

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25871000

研究課題名(和文) クラミジア感染症治療薬としての可能性を秘めたカルパイン阻害剤

研究課題名(英文) Analysis of calpain inhibitors for the growth-inhibitory ability of Chlamydia

研究代表者

伊藤 竜太 (ITO, Ryota)

福岡大学・医学部・助教

研究者番号：70403920

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：クラミジアは性感染症、眼病および肺炎の原因となる細胞内寄生菌である。本研究では、動物細胞内のカルシウム依存性プロテアーゼであるカルパインの阻害剤が、クラミジアの増殖を強力に阻害することを見出した。これらのクラミジアの増殖を抑制するカルパイン阻害剤には、疎水性アミノ酸で構成される共通した構造が存在することを明らかにした。また、カルパイン阻害剤はシグナル伝達のひとつであるNF- κ B経路を遮断することで、クラミジア感染時に誘発されるサイトカイン産生を著しく阻害することを明らかにした。以上の結果はカルパイン阻害剤の共通構造からクラミジア感染症の新しい治療薬を開発する足がかりとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The obligate intracellular pathogens Chlamydiae replicates within a membrane-bound vacuole termed inclusion and acquire the nutrients from infected cells. For optimal chlamydial growth, prompt modifications of host intracellular environment is indispensable. Here we show that some inhibitors for the calcium-activated protease calpain dramatically affect in both chlamydial growth and host immunological responses. Calpain inhibitor MDL28170 suppress nuclear localization of the transcription factor NF- κ B p65 (RelA) and strictly down-regulates both mRNA expressions and proteins secretions of inflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-1 α and IL-6 from Chlamydia-infected murine macrophages. Several calpain inhibitors MDL28170, calpeptin, ALLN and MG132 exclusively regulates chlamydial growth and contains similar dipeptide structures. Our results suggested the possibility of some calpain inhibitors such as MDL28170 or calpeptin for therapeutic usage to the chlamydial infectious disease.

研究分野：細菌学

キーワード：クラミジア カルパイン 阻害剤

1. 研究開始当初の背景

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た。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機能メカニズムを解明することは、クラミジア感染症の新規な治療薬として応用する可能性が見いだせるのではないかと推察した。

2. 研究の目的

先の研究に関連して得られた、カルパイン阻害剤が肺炎クラミジアの増殖を抑制する新知見に着目し、本研究では培養細胞に対する *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、増殖抑制のメカニズムを、分子生物学的手法を用いて解明することを目指した。

(1) 肺炎クラミジアのみならず、性感染症クラミジア等に対してもカルパイン阻害剤による増殖抑制効果が得られるかを検討する。

(2) カルパイン阻害剤はクラミジア増殖サイクルのどの段階に影響を与えるのかを検討する。

(3) クラミジア以外の細胞内寄生菌に対しても、カルパイン阻害剤による増殖抑制効果は認められるかを検討する。

(4) カルパイン阻害剤によるクラミジア感染時のサイトカイン産生の抑制メカニズムを、分子レベルで解明する。

(5) 動物を用いたクラミジア感染系の実験において、カルパイン阻害剤による病態の軽減、菌数の減少および回復の促進に効果があるかを検討する。

3. 研究の方法

(1) 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

ヒト上皮系細胞に対し様々なクラミジアを感染させ、カルパイン阻害剤の存在下および非存在下において一定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。また、感染後、一定時間経過した後カルパイン阻害剤を添加し、クラミジアの増殖サイクルに対してカルパイン阻害剤の効力を有する時期に検討した。

(2) クラミジア増殖抑制能を有するカルパイン阻害剤の検討について

ヒト上皮系細胞に対しクラミジアを感染させ、様々なカルパイン阻害剤の存在下および非存在下において一定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。クラミジア増殖抑制能を有するカルパイン阻害剤に対し、その化学構造を比較してクラミジア増殖抑制に有効と思われる部位を推定した。

(3) 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

クラミジア以外の細胞内寄生菌に対してもカルパイン阻害剤による増殖抑制効果が認められるかを検討した。HeLa細胞に対してリステリア (*Listeria monocytogens*) を感染させ、カルパイン阻害剤存在下におけるリステリアの増殖効率を比較した。

(4) クラミジア感染によるサイトカイン産生のカルパイン阻害剤による抑制について

マウス骨髄由来マクロファージに対して肺炎クラミジアを感染させ、カルパイン阻害剤の存在下および非存在下において一定時間後における炎症性サイトカイン mRNA 転写量および産生量およびサイトカイン産生量を比較し

た。また、サイトカインのmRNA転写を抑制する仕組みについて、シグナル伝達系に着目してカルパイン阻害剤のシグナル経路に与える影響を検証した。

(5) クラミジア動物感染モデルに対するカルパイン阻害剤の応用について

カルパイン阻害剤を腹腔内投与した実験マウスに対し、肺炎クラミジアを経気道感染させ、マウス肺炎の発症による体重の経時変化、臓器内の菌数の変化、血中炎症性サイトカインの量的変化などを検討する。

4. 研究成果

(1) 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

クラミジアは上皮系細胞に対してよく感染し増殖することから、モデル細胞としてHeLa細胞を選択した。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。

次に、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した。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。

(2) クラミジア増殖抑制能を有するカルパイン阻害剤の検討について

市場において様々なカルパイン阻害剤が販売されていることから、本研究では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、カルバスタチン、E64dおよびPD150606をそれぞれ50 μ M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、残るカルバスタチン、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。

(3) 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

クラミジアに対してカルパイン阻害剤が増殖抑制効果が認められるならば、他の細胞内寄生菌に対しても、同様のメカニズムによって増殖の抑制を示す可能性が考えられる。したがって、クラミジア以外の細胞内寄生菌の一例としてリステリア *L. monocytogenes* を用い、クラミジアの時と同様に、感染後のMDL28170およびカルペプチンの処理によってリステリアの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ないことから、これらカルパイン阻害剤の効果はクラミジアにのみ認められる(=高い選択性を示す)ことが示唆された。

(4) クラミジア感染によるサイトカイン産生のカルパイン阻害剤による抑制について

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を誘発させること、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、細胞内シグナル伝達等に着目し、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を解明しようと試みた。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-1 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-1 およびIL-6発現の典型的なシグナル経路であるNF- κ B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- κ B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- κ B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- κ B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。

(5) クラミジア動物感染モデルに対するカルパイン阻害剤の応用について

培養細胞系においてクラミジア増殖抑制効果が認められたカルパイン阻害剤MDL28170およびカルペプチンについて、実際に生体レベルで効果があり、臨床の応用が期待できるかどうかを検討した。前実験の段階において、マウスに対するMDL28170の毒性を腹腔内投与により検討したところ30 mg/kgの投与が上限であり、この濃度では経気道感染した肺炎クラミジアに対し有意な影響を与えないことが明らかとなった。これ以上の濃度によるMDL28170の投与は動物実験の倫理上問題があると判断し、動物モデルにおける投与実験は中止することとした。

(6) 得られた結果の国内外における位置づけ、インパクト、今後の展望について。

本研究で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の免疫反応抑制に効果があることが明らかとなり、その仕組みを解明したものである。カルパインの阻害がどのようにしてクラミジアの影響を与えるかは課題終了の時点では不明であるが、今なおカルパイン阻害剤のクラミジアに対する影響は先行する論文や知見等は報告されておらず、その点では独創的な研究であるといえる。マウス感染系を用いた実験については今回中止としたが、阻害剤の改良や選別、感染経路の変更などを検討することで改善できる可能性は十分にあると思われる。

今後速やかに論文等を通してこれらの結果をまとめ、世間に公表する予定である。

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3件)

Kanefumi Yamashita, Takamitsu Sasaki, Ryota Itoh, Daisuke Kato, Naoya Hatano, Toshinori Soejima, Kazunari Ishii, Tadaomi Takenawa, Kenji Hiromatsu, Yuichi Yamashita: Pancreatic fistulae secondary to trypsinogen activation by *Pseudomonas aeruginosa* infection after pancreatoduodenectomy. Journal of hepato-biliary-pancreatic sciences. (2015) Vol.22:454-462. DOI: 10.1002/jhbp.223. 査読あり。

Ryota Itoh, Issaku Murakami, Bin Chou, Kazunari Ishii, Toshinori Soejima, Toshihiko Suzuki, Kenji Hiromatsu: *Chlamydia pneumoniae* harness host NLRP3 inflammasome-mediated caspase-1 activation for optimal intracellular growth in murine macrophages. Biochemical and biophysical research

communications. (2014) vol.452:689-694. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.08.128. 査読あり。

Emi Sato, Shinichi Imafuku, Kazunari Ishii, Ryota Itoh, Bin Chou, Toshinori Soejima, Juichiro Nakayama, Kenji Hiromatsu: Vitamin D-dependent cathelicidin inhibits *Mycobacterium marinum* infection in human monocytic cells. Journal of dermatological science. (2013) Vol. 70:p166-172. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2013.01.011. 査読あり。

[学会発表](計2件)

伊藤竜太, 廣松賢治: カルパイン阻害剤はクラミジアの増殖を抑制する。第88回日本細菌学会総会, 2015年3月26日~28日, 長良川国際会議場, 岐阜県岐阜市

Ryota Itoh, Kenji Hiromatsu: Calpain inhibitor MDL28170 and Calpeptin strictly arrests the growth of Chlamydiae. 日本免疫学会総会, 2013年12月11日~13日, 幕張メッセ, 千葉県千葉市美浜区

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 竜太 (ITOH, Ryota)

福岡大学・医学部・助教

研究者番号: 70403920

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし