

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08040

研究課題名(和文) 志賀毒素による細胞死誘導機構の解析と治療薬の開発

研究課題名(英文) Mechanism of Shiga toxin-induced cell death and development of therapeutic agent

研究代表者

服部 隆行 (HATTORI, TAKAYUKI)

国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子医薬部・主任研究官

研究者番号：50377751

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：腸管出血性大腸菌(EHEC)の感染は下痢や出血性大腸炎を誘発するのみならず、溶血性尿毒毒症候群や脳症といった致死性の合併症を引き起こす。これらの症状を誘発する主要病原因子は、EHECの産生する志賀毒素であると考えられており、志賀毒素を中和する薬剤の開発が急がれているが、未だ有効な治療薬は確立していない。

我々は志賀毒素を中和することの出来る薬剤を開発することを目的に研究を行い以下の結果を得た。志賀毒素による細胞死は、プロテアソーム阻害薬(1)や、小胞輸送阻害薬(2)によって抑制することが出来る。(3)志賀毒素受容体の発現が欠落すると志賀毒素による細胞死が誘導されなくなる。

研究成果の概要(英文)：Shiga toxin (Stx) causes fatal systemic complications. Stx induces apoptosis, but the mechanism of which is unclear. Therefore, the development of an antidote to neutralize Stx toxicity is urgently required. Proteasome inhibitors prevented the induction of apoptosis in vitro. A clinically approved proteasome inhibitor, bortezomib, improved the survival rate of mice challenged by Stx.

We also demonstrated that AMF26, a compound that induces disassembly of the Golgi apparatus by inactivating ADP-ribosylation factor 1, suppresses Stx-induced apoptosis in vitro.

Furthermore, we isolated resistant clones to Stx-induced cell death from THP1 cells. The resistant clones lost the expression of CD77 as a consequence of the reduction in CD77 synthase mRNA expression. The result suggests that downregulation of CD77 or CD77 synthase expression could be a novel approach to neutralize the fatal toxicity of Stx.

研究分野：分子生物学、生化学、細胞生物学

キーワード：志賀毒素 THP1細胞 アポトーシス プロテアソーム 小胞輸送阻害 耐性 CD77 CD77 synthase

1. 研究開始当初の背景

1996年に大阪府堺市において大流行した O157 に代表される腸管出血性大腸菌の感染者数は、1997年以降は集団事例の報告数は減ったものの、患者数は年間約 3,000~4,000 人で推移しており、現在に至るまで減少の傾向を示していない。腸管出血性大腸菌の感染は下痢や出血性大腸炎を誘発するのみならず、感染者の 3~10%において溶血性尿毒症症候群や脳症といった致死性の合併症を引き起こす。これらの症状を誘発する主要病原因子の一つは、腸管出血性大腸菌の産生する志賀毒素 (Shiga toxin) であると考えられている。とりわけ、消化管の損傷により循環血中に侵入した志賀毒素が、腎臓や脳の血管内皮細胞を障害することによって、上述の重篤な合併症を併発すると考えられている。このように、志賀毒素の作用を中和する薬剤の開発が急がれているが、未だ有効な治療薬は確立していない。志賀毒素は AB5 型のホロトキシンであり、A サブユニットはリボソーム 60S サブユニットを失活させタンパク質合成を阻害し毒性を発現すると考えられている。一方、5 量体の B サブユニットは標的細胞表面上の中性糖脂質 globotriaosylceramide (Gb3、または CD77) に結合し、志賀毒素の細胞内への侵入に関与する。志賀毒素は、種々の Gb3 陽性の細胞株にアポトーシスを誘導することが知られているが、その誘導機構に関する報告は、多種多様であり混沌としている。また、志賀毒素によって誘導されるアポトーシスを抑制することが、上述した志賀毒素の致死活性の緩和に有効かどうか不明であった。

我々は、様々な培養細胞株に志賀毒素を作用させることによって、速やかに、かつ効率的にアポトーシスを誘導することの出来る細胞株を探索した。その結果、ヒト急性単球性白血病細胞株 THP1 が志賀毒素に最も高感受性であることを見出した。我々は THP1 細胞をモデル細胞株として、志賀毒素によるアポトーシス誘導機構を詳細に調べた。その結果、プロテアソームを阻害すると、志賀毒素による *in vitro* における細胞死が抑制されることが判明している。

細胞内小胞輸送阻害薬 brefeldin A が志賀毒素の毒性を軽減することが報告されているが (*J. Infect. Dis.*, **171**, 721), brefeldin A は非常に細胞毒性が高いことが知られており、brefeldin A に変わる新たな薬剤が求められている。我々は、同様に細胞内小胞輸送を阻害し、*in vivo* で用いても毒性を示さない化合物である AMF26 (*J. Biol. Chem.*, **287**, 3885) を用いることを試みた。

さらに我々は THP1 細胞から志賀毒素耐性株の単離に成功しており、耐性株と感受性株を比較することにより、新規志賀毒素感受性因子を同定し、その因子が志賀毒素中和薬創薬の標的となる可能性が期待される。

2. 研究の目的

腸管出血性大腸菌感染症は、未だ有効な治療薬がなく、本邦においても毎年一定の患者を出しており、減少の傾向を示していない。本感染症の主要病原因子は腸管出血性大腸菌の産生する志賀毒素であると考えられており、志賀毒素の毒性を中和できる治療薬の開発が急務である。本研究では、志賀毒素の毒性発現機序の詳細を解明し、我々が *in vitro* での有効性を見出したプロテアソーム阻害薬、および細胞内小胞輸送阻害薬が、*in vivo* でも志賀毒素の致死活性を中和できるかを検証することが第一の目標である。さらに、志賀毒素耐性細胞株を用いた新規治療標的の同定、および化合物スクリーニングによって新規の志賀毒素中和活性を有した化合物の同定を行う。上記アプローチにより、新規腸管出血性大腸菌感染症治療薬の開発することが本研究の究極の目的である。

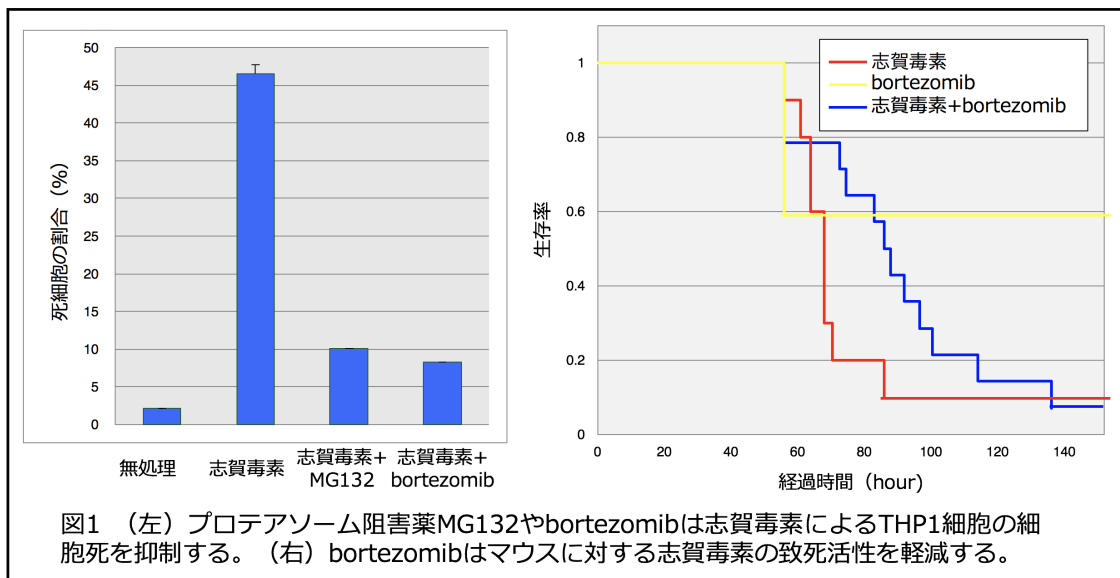
3. 研究の方法

- ・志賀毒素が THP1 細胞にアポトーシスを起こす作用機序を解明し、関与している分子を同定する。
- ・プロテアソーム阻害薬 bortezomib と細胞内小胞輸送阻害薬 AMF26 の *in vivo* での有効性の検証を行う。これらの化合物については *in vitro* における効果は既に立証されているので、*in vivo* マウスモデルでの有効性の評価から行う。
- ・志賀毒素耐性 THP1 亜株を用いて志賀毒素感受性因子の同定を行う。同定後、この因子に相互作用する化合物を探索し、阻害薬や活性化薬を同定する。

