

厚生労働科学研究費補助金(社会保障国際協力推進研究事業)

分担研究報告書

マラリア原虫の宿主細胞侵入機序の解析

分担研究者 鳥居本美 愛媛大学大学院医学系研究科教授

研究要旨 マラリア原虫メロゾイトの赤血球結合分子 EBL (EBL : Erythrocyte Binding-Like) は赤血球侵入に必須とされる分子である。我々はメロゾイトの赤血球侵入の分子機構を解明する目的で、ネズミマラリア原虫 *Plasmodium yoelii* の EBL 分子 (PyEBL) の解析を行っている。急激な原虫感染率の上昇により致死となる強毒株 (17XL) と致死でない弱毒株 (17XNL) のアミノ酸配列を比較したところ、C 末端部の Cys に富む領域 (第 6 領域) 内の Cys の一つが、17XL 株では Arg に置換されていることを見出した。pyebl の転写量には 17XNL 株と 17XL 株の間で差が見られなかった。ウエスタンブロッティングでは、両株共に 110kDa のバンドが検出され、PyEBL の発現にも差が見られなかった。ところが、間接蛍光抗体法による PyEBL の局在は、Cys の保存されている 17XNL 株ではメロゾイト先端部に局在しているのに対し、Cys が置換されている 17XL 株では局在が異なっていた。免疫電子顕微鏡法による詳細な局在の観察によって、17XNL 株では PyEBL はマイクロネームに局在するのに対し、17XL 株ではデンスグラニュールに局在する事が明らかになった。

A. 研究目的

マラリア原虫メロゾイトの赤血球結合分子 (EBL : Erythrocyte Binding-Like) はメロゾイトの赤血球侵入に重要な機能を果たすことから、赤血球ステージ原虫に対するワクチン候補抗原として注目されている。我々は EBL 分子を標的とするワクチン開発のモデルとして、ネズミマラリア原虫 *Plasmodium yoelii* の EBL (PyEBL) の解析を行っている。感染後の急激な原虫感染率の上昇により致死となる強毒株 (17XL) と致死でない弱毒株 (17XNL) の pyebl の塩基配列を解析し、その結果から予想されるアミノ酸配列を比較したところ、オープンリーディングフレーム内での相違は、C 末端部のシステイン (Cys) に富む領域 (第 6 領域) 内の Cys の一つが、

17XL 株では Arg に置換されていることのみであった。本研究は、この Cys の変異に着目して、この分子のアミノ酸変異が病原性の違いに関連性があるか否かを明らかにすることを目的として実施した。

B. 研究方法および結果

PyEBL をコードする遺伝子のコピー数を確認する目的で、*P. yoelii* 17XL および 17XNL の遺伝子を制限酵素を用いて切断してサザンブロットを行い、pyebl は単一の遺伝子にコードされていることを確認した。次に、Py17XNL と Py17XL で pyebl の転写レベル (mRNA 量) に差が見られるか否かを RT-PCR によって比較したところ、両者には差が認められなかった。

PyEBL のシグナルペプチドを含む領域と C 末端側の膜貫通領域を除いた部分の遺伝子を増幅し、無細胞発現ベクター (pEU-E01 (TEV)-N2) に組み込み、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成法を用いて、組換え PyEBL タンパク質を作成したところ、可溶性タンパク質として発現させることが出来た。この GST 融合 PyEBL (R1-6) 組換えタンパク質をフロイントアジュバントと共に BALB/c マウスの腹腔内に投与して免疫し、抗血清と単クローン抗体を作成した。

17XNL 株と 17XL 株のシズント期原虫を用いたウエスタンブロッティングでは、PyEBL は両株ともに 110kDa のバンドとして検出された。また、バンドの染色強度に大きな差異が認められなかったことから、PyEBL は Py17XL と Py17XNL の量株共にタンパク質として発現されていることが確認された。ところが、間接蛍光抗体法によって PyEBL 分子の局在をみると、第 6 領域の 2 番目の Cys の保存されている 17XNL 株ではメロゾイト先端部に蛍光が限局しているのに対し、当該 Cys が Arg に置換されている 17XL 株では、蛍光は先端部に限局せず、細胞質内に拡散して観察された。そこで、細胞内での PyEBL の詳細な局在の違いについて免疫電子顕微鏡写真を用いて検討を行ったところ、17XNL 株では抗原の局在を示す金コロイド粒子がマイクロネームに認められたのに対し、17XL 株では他の細胞内小器官であるデンスグラニールに金コロイド粒子が認められた。以上の結果から、PyEBL の第 6 領域が本分子の細胞内移送、特に侵入に深く関与することが報告

されている先端部小器官への移送に深く関与することが明らかとなった。

E. 結論

弱毒株の Py17XNL と致死株の Py17XL で PyEBL 分子の C 末端部の Cys に富む第 6 領域内の Cys の一つが、17XL 株では Arg に置換されていることに着目して検討を行った。17XNL 株と 17XL 株の間で *pyebl* の転写量には差が見られず、PyEBL のタンパク質としての発現量にも差が見られなかった。ところが、間接蛍光抗体法および免疫電子顕微鏡法による PyEBL の局在は両株で異なり 17XNL 株では PyEBL は原虫先端部のマイクロネームに局在するのに対し、17XL 株では先端部より後方に位置するデンスグラニールに局在する事が明らかになった。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ghoneim A, Kaneko O, Tsuboi T, Torii M.
The *Plasmodium falciparum* RhopH2 promoter and first 24 amino acids are sufficient to target proteins to the rhoptries. *Parasitol Int* 56:31-43 2007.
- 2) Tetsutani K, To H, Torii M, Hisaeda H, Himeno K.
Malaria parasite induces tryptophan-related immune suppression in mice. *Parasitology*. 134 (7): 923-930, 2007
- 3) Kobayashi F, Waki S, Niikura M, Tachibana M, Tsuboi T, Torii M, Kamiya

