らかにし、sandwich ELISA を軸とする HTS の開発も行った。こちらについても、2021 年度終了時には誘導分子の同定には至っていないが、分画による評価系ができたことで、近い将来に分子同定が可能であると考えている。また、原虫がもつ M ϕ 修飾機構について新しい知見も集まっており、それらの成果については複数の論文を投稿中・準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Goto Yasuyuki, Kuroki Akihiro, Suzuki Kengo, Yamagishi Junya	4. 巻 9
2. 論文標題 Draft Genome Sequence of <i>Leishmania tarentolae</i> Parrot Tar II, Obtained by Single-Molecule Real-Time Sequencing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00050-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MRA.00050-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kitano Hiroyuki, Sanjoba Chizu, Goto Yasuyuki, Iwamoto Kazumasa, Kitagawa Hiroki, Nomura Toshihito, Omori Keitaro, Shigemoto Norifumi, Hide Michihiro, Matsumoto Yoshitsugu, Ohge Hiroki	4. 巻 49
2. 論文標題 Complicated cutaneous leishmaniasis caused by an imported case of <i>Leishmania tropica</i> in Japan: a case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tropical Medicine and Health	6. 最初と最後の頁 20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41182-021-00312-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Maeda Kota, Sadoughi Sonya, Morimoto Ayako, Uchida Kazuyuki, Chambers James K., Sanjoba Chizu, Yamagishi Junya, Goto Yasuyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Hepatomegaly Associated with Non-Obstructive Sinusoidal Dilatation in Experimental Visceral Leishmaniasis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathogens	6. 最初と最後の頁 1356
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pathogens10111356	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Squarre D, Chambaro HM, Hayashida K, Moonga LC, Qiu Y, Goto Y, Oparaocha E, Mumba C, Muleya W, Bwalya P, Chizimu J, Chembensofu M, Simulundu E, Mwasinga W, Banda N, Mwenda R, Yamagishi J, Nalubamba KS, Banda F, Munyeme M, Sawa H, Fandamu P	4. 巻 28
2. 論文標題 Autochthonous <i>Leishmania infantum</i> in Dogs, Zambia, 2021	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Emerging Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 888 ~ 890
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3201/eid2804.212378	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Duthie Malcolm S., Goto Yasuyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Editorial: Emerging Concepts of Innate Immune Responses to Neglected Tropical Diseases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 658553
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.658553	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Current Approaches to the Development of a Vaccine against CL	4. 巻 49
2. 論文標題 Goto Yasuyuki	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Evaluation	6. 最初と最後の頁 225-232
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagai Kazuki, Goto Yasuyuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Parasitomimetics: Can We Utilize Parasite-Derived Immunomodulatory Molecules for Interventions to Immunological Disorders?	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 824695
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2022.824695	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Yasuyuki Goto
2. 発表標題 Hemophagocytosis induced by Leishmania donovani infection is beneficial to parasite survival within macrophages
3. 学会等名 The 19th Awaji International Forum on Infection and Immunity (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 後藤康之
2. 発表標題 内臓型リーシュマニア症の免疫病態：原虫感染による血球貪食の誘導とその意義
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yasuyuki Goto
2. 発表標題 Current approaches to the development of a vaccine against CL
3. 学会等名 Cutaneous leishmaniasis webinar: Knowledge gaps and challenges in managing patients suffering from CL（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中尾 洋一 (Nakao Yoichi) (60282696)	早稲田大学・理工学術院・教授 (32689)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------