

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（A）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19209058
 研究課題名（和文）プロテアーゼ反応を介する生体防御システム制御の分子基盤の確立と臨床
 応用への展開
 研究課題名（英文）Protease-mediated regulation of host immune system and application
 as therapeutic targets
 研究代表者
 山本 健二（YAMAMOTO KENJI）
 九州大学・大学院薬学研究院・特任教授
 研究者番号：40091326

研究成果の概要（和文）：本研究は、生体防御システムにおけるプロテアーゼ反応の意義および作用機序を、宿主と病原体の両方のプロテアーゼの視点に立って包括的に解明することを目的とした。得られた成果は以下の通りである。①宿主エンドリソソーム系酵素カテプシン E (CatE) のマクロファージおよび樹状細胞における異なる機能と制御機構、②CatE 欠損によるオートファジーシステムの破綻、③CatE 発現量と悪性腫瘍の発症・転移度との逆相関性、④CatE による癌細胞特異的の増殖抑制、⑤CatE の特異的な阻害剤ならびに活性化剤の開発、⑥ジンジバリス菌感染による動脈硬化症や早期低体重児出産の亢進機序の解明、⑦本菌由来の病原性酵素 **Gingipains** を阻害する二元的阻害剤の開発、等々である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the nature and function of both host- and bacteria-derived proteases in host immune system. Cathepsin E (catE) and gingipains were treated as a host-derived endolysosomal protease and bacterial proteases, respectively. The obtained results are as follows: (i) CatE differentially regulated the nature and function of dendritic cells and macrophages, (ii) CatE deficiency caused impairment of autophagy in macrophages manifesting mitochondria dysfunction and enhanced oxidative stress, (iii) Endogenous Cat E expression levels were positively associated with the growth arrest and metastasis reduction of tumor cells in vivo and the concomitant increase of tumor-associated activated macrophages in tumor microenvironment, (iv) CatE specifically induced apoptosis in tumor cells without affecting normal cells in vitro by catalyzing the proteolytic release of soluble TRAIL from tumor cell surface, (v) Peptide-aptamer-based inhibitors and activators of CatE was generated by cDNA display techniques, (vi) Atherosclerosis progression in apolipoprotein E-knockout mice was accelerated by *P. gingivalis* infection, which was mediated by selective proteolysis of apolipoprotein B-100 by Arg-gingipain (Rgp), (vii) A risk for preterm birth and fetal death in pregnant mice was enhanced by *P. gingivalis* infection and inhibited by combination treatment of Rgp and Kgp inhibitors, (iii) A newly developed peptide analogue inhibiting both Rgp and Kgp suppressed most of the pathogenicity of *P. gingivalis*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	18,500,000	5,550,000	24,050,000
2008年度	14,200,000	4,260,000	18,460,000
2009年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
総計	38,500,000	11,550,000	50,050,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：歯学、蛋白質、トランスレーショナルリサーチ、発現制御、薬理学、癌、免疫学、プロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

免疫システムとエンドリソソーム系蛋白質分解システムの関係については、抗原のプロセッシング提示機構やインバリエント鎖の分解などによる獲得免疫系の活性化、サイトカイン受容体やToll-like receptor (TLR)を介するシグナル伝達系の制御、アポトーシス誘導による自然免疫系の活性化など、これまで数多くの報告がなされている。しかし、免疫システムにおけるエンドリソソーム系プロテアーゼの役割や作用機構、および病原微生物の局所免疫応答回避機構における宿主ならびに病原体のプロテアーゼの機能の詳細について依然として不明な点が多い。これまで、申請者らは、エンドリソソーム系蛋白質分解システムを担うカテプシンE (CatE) やカテプシンD (CatD)の遺伝子欠損マウスやそれらに由来する細胞群の解析を通じて、これらの酵素が免疫システムを担う重要な酵素であることを報告してきた。なかでも、CatE欠損によるアトピー性皮膚炎の発症、細菌感染に対する易感染性の増大、自然発症癌の多発化など、CatEが生体防御系においてきわめて重要な役割を果たしていることを示唆してきた。しかし、CatEの生理的な基質が依然として不明なことから、それらの生理機能や作用機序については依然として不明のままである。一方、歯科領域において重要視されている歯周病は、成人の8割以上が罹患する国民病であり、ストレスや生活習慣とも密接に関係する生活習慣病の一つでもある。この疾患は口腔細菌によって惹き起こされる感染症で、その最重要原因菌として*Porphyromonas gingivalis* (ジンジバリス菌) が知られている。本菌は、強力な病原性プロテアーゼのRgpとKgpという2種類のGingipainsを産生し、これらが協調して病原性を発揮していることが知られている。しかし、Gingipainsと宿主免疫応答との関係については不明のままである。また近年、歯周