- S. *Plasmodium berghei* XAT: Protective 155/160 kDa antigens are located in parasitophorous vacuoles of schizont-stage parasite. *Exp. Parasitol*, 116 (4):450-457, 2007
- 4) Katsube T, Matsumoto S, Takatsuka M, Okuyama M, Ozeki Y, Naito M, Nishiuchi Y, Fujiwara M, Yoshimura M, Tsuboi T, Torii M, Oshitani Arakawa T, Kobayashi K Control of cell wall assembly by a histone-like protein in mycobacteria. *J Bacteriol* 189(22): 8241-8249 2007.
- ## 2. 学会発表
- 1) 大槻均、金子修、橘真由美、入子英幸、竹尾暁、坪井敬文、Thongkuiatkul Amporn、鳥居本美 ネズミマラリア原虫の赤血球結合分子相同体 EBL の局在 第 76 回日本寄生虫学会大会、大阪市 (2007, 03, 29-30)
- 2) Palacipac NQ, Arisue N, Tanabe K, Sattabongkot J, Tsuboi T, Torii M, Udomsangpetch R, Hotii T Polymorphism in malaria antigens and microsatellite markers of *Plasmodium vivax*: a parasite strategy for survival? 第 76 回日本寄生虫学会大会、大阪市 (2007, 03, 29-30)
- 3) 鉄谷耕平、藤秀人、鳥居本美、久枝一、姫野國祐 Malaria parasite induces tryptophan-related immune suppression in mice. 第 76 回日本寄生虫学会大会、大阪市 (2007, 03, 29-30)
- 4) 金玲、坪井敬文、竹尾暁、入子英幸、金子修、鳥居本美、新規熱帯熱マラリア感染阻止ワクチン候補抗原分子の探索 第 76 回日本寄生虫学会大会、大阪市 (2007, 03, 29-30)
- 5) 竹尾暁、金玲、坂本寛和、韓銀澤、入子英幸、金子修、鳥居本美、坪井敬文 熱帯熱マラリア原虫赤血球期発病阻止ワクチン候補抗原分子の探索 第 76 回日本寄生虫学会大会、大阪市 (2007, 03, 29-30)
- 6) Ghoneim A, 金子修、坪井敬文、鳥居本美 熱帯熱マラリア原虫ロプトリー蛋白質 (RhopH 複合体) のロプトリー移行シグナル 第 76 回日本寄生虫学会大会、大阪市 (2007, 03, 29-30)
- 7) 入子英幸、金玲、金子修、韓銀澤、橘真由美、大槻均、竹尾暁、福本宗嗣、鳥居本美、坪井敬文 熱帯熱マラリア原虫は頻りに選択的スプライシングを起こしている 第 76 回日本寄生虫学会大会、大阪市 (2007, 03, 29-30)
- 8) 高本美佐、矢野弘子、溝淵俊二、長龍充、Susiji W, Lalani Y, 鳥居本美、坪井敬文、笹栗志郎、渡部嘉哉、吾妻美子、吾妻健 ソフィβ-グルカンによる NK 細胞活性を利用した *Plasmodium yoelii* 感染に対する効果 第 76 回日本寄生虫学会大会、大阪市 (2007, 03, 29-30)
- 9) Cao J, Kaneko O, Thongkuiatkul A, Tachibana M, Otsuki H, Sattabongkot J, Tsuboi T, Torii M *Plasmodium falciparum* rhoptry neck protein (*PfRON2*) expressed at both erythrocytic and pre-erythrocytic invasive parasites. The 7th Awaji International Forum on

Infection and Immunity, Awaji, (September 4-7, 2007)

10) Tsuboi T, Jin L, Takeo S, Iriko H, Kaneko O, Sattabongkot J, Torii M Novel sporozoite antigen discovery of *Plasmodium falciparum* screened using human immunosera The 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, (September 4-7, 2007)

11) Cao J, Kaneko O, Thongkukiattkul A, Tachibana M, Otsuki H, Tsuboi T, Torii M A complex formation of rhoptry neck protein 2 with a microneme protein, AMA 1, in *Plasmodium falciparum*. 第6回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、松山 (2006. 10. 27-28)

12) 橘真由美、永徳千穂、大槻均、Sattabongkot J、鳥居本美、坪井敬文 生殖母体抗原 Pvs230 を標的とする新規三日熱マラリア伝搬阻止ワクチン 第6回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、松山 (2006. 10. 27-28)

13) 竹尾暁、坂本寛和、橘真由美、鳥居本美、坪井敬文 コムギ胚芽無細胞系を用いた新規熱帯熱マラリア感染阻止ワクチン候補抗原の探索。第6回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、松山 (2006. 10. 27-28)

14) 河津信一郎、矢野和彦、大槻均、新井明治、坪井敬文、鳥居本美、駒木-コムギ胚芽無細胞系を用いた新規マラリア安田加奈子、狩野繁之 2-Cys 型ペルオキシレドキシシン (TPx-1) ノックアウトがマラリア原虫の哺乳類体内での発育に及ぼす影響の解析 第6回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、松

山 (2006. 10. 27-28)

15) Kawazu S, Yano K, Otsuki H, Arai M, Komaki-Yasuda K, Tsuboi T, Torii M, Kano S. Disruption of 2-Cys peroxiredoxin TPX-1 gene in *Plasmodium berghei* hinders the sporozoite development. 56th Annual Meeting of ASTMH, Philadelphia, USA (November 4-8, 2007)

16) Jin L, Takeo S, Iriko H, Kaneko O, Sattabongkot J, Torii M, AGUIAR JC, Tsuboi T Novel sporozoite antigen discovery of *Plasmodium falciparum* screened using human antisera. 56th Annual Meeting of ASTMH, Philadelphia, USA (November 4-8, 2007)

16) Tachibana M, Eitoku C, Otsuki H, Sattabongkot J, Torii M, Tsuboi T Transmission-blocking activity of DNA vaccine encoding *Plasmodium vivax* gametocyte protein Pvs230. 56th Annual Meeting of ASTMH, Philadelphia, USA (November 4-8, 2007)

H. 知的財産権の出願・登録状況
特記すべきものはない

厚生労働科学研究費補助金（社会保障国際協力推進研究事業「寄生虫疾患の病態解明及びその予防・治療をめざした研究」）

分担研究報告書

熱帯熱マラリア原虫の抗原多型に関する集団遺伝学的解析

分担研究者 田邊 和祐 大阪大学微生物病研究所教授

研究要旨

熱帯熱マラリア原虫 (*P. falciparum*) の感染防御免疫は度重なる感染を経た後に獲得される。この免疫現象には株特異的免疫が関わるので、マラリア流行地における原虫集団の抗原多様性とその多様性を決める要因の研究は重要である。マラリアワクチン候補抗原である *P. falciparum* メロゾイト表面タンパク質-1 (MSP-1) の遺伝子多様性は有性生殖組換えによって生じる。この組換えはマラリア伝播の度合いに依存するので、伝播の高い地域では *mssl* の遺伝的多様度も高いことが予想される。本研究では、伝播度の異なる世界各地の *P. falciparum* 集団における *mssl* の多重感染度を、組換えによって生じる遺伝子型を検出する PCR タイピング法を用いて調べ、比較検討した。その結果、マラリア伝播度の高いアフリカでは予想通り、*mssl* 多重感染度が高かった。一方、メラネシアでは伝播度と多重感染度に明瞭な相関は認められなかった。得られた結果に基づき、マラリア伝播強度、遺伝子多様度、及び、マラリア感染防御獲得免疫の関係について検討した。

A. 研究目的

マラリア感染では感染を何度も繰り返すことによって徐々に防御免疫が獲得される。最近の研究で、マラリア原虫集団には異なる遺伝子型が数多く存在し、それらの多重感染がまれでないことが明らかにされている。異なる遺伝子型原虫は抗原型も異なり、マラリア原虫集団に抗原型の異なる株が多数あれば、感染防御免疫の獲得は度重なる感染を経た後に成立する。マラリア感染では株特異的免疫が作用するので、流行地で分布するマラ

リア原虫の抗原型の種類や数、抗原多様性を生じる遺伝的機構、また、異なる遺伝子型原虫の多重感染の程度は解明されるべき重要な研究課題になる。

熱帯熱マラリア原虫 (*P. falciparum*) メロゾイト表面タンパク質1 (MSP-1) はマラリアワクチンの有力な候補抗原であるが、その遺伝子 (*mssl*) は多型が激しい。*mssl* の多型は主に蚊ステージにおける有性生殖期組換えによって生じる。組換え頻度が高ければ新規対立遺伝子が頻繁に生じる。有性生殖組換えはマラリア伝播

の度合いに依存するので、伝播の高い地域では *mssl* の遺伝子型が多く、対立遺伝子多様度も高いことが予想される。しかし、マラリア伝播度と *mssl* 対立遺伝子多様度の相関に関する数量的解析はこれまであまりない。本研究分担者はこれまで、*mssl* 組換えによる遺伝子多様性と多重感染度の地理的差異について調べてきた。

本研究では、伝播度の高いアフリカのガーナ、マラウイガーナ、及び、パプアニューギニアにおける原虫集団の *mssl* 対立遺伝子多様性を *mssl* 5'ハプロタイプで比較検討し、これまでに得ている伝播度の低い原虫集団における多様性と比較し、マラリア伝播の度合い、多重感染度とマラリア感染防御における株特異的免疫の関わりについて検討した。

B. 研究方法

マラリア原虫フィールド株の採取は共同研究機関である東京女子医科大学熱帯医学国際環境教室（小早川隆敏教授）のグループによって行われた。ガーナでは、2004年11月、西部沿岸 Winneba 付近の3村（Okyereko, Mpota, Apam）の0-15歳の子供を対象にしたマラリアサーベイを行い、マラリア陽性感染血液を182検体得た。マラウイでは、2000年7-8月、Salima 地区のマラリアサーベイにおいて120検体得た（Mita et al., 2003）。パプアニューギニアでは、2001年8-9月、及び、2002年2月、東 Sepik 州 Wewak 地区の5村

（Kiniambu, Jawia, Witupe, Boiken, Wingei）のマラリアサーベイから195検体を得た。

感染血液 75 ml を Whatma 社の濾紙（31ETCHR）に吸着させ、乾燥させた後、日本に運んだ。濾紙からの熱帯熱マラリア原虫のゲノム DNA は我々の方法によって抽出した（Sahikama et al., 2001）。*mssl* 5'ハプロタイプは我々のPCRタイピング法を用いた（Sakihama et al., 2006）。この方法は、nested PCR法を用いて *mssl* のブロック2-6の組換え型を24通りに分けて検出するもので、マラリア感染血液サンプルが異なるハプロタイプに多重感染しているかどうか（多重感染率 = 全株中の多重感染株の割合）、及び、一人当たりの異なるハプロタイプの数（MOI = multiplicity of infection）を調べる。

C. 研究結果

PCR陽性検体はガーナでは175検体、マラウイでは119検体、パプアニューギニアでは137検体であった。この陽性検体について *mssl* 5'ハプロタイプ多重感染率、及び、一人当たりの多重感染数（MOI）を求めた。

感染多重率はガーナでは77.7%（136/175）、マラウイでは97.5%（116/119）、パプアニューギニアでは38.0%（52/137）であった。MOIはガーナで3.10、マラウイで6.85、パプアニューギニアで1.47であった。

今回の結果をこれまでに得ている他の

地域の結果と比較する。感染多重率は、タンザニアが 77.3%、タイが 96.3%、フィリピンが 33.0%、ソロモン諸島が 35.4%、バヌアツが 0.7%であり、MOI は、タンザニアが 3.42、タイが 3.61、フィリピンが 1.44、ソロモン諸島が 1.41、バヌアツが 1.01 であった。

多重感染率、MOI ともよく似た傾向をしめし、全体的にアフリカでは高く、アジア、オセアニアでは低いことが認められる。この傾向の例外はタイであるが、タイのサンプルは地域マラリア診療所を訪問した患者からのサンプリングであるために高くなっていると思われる。タイ以外の地域ではマラリアサーベイによるサンプリングなので自然流行集団を反映していると思える。実際に、タイでも西部 Kanchanaburi 県のサーベイによるサンプリングでは多重感染率、MOI ともアジア、オセアニア地域と同程度であった（未発表）。バヌアツは感染多重率、及び、MOI も極めて低く、単一遺伝子型原虫のクローナルな伝播が示唆された。

D. 考察

本研究で用いた *mssl* 5'ハプロタイプピニングでは、遺伝子 5'側 1 kb の多型領域(ブロック 2-6) の組換えによる遺伝子型を測定し、同一サンプル中の異なる *mssl* 5'ハプロタイプの数を決する。一般的に、マラリア原虫の組換え頻度はマラリア伝播の強い地域で高い。得られた結果ではマラリア伝播度の高いアフリカの 3 地域

(ガーナ、マラウイ、タンザニア) では予想通り、*mssl* 5'ハプロタイプの MOI が高かった。アフリカではマラリア伝播が高いので、MOI が高いことは、蚊体内における組換えが頻繁に生じ、その結果、絶えず新しい *mssl* 対立遺伝子が生じていることが推定できる。本研究で用いた *mssl* 5'ハプロタイプピニングは PCR 法によるものなので、実際のハプロタイプの数を通小評価していると思える。従って、本研究から、アフリカでは異なる遺伝子型の多重感染が高く、蚊体内における組換えにより、絶えず新規遺伝子型が創出され、その結果、マラリア感染防御免疫の獲得が容易ではないことが示唆される。

一方、東南アジア、西太平洋では伝播度と多重感染度に明瞭な相関は認められなかった。すなわち、伝播度がアフリカ並みに高いパプアニューギニア、ソロモン諸島では MOI は低かった。伝播度が中程度のバヌアツでは、MOI は最も低かった。パプアニューギニア、ソロモン諸島ではマラリア伝播が強いにもかかわらず感染がアフリカに比べて軽度である。パプアニューギニア、ソロモンでは *mssl* ハプロタイプの多重感染が少ないことが本研究で明らかになった。従って、パプアニューギニア、ソロモンでは組換えによる新規対立遺伝子の発生頻度が限られており、そのため同一の対立遺伝子の感染が重なっていることが予想される。このことがひいては株特異的免疫をうまく誘導しているという可能性を示唆する。

バヌアツでは多重感染がほとんどなく、単独遺伝子型原虫のクローナルな伝播が示された。バヌアツでは重症マラリアが極めてまれであるが、分布する遺伝子型の単純性がこのことに関わると思える。

マラウイではMOIが調べた原虫集団では最も高かったが、その理由は本研究からは不明である。マラウイではクロロキンの使用が1990年代始めに禁止され、その結果、クロロキン感受性を示すマラリア原虫集団が周辺地域から流入し、すでに2000年（サンプリングの年）には感受性原虫集団にほぼ置き換わったことが示唆されている。このこととMOIの高さに何らかの関係があるものと思える。MOIの変動はマラリア原虫集団のダイナミズムを理解する上で興味深い現象であるので、今後の研究が待たれる。

E. 結論

株特異的免疫を介した熱帯熱マラリアの感染防御免疫の獲得はマラリア流行地によって異なる。株特異的感染防御免疫の獲得には、マラリア伝播の強度、蚊体内の組換え頻度、さらに地域に分布する原虫の遺伝子型の数と多重感染の程度が関わることを本研究より示唆された。

F. 研究発表

論文発表

1. Y. Nishimoto, N. Arisue, S. Kawai, A. A. Escalante, T. Horii, K. Tanabe, and T. Hashimoto. (2008) Evolution and phylogeny of the

heterogeneous cytosolic SSU rRNA genes in the genus *Plasmodium*. **Mol. Phylog. Evol.** (in press).

2. H. Iriko, . Kaneko, H. Otsuki, T. Tsuboi, X-z. Su, K. Tanabe, and M. Torii. (2008) Diversity and evolution of the highly diverse rhoph1/clag multigene family of *Plasmodium falciparum*. **Mol. Biochem. Parasitol.** 158: 11-21.

3. K. Tanabe, A. Escalante, N. Sakihama, M. Honda, N. Arisue, T. Horii, R. Culleton, T. Hayakawa, T. Hashimoto, S. Longacre, S. Pathirana, S. Handunnetti, H. Kishino. (2007) Recent independent evolution of *msp1* polymorphism in *Plasmodium vivax* and related malaria parasites. **Mol. Biochem. Parasitol.** 156: 74-79.

4. N. Arizono, K. Nakanishi, T. Horii and K. Tanabe. (2007) Progress in the molecular biology and the immunology of nematode infections. **Trends Parasitol.** 23: 175-181.

5. N. Sakihama, M. Nakamura, A. A. Palanca Jr, R. A. Argubano, E. P. Realon, A. L. Larracas, R. L. Espina, and K. Tanabe (2007) Allelic diversity in the merozoite surface protein 1 gene of *Plasmodium falciparum* on Palawan Island, the Philippines. **Parasitol. Int.** 56: 185-194.

6. K. Tanabe, N. Sakihama, D. Walliker, H. Babiker, A. A. Abdel-Muhsin, B. Bakote'e, H. Ohmae, N. Arisue, T. Horii, I. Rooth, A. Färnert, A. Björkman, and L. Ranford-Cartwright. (2007) Allelic dimorphism-associated restriction of recombination in *Plasmodium falciparum msp1*. **Gene** 392: 153-160.

7. K. Tanabe, N. Sakihama, I. Rooth, A.

Björkman and A. Färnert. (2007) High frequency of recombination-driven allelic diversity and temporal variation of *Plasmodium falciparum* in Tanzania. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 76: 1037-1045.

8. X. Cheng, H. Hayasaka, K. Watanabe, Y. Tao, J. Liu, H. Tsukamoto, T. Horii, K. Tanabe, and H. Tachibana. (2007) Production of High-Affinity Human Monoclonal Antibody Fab Fragments to the 19-Kilodalton C-Terminal Merozoite Surface Protein 1 of *Plasmodium falciparum*. **Infect. Immun.** 75: 3614-3620.

9. T. Mita, K. Tanabe, N. Takahashi, L. Dysoley, F. Eto, I. Hwaihwanje, H. Ohmae, K. Kita, S. Looareesuwan, A. Kaneko, A. Björkman, and T. Kobayakawa. (2007) Independent unique evolution of pyrimethamine resistance of *P. falciparum* in Melanesia. **Antimicrob. Agents Chemother.** 51: 1071-1077.

10. M. A. Pacheco, A. C. Poe, W. E. Collins, A. A. Lal, K. Tanabe, V. Udhayakumar, and A. E. Escalante. (2007) A comparative study of the genetic diversity of the 42 kDa fragment of the merozoite surface protein 1 in *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. **Inf. Gen. Evol.** 7: 180-187.

学会発表

1. Toshiyuki Hayakawa, Richard Culleton, Toshihiro Horii, Kazuyuki Tanabe. Incipient rapid diversification in the evolution of extant malaria parasites. 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2007.9.4.

2. Nobuko Arisue, Tetsyo Hashimoto, Toshiyuki Hayakawa, Hideya Mitsui, Naoko Sakihama, Mozhi Jia, Nirianne M. Q. Palacpac, Kazuyuki Tanabe, Toshihiro Horii. Phylogenetic relationship of malaria parasites inferred from multiple gene data. 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2007.9.4.

3. Richard Culleton, Toshihito Mita, Mathieu Ndounga, Holger Unger, Pedro Cravo, Akira Kaneko, Milijaona Randrianariveolosia, Shigeyuki Kano, Takafumi Tsuboi, Anjali Yadava, Anna P. Arez, Virgilio do Rosario, Francine Ntoumi, Richard Carter, Kazuyuki Tanabe. *Plasmodium vivax* in Africa. 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2007.9.4.

4. Nirianne M. Q. Palacpac, Nobuko Arisue, Kazuyuki Tanabe, Jetsumon Satabongkt, Takafumi Tsuboi, Motomi Torii, Rachanee Udomsangpetch, Toshihiro Horii. Genetic make-up of *Plasmodium vivax* population in Mae Sot, Thailand. 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2007.9.4.

5. Kazuyuki Tanabe, Ananias Escalante, Naoko Sakihama, Masanori Honda, Nobuko Arisue, Toshihiro Horii, Richard Culleton, Toshiyuki Hayakawa, Tetsuo Hashimoto, Shirley Longacre, Sisira Pathirana, Shiroma Handunnetti, Hirohisa Kishino. Recent independent evolution of msp1 polymorphism in *Plasmodium vivax* and *Plasmodium cynomolgi*. 5th European Congress on Tropical Medicine and International Health. 2007.5.26

6. 田邊和祐、ゲノム多様性が語るマラリア病原体の寄生戦略、日本動物学会近畿支部公開講演会、2007.11.24.

7. 澤井裕美、大谷寛人、田邊和祐、遺伝学会第79回大会、マラリア原虫の表面抗原遺伝子 *msp1* における種特異的な自然選択、2007.9.21.

8. 早川敏之、Richrad Culleton, 堀井俊宏、田辺和祐、現生マラリア原虫系統の起源における急速な多様化、第6回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、2007.10.27.

9. 有末伸子、賈黙稚、Niriann Palacpac、田邊和祐、堀井俊宏、Group I. II 及び III SERA 遺伝子配列から推定したマラリア原虫の系統

関係、第6回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、2007.10.27.

10. 澤井裕美、大谷寛人、田邊和祐、マラリア原虫表面抗原 *msp1* における種特異的な自然選択、第6回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、2007.10.27.

11. 有末伸子、橋本哲男、早川敏之、三井英也、先濱直子、賈黙稚、Nirianne Palacpac、田邊和祐、堀井俊宏、複数遺伝子配列データによるマラリア原虫の系統解析、第30回日本分子生物学会年会、2007.12.15.

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

寄生虫症の免疫病理学

分担研究者 中西憲司 兵庫医科大学 免疫学・医動物学教室 教授

研究要旨

IL-27 の受容体は WSX-1/gp130 である。既に、WSX-1 欠損マウスが *Leishmania major* (*L. major*) 感染時に Th1 応答が障害されることが明らかにされている。本研究において *L. major* を感染させた BALB/c マウスに IL-27 を投与すると、Th1 応答が促進され、同時に Th2 応答が抑制され、その結果感染抵抗型になることを明らかにした。一方、IL-27 の作用で Th2 応答が抑制されるため、*Strongyloides venezuelensis* (*Sv*) を感染させた場合は、*Sv* の排除に必要な小腸粘膜型肥満細胞の活性化が阻止され、その結果 *Sv* の排除が遅延することを明らかにした。さらに、IL-27 transgenic (Tg) マウスでは、*Sv* の排除能が極めて低下していることを明らかにした。

A. 研究目的

BALB/c マウスの footpad に *Leishmania major* (*L. major*) を感染させると、Th2 優位の宿主応答が起こり、感染部位の進行性の腫脹が起こり、やがて肝臓・脾臓まで感染が拡大しマウスは悪液質で死亡する。我々は既に *L. major* を感染させた BALB/c マウスに IL-12+IL-18 投与することで、Th2 応答を抑制出来るとともに Th1 応答を誘導して、病原体を排除できることを既に報告している。新規サイトカインの IL-27 は Th1 応答を誘導するが、Th2 応答を抑制する調節性のサイトカインとして注目されている。本研究において、IL-27 を *L. major* 感染

BALB/c マウスに投与して、これらの病原体に対する排虫増強効果を検討するとともに、その増強効果誘導機序を検討した。

一方、*Strongyloides venezuelensis* (*Sv*) の様な蠕虫感染に対しては、宿主は Th2 応答を発動することで排除する。IL-27 は Th2 応答を抑制する。そこで本研究では、新規サイトカインの IL-27 を *Sv* 感染 C57BL/6 に投与して、*Sv* 排除阻止効果も検討した。

B. 研究方法

BALB/c 野生型の footpad に *L. major* を感染させた。あるいは C57BL/6 野生型に *Sv* の L3 幼虫を感染させた。感染後、IL-27 を投

与して、感染宿主の排虫能を検討した。あるいは C57BL/6 バックの IL-27Tg マウスに、SV の L3 幼虫を感染させ、排虫能力を検討した。

(倫理面の配慮)

マウスの処置はエーテル麻酔下で行なっている。

C. 研究結果

IL-27 を *L.major* 感染 BALB/c マウスに一週間投与すると、PBS を投与された *L.major* 感染 BALB/c マウスに比較して、footpad の swelling が著明に抑制された。PBS を投与された BALB/c の所属リンパ節は、Th2 細胞が優位になっていたが、IL-27 投与群では、Th2 応答が抑制されるとともに、Th1 細胞が著明に誘導されていた。

次に、C57BL/6 野生型に SV の L3 幼虫を感染させた。感染後、IL-27 を一週間投与すると、PBS を一週間投与された SV 感染 C57BL/6 に比較して、排虫能は遅延していた。その理由は、SV の排除に必要な小腸粘膜型肥満細胞の活性化が阻止されることであった。更に、C57BL/6 バックの IL-27Tg マウスに、SV の L3 幼虫を感染させると Th2 応答が起こらず専ら Th1 応答が起こるため、SV の排除能が極めて低下することを明らかにした。

D. 考察

この様に、IL-27 はそれ単独で Th1 応答を誘導し、同時に Th2 応答を抑制することから、細胞内寄生病原体感染症あるいはア

レルギー疾患の治療に有効な生物製剤となる可能性が示唆された。

E. 結論

本課題において、IL-27 はそれ単独で Th1 応答を誘導し、Th2 応答を抑制する。一方、IL-27 を過剰に発現させたマウスに SV を感染させても、Th2 応答が起こらないため、SV の排虫が著明に抑制されることを明らかにした。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

論文発表

Sawaki, J., Tsutsui, H., Hayashi, N., Yasuda, K., Akira, S., Tanizawa, T. and Nakanishi, K. Type 1 cytokine/chemokine production by mouse NK cells following activation on their TLR/MyD88-mediated pathways. *Int. Immunol.* 19: 311-320. (2007)

Hayashi, N., Yoshimoto, T., Izuhara, K., Matsui, K., Tanaka, T., Nakanishi, K. T helper 1 cells stimulated with ovalbumin and IL-18 induce airway hyperresponsiveness and lung fibrosis by IFN- γ and IL-13 production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 104: 14765-14770. (2007)

Fujibayashi, Y., Fujimori, Y., Kasumoto, I., Kai, S., Hara, H., Okamura, H., Tsutsui, H., Ogawa, H. and Nakanishi, K.

Interleukin-18 regulates T helper 1 or 2 immune responses of human cord blood CD4+ Valpha24+ Vbeta11+ natural killer T cells. *Int. J. Mol. Med.* 20: 241-245. (2007)

Yoshimoto T, Yoshimoto T, Yasuda K, Mizuguchi J, Nakanishi K. IL-27 suppresses Th2 cell development and Th2 cytokines production from polarized Th2 cells: a novel therapeutic way for Th2-mediated allergic inflammation. *J. Immunol.* 179:4415-23 (2007)

Arizono N, Nakanishi K, Horii T, Tanabe K. Progress in the molecular biology of malaria and the immunology of nematode infections. *Trends Parasitol.* 23:175-81 (2007)

Seki, E., Kondo, Y., Iimuro, Y., Naka, T., Son, G., Kishimoto, T., Fujimoto, J., Tsutsui, H. and Nakanishi, K. Demonstration of cooperative contribution of MET and EGFR-mediated STAT3 phosphorylation to liver regeneration by exogenous suppressor of cytokine signalings. *J. Hepatol.*, 48: 237-245. (2008)

Andoh, T., Kishi, H., Motoki, K., Nakanishi, K., Kuraishi, Y. and Muraguchi A.

Protective Effect of IL-18 on Kainate- and IL-1 β -Induced Cerebellar Ataxia in Mice. *J. Immunol.*, 180: 2322-2328. (2008)

学会発表

Yoshimoto, T. (2007) Lipopolysaccharide induction of IgE by innate type 2 basophils. 2007 Keystone Symposia Conference. 1.20-24, Colorad, USA.

Sasaki, Y., Yoshimoto, T. and Nakanishi, K. (2007) IL-18 with IL-2 protects against *Strongyloides venezuelensis* infection by activating both IL-18-dependent and Th2 cell-dependent mastocytosis. 日米医学協力プログラム寄生虫専門部会 国内・合同会議, 2.2-3, 東京.

筒井ひろ子, 今村美智子, 中西憲司 (2007) Requirement of TRAM for caspase-1-dependent IL-18 secretion after stimulation with LPS. 第80回日本細菌学総会, 3.26-28, 大阪.

Yoshimoto, T. (2007) IL-27 inhibits Th2 responses in vitro and in vivo by suppressing GATA-3; demonstration of its protective role against Leishmaniasis. 第76回日本寄生虫学会大会, 3.29-30, 大阪.

小坂 久, 善本知広, 中西憲司, 藤元治朗 (2007) 新しいマウス腹腔内癒着モデルの確立と癒着形成に関わる免疫学的要因の解析.

第107回日本外科学会定期学術集会, 4.11-13, 大阪.

中西憲司 (2007) 寄生虫感染と宿主応答. 特定領域研究「感染現象のマトリックス」第3回全体班会議, 5.12, 東京.

Kosaka, H., Yoshimoto, T., Nakanishi, K. and Fujimoto, J. (2007) Establishment of experimental surgical adhesion model and analysis of immunological mechanism underlying organ adhesion. 42nd Congress of the European Society for Surgical Research (ESSR), 5.23-26, Rotterdam, The Netherlands.

今村美智子, 安田好文, 筒井ひろ子, 中西憲司, 藤元治朗 (2007) lipopolysaccharide 刺激による Toll-like receptor を介した IL-18 の産生. 第43回日本肝臓学会総会, 5.31-6.1, 東京.

中西憲司 (シンポジウム) (2007) アレルギーの発症と感染—自然免疫から—. 第19回日本アレルギー学会春季臨床大会, 6.10-12, 横浜.

善本知広 (シンポジウム) (2007) IL-18 を標的とした Th1 型アレルギー性炎症の治療. 第72回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会. 7.5-6, 京都.

中平 雅清, 田中貴志; Robson, B.E.,

Mizgerd, J.P., 中西憲司, Grusby, M.J. (シンポジウム) (2007) チロシン脱リン酸化酵素 PTP-BL による STAT シグナル伝達経路の制御. 第72回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会, 7.5-6, 京都.

今村美智子, 安田好文, 審良静男, 筒井ひろ子, 藤元治朗, 中西憲司 (シンポジウム) (2007) Lipopolysaccharide(LPS)刺激による Toll-like receptor(TLR)を介した IL-18/1 β の分泌. 第72回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会, 7.5-6, 京都.

小坂 久, 善本知広, 藤元治朗, 中西憲司 (2007) マウス腹腔癒着モデルの確立と IFN- γ を中心とした癒着形成に関わる免疫学的要因の解析. 第72回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会. 7.5-6. 京都.

中西憲司 (シンポジウム) (2007) IL-18 中和による感染増悪型アレルギー性炎症の制御. 第28回日本炎症・再生医学会, 8.2-3, 東京.

中西憲司 (2007) IL-18 を標的とした炎症の制御. (特別講演) 第8回日本分子脳神経外科学会, 8.31-9.1, 兵庫.

Nakanishi, K. (Symposium) (2007) Regulation of host defense against helminthes and protozoa by IL-18 and IL-27. The 7th Awaji International forum on infection and immunity. 9.1-5, Hyogo.

安田好文, 佐々木由紀, 松本真琴, 善本知広, 中西憲司 (2007) IL-33 のマウス生体内投与は *Nb* 排虫作用を有する杯細胞を誘導する. 第 63 回日本寄生虫学会西日本支部大会, 10.6-7. 高知.

中西憲司 (2007) Induction of Th2/IgE-independent allergic inflammation by IL-18. (招待講演) 第 20 回内藤コンファレンス「自然免疫の医学・生物学〔Ⅲ〕」, 10.9-12. 神奈川.

Tsutsui, H., Imamura, M., Yasuda, K., Akira, S. and Nakanishi, K. (2007) Contribution of TRIF to secretion of mature IL-1 β and IL-18 via the TLR-mediated Caspase-1 activation during extracellular bacterial infection in mice. 第 20 回内藤コンファレンス「自然免疫の医学・生物学〔Ⅲ〕」, 10.9-12, 神奈川.

Imai, Y., Yasuda, K., Hayashi, N., Matsumoto, M., Yoshimoto, T., Mizutani, H. and Nakanishi, K. (2007) DC cultured with Alum and OVA principally induce Th2 cells in vivo. 第 20 回内藤コンファレンス「自然免疫の医学・生物学〔Ⅲ〕」, 10.9-12, 神奈川.

Imamura, M., Yasuda, K., Akira, S., Fujimoto, J., Tsutsui, H. and Nakanishi, K. (2007) Requirement of TRIF for Caspase-1-dependent secretion of

IL-18/IL-1 β upon TLR3 engagement in mice. 第 20 回内藤コンファレンス「自然免疫の医学・生物学〔Ⅲ〕」, 10.9-12, 神奈川.

中西憲司 (2007) 蠕虫感染と宿主応答. 「感染現象マトリックス」横糸の会:「蠕虫宿主応答の特殊性と普遍性」, 10.16-17. 神戸.

安田好文 (2007) IL-33 のマウス生体内投与は *Nb* 排虫作用を有する杯細胞を誘導する. 「感染現象マトリックス」横糸の会:「蠕虫宿主応答の特殊性と普遍性」, 10.16-17. 神戸.

中西憲司 (シンポジウム) (2007) IL-18 中和による感染増悪型気管支喘息の制御. 第 35 回日本臨床免疫学会総会, 10.19-20, 大阪.

善本知広, 善本隆之, 安田好文, 水口純一郎, 中西憲司 (ワークショップ) (2007) IL-27 suppresses Th2 cell development as well as Th2 cytokines production from polarized Th2 cells: a novel therapeutic way for Th2-mediated allergic inflammation. 第 35 回日本臨床免疫学会総会, 10.19-20, 大阪.

今井康友, 安田好文, 林伸樹, 松本真琴, 善本知広, 水谷仁, 中西憲司 (ワークショップ) (2007) ナイーブマウスに移入された抗原と Alum でパルスされた DC は Th2 細胞を Caspase-1 非依存性に誘導する. 第 35 回日本臨床免疫学会総会, 10.19-20, 大阪.

松葉沙織, 善本知広, 安田好文, 池田誠宏, 三

- 村 治, 中西憲司 (ワークショップ) (2007) アレルギー性結膜炎に対する IL-33 の病因的役割の基礎的解析. 第 35 回日本臨床免疫学会総会, 10.19-20, 大阪.
- 小坂 久, 善本知広, 藤元治朗, 中西憲司 (ワークショップ) (2007) NKT 細胞由来の IFN- γ を中心とした術後癒着形成に関わる免疫学的要因の解析. 第 35 回日本臨床免疫学会総会, 10.19-20, 大阪.
- 今村美智子, 藤元治朗, 安田好文, 中西憲司, 審良 静男, 筒井ひろ子 (2007) Lipopolysaccharide(LPS) 刺激による Toll-like receptor(TLR)を介した IL-18/1 β の分泌. 第 13 回日本エンドトキシン研究会, 10.19-20, 鹿児島.
- 中西憲司 (2007) アトピー性皮膚炎と気管支喘息において super Th1 が果たす役割. (特別講演) 第 57 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 11.1-3, 横浜.
- 善本知広, 中西憲司 (シンポジウム) (2007) IL-18 を標的とした Th1 型アレルギー性炎症の治療的戦略. 第 57 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 11.1-3, 横浜.
- 林 伸樹, 黒田麻衣, 田中英久, 中西憲司 (ミニシンポジウム) (2007) Th1 型気管支喘息の病態と発症メカニズムの解析. 第 57 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 11.1-3, 横浜.
- 松葉沙織, 善本知広, 安田好文, 池田誠宏, 三村 治, 中西憲司 (2007) アレルギー性結膜炎に対する IL-33 の病因的役割の基礎的解析. 第 57 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 11.1-3, 横浜.
- 今井康友, 安田好文, 林 伸樹, 松本真琴, 善本知広, 水谷 仁, 中西憲司 (2007) マウスに移入された抗原と Alum でパルスされた DC は Th2 細胞を Caspase-1 非依存性に誘導する. 第 57 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 11.1-3, 横浜.
- Imamura, M., Yasuda, K., Fujimoto, J., Akira, S., Tsutsui, H. and Nakanishi, K. (2007) Contribution of TRIF to secretion of mature IL-1 β and IL-18 via the TLR-mediated caspase-1 activation during extracellular bacterial infection in mice. 58th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases(AASLD), 11.2-6, Boston, U.S.A.
- Yoshimoto, T., Yoshimoto, T., Yasuda, K., Mizoguchi, J. and Nakanishi, K. (ワークショップ) (2007) IL-27 suppresses Th2 cell development as well as Th2 cytokines production from polarized Th2 cells; a novel therapeutic way for Th2-mediated allergic inflammation. 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会, 11.20-22, 東京.
- Nakahira, M., Tanaka, T., Robson, B.E., Mizgerd, J.P., Nakanishi, K. and Grusby,

M.J. (ワークショップ) (2007) Regulation of STAT signaling by the tyrosine phosphatase PTP-BL. 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会, 11.20-22, 東京.

松葉沙織, 善本知広, 安田好文, 池田誠宏, 三村 治, 中西憲司(ワークショップ)(2007) 花粉で惹起される実験的アレルギー性結膜炎は IL-33 で増悪する. 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会, 11.20-22, 東京.

安田好文, 佐々木由紀, 松本真琴, 善本知広, 中西憲司 (ワークショップ) (2007) IL-33 は正常マウスに杯細胞を誘導し、*Nippostrongylus brasiliensis* 排虫作用を誘導できる. 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会, 11.20-22, 東京.

山田 潤, 羽室敦爾, 中西憲司, 安田好文, 橋木俊聡, 木下 茂 (2007) IL-12/IL-18 非依存性の全層角膜移植拒絶反応の検討. 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会, 11.20-22, 東京.

Imai, Y., Yasuda, K., Hayashi, N., Matsumoto, M., Yoshimoto, T., Mizutani, H. and Nakanishi, K. (2007) Transferred Antigen(Ag)/Alum-DCs induce Ag-specific Th2 cells in a naïve mouse without help from caspase-1-activated cytokines. 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会, 11.20-22, 東京.

Kosaka, H., Yoshimoto, T., Fujimoto, J. and Nakanishi, K. (2007) NKT cell-driven IFN-

γ plays an important role in postoperative adhesion formation. 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会, 11.20-22, 東京.

Imamura, M., Yasuda, K., Akira, S., Fujimoto, J., Tsutsui, H. and Nakanishi, K. (2007) Contribution of TRIF to secretion of mature IL-1 β and IL-18 via the TLR-mediated caspase-1 activation during extracellular bacterial infection in mice. 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会, 11.20-22, 東京.

中西憲司 (2007) 寄生虫感染と宿主応答. 第一回蠕虫研究会, 11.26-27, 宮崎.

善本知広, 中西憲司 (2007) 術後腸管癒着形成の発症機序の解明とその制御法の確立. 「免疫難病・感染症等の先進医療技術」第 4 回公開シンポジウム, 12.14, 東京.

安田好文, 善本知広, 今村美智子, 筒井ひろ子, 杉村和久, 中西憲司 (2007) IL-18 を標的としたアレルギー性炎症の制御. 「免疫難病・感染症等の先進医療技術」第 4 回公開シンポジウム, 12.14, 東京.

H. 知的所有権の出願・登録状況
なし

ハマダラカにおけるキサンツレン酸産生の制御とマラリア伝播性の抑制

分担研究者 松岡裕之 自治医科大学・教授

研究要旨 マラリア原虫の生殖体形成は、ヒトからハマダラカへの伝播の最初の段階であり、トリプトファンの代謝産物であるキサンツレン酸（XA）によって誘導される。HPLC-ECD分析によりハマダラカ（*Anopheles stephensi*）に含まれる微量の XA を測定したところ、幼虫一蛹では 1 匹あたり 20–50ng、成虫では 10–50ng であった。蛹および羽化直後のメスの含有量が最も高く 50ng であった。XA は羽化後急速に減少し、4 日目には 12ng になった。これはハマダラカのマラリア伝播効率と密接に関係していると思われた。

A. 研究目的

何故ハマダラカだけがマラリアを媒介できるのか、という疑問を解決することを通じて、マラリアを媒介しないハマダラカを創製できるかもしれない。マラリア原虫の生殖体形成は、ヒトからハマダラカへの伝播の最初の段階であり、トリプトファンの代謝産物であるキサンツレン酸（XA）によって誘導される。XA の代謝経路を操作して XA の産生を抑制し、マラリア伝播能を低下させることをめざした。

B. 研究方法

ハマダラカ（*Anopheles stephensi*）の幼虫に XA 産生に必須な酵素 kynurenine 3-hydroxylase の dsRNA を注射し、XA 産生抑制が起きるかどうかが、マラリアの伝播が抑制されるかどうかを検証した。また幼虫飼育水中に XA 産生を抑制する物質を添加して、同様の抑制効果があるかどうかを調べた。

C. 研究結果

kynurenine 3-hydroxylase の dsRNA を注射されたハマダラカについて、個別に XA を測定したところ、XA の産生が抑制されていない個体が約 80%、抑制されている個体が約 20% だった。幼虫飼育水中に Thyroxine あるいは Bisphenol を添加して飼育したところ、Thyroxine には XA 産生抑制効果が認められ

なかったものの、Bisphenol 添加群では 30–50% の XA 産生抑制がみられた。この成虫群にマラリア感染マウスを吸血させたところ、マラリア伝播性は非添加群と差はなかった。

D. 考察

dsRNA 注射個体すべてにおいて XA 産生が抑制されているわけではないことが分かった。これは注射が不適切であった個体が多くあったことに起因すると思われた。Bisphenol 添加群では 30–50% の XA 産生抑制がみられたが、この程度の産生抑制ではハマダラカのマラリア伝播能を抑制・消滅させることはできないことが分かった。

E. 結論

30–50% の XA 産生抑制ではハマダラカのマラリア伝播能を抑制・消滅させることはできない

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし

マラリアにおける宿主病原体相互関係の解析

分担研究者 久枝 一 九州大学医学研究院准教授

研究要旨 マラリア等の細胞内寄生性病原体による感染症に対する防御免疫には細胞傷害性CD8T細胞が重要な役割を果たす。本研究では、我々がこれまでに開発してきたCD8T細胞活性化のための遺伝子ワクチン方法を最適化することを試み、CD8T細胞エピトープのプロセッシングに必須のプロテアソームによる抗原分解を促進させる戦略を確立した。

A. 研究目的

有効なワクチンを得るためには防御免疫に働く細胞群を効率良く活性化する戦略の樹立が必須である。CD8T細胞はマラリア原虫など多くの細胞内寄生性病原体に対する防御機構において重要な役割を果たすが、これまでのワクチン方法ではCD8T細胞を活性化する事が困難である事が示されてきた。我々はこれまでにT細胞への抗原プロセッシング・提示機構に着目した遺伝子ワクチン法を用いてCD8T細胞を活性化する方法を樹立してきた。すなわち、標的とする抗原にユビキチンを融合させ、プロテアソームによる標的抗原のプロセッシングを増強するのである。結果として効率良くプロセッシングを受けた抗原エピトープが提示されCD8T細胞は活性化される。プロテアソームによるプロセッシングの効率はユビキチンとの物理的な結合が必須であるので、本研究ではさらに、ユビキチンと標的抗原の結合の安定性を強化しさらにCD8T細胞活性化を最適化することを目的とした。

B. 研究方法

ユビキチンとモデル抗原、卵白アルブミン(OVA)、の融合蛋白をコードする発現プラスミドを構築した。ユビキチンのC末端のアミノ酸を本来のグリシンから各種アミノ酸に変異させたものも構築した。各プラスミドを発現させた細胞でのOVAとユビキチンの結合パターンをウエスタンブロット法で解析した。ワクチン効果はC57BL/6マウスに遺伝子銃を用い免疫しOVA特異的CD8T細胞の活性化を評価した。さらにワクチンマウスにOVA発現腫瘍細胞を接種し、ワクチンの増殖抑制効果も観察した。

全ての動物実験は九州大学倫理委員会の承認を得た後、ガイドラインに従って行われた。

C. 結果および考察

ユビキチンとOVAの結合はユビキチンC末端のアミノ酸によって3つのパターンに分類できた。1つは融合蛋白発現後全てが速やかに解離するものでグリシンがあてはまる。2つ目は解離が全く起こらないもので、バリン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸等がこのタイプであった。3つ目はその中間で融合したもの、解離したものの双方が認められるタイプで、アラニン、セリン、システイン、アスパラギン、グルタミンが含まれる。3つの解離パターン示すプラスミドを遺伝子ワクチンとして用いて抗原特異的CD8T細胞活性化機能を解析した。OVA特異的T細胞レセプタートランスジェニックOT-Iマウスから調整したCD8T細胞を移入したマウスに免疫後、OT-ICD8T細胞の増殖を指標とした。OVA特異的活性化能はユビキチンとOVAの結合の安定性に相関しており、バリン、アラニン、グリシン置換の順序で強かった。OVAエピトープをパルスした脾臓細胞に対する生体内細胞傷害活性も同様にバリン置換ユビキチンで最も強く見られた。抗腫瘍活性もCD8T細胞の活性化に比例していた。以上のことから、ユビキチンのC末端のアミノ酸を変化させることで標的抗原との結合が操作できる事、その結合の安定性によりCD8T細胞を活性化する能力が左右される事が明らかとなった。今後、この結果をもとにより良い抗病原体遺伝子ワクチン戦略の開発が期待される。

D. 考察

ユビキチン融合抗原遺伝子ワクチンのCD8 T細胞活性化の最適化を試み、予想通りユビキチンと標的抗原との物理的結合の安定性が重要なファクターであることが示された。ユビキチンは生合成の過程でテトラマーとして発現される。その後、ユビキチンC末端水解酵素(UCH)により4つのモノマーに分解される。ユビキチンと抗原間の分解もこの酵素が関わっていると思われる。オリジナルのグリシンではこの酵素が十分に機能を発揮し、全てが分解されるのであろう。側鎖の比較的小さなアミノ酸に置換した場合は部分的に働き一部が分解され、側鎖の大きなアミノ酸、電荷をもったアミノ酸ではUCHがアクセスできず分解することができないのであろう。

ユビキチンと抗原の結合が安定であることでさらにユビキチンが多量体を形成し、その結果としてプロテアソームによるCD8T細胞のエピトープの切り出しが促進するのであろう。

E. 結論

我々の提唱してきたユビキチン-プロテアソーム系を利用したCD8T細胞活性化遺伝子ワクチンを最適化した。ユビキチンのC末端のアミノ酸をグリシンからバリン・アルギニンに置換することでより良いワクチン効果を発揮することが明らかとなった。

G. 論文発表

Imai T, Duan X, Hisaeda H, and Himeno K. Antigen-specific CD8+ T cells induced by the ubiquitin fusion degradation pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 365: 758-763, 2008.

Shen J, Hisaeda H, Chou B, Yu Q, Tu L, and Himeno K. Ubiquitin-fusion degradation pathway: A new strategy for inducing CD8 cells specific for mycobacterial HSP65. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 365: 621-627, 2008.

Tetsutani K, To H, Torii M, Hisaeda H, and Himeno K. Malaria parasite induces tryptophan-related immune suppression in mice. *Parasitology* 134: 923-930, 2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし