

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：32653
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22591112
 研究課題名（和文） ラフトを標的とした新規の広スペクトル抗感染症薬としてのリドカインの効果の検討
 研究課題名（英文） Exploration of a novel role for lidocaine as a wide range spectrum anti-infection drug.
 研究代表者
 高桑 雄一（ TAKAKUWA YUICHI ）
 東京女子医科大学・医学部・教授
 研究者番号：40113740

研究成果の概要（和文）：

原虫感染症として熱帯熱マラリア原虫、ウイルス感染症としてネコ免疫不全ウイルスをモデルとして用い、それぞれリドカイン処理による宿主細胞膜の脂質ラフトの消失とそれに伴う感染抑制効果を確認した。マラリア原虫感染に関する詳細な検討から、原虫は脂質ラフトを介した情報伝達経路を活性化して膜骨格蛋白質デマチンをリン酸化すること、その結果膜骨格構造が緩み原虫の侵入を許容してしまうこと、リドカインはラフト消失により膜骨格の緩みを抑制し、原虫の侵入を阻害することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Plasmodium falciparum, a causative agent of malaria, and feline immunodeficiency virus were used as models for parasitic and viral infection, respectively. Lidocaine treatment disrupted lipid rafts in respective host cells and concomitantly inhibited the parasite invasion and viral entry. Detailed study revealed that malaria parasites activate raft-mediated signal transduction in host erythrocytes to phosphorylate dematin, a membrane skeletal protein. Phosphorylation of dematin results in a transient loosening of membrane skeletal meshwork, allowing the parasite invasion. Lidocaine was shown to inhibit the parasite invasion by preventing membrane skeletal loosening via disruption of lipid rafts.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科

 キーワード：脂質ラフト、リドカイン、*Plasmodium falciparum*、Feline immunodeficiency virus、
 抗感染症薬

1. 研究開始当初の背景

抗感染症治療の主流は病原体自体を標的としたものであるが、高頻度に起こる病原体遺伝子の変異による耐性株の出現の問題が常につきまとう。一方、様々な病原体の細胞侵入や病原性発現のプロセスに宿主細胞膜の脂質ラフトが関与することが報告されている。病原体よりも変異頻度が低い宿主細胞の、しかも直接遺伝子による支配を受けない脂質ラフトを標的とすれば、遺伝子変異による薬剤耐性の出現を事実上危惧する必要がなく、かつ幅広い病原体に対して効果を発揮する、全く新規の抗感染症治療が可能となる。我々が、膜コレステロール含量を維持したまま脂質ラフトを可逆的に消失させる効果を見出していた局所麻酔薬リドカインをこれに応用し、リドカインの広スペクトル抗感染症薬としての有用性の探索に着手した。

2. 研究の目的

我々が見出した「リドカインによる可逆的ラフト消失作用」を基盤として、細胞への侵入過程に宿主細胞膜の脂質ラフトが関与することが知られている病原体に対する、宿主細胞の脂質ラフトを標的として新規の広スペクトル抗感染症薬としてのリドカインの有用性を確立するとともに、その作用の分子機序を解明することを目的とする。原虫・細菌・ウイルス感染症について臨床応用に向けた基礎実験を行う。

3. 研究の方法

宿主細胞をリドカイン処理することによって、

- (1) 脂質ラフトが消失し、
- (2) 情報伝達が遮断され、
- (3) 病原体の侵入が阻害されること、
- (4) 情報伝達を再開させると侵入阻害が解除されること、

を培養細胞を用いた *in vitro* 実験系において実証する。

4. 研究成果

(1) 原虫感染症のモデルとして熱帯熱マラリア原虫を用いた。リドカインによる脂質ラフトの消失、原虫の侵入阻害は既に確認してあったので、侵入に関与する情報伝達経路の全容解明とその遮断の意義に関して詳細に検討を加え、以下の成果を得た。

- ① ATP 加水分解酵素ならびにアンタゴニストを用いた検討から、マラリア原虫が赤血球への侵入に利用している情報伝達経路は P2Y₁₁ 受容体 (プリンヌクレオチド受容体) ならびにそのリガンドとし

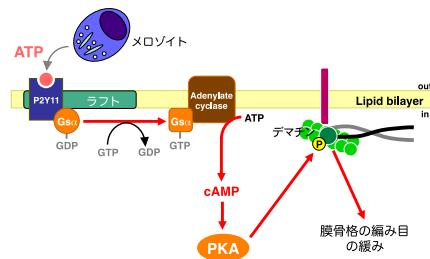
ての ATP (を含むプリンヌクレオチド) であることが明らかになった。GPCR の一種である P2Y₁₁ 受容体は三量体 G 蛋白質の G_s と共役しており、その活性化は細胞内 cAMP 濃度を上昇させ PKA を活性化することが知られている (下図参照)。

- ② 赤血球内に cAMP を封入し PKA を活性化すると、いくつかの膜蛋白質がリン酸化された。そのうち最も顕著なリン酸化の増強を示したのは膜骨格蛋白質のデマチンであった。
- ③ 赤血球を細胞外に添加した ATP で刺激すると、デマチンが PKA リン酸化されることが確認できた。リドカイン処理により脂質ラフトを消失させておくと、ATP 刺激によるデマチンのリン酸化は消失した。
- ④ デマチンはスペクトリン-アクチン間の結合を強めることにより膜骨格構造を安定化させる機能を持っていること、PKA リン酸化によりその機能が消失することを明らかにした。

