

令和元年5月20日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19117

研究課題名(和文)赤痢アメーバ“シスト形成”の分子機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of Cell Differentiation Process of Entamoeba Encystation

研究代表者

見市 文香(三田村文香)(Mi-ichi, Fumika)

佐賀大学・医学部・講師(特定)

研究者番号：70576818

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文): 赤痢アメーバはヒトの大腸に感染し、アメーバ赤痢を引き起こす寄生原虫である。生活環は栄養型期とシスト期の2つに大別、主な感染経路はシストの経口摂取である。シスト形成は寄生原虫の寄生性・病原性に関わる重要な生物機構であるが、その制御機構は未解明なままであった。

我々はシスト形成の新規解析法としてフローサイトメトリー法を導入、栄養体とシストをそれぞれ、細胞集団として明確に区別して検出することに成功した。さらに本方法を、シスト形成を阻害する化合物のスクリーニングに応用、400化合物のスクリーニングを行った結果、シスト形成を顕著に阻害する化合物を17個得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シスト形成は、寄生原虫の寄生性・病原性に関わる重要な生物機構であるが、その分子機構はほとんど解明されていない。今回フローサイトメトリーを用いる新規解析法を導入したことにより、シスト形成に伴う、栄養体からシストへの細胞の分化を経時的にモニターできるようになっただけでなく、シスト形成数を自動で解析することが可能になったことから薬剤スクリーニングにも有用な方法である。限られた治療薬しか存在しないアメーバ赤痢症対策として喫急の課題である新規薬剤開発における薬剤標的候補分子の提示に繋がり、社会的な貢献という意義も大きい。

研究成果の概要(英文): Amoebiasis is caused by *Entamoeba histolytica* infection, a protozoan parasite belonging to the phylum Amoebozoa. This parasite undergoes a fundamental cell differentiation process from proliferative trophozoite to dormant cyst, termed “encystation”. The cysts formed by encystation are solely responsible for the transmission of amoebiasis; therefore, *Entamoeba* encystation is an important subject from both biological and medical perspectives. Here, we have established a flow cytometry strategy for not only determining the percentage of formed cysts but also for monitoring changes in cell populations during encystation. This flow cytometry technique enabled us to screen a chemical library, the Pathogen Box of the Medicine for Malaria Venture. Among 400 compounds screened, 17 consistently showed a high negative effect in cyst formation. This is a prerequisite for the development of new drugs against amoebiasis, a global public health problem.

研究分野：分子寄生虫学

キーワード：赤痢アメーバ シスト形成 フローサイトメトリー法

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

### 1. 研究開始当初の背景

赤痢アメーバは、ヒトの大腸に感染しアメーバ赤痢を引き起こす寄生原虫である。発展途上国を中心に世界で年間約 5 千万人の感染者、4-7 万人の死者を出している。治療薬に限られること、有効なワクチンが存在しないことから、病原性の解明、新規薬剤開発が危急の課題である。赤痢アメーバの生活環は栄養型期とシスト期の 2 つに大別され、主な感染経路はシストの経口摂取である。シスト形成は寄生原虫の寄生性・病原性に関わる重要な生物機構であるが、その制御機構は未解明なままであった。近年我々は、赤痢アメーバが産生する含硫脂質の 1 種、コレステロール硫酸がシスト形成に重要な役割を持つことを報告した。

### 2. 研究の目的

“赤痢アメーバ”のシスト形成は次の宿主への唯一の伝播経路であり、その阻害は感染拡大を阻止することが出来るため着目されてきたが、分子機構は不明な点が多く、特に制御機構については未だに解明されていない。本研究課題では、“赤痢アメーバ”のシスト形成の分子レベルでの全容解明を目指し、

- 1) 栄養体からシストへのステージ移行に伴う、細胞の劇的な形態変化を経時的に評価する新規解析方法の導入
- 2) シスト形成を阻害する化合物の探索、を行った。