病は動脈硬化性心疾患のハイリスクファクターであることが疫学的研究によって明らかにされ、歯周病による動脈硬化性心疾患促進機構におけるジンジバリス菌とGingipainsの機能にも新たな注目が集まっている。申請者らは、最近、ジンジバリス菌感染による動脈硬化症促進にGingipainsのうちのRgpがLDLの変性に直接関与していることを世界に先駆けて明らかにしている。

2. 研究の目的

本研究提案は、自然免疫を含む生体防御システムの制御におけるプロテアーゼ反応の意義および作用機序を、宿主と病原体の両方のプロテアーゼの視点に立って包括的に解明することを目的としている。また、本研究提案では、CatEの制御と関係する悪性腫瘍や感染症、Gingipainsが関係する歯周病や関連の動脈硬化性心疾患などの難治性疾患の克服を目指して、これらのプロテアーゼを新たな分子標的とする創薬研究が展開された。具体的には、以下の研究課題のもとに研究が遂行された。①エンドリソソーム系蛋白質分解システムにおけるCatEの作用機構と生理作用の解明、②悪性腫瘍を制御するCatEの分子機構の解明、③ジンジバリス菌感染による動脈硬化性心疾患促進機構の分子機構の解明とGingipainsの機能解析、④これらのプロテアーゼを分子標的とする上記疾患の予防・診査・治療に向けた新たな方法論の確立、等である。

3. 研究の方法

① エンドリソソーム系蛋白質分解システムの作用機構と生理作用の解明

正常マウスおよびCatE欠損マウスから腹腔および骨髄由来マクロファージや骨髄由来の樹状細胞を調製し、エンドリソソーム系の性状や機能に及ぼすCatE欠損の影響を解析

し、CatEのエンドリソソーム系における作用機構と生理作用を解析した。CatE欠損マウスは、アトピー性皮膚炎や細菌に対する易感染性を示すなど、免疫制御系の破綻が強く示唆されていることから、これらの動物の骨髄および腹腔由来のマクロファージや骨髄由来樹状細胞におけるエンドリソソーム系の性状と機能変化を各々の正常細胞と対比させて解析した。

② 悪性腫瘍におけるエンドリソソーム系蛋白質分解システムの機能変換機構の解明

免疫担当細胞は、その活性化に伴いCatEなどのエンドリソソーム系プロテアーゼを細胞外に多く分泌することが知られている。また最近、悪性腫瘍細胞においても、これらのプロテアーゼの細胞外分泌が亢進していることが明らかとなっている。そこで、本研究では、免疫担当細胞ならびに悪性腫瘍細胞から細胞外分泌されるCatEの作用機構と生理作用について解析した。ヒト由来の悪性腫瘍細胞の培養系に各種精製カテプシン群や活性化マクロファージを加え、悪性腫瘍細胞の性状・増殖・生存に及ぼす影響を解析した。

また、ヒト悪性腫瘍細胞を移植したヌードマウスに精製した CatE を外来性に原発巣に投与し、悪性腫瘍の増殖ならびに転移に及ぼす効果を解析した。さらに、CatE 欠損マウスおよび同系の野生型マウス、さらに CatE 過剰発現トランスジェニックマウスのそれぞれに同系由来のミエローマ B16 細胞を移植し、悪性腫瘍細胞の増殖ならびに転移に及ぼす CatE 発現レベルの影響を解析した。さらに、ヒト由来の癌細胞（ヒト前立腺がん細胞 ALVA-101 ; CatE をほとんど発現していない細胞）に CatE を過剰発現させた場合とそうでない場合の *in vivo* および *in vitro* での細胞増殖能や悪性度の比較が行われた。

