

厚生科学研究費補助金  
新興・再興感染症研究事業

# マラリアの病態疫学、流行予測 及び感染動向に関する研究

(課題番号：H12-新興-17)

平成12年度 総括研究報告書

主任研究者 鈴木 守

平成13(2001)年4月

# 厚生科学研究費補助金研究報告書

平成13年4月10日

厚生労働大臣 坂口 力 殿

住 所

研究者 氏 名 スズ キ マモル 鈴木 守  
(群馬大学医学部)

平成12年度厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）に係る研究事業を完了したので、次のとおり報告する。

研究課題名（課題番号）：マラリアの病態疫学、流行予測及び感染動向に関する研究  
(H12-新興-17)

国庫補助金精算所要額：金 25,700,000 円也

# 目 次

|   |          |
|---|----------|
| I. 総括研究報告書                                  |          |
| マラリアの病態疫学、流行予測及び感染動向に関する研究                  | ----- 1  |
| 鈴木 守  |          |
| II. 分担研究報告                                  |          |
| 1. 熱帯熱マラリア原虫エノラーゼ合成ペプチドの機能と構造に関する研究         | ----- 6  |
| 狩野 繁之                                       |          |
| 2. 熱帯熱マラリア原虫エノラーゼの部分ペプチドと水溶性 MAP 抗原の合成的研究   | - 8      |
| 片貝 良一                                       |          |
| 3. マラリアの重症化に関わる宿主因子に関する研究                   | ----- 10 |
| 相川 正道                                       |          |
| 4. マラリア原虫のクロロキン耐性を消去する薬剤の開発-                | ----- 12 |
| 竹内 勤  |          |
| 5. マラリア原虫の薬剤耐性に関わる ATP 結合カセット(ABC)トランスポーター群 | --- 15   |
| 桑野 信彦                                       |          |
| 6. マラリア伝搬阻止ワクチンの開発に関する研究                    | ----- 19 |
| 鳥居 本美                                       |          |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表                         | ----- 24 |
| IV. 研究成果の刊行物・別刷                             |          |

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
総括研究報告書

マラリアの病態疫学、流行予測及び感染動向に関する研究

主任研究者 鈴木守 群馬大学医学部教授

研究要旨

本研究班は標記研究題目を目的として、病態疫学解明のためのマラリア原虫抗原を特定し、分子設計する分担者と、新しい視点にたつて薬剤耐性マラリアに対処する研究を行う分担者とによって構成されている。マラリア対策推進の新しい指針の策案に直結する成果を生み出すために流行地の罹患者より採取した血清や、感染血液から分離したマラリア原虫などを研究試料としている。流行地のマラリア重症患者からの血清と強く反応するマラリア抗原がエノラーゼであることが判明し分子構造に基づく活性部位の合成がなされた。活性部位で免疫された動物の血清は、マラリア原虫の増殖を阻止する。重症化に関与する宿主側の因子についても検討し、トロンボキササンチン、プロスタグランジンの動態について知見をえた。薬剤耐性マラリアについては耐性除去に有用な化合物の検索と耐性除去の機序につき検討し、タイの耐性マラリアと比較するためアフリカの耐性マラリア原虫の収集が始められた。マラリア対策の将来の要と目されるワクチンについては、三日熱伝播阻止ワクチンの研究は、タイの分離株を得て進められている。タイにおいて野外実験実施も検討されている。以上すべての分担研究においてヒトが直接対象となるため倫理上の問題につき特に留意して進めている。

分担研究者

(愛媛大学医学部教授)

狩野 繁之

研究協力者

(国立国際医療センター研究所部長)

佐藤 久美子

片貝 良一

(群馬大学医学部教授)

(群馬大学工学部教授)

片倉 賢

相川 正道

(群馬大学医学部助教授)

(東海大学総合科学技術研究所教授)

竹内 勤

A. 研究目的

(慶應義塾大学医学部教授)

(1) 申請者は、マラリア流行地を調査し、一定地域内の流行状況が非均一に分布していること、そのため、同一地域内でもマラリア罹患者の病態が多様性に富み、あ

桑野 信彦

(九州大学大学院医学系研究院教授)

鳥居 本美

る者はマラリアに抵抗力を示し、ある者は重症化することを観察してきた。このようなマラリア疫学の実態は意外にも知られていない。1992年にWHOにより宣言された新しいマラリア対策指針を推進させるためには、病態疫学調査を進め、マラリアに罹患した場合に重症化する住民と軽症で済む住民との分布図を作成し対策計画をたてる必要がある。そのためには重症化を反映するマラリア抗原エピトープおよび抵抗性を反映するエピトープを特定し、住民の血清との反応を計測することが必要となる。現在までに熱帯熱マラリア原虫の持つエノラーゼに対して産生される抗体が結合するエピトープ部位はコンピューターによって特定され、今年度の研究で4種類のポリペプチドが合成されている。本研究は用意されたポリペプチドを流行地患者（抵抗性）と日本人患者（感受性）とに反応させ、病態疫学調査法の基礎をかため、一部流行地の現場と連絡しながら小規模パイロットスタディを進める。この結果、新しいWHO計画を現地において科学的に推進させる方法が開発されることになる。

(2) 新しいマラリア対策計画においては、マラリアによる死亡率を低下させることに最も高いプライオリティを与えている。したがって重症マラリアについて検討を加え、最終的に医師不足の流行地の現場でいかなる対処をすべきかにつき、科学的根拠に基づいた指針をだす必要がある。本年度は、タイの研究者との共同体制によ

り、重症マラリア患者から採取した血清を使い重症化したマラリア患者の病態につき解析し、重症マラリアに対処する科学的根拠をあきらかにすることを目的とする研究を進める。この研究計画の中から(1)による方法論で重症マラリアの病態を反映する何らかの物質の分子設計、それに基づく病態疫学上の応用も生まれてくるものと思われる。

薬剤耐性マラリアに対処するために新薬の開発計画があるが、新薬を開発するための資金が莫大で時間もかかるため、巨大メーカーが次々に手をひいていった現実がある。本研究班においては敢えて新薬開発を目的とせず、現在までに使用が承認された薬剤の中で、マラリア以外の治療に使用されている薬剤について、特にクロロキン耐性を示すマラリアに対して効果があるか、あるとすればその機序はなにかについて調べること、また既存の認可された薬剤の中から、耐性を除去する作用をもつ薬剤を取り出してその効果、作用機序についても検討すること、以上を研究目標としている。

(3) マラリアワクチン開発研究は、現在なお世界の研究者がしのぎをけずって競争している分野である。分担者鳥居による三日熱マラリア伝播阻止ワクチンは、タイの流行地において採取された三日熱マラリア原虫を使用して効果を確かめるまでに研究が進展してきた。小規模野外試験に踏み切る可能性もみえてきた。本研究班の目玉と

もいえる実績であるのでさらに流行地での試験実施をめざして検討を進める。

## B. 研究方法

(1) マラリア病態疫学のアセスメントを行うためのマラリア原虫分子を特定する研究については、流行地住民の血清によりその反応性を調べながら進めている。特定された分子について、コンピューター解析により分子構造モデルを想定し、そのモデルから活性部位を特定し、特定された部分を合成する方法がとられている。