### 3. 研究の方法

#### 1) シスト形成の新規解析方法の導入

赤痢アメーバの培養株はシスト形成能を失っているため、*Entamoeba invadens* の *in vitro* の培養系を用いてシスト形成の解析を行った。栄養体を低栄養状態にすることでシスト形成を誘導する。次に形成されるシストの誘導効率を測定する。従来法の主流は、形成されたシスト数を、顕微鏡下で実測する方法であった。我々は、迅速にかつ再現性高く *E. invadens* のステージ毎の細胞数を計測できる方法の確立のため、フローサイトメトリー法の導入を試みた。フローサイトメトリーを用いた解析により、栄養体とシストを異なる細胞集団として検出するために、染色に用いる蛍光色素を検討、Evans blue と Calcofluor を選択した。

#### 2) シスト形成に伴う細胞分化過程を経時的に解析

シスト形成を誘導後、経時的に細胞を回収 Evans blue と Calcofluor を用いて蛍光染色を行った後、フローサイトメトリー法で解析を行った。

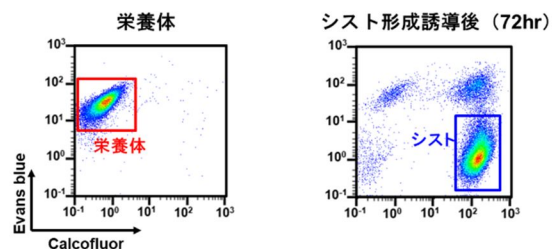
#### 3) シスト形成を阻害する化合物の探索

我々の確立した新規解析方法は、形成されたシスト数についても定量化でき、阻害剤の効果を細胞数の計測によって評価することが可能となった。最初のトライアルとして 400 化合物を用いてスクリーニングを行った。それぞれの化合物を終濃度 10  $\mu$ M で培地に添加しシスト形成を誘導、72 時間後に細胞を回収、Evans blue と Calcofluor を用いて蛍光染色を行った後、フローサイトメトリー法で解析を行った。

### 4. 研究成果

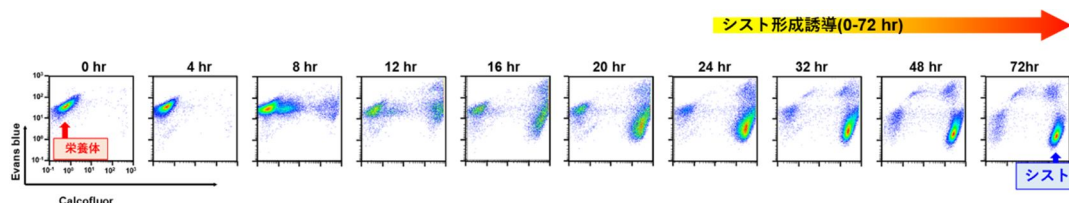
#### 1) シスト形成の新規解析方法の導入

栄養体とシストを異なる細胞集団として検出するための蛍光色素として、栄養体の細胞膜構造を染色する蛍光色素として Evans blue (EB) を、シスト壁の構成成分であるキチンを染色する蛍光色素として Calcofluor (CF) を選択した。そして、栄養体および、シスト形成を誘導した細胞について、それぞれを染色処理後フローサイトメトリーを用いて解析を行った。結果、右図のように栄養体とシストを、それぞれ (EB<sup>+</sup>CF<sup>-</sup>) (EB<sup>-</sup>CF<sup>+</sup>) という細胞集団として明確に区別して検出することが出来た。



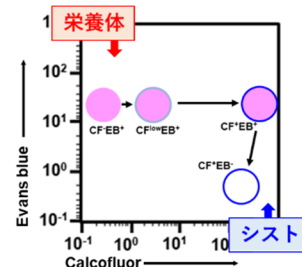
#### 2) シスト形成に伴う細胞分化過程を経時的に解析

*E. invadens* の栄養体を低栄養培地で培養を行うと 72 時間でシスト形成が行われる。今回誘導後、経時的に細胞を回収、Evans blue と Calcofluor を用いた 2 重染色とフローサイトメトリーを組み合わせた解析を行った。結果、下図のような細胞集団の移動として検出することができた。



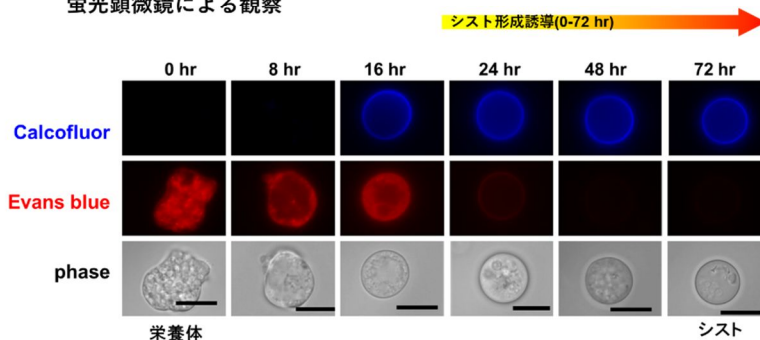
そして、栄養体 (EB<sup>+</sup>CF<sup>-</sup>) とシスト (EB<sup>-</sup>CF<sup>+</sup>) の間には、少なくとも 2 つのステージ (EB<sup>+</sup>CF<sup>ow</sup>)、(EB<sup>+</sup>CF<sup>+</sup>) を経ることを明らかにした。模式的表すと右図のようになる。さらに、これらの細胞集団の細胞形態を、蛍光顕微鏡を用いて解析した。結果、下図のように、フローサイトメトリーでの結果と一致した細胞の蛍光像を得ることが出来た。

細胞集団の移動



以上をまとめると、シスト形成が誘導されるとまず、キチン壁が形成され、その後膜の透過性の低下が起き、耐水性のシストが形成されると考えられる。

蛍光顕微鏡による観察



### 3) シスト形成を阻害する化合物を探索

我々の確立した新規解析方法は形成されたシスト数についても定量することが可能であることから、阻害剤の探索への応用を試みた。最初に系の評価を行う目的で、既存の阻害剤、メトロニダゾール (赤痢アメーバ治療薬)、パロモマイシン (赤痢アメーバ治療薬)、ポリオキシニン D (キチン合成酵素阻害剤)、ラクタシスチン (プロテアソーム阻害剤) を用いて検討した。結果、メトロニダゾール、パロモマイシン、ラクタシスチンそれぞれの IC<sub>50</sub> 値は 12.3 ± 2.47、11.5 ± 0.7、13.6 ± 0.14 μM であり、過去の文献報告と一致する結果であった。一方、ポリオキシニン D はシスト形成を全く阻害しないことを見出した。

次に確立した系を用いて、シスト形成を阻害する化合物のスクリーニングを行った。最初のトライアルとして 400 化合物 [ Medicines for Malaria Venture (<https://www.pathogenbox.org/>) より供与された The Pathogen Box ] を用いてシスト形成を阻害する化合物のスクリーニングを行った。結果、17 化合物がシスト形成を顕著に阻害する化合物として得ることが出来た。これら 17 化合物は、新規薬剤開発に資するリードとなることが期待される。

## 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ]

1. **Mi-ichi F\***, Miyake Y, Tam VK, Yoshida H. A Flow Cytometry Method for Dissecting the Cell Differentiation Process of *Entamoeba* Encystation. *Front Cell Infect Microbiol.* 8: 250. 2018 (\*Corresponding author)
2. Tong H, Miyake Y, **Mi-ichi F**, Iwakura Y, Hara H, Yoshida H. Apaf1 plays a negative regulatory role in T cell responses by suppressing activation of antigen-stimulated T cells. *PLoS One.* 13, e0195119. 2018
3. **Mi-ichi F\***, Miyamoto T, Yoshida H. Uniqueness of *Entamoeba* sulfur metabolism: sulfolipid metabolism that plays pleiotropic roles in the parasitic life cycle. *Mol Microbiol.* 106: 479-491. 2017 (\*Corresponding author)
4. **Mi-ichi F\***, Yoshida H, Hamano S. *Entamoeba* encystation: new targets to prevent the transmission of amebiasis. *PLoS Pathogens.* 12: e1005845. 2016 (\*Corresponding author)

[ 学会発表 ]

< 招待講演 >

1. **Fumika Mi-ichi.** (招待講演) “*Entamoeba* encystation has a causal link to the unique sulfur metabolism” 2018 The 17th Awaji International Forum on Infection and Immunity (Awaji, Japan)

2018年9月4-7日.

2. **見市文香**. (シンポジウム招待講演)「含硫脂質代謝に特化した赤痢アメーバの硫酸代謝」2017年度生命科学系学会合同年次大会(神戸, 兵庫) 2017年12月6-9日.
3. **見市文香**. (シンポジウム招待講演)「Unique role of *Entamoeba* mitochondria: contributing for adaptation to parasitic lifestyle」第90回日本細菌学会総会(仙台, 宮城) 2017年3月19-22日.

< 国際学会 >

4. **Fumika Mi-ichi**, Yasunobu Miyake, Vo Kha Tam, and Hiroki Yoshida. A new method for dissecting the cell differentiation process of *Entamoeba* encystation. The 49th Annual Japan-U.S. Joint Conference on Parasitic Diseases (Hanoi, Vietnam) 2019年2月28日-3月1日.
5. **Fumika Mi-ichi**, Tomofumi Miuamoto, Hiroki Yoshida. Uniqueness of *Entamoeba* sulfur metabolism. The 48th Annual Japan-U.S. Joint Conference on Parasitic Diseases (Nagasaki, Japan) 2018年2月16日.
6. **Fumika Mi-ichi** & Hiroki Yoshida. *Entamoeba* mitochondria play an important role in cell differentiation from proliferative form into dormant form (encystation) by association with cholesteryl sulfate synthesis. 58th International Conference on the Bioscience of Lipids (ETH Zurich, Switzerland) 2017年9月10-14日.

< 国内学会 >

7. **見市文香**, 三宅靖延, Vo Kha Tam, 吉田裕樹. 「*Entamoeba* シスト形成に伴う細胞分化のフローサイトメトリー法を用いた新規解析法の導入」第88回日本寄生虫学会大会(長崎) 2019年3月15-16日
8. **見市文香**, 三宅靖延, 山口タム, 吉田裕樹. 「*Entamoeba* シスト形成に伴う細胞分化の新規解析法の導入」第71回日本寄生虫学会南日本支部大会/第68回日本衛生動物学会南日本支部大会(福岡) 2018年10月27-28日
9. 新庄記子, **見市文香**, 石丸幹二, 吉田裕樹. 「オトギリソウ抽出エキスによるマクロファージ炎症性サイトカインの発現制御」第83回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会(東京) 2018年7月26日.
10. **見市文香**, 宮本智文, 吉田裕樹. 「赤痢アメーバの含硫脂質代謝の全容解明」第59回日本脂質生化学会(京都) 2017年6月15-16日.
11. **見市文香**, 宮本智文, 吉田裕樹. 「赤痢アメーバの含硫脂質代謝の全容解明」第86回日本寄生虫学会大会(札幌) 2017年5月28-29日.
12. **見市文香**, 濱野真二郎, 吉田裕樹. 「赤痢アメーバ“シスト形成”分子機構の解明」第69回日本寄生虫学会南日本支部大会/第66回日本衛生動物学会南日本支部大会(佐賀) 2016年11月5-6日

[ 雑誌論文 ] (計 4 件)

[ 学会発表 ] (計 12 件)

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。