

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：84407

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590836

研究課題名(和文) アメーバ性角膜炎迅速診断法に応用可能なアcantアメーバ特異抗原蛋白質の同定と発現

研究課題名(英文) Detection of candidate antigen of Acanthamoeba castellanii practicable for immunological examination of Amoebic Keratitis

研究代表者

木村 明生 (Kimura, Akio)

大阪府立公衆衛生研究所・その他部局等・その他

研究者番号：00250283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：アcantアメーバのヒト角膜上皮細胞に対する細胞障害性を検討した結果、従来は非病原性とされていた遺伝子型にも傷害性が認められた。この結果は現在用いられている18SrRNA遺伝子による病原性の分類は、角膜炎に関わる病原性を正確に反映するものではないことを示唆するものであった。またアcantアメーバが分泌するプロテアーゼが細胞傷害性に大きく影響する可能性は低いこと、さらにはアメーバ性角結膜炎の原因の一つにインターフェロン産生が関与していることが示唆される結果が得られた。病原性種のcDNAライブラリーを作製しウサギ抗体を用いてスクリーニングを実施したが、陽性クローンは得られなかった。

研究成果の概要(英文)：We investigated cytopathic effect of Acanthamoeba T2, T4 and T7 genotypes on human corneal epithelial cell (HCE-T). Cytopathic effects were observed not only in T4 genotype but also in T2 genotypes that classified as nonpathogenic species by 18SrRNA genotyping. These results suggested the discrepancy between 18sRNA typing and actual pathogenicity of Acanthamoeba species. In addition, we found that protease inhibitor did not inhibit cytopathic effect of Acanthamoeba on HCE-T cell, and after challenging Acanthamoeba to rabbit kidney 13 cell induced interferon via interferon-sensitive response element. These results suggested the existence of novel mechanism of Acanthamoeba keratitis. To investigate antigen which might be useful for diagnosis of amoebic keratitis, we constructed cDNA library of A. castellanii and screened immunologically using polyclonal rabbit antibody against A. castellanii soluble antigen. However, in spite of our expectation, we could not obtain positive clones.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学 公衆衛生・健康科学

キーワード：Acanthamoeba 細胞障害性

1. 研究開始当初の背景

アカントアメーバ(*Acanthamoeba*)は河川水や土壌等の環境中に広く存在する自由生活性の原生動物であり、多くはヒトに対して非病原性である。しかし、これらの中には角膜障害部位に侵入増殖して難治性のアカントアメーバ角膜炎を引き起こす病原性種が存在する。アカントアメーバ角膜炎は、日本においては1988年に初めて症例が報告されて以来症例報告が続いており、近年になりコンタクトレンズ装用者数の増加によって患者発生数も増加しており、眼科および公衆衛生の両領域での問題となって来ている。多くの場合、アカントアメーバ角膜炎は環境中の病原性アカントアメーバがコンタクトレンズ保存液を汚染し、これらを介して感染発症する。国内外の研究グループが環境中の自由生活性アメーバの疫学的調査を実施しており、水道原水を含む河川水、土壌、エアコンフィルターの塵中に病原性のアカントアメーバが存在する事を明らかにしている。

現在アカントアメーバには十数種類の存在が報告されており、このうち *A. castellanii*、*A. hatchetti*、*A. polyphaga* 等が角膜炎を引き起こすとされている。アカントアメーバの病原性には栄養体の膜表面に発現している数種のレクチンや、栄養体が分泌する蛋白質分解酵素であるセリンおよびシステインプロテアーゼが関わっているという報告があるが、アカントアメーバの病原性に関わる蛋白質については未だ明らかになっていない部分が多い。また現在アカントアメーバの病原性有無の判断には、18S rRNA 遺伝子の部分配列を基準にした方法も用いられており、現時点では15の遺伝子型(T1~T15)の存在が報告されている。このうちT4、T5等に分類されるものが病原性を有することが明らかになっている。しかし同じ種名のものが別の遺伝子型に分類されるなど、分類結果に矛盾が生じる事も多く病原性に関わる因子を基準にした新たな分類法の確立が望まれている。

アメーバ性角膜炎の診断には、臨床材料(主として角膜生検材料)からのアカントアメーバの検出・同定が必須であるが、従来法である直接染色法は染色や鏡検に熟練を要し、また培養法を用いる場合には3日から7日程度の日数を要する。アカントアメーバの臨床現場での迅速な検出および同定は、その後の治療法を選択するために重要であるが、前述のようにその同定には問題点も多い。そのため最近では、迅速診断法としてアカントアメーバの18S rRNA 遺伝子等を標的とした real-time PCR 法が開発されているが、これを行うには高価な機器や試薬が必要であり、一般の眼科クリニック等で普及するには至っていない。このような現状から、より簡便なアメーバ性角膜炎の診断に応用が可能な抗原蛋白質の検索および同定や、病原性の指標となる蛋白

質の特定が必要となって来ている。

2. 研究の目的

アカントアメーバの18SrRNA 遺伝子による病原性、非病原性の分類方法を検証するとともに、アメーバ性角膜炎の診断法に応用可能な抗原蛋白質の同定を目的とする。

3. 研究の方法

(1) アカントアメーバ種の入手と維持
本研究で使用したアカントアメーバは、American Type Culture Collection (ATCC)より入手した。使用アメーバ種は表1に示した。各アメーバはフラスコ中のPYGC液体培地を用い30℃で無菌的に維持培養した。実験使用時の虫体数の計測は、血球計測盤により行った。

表1 使用アカントアメーバ種

| 種名 | 株名 | ATCC No. | 由来 | 遺伝子型 |
|-------------------------|----------|----------|------|------|
| <i>A. castellanii</i> | Neff | 30234 | 酵母培地 | T4 |
| <i>A. castellanii</i> | V014 | 50492 | ヒト角膜 | T4 |
| <i>A. polyphaga</i> | eye | 30461 | ヒト角膜 | T4 |
| <i>A. hatchetti</i> | FDA97BMX | 50673 | 下水汚泥 | T4 |
| <i>A. palestinensis</i> | Reich | 30870 | 土壌 | T2 |
| <i>A. astronyxis</i> | Page | 30137 | 土壌 | T9 |

(2) ヒト角膜上皮細胞の入手と維持

使用したヒト角膜上皮細胞は、理化学研究所より入手したSV40不活化ヒト角膜上皮細胞(HCT-T, RCB No.1384)を、100IU/ml ペニシリン、100µg/ml スプレプトマイシンおよび5.0%ウシ胎児血清を含むDMEM/F12培地(GIBCO社製)で培養維持した。

(3) 細胞障害性の検討

18S rRNA 遺伝子によって病原性および非病原性と分類された種について、ヒト角膜上皮細胞に対する細胞障害性を検討した。
使用アメーバ：*A. castellanii* V014、*A. polyphaga*、*A. hatchetti* (病原性遺伝子型T4) *A. palestinensis*、*A.* および *A. astronyxis* (非病原性遺伝子型T2およびT9)
使用細胞：HCE-T (ヒト角膜上皮細胞 RIKEN RCB1384)

6穴プレートにて10%ウシ血清 RPMI1640で~90%コンフルエントに培養したHCE-TをDMEM:HamF12=1:1で洗った後、それぞれDMEM:HamF12=1:1で希釈した1~2x10⁵のアメーバを接種して35℃および27℃で24時間培養した。

(4) 細胞障害因子の検討

アカントアメーバの細胞障害には、アメーバが分泌するセリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ等のプロテアーゼによる細胞の障害が報告されている。このため、プロテアーゼインヒビターを用いて細胞とアメーバを共培養し、細胞傷害性を検討した。

使用アメーバ：*A. castellanii* V014
使用細胞：HCE-T (ヒト角膜上皮細胞 RIKEN RCB1384)

96 穴プレートに HCE-T を～90%コンフルエントに培養した後に、説明書に従って調整した Halt Protease Inhibitor Cocktail (Thermo scientific) を DMEM:HamF12=1:1 で 5 倍希釈したメディウムでアメーバを階段希釈し、HCE-T 細胞に重層して 24 時間培養した。

(5) インターフェロン産生誘導の検討

アメーバによる角結膜炎には、角結膜組織の直接の障害のみならず、インターフェロンの誘導による炎症反応の促進が考えられる。アメーバ性角膜炎では既に TLR4 を介したインターフェロン産生が報告されている (Immunol. Cell Biol. 2010. 88, 529-536)。A. castellanii においても産生誘導が生じるのかを RK13 (Rabbit Kidney 13)細胞に ISRE (Interferon-sensitive response element) をプロモーターに持つ Luciferase 遺伝子を染色体に組み込んだ細胞クローン (RK13ISRE-Luc) および A549 細胞(ヒト肺基底上皮腺癌細胞)に NF B response element をプロモーターに持つ Luciferase 遺伝子を染色体に組み込んだ細胞クローン (A549NF B-Luc) を用いて評価した。

使用アメーバ: A. castellanii

a) 使用細胞: RK13-Luc

96 well plate (8x10⁴/well) に約 8x10⁴/well から DMEM:HamF12=1:1 で 2 倍階段希釈したアメーバを接種し、35 °C で 3 日間培養した後 Luciferase Assay Systems (Promega) を用いてアッセイを行った。

b) 使用細胞: A549NF B-Luc

96 well plate (9x10⁴/well) に約 8x10⁴/well から 10% 子牛血清を含む RPMI1640 (SIGMA) で 2 倍階段希釈したアメーバを接種し、35 °C で 24 時間培養した後 Luciferase Assay Systems (promega) を用いてアッセイを行った。

(6) A. castellanii 化溶化抗原調整とウサギ抗血清の作製

A. castellanii V014 を PYGC 培地で増殖させ回収後、HEPES buffer 中でソニケーションし、40,000 回転、2 時間遠心し沈渣を抗原液とした。これをウサギ 2 羽に接種し、6 週間目に全採血血清を入手した。血清中に A. castellanii V014 に対する抗体が産生されている事の確認は、Western Blotting 法により行った。

(7) 病原性種 A. castellanii の抗原遺伝子同定の試み

A. castellanii V014 を PYGC 培地で増殖させ回収後、ISOGEN II および RNeasy Midi Kit を用い total RNA を抽出・精製した。この total RNA から SMART 法 (タカラバイオ) により TriplEx2 をベクターとした cDNA ライブラリーを構築した。ライブラリーのタイトレーションで得られたコロニーについてランダムに 16 個選択し、PCR によりインサートサイズ

を確認した。各クローンの蛋白質 1mMIPTG にさせた後。ウサギ抗血清を用いイムノスクリーニングを行った。

4. 研究成果

(1) 細胞障害性について

病原性種として分類されている遺伝子型 T4 である A. castellanii, A. palestinensis, A. hatchetti および A. polyphaga ではすべての細胞が破壊される強い細胞傷害性が認められた。また従来は非病原性として認識されていた遺伝子型 T2 である A. palestinensis にも同様に細胞傷害性が認められた。一方非病原性遺伝子型 T7 である A. astronyxis では細胞障害性は認められなかった (図 1)。これらの結果は、現在用いられている 18SrRNA 遺伝子による病原性の有無の分類は、角膜炎に関わる病原性を正確に反映するものではないことを示唆するものであった。