この知見は、これまで不明であった赤血球におけるデマチンの生理機能に関する世界初の報告であるとともに、PKA リン酸化が及ぼす赤血球膜の生理機能への影響を初めて明らかにした。

- ⑤ リドカイン処理によって、赤血球の脂質ラフトを介した情報伝達を遮断した状態においても、膜透過性の cAMP 類自体を添加し、情報伝達を再開した状態を再現することにより、マラリア原虫の赤血球侵入は部分的に回復した。

以上の結果から、熱帯熱マラリア原虫は ATP をリガンドとして宿主赤血球の脂質ラフトを介した GPCR シグナリングを活性化し、デマチンを PKA リン酸化することによって膜骨格の編目を緩めて侵入を完遂することが明らかになった (下図)。



リドカインはこの一連の経路を、脂質ラフトを消失させることによって遮断し、原虫の侵入を阻害することが判明した。

(2) ウイルス感染症のモデルとしてネコ免疫不全ウイルス (Feline immunodeficiency virus, FIV) を用い、以下の成果を得た。

- ① FIV 感受性細胞である G355-5 細胞ならびに CRFK 細胞をメチル・シクロデキストリン (MBCD) 処理し、膜コレステロールを枯渇させると脂質ラフトが消失した。同時に、FIV の細胞侵入が有意に阻害された。このことは、FIV の細胞侵入に脂質ラフトが関与することを示唆する初めての知見である。
- ② G355-5 細胞ならびに CRFK 細胞にリドカイン処理を行うと、濃度依存的に脂質ラフトが消失した。
- ③ 同時に、FIV の細胞侵入が有意に阻害された。

MBCD ならびにリドカインによる、2 つの異なる機序によるラフトの消失がいずれも FIV の侵入を阻害したことから、FIV の細胞侵入には宿主細胞の脂質ラフトが重要であることを示すとともに、リドカインが脂質ラフトの消失を介してこうウイルス作用を発揮することを初めて明らかにした。推測されるリドカインの作用機序は、脂質ラフトに集積するとされる FIV 受容体の CD134 ならびに補助受容体 CXCR4 が、リドカイン処理により分散し、見かけの有効受容体濃度が低下する事によると思われる。

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 1 件)

1. Koshino, I., Mohandas, N., and Takakuwa, Y. Identification of a novel role for dematin in regulating red cell membrane function by modulating spectrin-actin interaction. *J. Biol. Chem.* (2012) 287:35244-35250

[学会発表] (計 12 件)

1. 越野一朗、高桑雄一 局所麻酔薬リドカインによる抗ウイルス効果の検討. 日本膜学会第 35 年会
2. 越野一朗、高桑雄一 Possible involvement of ATP derived from infected erythrocytes in invasion by Plasmodium falciparum. 第 85 回日本生化学会大会

3. 越野一朗、高桑雄一 マラリア原虫の赤血球侵入に利用される GPCR アゴニストに関する検討. 日本膜学会第 34 年会
4. 越野一朗、高桑雄一 Identification of the GPCR-agonist utilized by *P. falciparum*. 第 84 回日本生化学会大会
5. Koshino, I., Mohandas, N., and Takakuwa Y. Identification of a novel role for dematin in regulating red cell membrane mechanical function by PKA phosphorylation-dependent modulation of spectrin-actin interaction. Red Cell Club Annual Meeting 2011
6. Koshino, I. and Takakuwa, Y. Erythrocyte raft-dependent signal transduction pathway involved in Plasmodium falciparum invasion of erythrocytes. International Union of Microbiological Societies Congress 2011
7. 越野一朗、高桑雄一 マラリア原虫が赤血球侵入に利用する情報伝達経路の解明. 日本膜学会第 33 年会
8. Koshino, I. and Takakuwa, Y. Clever Mechanism for malaria parasite invasion of human erythrocytes: Innocent participation of the erythrocyte raft-dependent signal transduction pathway. 3rd Indo-Japanese Infectious Disease Symposium (招待講演)
9. 越野一朗、高桑雄一 マラリア原虫の侵入における赤血球膜骨格蛋白質デマチンの役割. 第 83 回日本生化学会大会
10. 高桑雄一 脂質ラフトを舞台とした熱帯熱マラリア原虫の赤血球侵入機構とその防御. 日本血液学会
11. 越野一朗、高桑雄一 デマチンの PKA リン酸化による赤血球膜骨格機能の調節. 日本膜学会第 32 年会
12. Koshino, I. and Takakuwa, Y. Regulation of erythrocyte membrane stability and malaria parasite invasion by lipid raft-dependent signal transduction. The 13th International Membrane Research Forum, The 6th iCeMS International Symposium (招待講演)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高桑 雄一 (Takakuwa Yuichi)
東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号：40113740

(2) 研究分担者

越野 一朗 (Koshino Ichiro)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号：80328377

萬野 純恵 (Manno Sumie)
東京女子医科大学・医学部・講師
研究者番号：10101205

田中 正太郎 (Tanaka Shotaro)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号：90380667

新敷 信人 (Arashiki Nobuto)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号：80569658