

令和元年5月16日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08452

研究課題名（和文）トリパノソーマにおけるCa²⁺シグナリングの分子基盤の解明と創薬への応用研究課題名（英文）Research of Ca²⁺ signaling in Trypanosoma cruzi for drug discovery

研究代表者

橋本 宗明（Muneaki, Hashimoto）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：30407308

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：T. cruziを病原体とするシャーガス病に対する新規治療薬開発が急務である。本研究では、T. cruziの分裂増殖などを制御するCa²⁺チャネル（TcIP3R）を介するCa²⁺シグナリングを標的とした治療薬開発のための基盤研究を行った。本経路の分子特性を電子顕微鏡、生体イメージングなどにより明らかにしたと共に、治療薬のリード化合物となり得る本経路の阻害剤を次世代アンチセンスオリゴを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

寄生原虫Trypanosoma cruziを病原体とするシャーガス病に対する現行の治療薬は、効果や副作用の点で実用的でなく、新規治療薬開発が急務である。本研究は、申請者らの独自研究を発展させ、T. cruziの分裂増殖・変態・細胞侵入などを制御するCa²⁺チャネル（TcIP3R）を介するCa²⁺シグナリングを標的とした治療薬開発のための基盤研究を行った。本成果により、トリパノソーマのCa²⁺シグナリングのユニークな点を顕在化したとともにその特異的阻害剤を新たに同定し、副作用のない治療薬開発で患者救済に貢献する。

研究成果の概要（英文）：It is very important to develop drug for Chagas disease caused by Trypanosoma cruzi. In this study, research for drug development focusing on Ca²⁺ signaling mediated by a Ca²⁺ channel (TcIP3R), which regulates the parasite growth etc.. Importance of TcIP3R was investigated by electron microscopic analysis or live cell imaging. Furthermore, we developed novel antisense oligo nucleotides which inhibit TcIP3R expression in the parasites.

研究分野：寄生虫学

キーワード：トリパノソーマ Ca²⁺シグナリング IP3受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

寄生原虫 *Trypanosoma cruzi* を病原体とするシャーガス病は中南米で流行し、貧困層を中心に 1000 万人以上もの患者がいる。現在の治療薬は感染初期 (急性期) のみに有効で、1~2 ヶ月の長期間の服用が必要であるのに加え、強い悪心や吐気などの副作用がある。しかしながら、コスト面から製薬会社発の開発が難しいことから「顧みられない病」と称され、このため、研究機関主導の治療薬開発が必須である。このような状況の中、申請者らは *T. cruzi* における細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が宿主細胞への侵入に必須であることに注目し (Moreno SN, 1994)、この Ca^{2+} 濃度の上昇を担う本体が、イノシトール 1,4,5-三リン酸受容体 (TcIP3R) であることを突き止めた (Mol Microbiol, 2013)。

本研究は、申請者らの独自研究を進展させ、*T. cruzi* の分裂増殖・変態・細胞侵入などを制御する Ca^{2+} チャネル (TcIP₃R) を介する Ca^{2+} シグナリングを標的とした治療薬開発のための基盤研究を行った。具体的には、本経路の分子特性を電子顕微鏡、生体イメージング、及び生化学的解析などにより明らかにすると共に、治療薬のリード化合物となり得る本経路の阻害剤を次世代アンチセンスオリゴ及び化合物ライブラリより同定を試みる。その成果をもとに、トリパノソーマの Ca^{2+} シグナリングのユニークな点を顕在化するとともにその特異的阻害剤を新たに同定し、副作用のない治療薬開発で患者救済を目指す。

2. 研究の目的

本研究では新規トリパノソーマ治療薬開発に向けて、基礎から応用に向けた基盤研究を行った。具体的には、原虫の生存に必須な TcIP₃R を介する Ca^{2+} シグナリングの生理機能や分子特性を多角的かつ詳細な解析をすると共に (基礎的研究) 特異的阻害剤の同定するための研究を行った (応用的研究)。

3. 研究の方法

本研究でおこなった基礎的研究および応用的研究を下記に示す。

[基礎的研究]

(1) 超微形態：細胞の形態の観点から、哺乳類 IP3R がオルガネラの形態維持に関わることが示唆されている。本研究では、TcIP3R が原虫のミトコンドリアの維持に関与するかを明らかにした。