(2) 熱帯熱マラリアに罹患したタイの患者から血清を得て、プロスタグランディン、トロンボキサンを測定し、重症度との関連性をしらべた。

(3) クロロキンに対して耐性を示すマラリア原虫から、耐性を除去する研究において使用されている薬剤は、蟻虫の駆除薬として小児に対して広く使用され、安全性も確認されたピペラジンおよびその誘導体である。蛇咬症に使用され、薬剤耐性癌細胞の耐性除去作用の確認されており、安全性においても問題のないセファランチンについても耐性除去作用を調べた。

テトラサイクリン系の薬剤は半世紀の使用により安全性に関する資料は十分揃っている。マラリア治療においては、現在ドキシサイクリンが一般的につかわれているが、われわれは、ミノサイクリンの効果について *in vitro* の系で調べた。

(4) マウスと *Plasmodium yoelii* の系でき

わめて、有望な結果をえたので、三日熱マラリア原虫のオーキネート表面タンパクを組み替え技法で用意し、伝播阻止実験をおこなった。

## C. 結果と考察

流行地住民の病態疫学を調べるための合成抗原が4種類用意され、その抗原を使ってマラリア患者血清との反応性を調べたところ重症度との関連性について、一定の成績がえられた。タイの重症マラリア患者血清中のプロスタグランディン、およびトロンボキサンの追跡測定結果により、重症マラリアの極期に何れも上昇し、患者が治癒過程に入ると、正常化する事実時が判明した。この知見は、マラリア重症化の機序を解明する上で重要である。この結果を病態疫学の解析に応用させ、全体を整合性のある研究計画として仕上げる予定である。薬剤耐性マラリアから耐性を除去する方法については、一定の結果をえたが、さらに癌やリーシュマニア症の薬剤耐性の機序、耐性除去の情報を応用することが必要である。ミノサイクリンの抗マラリア作用は、本剤の脂質親和性のため他のテトラサイクリン系薬剤よりもまざっている。実用化に最も近い実績となったのでメーカーや流行地との連携により実際の治療応用をはかる予定である。三日熱マラリア伝播阻止研究については、I~IVまでのPhaseと時期を設定し、日本およびタイの倫理委員会を通した上で、流行地でのテストに入る予定であ

る。

#### D. 結 論

本研究班の研究理念は1992年にアムステルダムにおいてなされたWHOの宣言を基盤としている。かつて進められたマラリア対策の基本方針は、マラリア原虫の保有率を指標にして流行地のハマダラカ制圧対策を主体とすることになった。しかしその方針による対策計画の限界が次第に明らかになり、むしろ「病」としてのマラリアに対処することを優先させることになり、そのため流行地の病態疫学といういままでにない概念を導入する必要性が生じ、さらに重症マラリアに対する対処を医療体制の劣悪な流行地の現場でどのように進めるかが問題となった訳である。本研究班はこれらの問題に正面から対面し、上記において報告してきた結果を得た。最も現場での利用に近い研究課題が、流行地の病態疫学調査に一定の意味のある抗原も合成できたが、さらに別の抗原との組み合わせを試みて正確な資料が整えられるよう次の計画を推進させている。現在えられている抗原を同時並行の形で使い、流行地住民の調査を進める予定である。マラリアの薬剤耐性に対処する研究においては、耐性除去に有用な薬物については、薬剤耐性の機序解明を含めて実用化の可能性の高い既存の薬剤を検討しているが、最も現場での利用に近い研究は、ミノサイクリンの臨床応用と思われる。近い将来に一定の結果が出せることと思われる。

る。ワクチン物質の効果判定については、Phase I~IV までのステップが詳細に決められているので、これに従って効果判定の検討が進められることになる。タイにおいてはすでにワクチンの野外試験が行われたので、野外試験の実施に困難はない。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) Karasawa, M., Kobayashi, K., Oku, H., Sato, K., Kano, S., Suzuki, M. and Katakai, R. Synthesis and structure of a peptide having partial sequence of *Plasmodium falciparum* enolase. In *Peptide Science 1999*, N. Fujii, Ed.; The Japanese Peptide Society: Osaka, 2000; pp 295-298 (2000).

(2) Sato, K., Kano, S., Matsumoto, Y., Glanarongran, R., Krudsood, S., Looareesuwan, S., Aikawa, M. and Suzuki, M. Application of yeast enolase as antigen for immunodiagnosis of malaria. *South East Asia J. Trop. Med. Pub. Health*, 31(suppl 1), (in press).

##### 2. 学会発表

(1) Katakura, K., Suzuki, M., Fujise, H. and Hashiguchi, Y. Drug resistance mediated by ABC proteins in parasitic protozoa. 第69回日本寄生虫学会大会, 松江, 2000年4月. *Parasitol. Int.* 49 (suppl.): 28.

(2) Suzuki, M. New concept of parasitology in medical education. 第69回日本寄生虫

- 学会大会, 松江, 2000年4月 . Parasitol. Int. 49 (suppl.): 29.
- (3) Toshinari, M., Kawai, S., Ichino, M., Suzuki, M., Aikawa, M. and Minami, M. Analysis of adhesion of *Plasmodium coatneyi* infected red blood cells to adhesion molecules in three kind of Macaque under flow condition system. 第69回日本寄生虫学会大会, 松江, 2000年4月 . Parasitol. Int. 49 (suppl.): 94.
- (4) Hatabu, T., Kawazu, S-I., Mizuno, Y., Suzuki, M. And Kano, S. Infection of *Plasmodium berghei* XAT in Beige mutant mice. 第69回日本寄生虫学会大会, 松江, 2000年4月 . Parasitol. Int. 49 (suppl.): 95.
- (5) 奥浩之、唐澤睦実、片貝良一、佐藤久美子、鈴木守、狩野繁之：熱帯熱マラリア原虫エノラーゼ部分配列の合成・構造解析、第49回高分子学会年次大会、平成12年5月29-31日、名古屋国際会議場
- (6) Kano S, Kawazu S, Hatabu T, Ishikawa H, Komaki K, Oku H, Katakai R, Sato K, Hosaka K, Miyamoto K, Looareesuwan S, Aikawa M, and Suzuki M: Molecular characterization of synthetic peptides of *Plasmodium falciparum* enolase. XV International Congress for Tropical Medicine and Malaria, August 20-25, 2000, Cartagena de Indias, Colombia .
- (7) 狩野繁之、河津信一郎、Tongol Rivera, P., Andino Villacorte, E., Caneta Miguel, E., Antonio Socrates, J., 鈴木 守  
フィリピンパラワン島における住民参加型マラリア対策. 第41回日本熱帯医学会, 東京, 2000年11月. 日熱医学会誌 28 (増): 74.
- (8) 林 清華、片倉 賢、鈴木 守  
熱帯熱マラリア原虫に対するテトラサイクリン系抗生物質の作用機序：プラスチドを標的とする可能性について. 第41回日本熱帯医学会, 東京, 2000年11月. 日熱医学会誌 28 (増): 81.
- (9) Ishiguro, T., Oku, H., Sato, K., Kano, S., Suzuki, M. and Katakai, R. Synthesis of a peptide having partial sequence of enolase, 第37回ペプチド討論会、平成12年10月. 愛知県勤労会館.
- (10) Kano, S., Sato, K., Oku, H., Katakai, R., Masuda, G., Looareesuwan, S., Aikawa, M. and Suzuki, M. Synthetic polypeptides of *Plasmodium falciparum* enolase which react with malaria patients' sera, Joint International Tropical Medicine Meeting 2000, Bangkok, Thailand, 6-8 December, 2000  
Ging-hua Lin, Katakura, K, Ohue M, Kano S, Suzuki, M A rationale to use minocycline as an antimalarial agent against drug-resistant *Plasmodium falciparum* and inhibition fo the plastid by tetracyclines. (submitted)
- F. 知的所有権の取得状況  
特になし



熱帯熱マラリア原虫エノラーゼ合成ペプチドの機能と構造に関する研究

分担研究者 狩野繁之 国立国際医療センター研究所部長

研究要旨：昨年度の研究において、熱帯熱マラリア原虫のエノラーゼの人工合成ペプチドおよび組換え蛋白質（rPf Eno）を作製し、患者血清との反応性を解析したが、本年度はそれらの蛋白質の機能、局在に関わる研究をさらに展開した。その結果、rPf Enoや合成ペプチドに対する免疫ウサギ血清が、*in vitro*の系で原虫の増殖を阻害するなど、それらの蛋白質のワクチン抗原としての重要性を示唆する結果を得た。

A. 研究目的

本年度の分担研究では、エノラーゼ分子を、将来のワクチン抗原分子として想定した研究の展開を行うことを目的とした。すなわち、1. rPf Enoは、活性を持った分子として構築できているか？また、その抗原性は十分であるか？ 2. rPf Enoそして人工ペプチドで免疫した動物血清は、培養系で熱帯熱マラリア原虫の増殖をおさえることができるか？ 3. エノラーゼ分子は原虫のどこに局在しているか？等について答えてゆく。

B. 研究方法および結果

1. 合成部分ペプチドの作製とELISA

熱帯熱マラリア原虫のエノラーゼ分子の配列をコンピュータグラフィックスを用いて解析し、そのうちAD22と命名した22個のアミノ酸から構成される部分配列を合成した（合成方法は分担研究者片貝良一教授の報告を参照）。このAD22はマラリア原虫に特異的な構造を持ち、エノラーゼの活性の中心に近い部分をなしている。

同ペプチドを精製した後、それを抗原として fluorescence-enzyme linked immunosorbent assay (F-ELISA)法で22人の輸入マラリア患者血清および62人の健康人血清との反応性を解析した。その結果、合成ペプチドは低いながらも抗原性を持ち、すなわち患者グループとの反応性を認めることができた。健康コントロール群とは一定の有意の差を認めることができたが、反応強度が重なる部分も多く、診断用の抗原としての有用性は低いと考えられた。

（倫理面への配慮）

患者血清の東京都内の複数の病院で採取した検体であるが、検体はコード化して検査者には個人を特定する情報を提供していない。また、研究の方針に関しては、各病院における倫理委員会を通過させているので、倫理上の問題は無いと考えられる。

2. 組換え蛋白質（rPf Eno）の作製と活性

昨年度の作成方法と、精製の段階をかえてrPf Enoをつくりなおした。すなわち、DNAデータベースに登録された配列を元に5'端に制限酵素配列を付加した特異的プライマーを作成した。このプラ

イマーを用い、RT-PCR法にて熱帯熱マラリア原虫Enolase遺伝子の開始コドンから終止コドンまでを増幅、精製を行った。制限酵素配列を利用し、増幅された遺伝子を組換え融合蛋白質発現ベクター（pTrcHis）に組み込んだ。組換え体プラスミドを導入した大腸菌（Top10）を大量培養し、菌体ライセート中に発現したrPf Enoをニッケルカラムクロマトグラフィーにて精製した。

精製したrPf EnoをBeutler法、Bergmeyer法等に従い、比色法を用いて測定した。その結果、組換えられたrPf Eno蛋白質は独自の酵素活性のある蛋白質として構築されていることが判明した。

3. 組換え蛋白質および合成抗原でのウサギの免疫

精製したrPf Enoおよび群馬大学工学部で作製したAD22を抗原として、ウサギ（日本白色種、♀、11週齢）に感作させた。初回免疫はrPf Enoをそれぞれ600 $\mu$ g、CFAと共にウサギ背部皮下に投与した。追加免疫は初回免疫より2週間後、4週間後、6週間後にそれぞれ300 $\mu$ g、150 $\mu$ g、100 $\mu$ gで免疫した。最終免疫より1週間後、ウサギをペントバルビタールによる全身麻酔導入後、頸静脈より全採血を行った。採血後、血清を分離し、プロテインAカラムによりIgGに分離精製した。血清を分離して上記組換えタンパクを抗原としたSDS-PAGE、虫体を抗原としたIFATにより特異的抗体の上昇を確認した。

さらにはウサギ抗rPf Eno IgGは、rPf Enoの活性を阻害することが確認された。

4. 原虫のエノラーゼ蛋白質の発現とその局在

熱帯熱マラリア原虫同調培養後、各stageの原虫を採集し、SDS-Pageで展開後PVDF膜に転写した。Western Blot法にて原虫抗原と上記で精製したIgGの反応性を観察した。熱帯熱マラリア原虫のEnolaseは輪状体から分裂体に到る原虫成熟過程に従って増加していることが判明した。

培養で得た熱帯熱マラリア原虫を1%パラフォルムアルデヒド・0.1%グルタルアルデヒドで固定（氷冷、15分）した。その後、洗浄、包埋、薄切し、上記で精製したIgGおよび金コロイド標識抗ウサギIgG抗体による免疫反応を行った。反応終了後、酢酸ウラニルにて染色、電子顕微鏡下に観察を行った。

また、熱帯熱マラリア原虫同調培養後、輪状

体、原虫血症10%の感染赤血球にプラスミドDNAを電気穿孔法により導入した。導入の評価は薬剤添加培地での選択培養法により行った。

これらのマラリア原虫への遺伝子導入や免疫電顕による観察の結果、Enolaseは原虫細胞質に局在することが確かめられた。

#### 5. 増殖抑制試験

熱帯熱マラリア原虫同調培養後、輪状体寄生率4~6%の感染赤血球を用いた。濃度を振って抗rPf Eno IgGを添加し培養を行ったところ、IgGの培養中への添加により輪状体から分裂体に到る原虫の成熟が阻害された。さらに、培養上清にIgGを添加する前にrPf Eno抗原とインキュベーション（4℃、4時間）させると、吸収効果が現れ増殖実験で阻害の程度がさがった。同様に精製IgGによる増殖の阻害はrPf Enoの培養系への添加により相殺された。

また、原虫Enolaseの部分ペプチド（AD22）を抗原として作成したウサギ抗血清の培養中への添加によっても、同様に原虫の成熟阻害が観察された。

### C. 考察

以上の結果より、rPf Enoおよびエノラーゼの合成抗原AD22には、マラリアワクチン候補抗原としてのポテンシャルが高いことが判明した。しかしながら、メロゾイトのサイトゾルに局在するであろう抗原に対する抗体が、どのような機序によって原虫の増殖を阻害するかに関しては、今後の研究の成果により理論立たせなければならない。

当該分担研究では、エノラーゼの合成抗原ペプチド、組換え蛋白質抗原を作製し、さらにはエノラーゼに対する特異的抗体の作製に成功し、*in vitro*の系で原虫の増殖を阻害するなど、一定の基礎的データを得ることができた。エノラーゼ抗原分子の機能のさらなる解析が、マラリア重症化阻止へ向けて研究や病態疫学への研究に重要なデータを提供するものと考えられた。

### D. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Shin-ichiro Kawazu, Noaotoshi Tsuji, Toshimitsu Hatabu, Satoru Kawai, Yoshitsugu Matsumoto and Shigeyuki Kano: Molecular cloning and characterization of a peroxiredoxin from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*, *Mol Biochem Parasitol*, 109, 165-169, 2000
- 2) Mutsumi Karasawa, Kyoko Kobayashi, Hiroyuki Oku, Kumiko Sato, Shigeyuki Kano, Mamoru Suzuki and Ryoichi Katakai: Synthesis and structure of a peptide having partial sequence of *Plasmodium falciparum* enolase, *In: Peptide Science 1999*, N.Fujii ed., The Japanese Peptide Society, Osaka, 295-298, 2000
- 3) Peter Perlmann, Hedvig Perlmann,

Sornchai Looareesuwan, Srivicha Grudsood, Shigeyuki Kano, Yoshitsugu Matsumoto, Gary Brittenham, Marita Troye-Blomberg and Masamichi Aikawa: Contrasting functions of IgG and IgE antimalarial antibodies in uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 62(3), 373-377, 2000

4) Kumiko Sato, Shigeyuki Kano, Yoshitsugu Matsumoto, Ratchanida Glanarongran, Srivicha Krudsood, Sornchai Looareesuwan, Masamichi Aikawa and Mamoru Suzuki: Application of yeast enolase as antigen for immunodiagnosis of malaria, *The South East Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 31(suppl 1), 2000 (in print)

#### 2. 学会発表

- 1) Kano S, Kawazu S, Hatabu T, Ishikawa H, Komaki K, Oku H, Katakai R, Sato K, Hosaka K, Miyamoto K, Looareesuwan S, Aikawa M, and Suzuki M: Molecular characterization of synthetic peptides of *Plasmodium falciparum* enolase. XV International Congress for Tropical Medicine and Malaria, August 20-25, 2000, Cartagena de Indias, Colombia
- 2) Sato K, Nakazawa T, Miyazaki Y and Kano S: Epidemiological studies on specific IgE response to various antigens in individual subjects. The XVII International Congress of Allergology and Clinical Immunology, October 15-20, 2000, Sydney, Australia
- 3) 奥浩之、唐澤陸実、片貝良一、佐藤久美子、鈴木守、狩野繁之：熱帯熱マラリア原虫エノラーゼ部分配列の合成・構造解析、第49回高分子学会年次大会、平成12年5月29-31日、名古屋国際会議場
- 4) Tadashi Ishiguro, Hiroyuki Oku, Kumiko Sato, Shigeyuki Kano, Mamoru Suzuki, and Ryoichi Katakai: Synthesis of a peptide having partial sequence of enolase, 第37回ペプチド討論会、平成12年10月18-20日、愛知県勤労会館
- 5) S Kano, K Sato, H Oku, R Katakai, G Masuda, S Looareesuwan, M Aikawa, M Suzuki: Synthetic polypeptides of *Plasmodium falciparum* enolase which react with malaria patients' sera, Joint International Tropical Medicine Meeting 2000, The Royal River Hotel, Bangkok, Thailand, 6-8 December, 2000

### E. 知的所有権の取得状況

特記することなし

熱帯熱マラリア原虫エノラーゼの部分ペプチドと水溶性 MAP 抗原の合成的研究

分担研究者 群馬大学工学部 教授 片貝良一

**研究要旨** 流行地の病態解析を目的として熱帯熱マラリア原虫エノラーゼの部分ペプチドを4種類合成した。何れの合成ペプチドも患者血清に反応し、人工抗原となりうることがわかった。さらに2種類のものについては、水溶性でミセルを形成する多抗原 (MAP) 型のペプチドも作成した。これらは免疫検査やアジュバントフリー人工抗原として実用性のあるように分子設計されている。

**A. 研究目的**

これまでに群馬大の鈴木と国立国際医療センターの狩野らによって急性期の熱帯熱マラリア患者血清において、抗エノラーゼ抗体を多量に産生していることが報告されてきた (S. Kano et al., 1999)。抗体検査によるマラリア疫学調査に用いることを目的として熱帯熱マラリア原虫 (= P.f.) 由来 エノラーゼの部分配列を用いたペプチドを合成した。

**B. 研究方法**

P.f.エノラーゼのアミノ酸配列は Read らの報告 (M. Read et al., 1994) とは数カ所異なっていた。立体構造は 64%相同なアミノ酸配列を持つイースト由来酵素の結晶構造 (1ELS on PDB) を基にアミノ酸を置換・挿入・削除した後、構造最適化を行うことで構築した。

次に P.f.とヒトでのエノラーゼ配

列の大きく異なる部位を検出するためにアミノ酸残基の疎水性—親水性プロット (hydropathy plot) を比較した。大きく異なる4ヶ所を人工抗原の候補 (AD22, AA13, GL16, GG14) とし、ペプチド合成を行った。

**C. 研究結果**

合成した4種の合成ペプチドは蛍光 ELISA 法を用いて、患者血清との反応性をしらべた。何れのペプチドも人工抗原として患者血清に反応することがわかった。

**D. 考察**

合成ペプチドの蛍光 ELISA での反応性は配列により異なることがわかった。これまでにエノラーゼの抗原部位は2種のヒト由来酵素について報告されている (G. B. Quinn et al., 1994, B. Arza et al., 1997)。もっとも強い反応を示した AA13 は未報告の抗原部位であった。これは

蛋白質化学の知見に基づいた抗原ペプチドの分子設計法が、従来の抗原配列決定法を補完できることを示している。

## E. 結論

これまでに流行地の病態解析を目的として熱帯熱マラリア原虫エノラーゼの部分ペプチドの合成研究を行ってきた。4種類 (AD22, AA13, GL16, GG14) の何れの合成ペプチドも患者血清に反応し、人工抗原となりうることがわかった。さらに2種類のものについては、水溶性でミセルを形成する多抗原 (MAP) 型のペプチドも作成した。これら現在、免疫検査やアジュバントフリー人工抗原として実用性のあるように分子設計と改良を行っている。

## F. 研究発表

### 1. 発表論文

(1) Synthesis and Structure of a Peptide having partial Sequence of *Plasmodium falciparum* Enolase. Karasawa, M.; Kobayashi, K.; Oku, H.; Sato, K.; Kano, S.; Suzuki, M.; Katakai, R. In *Peptide Science 1999*; N. Fujii, Ed.; The Japanese Peptide Society: Osaka, 2000; pp 295-298.

(2) Side Chain Conformational Changes During the Thermo-Shrinking Process:  $\gamma$ -Ray Polymerization and Spectroscopic Study of Uncrosslinked Poly(methacryloyl-Ala-OMe), Oku, H., Fujimoto, J., Ohyama, T., Hiroki, A., Yoshida, M., & Katakai, R. (2000). *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, vol. 38, pp 2671-2677 (2000).

(3) Conformational change of proline residues

observed in swollen and shrunken phases:  $\gamma$ -Ray synthesis and variable temperature circular dichroism spectra of a thermo-responding polymer, poly(acryloyl-Pro-OMe), Oku, H., Ohashi, H., Fujimoto, J., Shimizu, M., Yoshida, M., & Katakai, R. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, vol. 38, pp. 4524-4530 (2000).

(2) Synthesis of Small Domain Peptides of Glycolytic Enzyme Enolase. Nonaka, R.; Oku, H.; Sato, K.; Kano, S.; Suzuki, M.; Katakai, R. In *Peptide Science 2000*; T. Shioiri, Ed.; The Japanese Peptide Society: Osaka, 2001; in press.

(3) Synthesis of a Peptide having Partial Sequence of Enolase. Ishiguro, T.; Oku, H.; Sato, K.; Kano, S.; Suzuki, M.; Katakai, R. In *Peptide Science 2000*; T. Shioiri, Ed.; The Japanese Peptide Society: Osaka, 2001; in press.

### 2. 学会発表

(1) 奥 浩之、唐澤睦実、佐藤久美子、狩野繁之、鈴木 守、片貝良一  
熱帯熱マラリア原虫エノラーゼ部分配列の合成・構造解析、第49回高分子学会、名古屋、10月 (2000).

(2) 野中良子、奥 浩之、佐藤久美子、狩野繁之、鈴木 守、片貝良一： Synthesis of Small Domain Peptides of Glycolytic Enzyme Enolase、第37回ペプチド討論会、名古屋、10月 (2000).

(3) 石黒 正、奥 浩之、佐藤久美子、狩野繁之、鈴木 守、片貝良一： Synthesis of a Peptide having Partial Sequence of Enolase、第37回ペプチド討論会、名古屋、10月 (2000).

マラリア重症化に関わる宿主因子に関する研究

分担研究者 相川正道 東海大学総合科学技術研究所 教授

重症マラリアの病態疫学と対策に関する基礎研究を遂行するため、タイ国を中心としたマラリア蔓延地域の重症熱帯熱マラリア患者の血液を入手し、重症化に関わる因子を検討した。重症患者血中では、治療に伴い減少していたトロンボキサン B2 が増加し、一方増加していた 8-epi プロスタグランディン F2 $\alpha$ が減少してそれぞれ、7日で正常値のレベルに達した。重症患者と非重症患者の血中抗体を比較したところ、IgG 抗体は非重症患者で高く、IgE 抗体は重症患者で高かった。従って、IgG 抗体はマラリアの重症化を押え、一方 IgE 抗体はマラリアの重症化に関わると考えられた。マウス重症マラリアモデルを用いて重症化に関連する遺伝子を検索した結果、第 18 染色体上のマーカーである D18mit123 を中心とする約 10 センチモルガンの領域にマウス重症マラリアの感受性を規定する遺伝子が存在すること示唆された。

A. 研究目的

熱帯熱マラリア原虫により引き起こされる重症マラリアの病態疫学と対策に関する基礎研究を行う。そのため、タイ国を中心としたマラリア蔓延地域で入手された熱帯熱マラリア患者の血液サンプルを用い、重症化に関連する因子を見出す。また、補体レセプター 1 型以外の新たな重症化に関連する遺伝因子の検索のため、マウス重症マラリアモデルを用い遺伝子解析を行った。

B. 研究方法

1. 前年度に引き続いて、タイ国のマヒドン大学で入手されたタイの健常人、マラリア患者の血漿中のプロスタノイド（プロスタグランディン (PG) とトロンボキサン (TX)）の GC-MS 一斉分析法を行った。
2. 熱帯熱マラリア患者血中のイムノグロビン (Ig) 量を測定した。
3. マラリア原虫 *Plasmodium berghei* ANKA により引き起こされる重症マラリアに対して高度感受性を示す近交系マウス C57BL/6N と高度抵抗性を示す近交系マウス DBA/2N 間の雑種第 2 世代 (C57BL/6N × DBA/2N)F<sub>2</sub> を用いた連鎖解析を行った。

(倫理面への配慮)

健常人および患者血液サンプルはタイ国における倫理規定に基づいて採取されたものを入手した。また、動物実験に関しては、東海大学の実験動物に関する倫理規定に基づき、使用数は必要最小限とした。

C. 実験結果

1. 熱帯熱マラリア重症患者では、健常人に比べて、TXB2 が減少し、PGF2 $\alpha$ 、8-epi PGF2 $\alpha$ 、PGE1 および PGE2 が増加していた。さらに、アルテスネート治療を行った患者の PG 類濃度の経時的変化を調べた。治療に伴い、感染赤血球は 4 日で消滅し、約 1 週間で TXB2 は増加し、8-epi PGF2 $\alpha$ は減少して、それぞれ健常人の価に達した。一方、増加した PGF2 $\alpha$ 、PGE1 および PGE2 の減少は緩やかで、感染赤血がなくなった後も、長期 (20 日) にわたり高いレベルを維持した。
2. 熱帯熱マラリア患者の血中 Ig の種類と濃度と重症化との関係を調査した結果、以下のことが判った。重症患者では非重症患者の 3 倍の赤血球感染率を示し、全 IgG およびマラリア抗原に対する IgG 抗体は非重症患者で高かった。一方、全 IgE およびマラリア抗原に対する IgE 抗体は重症患者で高かった。従って、IgG 抗体はマラリアの重症化を押え、一方 IgE 抗体

はマラリアの重症化に関わると考えられた 3. マウス第 18 染色体上のマーカーである D18mit123 が SM 感受性・抵抗性という表現型と強く連鎖することが分かった ( $p < 1.0 \times 10^{-6}$ ,  $\chi^2$  検定)。コンピュータ解析の結果、このマーカーを中心とする約 10 センチモルガンの領域にマウス重症マラリアの感受性を規定する遺伝子が存在することが強く示唆された。

#### D. 考察

1. TXB2 の減少は血小板減少症に起因し、イソプロスタノールである PGF2 $\alpha$  の増加は生体の酸化状態の反映であるので、治療 1 週間によりこれらが改善されたと考えられた。現在検討中の重症化に特徴的な PG 動態が明らかになることにより、重症マラリアの診断や発症機構解明に役立つと考えられる。

2. IgG 抗体はマラリアの重症化を抑え、一方 IgE 抗体はマラリアの重症化に関わる可能性があると考えられた。我々は、現在重症患者のマラリア抗原検索のため、ファージディスプレイ法により、健常人の IgG および IgM と全く反応しないものかまたは弱くしか反応しないものうち患者 IgG または IgM と強く反応するクローンを得た。これらのクローンがどのようなエピトープをミミックしているかを検討中である。

3. 今回示されたマウス染色体の領域はヒトゲノム上では第 5 染色体と相同性を示す部位であり、今後のヒトマラリア重症化の遺伝的素因を解析する上での、候補領域となることが期待される。

#### E. 結論

熱帯熱マラリア患者の血液サンプルを用い、重症化に関連する因子を検索した。こ

れらの結果を実際の重症マラリア対策に結び付ける研究が、さらに必要である。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 研究論文

1) Perlmann P, Perlmann H, Looareesuwan S, Krudsood S, Kano S, Matsumoto Y, Brittenham G, Troye-Blomberg M, Aikawa M. Contrasting functions of IgG and IgE antimalarial antibodies in uncomplicated and severe Plasmodium falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg*, 2000 62(3):373-7.

2) Nagayasu E, Ito M, Akaki M, Nakano Y, Kimura M, Looareesuwan S and Aikawa M. CR1 density polymorphism on erythrocytes of falciparum malaria patients. *Am J Trop Med Hyg*, 2001 (in press).

##### 2. 学会発表

1. 中野山路、長安英治、小幡徹、Sornchai Looareesuwan、大友弘士、相川正道「タイ国熱帯熱マラリア患者の血漿プロスタグランディン分析」第 41 回日本熱帯医学会 (平成 12 年 11 月)。

2. Obata T, Nakano Y, Looareesuwan S, Ohtomo H and Aikawa M. Prostaglandin spectrum in falciparum malaria patients. The 3rd International Conference on Oxygenases at Kyoto (November, 2000).

#### H. 知的財産権の出願登録状況

なし

マラリア原虫のクロロキン耐性を消去する薬剤の開発

分担研究者 竹内 勤 慶応義塾大学医学部教授

研究要旨

ここ数年マラリア原虫のクロロキン耐性を消去する薬剤の開発を行ってきたが、ジベンソスベラニルピペラジン誘導体のうち、側鎖の炭素鎖の中途に水酸基、末端に不飽和結合を有する一連の化合物が有意なクロロキン耐性消去作用を有する事がクロロキン耐性マラリア原虫 (*Plasmodium chabaudi*) の薬剤耐性を消失せしめることがICRマウスモデルを使用して検討した結果明らかになった。その結果テストした誘導体のうち1-ジベンソスベラニル-4-(2-ヒドロキシ-7-オクテニル)ピペラジン及び1-ジベンソスベラニル-4-(2-ヒドロキシ-3-ブテニル)ピペラジンが優れた耐性抑制作用を示すことが明らかになった。

A. 研究目的

マラリア原虫における薬剤耐性は開発途上国、特にサブサハラ地域におけるマラリアの猖獗の原因の一つとなっている。特にクロロキン耐性原虫はマラリア分布域のほぼ全域に存在し、効果的な対策立案を妨げる大きな障壁となっている。抗マラリア薬の開発は特にメロゾイトを対象としてこれまで進められてきたが、その殆ど全ては直接メロゾイトに殺虫作用を示す薬剤であり、クロロキン耐性に影響する化学物質の開発はこれまで殆ど行なわれてこなかった。我々はここ数年ピペラジン誘導体でマラリア原虫のクロロキン耐性を消去する化合物の開発を試みてきたが、特定の化学構造を有しているジベンソスベラニル誘導体がこれまでのなかで最も強い消去作用を有している

事を見出だした。

B. 研究方法

使用したマラリア原虫はマウスに対して致死的な感染を起こす *Plasmodium chabaudi* のクロロキン耐性株である3CQ strainと6週令のfemale ICRの系である。基本的な実験系はマラリア原虫感染前にジベンソスベラニルピペラジン誘導体の10% solutionをDMSOにて作成し、これをdaily doseが50mg/kgとなるように4日間連続で腹腔内投与を行なって前処置し、ついでparasitemiaが5%に達したマウスから $5 \times 10^6$ 個の赤血球を各々のマウスの尾静脈に注入し感染せしめた。その日をゼロ日とし、ゼロ、1、2、3日と4日間連続してクロロキン2または3mg/kgを腹腔

内投与し、経時的にparasitemiaの推移と死亡日時の記録を行い、コントロールと比較検討した。Parasitemiaの推移はギムザ染色標本とアクリジンオレンジ、エチジウムブロマイド併用による蛍光染色標本の両者を適宜併用して行なった。ジベンゾスベラニル誘導体の化学合成には幾つかの方法を併用したが、基本的にはピペラジンとジベンゾスベラニルクロライドを当量反応させて得たジベンゾスベラニルピペラジン1重量部と1,2-エポキシデカン-9-エン2重量部とをメタノール10重量部に溶かし、1時間還流して溶媒を留去したのちにシリカゲルカラム（溶出溶媒ベンゼン：クロロホルム：メタノール 90:10:0 → 0:90:10）で精製した。この合成において1,2-エポキシデカン-9-エンを種々の化合物に改変することで異なった一連の誘導体を得ることができた。

### C. 実験結果および考察

一連のジベンゾスベラニルピペラジン誘導体で最も効果が優れていたのは、1-ジベンゾスベラニル-4-(2-ヒドロキシ-7-オクテニル)ピペラジン及び1-ジベンゾスベラニル-4-(2-ヒドロキシ-3-ブテニル)ピペラジンであった。これらの化合物はそれぞれ上記の合成法の1,2-エポキシデカン-9-エンを1,2-エポキシ-7-オクテン、1,2-エポキシ-3-ブテンに替え、シリカゲルカラムで精製することによって合成できた。この一連の化合物の化学構造の特徴はジベンゾスベラニルピペラジンの側鎖の炭素鎖に水酸基があり、末端に不飽和結合が存在しているところにある。この構造をとっている誘導体には程度の差はあるが全て基本的にはin vivoにおいてマラリア原虫のクロロキンに対する感受性を回復させた。すなわち上記の二種

の化合物のうち前者は本実験条件下でクロロキン2mg/kg投与群でも確実にクロロキン耐性を消去し、2週間の観察期間中蛍光染色によってもマラリア原虫の赤血球内発育型を検出できなかった。一方後者では最長で感染後12日前後まで、最短で7日目くらいまで蛍光染色によっても末梢血中にマラリア原虫は見いだされなかった。しかしその後parasite densityは明瞭な上昇傾向を示した。

また上記の二種の化合物は何れもDMSOに溶解せざるを得ず、DMSOのマウスに対する影響はコントロール実験では否定的であったものの、確証はなかった。よって今年度は1-ジベンゾスベラニル-4-(2-ヒドロキシ-3-ブテニル)ピペラジンの塩酸塩を合成し、水溶性としたうえで上記同様の実験を行なった。その結果は予備的な段階ではあるが、薬剤耐性除去能力の低下は見られなかった。

コントロール実験の一環として今年度はこれまで検討しなかったので1-ジベンゾスベラニル-4-(2-ヒドロキシ-7-オクテニル)ピペラジンのみを投与した群におけるparasitemiaの推移を調べた。その結果、3CQ strainの末梢血中のdensityの増加にこの化合物は全く影響を与えず、直接的な抗マラリア作用はないものと判断された。

本実験の結果から、今回テストした一連のジベンゾスベラニルピペラジン誘導体のうち、特に1-ジベンゾスベラニル-4-(2-ヒドロキシ-7-オクテニル)ピペラジンは優れたクロロキン耐性除去作用を有していると思われ、今後さらに検討すべき価値あるものと推定できた。今年度の研究で特筆すべきなのは、ジベンゾスベラニルピペラジン誘導体の側鎖の構造に関して一定の情報が得られたことで、重要な進展と思われた。現在更に側鎖の構造



を改変した化合物の合成を継続しており、近い将来確実なリード化合物が合成できるものと期待される。

#### D. 結論

*P. chabaudi*のクロロキン耐性を抑圧する薬剤を開発するために、種々のジベンゾスベラニルピペラジン誘導体を検索してきたが、今回従来と異なり、側鎖に水酸基と不飽和結合を有する一連の化合物を調べた結果、1-ジベンゾスベラニル-4-(2-ヒドロキシ-7-オクテニル)ピペラジンと1-ジベンゾスベラニル-4-(2-ヒドロキシ-3-ブテニル)ピペラジンが優れた耐性抑圧作用を有している事が明らかになった。

#### E. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 薬剤の耐性克服剤（現在申請中）

マラリア原虫の薬剤耐性に関わる ATP 結合カセット(ABC)トランスポーター群

分担研究者 桑野 信彦

九州大学大学院医学研究院分子常態医学部門生化学講座医化学分野 教授

研究要旨：

マラリアの薬剤感受性の分子的背景を把握して、マラリア感染症の薬物治療の向上に貢献するために、薬剤排出ポンプ、ATP 結合カセット（ABC）トランスポーターに注目した。マラリアの新規 ABC トランスポーターの同定と薬剤耐性への関与を明らかにするために、アフリカ、タンザニアにおける検体採取の計画を具体化した。一方、耐性克服のために ABC トランスポーター拮抗阻害薬の開発を行った。

A. 研究目的

マラリアの薬剤感受性の分子的背景を把握して、マラリア感染症の向上に貢献する。本研究では特に、薬剤排出ポンプ、ATP 結合カセット（ABC）トランスポーター遺伝子群に焦点を絞って薬剤感受性に関与する遺伝子群とその基質特異性の把握および ABC トランスポーターを標的とした耐性克服薬の開発を目指す。

B. 研究方法

1. 我々は ABC 遺伝子群で塩基配列がよく保存されているカセット部分にプライマーを設計し、RT-PCR 法により新規ヒト ABC トランスポーター、MRP2、MRP3 および MRP7 の単離に成功した。本研究ではこの方法を、ヒト MDR サブファミリー遺伝子のマラリアオルソログに加え、MRP サブファミリーの遺伝子群の単離を試みる。
2. マラリア ABC トランスポーターの強制発現動物細胞株を樹立し、抗マラリア薬に対する基質特異性を明らかにする。
3. 2.において樹立した細胞株を用いて、ヒト ABC トランスポーターに対する拮抗阻害薬による阻害効果を評価する。

4.倫理面への配慮

マラリア患者の末梢血より総 DNA を分離し、マラリア ABC トランスポーターの発現を解析する。計画 1 および 4 では、タンザニア在住の患者から採血予定であるが、採血に当たっては研究目的と意義の説明を現地医師より行い、同意を得た上で採血する。

C. 研究結果

1. 計画 1 および 4 を行うためにマラリア患者よりの採血が必要となるが現地医師への計画説明はタンザニア在住の外務省職員川原尚行に依頼済みである。
2. ABC トランスポーターはその構造が種を越えて、良く保存されており、ヒト ABC トランスポーターに対する克服薬が、マラリアの薬剤克服薬の開発のためのリード化合物として期待される。既存のカルシウム拮抗剤、ベラパミール、サイクロスポリン A とその誘導体である PSC833、セファランチンなどに加え、我々はイソプレノイドやその誘導体 NK250 および NK252 を開発し、ヒトがん細胞の P-糖蛋白質を分子標的とした耐性克服に関する基礎的な知見を集積した。
3. ヒトに対して、薬物療法を行う場合、がんやマラリアに発現している薬剤感受性制御因子に加え、宿主

に発現している解毒、排泄機構についての理解が薬効と副作用を考える上で必須となる。我々は、ABC トランスポーターの中でも、MDR1 や MRP サブファミリーに属する異物・薬物排出ポンプが、薬物の体内動態に重要な影響を及ぼしようという知見を蓄積しつつある。

#### D. 考察

薬物の体内動態に関与する ABC トランスポーターについての知見はマラリア薬物療法を考える上で必ず必須のものとなると信じている。

1. ゲノムデータベース上には既にヒト MRP2 に相同性のある *P. falciparum* 遺伝子 (うち 1 つは膜蛋白質) が 4 つ存在する。マラリアのゲノムプロジェクトが進んでおり、ゲノムデータベースから、マラリア ABC トランスポーターを同定する方法も有効と考えられる。
2. 多くの ABC トランスポーター拮抗阻害薬が開発されているので、この中から、マラリア薬剤耐性克服薬を開発するための足がかりを得るためには、マラリアに発現している ABC トランスポーターの同定とその強制発現の細胞株を用いた、阻害薬のスクリーニング薬の開発が必須と考えられる。

#### E. 結論

マラリア薬物治療の向上のために ABC トランスポーターのマラリア薬剤耐性関与を把握することが必須と考えられる。また、耐性克服剤の開発のためにもマラリア ABC トランスポーター群の同定と、強制発現系の構築が必要と考えられる。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Torisu, H., Ono, M., Kiryu, H., Furue, M., Ohmoto, Y., Nakayama, J., Nisioka, Y., Sone, S. and Kuwano, M.

Macrophage infiltration correlates with tumor stage and angiogenesis in human malignant melanoma: possible involvement of TNF $\alpha$  and IL-1 $\alpha$ . *Int. J. Cancer*, 85: 182-188 (2000).

2. Torisu, H-I., Furue, M., Kuwano, M. and Ono, M. Co-expression of thymidine phosphorylase and heme oxygenase-1 in macrophages in human malignant vertical growth melanomas. *Jpn. J. Cancer Res.*, 91: 906-910 (2000).
3. Fukushi, J., Ono, M., Morikawa, W., Iwamoto, Y. and Kuwano, M. The activity of soluble VCAM-1 in angiogenesis stimulated by IL-4 and IL-13. *J. Immunol.*, 165: 2818-2823 (2000).
4. Umeshita-Suyama, R., Sugimoto, R., Akiwa, M., Arima, K., Yu, B., Wada, M., Kuwano, M., Nakajima, K., Hamasaki, N. and Izuhara, K. Characterization of IL-4 and IL-13 signals dependent on the human IL-13 receptor  $\alpha$  chain 1: redundancy of requirement of tyrosine residue for STAT3 activation. *Int. Immunol.*, 12: 1499-1509 (2000).
5. Morikawa, W., Yamamoto, K., Ishikawa, S., Takemoto, S., Ono, M., Fukushi, J., Naito, S., Nozaki, C., Iwanaga, S. and Kuwano, M. Angiostatin generation by cathepsin D secreted by human prostate carcinoma cells. *J. Biol. Chem.*, 275: 38912-38920 (2000).
6. Harada, T., Nagayama, J., Kohno, K., Mickley, L., Fojo, T., Kuwano, M. and Wada, M. Alu-associated interstitial deletions and chromosomal rearrangement in 2 human multidrug-resistant cell lines. *Int. J. Cancer*, 86: 506-511 (2000).
7. Hinoshita, E., Uchiumi, T., Taguchi, K., Kinukawa, N., Tsuneyoshi, M., Maehara, Y., Sugimachi, K. and Kuwano, M. Increased expression of an ATP-binding cassette superfamily transporter, multidrug resistance protein 2, in human colorectal carcinomas. *Clinical Cancer Res.*, 6: 2401-2407 (2000).
8. Tada, Y., Wada, M., Kuroiwa, K., Harada, T., Tsuneyoshi, M., Nakagawa, M., Naito, S., Kuwano, M. MDR1 overexpression and altered degree of methylation at the promoter region in bladder cancer during chemotherapeutic treatment. *Clinical Cancer Res.*, 6: 4618-4627 (2000).
9. Naito, S., Koga, H., Yokomizo, A., Sakamoto, N., Kotoh, S., Nakashima, M., Kiue, A. and Kuwano, M. Molecular analysis of mechanisms regulating drug sensitivity and the development of new chemotherapy strategies for genitourinary carcinomas. *World J. Surg.*, 24:1183-1186 (2000).
10. Okamoto, T., Izumi, H., Imamura, T., Takano, H., Ise, T., Uchiumi, T., Kuwano, M. and Kohno, K. Direct interaction of p53 with the Y-box binding protein, YB-1: a mechanism for regulation of human gene expression. *Oncogene*, 19: 6194-6202 (2000).
11. Ushigome, F., Takanaga, H., Matsuo, H., Yanai, S., Tsukimori, K., Nakano, H., Uchiumi, T., Nakamura, T., Kuwano, M., Ohtani, H., and Sawada, Y. Human placental transport of vinblastine, vincristine, digoxin and progesterone: contribution of P-glycoprotein.

- Eur. J. Pharmacol., 408: 1-10 (2000).
12. Goto, H., Kohno, K., Sone, S., Akiyama, S., Kuwano, M. and Ono, M.  
Gamma interferon-dependent induction of thymidine phosphorylase/platelet derived endothelial growth factor through gamma-activated sequence-like element in human macrophages. *Cancer Res.*, 61: 469-473 (2001).
  13. Nagayama, J., Iino, M., Tada, Y., Kusaba, H., Kiue, A., Ohsima, K., Kuwano, M. and Wada, M.  
Retrovirus insertion and transcriptional activation of the multidrug resistance (mdr1) gene in leukemias treated by a chemotherapeutic agent in vivo. *Blood*, 97: 759-766 (2001).
  14. Haga, S., Hinoshita, E., Ikezaki, K., Fukui, M., Scheffer, G. L., Uchiyumi, T. and Kuwano, M.  
The involvement of the multidrug resistance protein 3 in drug sensitivity and its expression in human glioma. *Jpn. J. Cancer Res.*, 92: 211-219 (2001).
  15. Izumi, H., Imamura, T., Nagatani, G., Ise, T., Murakami, T., Uramoto, H., Torigoe, T., Ishiguchi, H., Nomoto, M., Okamoto, T., Uchiyumi, T., Kuwano, M., Funai, K. and Kohno, K.  
YB-1 binds preferentially to single-stranded nucleic acid and exhibit 3'-5' exonuclease activity. *Nucl. Acids Res.*, 29: in press (2001).
2. 学会発表
1. Uchiyumi, T., Nakamura, T., Ashizuka, M., Okamoto, T. and Kuwano, M.  
Isolation of proteins closed associated with the Y-box binding protein (YB-1) and their express in malignant cancers. 91th Annual Meeting of American Association for Cancer Research(Poster session)2000/4/1-4/5(San Francisco)
  2. Harada, T., Motida, Y., Tada, Y., Wada, M., Maehara, Y. and Kuwano, M.  
Association of MDR1 expression with methylatuiou status of 5' CPG sites at the promoter region and with mismatch repair status in colorectal tumor cell lines. 91th Annual Meeting of American Association for Cancer Research(Poster session)2000/4/1-4/5(San Francisco)
  3. Tada, Y., Wada, M., Nakayama, M., Harada, T., Nagayama, J., Kuroiwa, K., Tuneyoshi, M., Nagayama, M., Naito, S. and Kuwano, M.  
Methylation status of CPG sites at the promoter region and expression of MDR1 gene in patients with bladder cancer. 91th Annual Meeting of American Association for Cancer Research(Poster session)2000/4/1-4/5(San Francisco)
  4. Okamoto, T., Takano, H., Imamura, T., Ise, T., Ohmori, H., Izumi, H., Uchiyumi, T., Kuwano, M. and Kohno, K.  
Direct interaction of Y-Box protein, YB-1, with p53 and regulation of human multidrug resistance 1 gene expression. 91th Annual Meeting of American Association for Cancer Research(Poster session)2000/4/1-4/5(San Francisco)
  5. Nagayama, J., Hinoshita, E., Iino, M., Kiue, A., Oka, M., Uchiyumi, T., Wada, M. and Kuwano, M.  
Retrovirus-associated activation of multidrug resistance (MDR) gene and MDR-related protein (MRP) family genes in hematopoietic malignancies. 91th Annual Meeting of American Association for Cancer Research(Poster session)2000/4/1-4/5(San Francisco)
  6. Hinoshita, E., Uchiyumi, T., Taguchi, K., Kinugawa, N., Tsuneyoshi, M., Maehara, Y., Sugimati, K. and Kuwano, M.  
A multidrug resistance protein MRP2: its possible association with drug responce to cisplatin in human colorectal cartinomas. 91th Annual Meeting of American Association for Cancer Research(Poster session)2000/4/1-4/5(San Francisco)
  7. Haga, S., Uchiyumi, T., Hinoshita, E., Wada, M., Ikezaki, K., Furui, M. and Kuwano, M.  
Expression and localization of MRP family genes in capillary-like structures of human brain endothelial cell. 91th Annual Meeting of American Association for Cancer Research(Poster session)2000/4/1-4/5(San Francisco)
  8. 内海健、和田守正、桑野信彦  
ABC トランスポーター遺伝子ヒト MRP3 の基質特異性と腫瘍での発現 第 4 回がん分子標的治療研究会総会 (セッション) 2000 年 6 月 15 日-17 日 (名古屋)
  9. 多田靖弘、和田守正、黒岩顕太郎、永山淳、恒吉正澄、内藤誠二、中川昌之、桑野信彦  
膀胱腫瘍におけるヒト多剤耐性 MDR1 遺伝子の発現と 5'-制御領域の DNA メチル化 第 4 回がん分子標的治療研究会総会 (ポスターセッション) 2000 年 6 月 15 日-17 日 (名古屋)
  10. 桑野信彦  
ATP 結合カセット (ABC) トランスポーターの構造・機能と疾病 第 24 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム (特別講演) 2000 年 7 月 13 日-15 日 (鹿児島)
  11. 持田泰、和田守正、日下英司、多田靖弘、永山淳、原田大志、高木幸一、前原喜彦、杉町圭蔵、桑野信彦  
大腸癌における MDR1 遺伝子のメチル化による発現制御とマイクロサテライト不安定性 第 59 回日本癌学会総会 (ミニシンポジウム) 2000 年 10 月 4 日-6 日 (横浜)
  12. 井口明彦、日下英司、内海健、和田守正、桑野信彦  
肝細胞における ABC スーパーファミリー遺伝子の炎症性サイトカインに対する発現応答 第 59 回日本癌学会総会 (ポスター発表) 2000 年 10 月 4 日-6 日 (横浜)
  13. 内海健、中村崇規、和田守正、桑野信彦  
ABC トランスポーター遺伝子ヒト MRP7 の単離と発現 第 59 回日本癌学会総会 (ポスター発表) 2000 年 10 月 4 日-6 日 (横浜)
  14. 日下英司、内海健、田口健一、井口明彦、中村崇規、和田守正、恒吉正澄、杉町圭蔵、桑野信彦  
ヒト大腸癌の分化と ABC スーパーファミリー遺伝子の発現 第 59 回日本癌学会総会 (ポスター発表) 2000 年 10 月 4 日-6 日 (横浜)
  15. 多田靖弘、和田守正、永山淳、持田泰、内藤誠二、桑野信彦  
ヒト膀胱腫瘍における多剤耐性 MDR1 遺伝子と癌抑制遺伝子のプロモーター領域のメチル化と膀胱内再発 第 59 回日本癌学会総会 (ポスター発表)