③ ジンジバリス菌感染による動脈硬化性心疾患促進の分子機構の解明と Gingipains の機能解析

歯周病が動脈硬化性心疾患のハイリスクファクターであることは、これまでの疫学的研究によって明らかにされている。従って、現在の多くの研究者の関心は、歯周病がどのような機序で動脈硬化性心疾患の発症を促進

するのかという分子メカニズムの解明に向けられている。すでに申請者らは、動脈硬化性心疾患モデル動物であるアポリポプロテインE(ApoE)ノックアウトマウスを用いて、ジンジバリス菌感染の実験系を確立しているので、これを用いてジンジバリス菌感染による動脈硬化性心疾患の発症進展の促進効果が検討された。動脈硬化性心疾患の病理学的評価は、形態学的には、心臓におけるリポド沈着と内膜肥厚およびマクロファージなどの炎症性細胞や平滑筋細胞の浸潤の程度などの解析によって行い、生化学的には血清中のコレステロール、低密度リポプロテイン(LDL)コレステロール、高密度リポプロテイン(HDL)コレステロールの量的変化を生化学的に解析するとともに、アガロースゲルやSDSゲルによる電気泳動を行って、これらのリポ蛋白質の性状変化を比較検討した。野生株と同様に、RgpおよびKgpを欠損させた変異株をApoEノックアウトマウスに感染させ、その性状を野生株の場合と比較検討した。ついで、野生株の感染に対するRgpおよびKgpの特異的阻害剤（すでに申請者らが作成済み）の効果を検討した。Gingipains各種酵素欠損株と阻害剤の影響から、本菌感染によって促進される動脈硬化性心疾患での各種Gingipainsの役割を明らかにした。*in vivo*の実験と並行して、*in vitro*の系を用い、LDLおよびHDLをGingipains阻害剤の存在・非存在下で野生株や精製Gingipainsで処理し、その性状変化を生化学的に解析し、*in vivo*の実験の結果と対比させた。*in vitro*でGingipainsにより処理されたLDLおよびHDLがマクロファージに対して泡沫化を誘導するか否かがさらに検討された。これらの解析結果に基づき、ジンジバリス菌感染による動脈硬化性心疾患の促進機構の分子基盤が確立された。

④ プロテアーゼを標的とするこれら疾患の予防・診査・治療に向けた新たな方法論の確立

上記研究課題の研究成果に基づき、悪性腫瘍、感染症、歯周病および関連する動脈硬化性心疾患に対する予防・診査・治療に向けた新たな方法論の確立を目指した研究が行われた。CatEについては、その発現量の低下が悪性腫

瘍や免疫アレルギー疾患、および感染症を誘導する可能性があるため、リコンビナント蛋白質の作製や遺伝子治療を視野に入れ、新たなcDNAディスプレイ法を基盤とする高速分子進化技術を用いて特異的な親和性を有するペプチドが開発された。歯周病とそれに関連する動脈硬化性心疾患に対しては、RgpおよびKgp両酵素活性を一剤で阻害する二元的阻害剤(dual inhibitor)の開発を、これまでに開発した阻害剤の構造特性に基づいて共通骨格を有する化合物をデザイン・設計し、これらをリード化合物として多数の誘導体を合成した。

4. 研究成果：

得られた結果を簡単にまとめると以下の通りである。

(1) CatE のマクロファージおよび樹状細胞における制御機構と機能は明らかに異なっていた(*J Immunol* 179:5728-5737, 2007)。即ち、マクロファージでは、CatE 欠損がリソソーム膜蛋白質 LAMP-1 や LAMP-2 の特異的な蓄積と、それに伴うリソソーム性 pH の著明な上昇をもたらし、種々の細胞機能に破綻をもたらした。それに対し、樹状細胞ではこのような変化は認められず、むしろ外来性抗原のプロセッシング提示能が亢進していた。この亢進は、食食能の増大と補欠補助因子の細胞表面での発現増大によることが示された。

(2) CatE は、正常細胞にはほとんど影響することなく、癌細胞の増殖を強く抑制することが明らかとなった。これは、CatE が癌細胞表面から TRAIL という分子を切断遊離し、これが癌細胞表面のデス受容体に結合してアポトーシスを誘導すること、腫瘍部位へのマクロファージの遊走能や活性を高め、癌細胞の傷害を誘導すること(*Cancer Res* 67:10869-10878, 2007)、さらにエンドスタチンなどの血管新生阻害因子を産生し、腫瘍血管新生を抑制すること(*Biol Chem* 388:1173-1181, 2007)などによることが示された。