(2) 局在：生理機能を明らかにする上で、タンパク質の細胞内局在は重要である。そこで、TcIP3R の詳しい局在を免疫蛍光抗体法により明らかにした。

(3) 生化学：タンパク質の特性を明らかにする上で、生化学的解析は必要不可欠である。そこで、TcIP3R の IP3 への親和性及びそれを制御する分子の有無を明らかにすべく、実験を試みた。

(4) 生活環：生物学的な生活史の観点から、細胞内型から血流型への変態や、宿主細胞の破壊に TcIP3R が関与するかなどは未知であり、それらについて明らかにした。

(5) 生体イメージング： Ca^{2+} シグナリングの重要性を理解する上で細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の変化の解析は極めて有用である。そこで、生体イメージングにより、*T. cruzi* の細胞内寄生における $[Ca^{2+}]_i$ の変動を明らかにした。

[応用的研究]

(6) アンチセンス：TcIP₃R mRNA に対する AO が *T. cruzi* の宿主細胞への感染を阻害することから、さらに進展させ、次世代 AO による宿主細胞及びマウスへの感染阻害効果を明らかにした。

(7) 化合物：生体イメージングを応用し、 $[Ca^{2+}]_i$ を減ずる、すなわち原虫の Ca^{2+} シグナリングを阻害する分子の同定を試みた。

4. 研究成果

TcIP₃R を介する Ca^{2+} シグナリングが細胞内型原虫から血流型原虫への変態に重要であることを明らかにした。

TcIP₃R のドミナントネガティブ体を発現させた原虫は、ミトコンドリアに異常をきたし、メタサイクロジェネシスが誘導されることが明らかになった。

TcIP₃R mRNA の maturation を阻害するモルフォリノアンチセンスオリゴを開発し、抗原虫効果があることを明らかにした。

Live cell imaging 法により、TcIP3R がトリパノソーマの細胞内 Ca^{2+} 濃度の決定因子であることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

1: Hashimoto M, Morales J, Uemura H, Mikoshiba K, Nara T. A Novel Method for Inducing Amastigote-To-Trypomastigote Transformation In Vitro in *Trypanosoma cruzi* Reveals the Importance of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor. PLoS One. 2015 Aug 12;10(8):e0135726. doi: 10.1371/journal.pone.0135726. eCollection 2015.

2: Hashimoto M, Nara T, Enomoto M, Kurebayashi N, Yoshida M, Sakurai T, Mita

T,Mikoshiha K. A dominant negative form of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor induces metacyclogenesis and increases mitochondrial density in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Oct 23;466(3):475-80. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.09.053. Epub 2015 Sep 12.

3: Hashimoto M, Nara T, Mita T, Mikoshiha K. Morpholino antisense oligo inhibits trans-splicing of pre-inositol 1,4,5-trisphosphate receptor mRNA of *Trypanosoma cruzi* and suppresses parasite growth and infectivity. *Parasitol Int*. 2016 Jun;65(3):175-9. doi: 10.1016/j.parint.2015.12.001. Epub 2015 Dec 8.

4: Hashimoto M, Doi M, Kurebayashi N, Furukawa K, Hirawake-Mogi H, Ohmiya Y, Sakurai T, Mita T, Mikoshiha K, Nara T. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor determines intracellular Ca²⁺ concentration in *Trypanosoma cruzi* throughout its life cycle. *FEBS Open Bio*. 2016 Oct 14;6(12):1178-1185. doi: 10.1002/2211-5463.12126. eCollection 2016 Dec.

〔雑誌論文〕(計 4件)

〔学会発表〕(計 4件)

〔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：
国内外の別：

取得状況(計 1件)

名称：トリパノソーム関連疾患治療薬、トリパノソーム原虫の殺虫方法およびその利用
発明者：橋本宗明、奈良武司、御子柴克彦
権利者：
種類：
番号：特許第 6245570 号
取得年：2018 年
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：御子柴克彦、古川功治、戸井基道、呉林なごみ

ローマ字氏名 : Katsuhiko Mikoshiba, Koji Furukawa, Motomichi Doi, Nagomi Kurebayashi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。