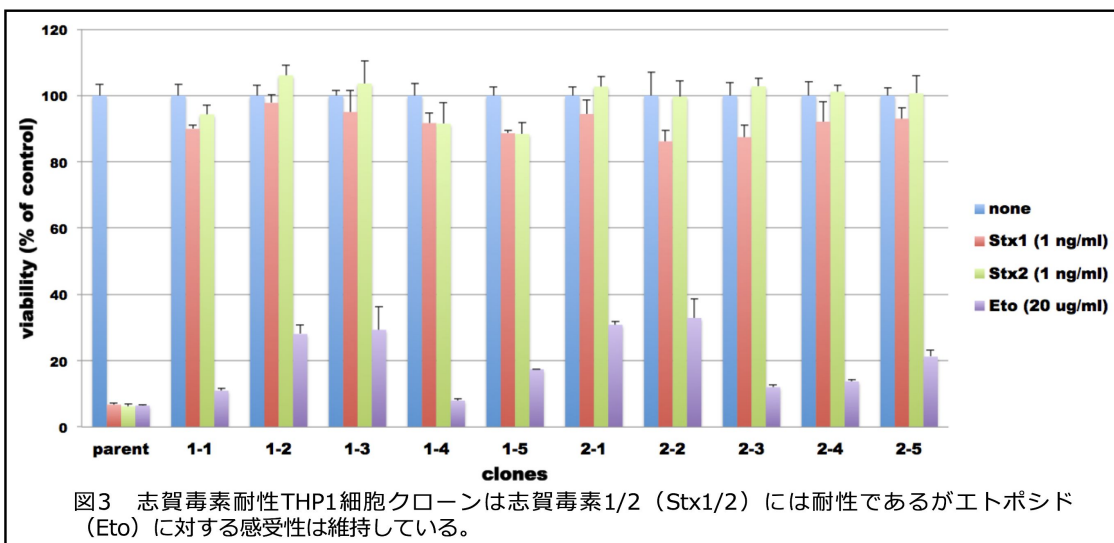
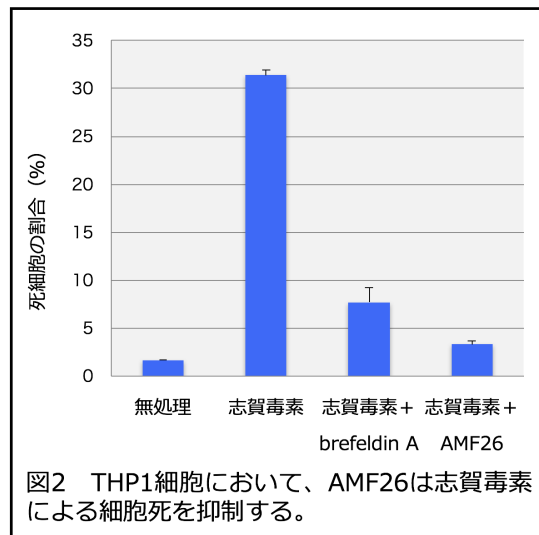
4. 研究成果

(1) THP1 細胞を志賀毒素で処理するとアポトーシスが誘導されるが、その時に THP1 細胞内で起こっていることを詳細に調べると、FLIP や MCL1 等の抗アポトーシス活性を有するタンパク質が、caspase 活性非依存的、プロテアソーム活性依存的に分解されることが明らかとなった。このことから、我々は志賀毒素によって抗アポトーシスタンパク質が分解されることが志賀毒素によるアポトーシスの誘導に関与していると仮定し、THP1 細胞を志賀毒素で処理する時に同時にプロテアソーム阻害薬で処理することを試みた。実際、プロテアソーム阻害薬である MG132 や bortezomib を併用すると、志賀毒素による細胞死は抑制された (図 1, 左)。また、bortezomib は、既に多発性骨髄腫の治療に用いられている薬剤であるが、*in vitro* モデルのみならず、*in vivo* のマウス志賀毒素投与モデルにおいても、プロテアソーム阻害によって志賀毒素

投与におけるマウスの生存率が改善した（図1, 右）。これらのことから、プロテアソーム活性阻害によるアポトーシスの抑制が志賀毒素中毒において有効であることが示唆された。



(2) プロテアソーム阻害薬 bortezomib は、志賀毒素の毒性軽減に一定の効果を示すものも、bortezomib 自体の毒性が無視できなかった。従って、bortezomib に代わるより毒性の少ない、安全な志賀毒素の中和薬が求められる。細胞内小胞輸送阻害薬 brefeldin A が志賀毒素の毒性を軽減することが報告されているが、brefeldin A も非常に細胞毒性が高いことが知られている。我々は、brefeldin A 同様に細胞内小胞輸送を阻害するが、brefeldin A に較べて毒性を示しにくい AMF26 を志賀毒素の中和薬として用いることを試みた。実際、THP1 細胞モデルにおいて AMF26 は志賀毒素による細胞死をほぼ完全に抑制する事が示された（図 2）。この結果から、AMF26 は、in vivo のマウスモデルにおいても志賀毒素の致死活性を抑制することが期待されたが、in vivo モデルにおいては AMF26 によるマウスの生存率の改善効果は認められなかった。



(3) 我々は THP1 細胞を致死濃度の志賀毒素にて長期培養する事によって、複数の志賀毒素耐性 THP1 細胞クローンを単離することに成功した。これらクローンは全て志賀毒素に対する耐性を獲得しているが、抗がん剤(エトポシド)に対する感受性は維持されており(図3)細胞死誘導の仕組みそのものが破綻しているわけではない。これら志賀毒素耐性 THP1 細胞クローンの細胞表面上の志賀毒素受容体 CD77 の発現量をフローサイ

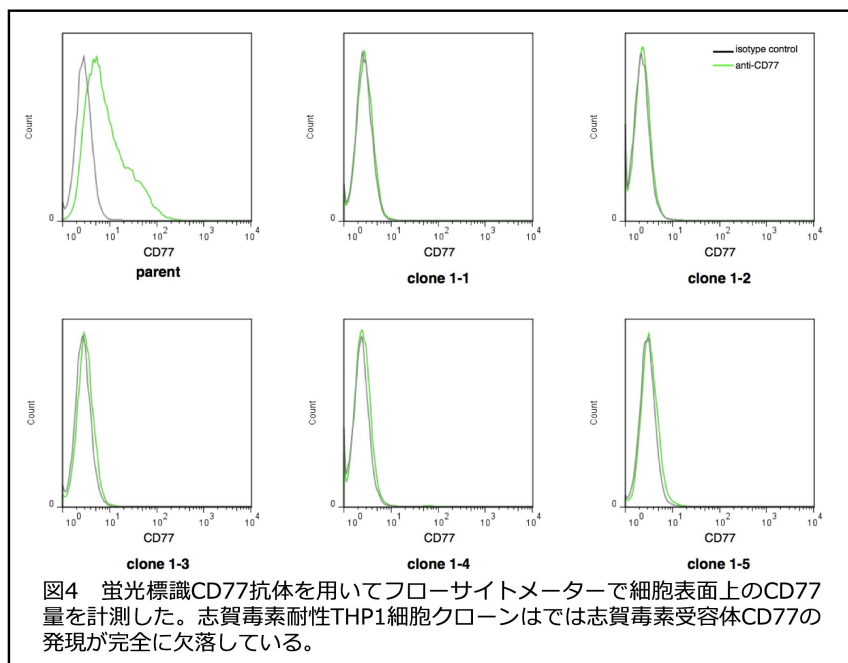


図4 蛍光標識CD77抗体を用いてフローサイトメーターで細胞表面上のCD77量を計測した。志賀毒素耐性THP1細胞クローンでは志賀毒素受容体CD77の発現が完全に欠落している。

トメトリーにて調べると、親株では発現が見られる CD77 を耐性クローンでは全く発現していないことが明らかとなった。さらに、CD77 生合成酵素 CD77 synthase の mRNA の発現を検証したところ、これら耐性クローンでは親株に比べ CD77 synthase mRNA の発現量が少なくなっており、このことが原因で耐性クローンでは CD77 が発現していないと考えられた。これまで志賀毒素を中和させるには志賀毒素受容体を標的とするといわれてきたが、以上のことはこのことを裏付ける結果となった。

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)

Takayuki Hattori, Miho Watanabe-Takahashi, Isamu Shiina, Yoshimi Ohashi, Shingo Dan, Kiyotaka Nishikawa, Takao Yamori, Mikihiko Naito. M-COPA, a novel Golgi system disruptor, suppresses apoptosis induced by Shiga toxin. *Genes Cells*, **21**, 901-906, 2016.(査読有り)

Takayuki Hattori, Miho Watanabe-Takahashi, Nobumichi Ohoka, Takashi Hamabata, Koichi Furukawa, Kiyotaka Nishikawa, Mikihiko Naito. Proteasome inhibitors prevent cell death and prolong survival of mice challenged by Shiga toxin. *FEBS Open Bio*, **5**, 605-614, 2015. (査読有り)

[学会発表](計3件)

服部 隆行, 高橋 美帆, 西川 喜代孝, 内藤 幹彦. 志賀毒素耐性 THP-1 細胞の単離と解析. 第20回腸管出血性大腸菌感染症研究会. 2016年11月(富山市).

服部 隆行, 高橋 美帆, 椎名 勇, 大橋 愛美, 旦 慎吾, 西川 喜代孝, 内藤 幹彦. 新規小胞輸送阻害薬を用いた志賀毒素のアポトーシス死誘導活性の抑制. 第38回日本分子生化学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会. 2015年12月(神戸市).

服部 隆行, 高橋 美帆, 椎名 勇, 大橋 愛美, 旦 慎吾, 西川 喜代孝, 内藤 幹彦. プロテアソーム阻害による志賀毒素誘導性細胞死の抑制. 第19回腸管出血性大腸菌感染症研究会. 2015年7月(東京都).

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nihs.go.jp/mtgt/index.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

服部 隆行 (HATTORI, Takayuki)

国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子医薬部・主任研究官

研究者番号：50377751