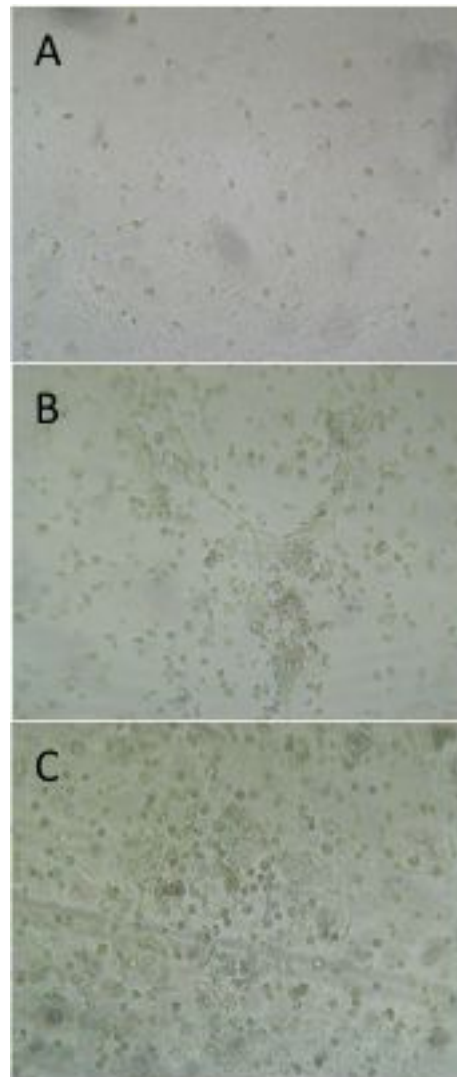


図 1. アカントアメーバによる HCE-T 細胞障害性 (A) HCE-T 細胞コントロール (B) A. polyphaga によって破壊された HCE-T 細胞 (C) A. astronyxis によって細胞障害は認められなかった

(2) 細胞障害因子の検討

インヒビターの有無にかかわらず感染させたアメーバ数と相関して細胞の傷害がみられた。プロテアーゼインヒビター濃度は、HCE-T 細胞を障害しない最も高い濃度に設定し、アcantアメーバが分泌するとされるセリン、システインおよびアスパラギン酸プロテアーゼに対する阻害剤を高濃度に含んでいたにも関わらず、アメーバの細胞障害性は抑制されなかった。これにより、培養液中にアメーバが分泌するプロテアーゼは細胞傷害性に大きく影響する可能性は低いと考えられた。

(3) インターフェロン産生誘導の検討

a) RK13 細胞はアメーバ接種 3 日後も、アメーバ濃度に関わらず殆ど肉眼での細胞障害性はみられなかったが、アメーバの濃度依存的に蛍光強度は増加し、コントロールと比較して最大 4.25 倍に増加した(図 2)。これにより、*A. castellanii* は細胞を直接破壊しない場合でも ISRE を介したインターフェロン誘導がおこすことが示唆され、アメーバ性角結膜炎の原因の一つにインターフェロン産生が関与していると考えられた。

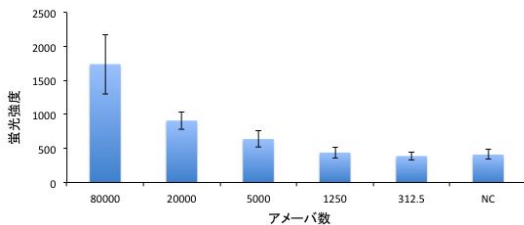


図 2. アメーバ接種 RK13 細胞のルシフェラーゼ産生量

b) A549 細胞はアメーバ接種 24 時間で、アメーバ濃度依存的に明瞭な細胞障害性および発光強度の増加が見られ、発光強度はコントロールと比較して最大 2.7 倍に増加した(図 3)。これにより、接種後 24 時間以内に強く細胞障害された場合でも、速やかに NF B の誘導は生じるとともにインターフェロンおよび炎症性サイトカインの誘導が起きる可能性が示された。

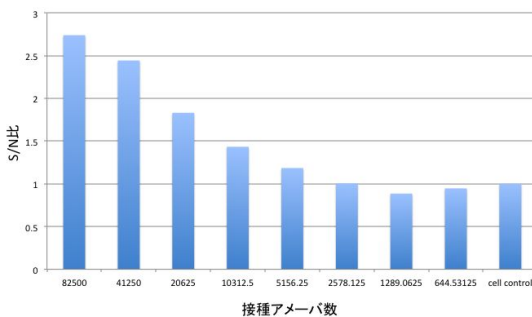


図 3. アメーバ接種 A549 細胞のルシフェラーゼ産生量

以上の結果は、アメーバ性角結膜炎の発生

原因のひとつに、インターフェロン産生が関与している事を示唆するものであった。

(4) 抗アメーバ血清の確認

Western Blotting 法による確認の結果、多数のバンドが検出され、得られたウサギ血清には *A. castellanii* V014 に対する抗体が産生された事が確認出来た。

(5) *A. castellanii* cDNA ライブラリー作製とイムノスクリーニング

cDNA ライブラリーのタイトレーションを実施した結果、オリジナルライブラリーのタイターは 2.2×10^6 pfu/ml、増幅ライブラリーのタイターは 6.6×10^9 pfu/ml であった。このライブラリーを、*A. castellanii* 50492 株に対するウサギポリクロナール抗体を用いて約 1.0×10^5 pfu のクローンのイムノスクリーニングを実施したが、陽性クローンは得られなかった。

アメーバ性角膜炎では、アメーバは局所(角膜)での寄生はするが全身感染しないため感染血清の確保が難しく、代替として用いた *A. castellanii* V014 可溶性抗原に対する免疫血清ではスクリーニングに適した抗体を得られなかったことが陽性クローンを得られなかった要因であると考えられた。

(6) まとめ

今回の研究では、アcantアメーバの病原性の指標として用いられている、18SrRNA による遺伝子型別と、ヒト角膜上皮細胞への細胞障害性が必ずしも一致しない事が明らかとなった。またアcantアメーバが分泌するプロテアーゼが細胞傷害性に大きく影響する可能性は低いこと、さらにはアメーバ性角結膜炎の原因の一つにインターフェロン産生が関与していることが示唆される結果が得られた。

今回の研究期間中には、当初目的としたアメーバ性角膜炎に関係する抗原蛋白質の同定およびその発現までには至らなかった。これは cDNA ライブラリーのスクリーニングに用いた免疫血清が、感染によるものでなく、人工的に作製したものである事が原因である可能性が考えられた。今後は cDNA ライブラリーの EST 検索等の方法を用いた更なる検討が必要であると思われる。

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)

Kimura, A., Morishima, Y., Nagahama, S., Horikoshi, T., Edagawa A., Kawabuchi-Kurata T., Sugiyama, H., Yamasaki, H.

A coprological survey of intestinal helminthes in stray dogs captured in Osaka Prefecture, Japan. (査読有)

〔学会発表〕(計2件)

枝川亜希子, 木村明生, 田中榮次,
足立伸一, 宮本比呂志
レジオネラ属菌のアメーバ内増殖能を利用
したアメーバ共培養法の検討
第39回日本防菌防黴学会, 東京, 2012
木村明生, 枝川亜希子, 倉田貴子,
楠原康弘
*Acanthamoeba*および*Naegleria*の分子分
類と今後の課題
第37回日本寄生虫学会大会西日本支部
大会, 金沢, 2011

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 明生 (KIMURA, Akio)
大阪府立公衆衛生研究所・企画総務部
企画調整課・課長
研究者番号: 00250283

(2) 研究分担者

枝川 亜希子 (EDAGAWA, Akiko)
大阪府立公衆衛生研究所・衛生科学部
生活環境課・主任研究員
研究者番号: 80321941

倉田 貴子 (KURATA, Takako)
大阪府立公衆衛生研究所・感染症部
ウイルス課・主任研究員
研究者番号: 70435890