(3) マウスに *P. gingivalis* を感染させると菌量に依存して出産数の減少が見られたが、Gingipains 欠損株や Gingipains 阻害剤の投与では出産数の減少が認められないこ

とから、*P. gingivalis* 感染による出生数の減少は Gingipains 作用によることが明らかとなった(Manuscript in preparation)。

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 16 件)

1. Kawakubo T., Okamoto K., Iwata J., Shin M., Okamoto Y., Yasukochi A., Nakayama K.I., Kadowaki T., Tsukuba T., Yamamoto K. Cathepsin E Prevents Tumor Growth and Metastasis by Catalyzing the Proteolytic Release of Soluble TRAIL from Tumor Cell Surface. *Cancer Res.* 67: 10869-10878, 2007 (査読有)
2. Kakehashi H., Nishioku T., Tsukuba T., Kadowaki T., Nakamura S., Yamamoto K. Differential regulation of the nature and functions of dendritic cells and macrophages by cathepsin E. *J. Immunol.* 179: 5728-5737, 2007 (査読有) .
3. Kanaji, S., Tanaka, Y., Sakata, Y., Takeshita, K., Arima, K., Ohta, S., Hansell, E.J., Caffrey, C., Mottram, J.C., Lowther, J., Donnelly, S., Stack, C., Kadowaki, T., Yamamoto, K., McKerrow, J.H., Dalton, J.P., Coombs, G.H. and Izuhara, K.: Squamous cell carcinoma antigen 1 is an inhibitor of parasite-derived cysteine proteases. *FEBS Lett.* 581: 4260-4264, 2007. (査読有)
4. Sakai, E., Naito, M., Sato, K., Hotokezaka, H., Kadowaki, T., Kamaguch, A., Yamamoto, K., Okamoto, K. and Nakayama, K.: Construction of recombinant hemagglutinin derived from the gingipain-encoding gene of *Porphyromonas gingivalis*, identification of its target protein on erythrocytes, and inhibition of hemagglutination by an interdomain regional peptide. *J. Bacteriol.* 189: 3977-3986, 2007 (査読有)
5. Yanagawa, M., Tsukuba, T., Nishioku, T., Okamoto, Y., Okamoto, K., Takii, R., Terada, Y., Nakayama, K.T., Kadowaki, T. and Yamamoto, K.: Cathepsin E deficiency induces a novel form of lysosomal storage disorder

- showing the accumulation of lysosomal membrane sialoglycoproteins and the elevation of lysosomal pH in macrophages. *J. Biol. Chem.* 282:1851-1862, 2007 (査読有) .
6. Shin, M., Kadowaki, T., Iwata, J., Kawakubo, T., Yamaguchi, N., Takii, R., Tsukuba, T. and Yamamoto, K.: Association of cathepsin E with tumor growth arrest through angiogenesis inhibition and enhanced immune responses. *Biol. Chem.* 388: 1173-1181, 2007 (査読有) .
 7. Kadowaki, T., Takii, R., Yamatake, K., Kawakubo, T., Tsukuba, T. and Yamamoto, K.: A role for gingipains in cellular responses and bacterial survival in *Porphyromonas gingivalis*-infected cells. *Frontiers in Biosci.* 12: 4800-4809, 2007 (査読有) .
 8. Yamatake, K., Maeda, M., Kadowaki, T., Takii, R., Tsukuba, T., Ueno, T., Kominami, E., Yokota, S. and Yamamoto, K.: Role for gingipains in *Porphyromonas gingivalis* traffic to phagolysosomes and survival in human aortic endothelial cells. *Infect. Immun.* 75: 2090-2100, 2007 (査読有) .
 9. Naimuddin, M., Kitamura, K., Kinoshita, Y., Honda-Takehashi, Y., Murakami, M., Ito, M., Yamamoto, K., Hanada, K., Husimi, Y. and Nishigaki, K.: Selection-by-function: efficient enrichment of cathepsin E inhibitors from a DNA library. *J. Mol. Recognit.* 20: 58-68, 2007 (査読有) .
 10. Shigematsu N., Fukuda T., Yamamoto T., Nishioku T., Yamaguchi T., Himeno M., Nakayama K.I., Tsukuba T., Kadowaki T., Okamoto K., Higuchi S., Yamamoto K.. Association of cathepsin E deficiency with the increased territorial aggressive response of mouse. *J. Neurochem.* 105: 1394-1404, 2008 (査読有) .
 11. Ishida Y., Hu J.P., Sakai E., Kadowaki T., Yamamoto K., Tsukuba T., Nakayama K., Okamoto K. Determination of active site of Lysine-specific cysteine proteinase (Lys-gingipain) by use of a *Porphyromonas gingivalis* plasmid system. *Arch. Oral Biol.* 53 (6): 538-544, 2008 (査読有) .
 12. Shigematsu, N., Yamamoto, K., Higuchi, S., and Fukuda, T. An immunohistochemical study on a unique colocalization relationship between substance P and GABA in the central nucleus of amygdala. *Brain Res.* 1198: 55-67, 2008 (査読有) .
 13. Kawakubo T., Yasukochi A., Tsukuba T., Kadowaki T., Yamamoto K. Gene expression of profiling of mammary glands of cathepsin E-deficient mice compared with wild-type littermates. *Biochimie* 90: 396-404, 2008 (査読有) .
 14. Tsukuba T., Yanagawa M, Okamoto K, Okamoto Y, Yasuda Y, Nakayama KI, Kadowaki T., Yamamoto K. Impaired chemotaxis and cell adhesion due to decrease in wide range of cell surface receptors in cathepsin E-deficient macrophages. *J. Biochem.* 145 (5): 565-573, 2009 (査読有) .
 15. Kitamura K, Yoshida C, Kinoshita Y, Kadowaki T., Takahashi Y, Tayama T, Kawakubo T., Naimuddin M, Salimulla M, Nemoto N, Hanada K, Husimi Y, Yamamoto K., Nishigaki K. Development of systemin in vitro evolution and its application to generation of peptide aptamer-based inhibitors of cathepsin E. *J. Mol. Biol.* 387: 1186-1198, 2009 (査読有) .
 16. Yasukochi A., Kawakubo T., Nakamura S, Yamamoto K. Cathepsin E enhances anticancer activity of doxorubicin on human prostate cancer cells showing resistance to TRAIL-mediated apoptosis. *Biol Chem* (in press) 2010 (査読有) .
- [学会発表] (計 44 件)
- 平成 19 年度 : 国内学会 15 編
国際学会 6 編 (うち招待講演 2 編)
- 平成 20 年度 : 国内学会 14 編
国際学会 2 編 (うち招待講演 2 編)
- 平成 21 年度 : 国内学会 3 編
国際学会 3 編
- [図書] (計 0 件)
- [産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

名称：アンチエイジング剤
発明者：山本健二、川久保友世、安河内篤
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2009-264894
出願年月日：平成 21 年 11 月 20 日
国内外の別：国内

名称：新規な抗癌カテプシン製剤およびそれを用いた癌併用療法抗癌剤
発明者：山本健二、川久保友世、安河内篤
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2008-500586
出願年月日：平成 19 年 02 月 19 日
国内外の別：国内

名称：新規ペプチド及びその使用
発明者：西垣功一、北村幸一郎、Madhu Biyani、二上雅恵、山本健二、川久保友世、安河内篤
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2009-245763
出願年月日：平成 22 年 03 月 17 日
国内外の別：国内

○取得状況 (計 1 件)

名称：カテプシン E の腫瘍マーカーとしての用途及びカテプシン E ならびにカテプシン D の腫瘍血管新生阻害療法のターゲットとしての用途
発明者：山本健二、岩田淳一
権利者：同上
種類：特許
番号：特許第 4452791 号
取得年月日：平成 22 年 02 月 12 日
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.phar.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 健二 (YAMAMOTO KENJI)
九州大学・大学院薬学研究院・特任教授
研究者番号：40091326

(2) 研究分担者

筑波 隆幸 (TSUKUBA TAKAYUKI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：30264055

(3) 研究分担者

瀧井 良祐 (TAKII RYOSUKE)
山口大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：00419558

(4) 研究分担者

門脇 知子 (KADOWAKI TOMOKO)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：70336080

(5) 研究分担者

川久保 友世 (KAWAKUBO TOMOYO)
九州大学・大学院薬学研究院・特任助教
研究者番号：70507813