

201004004A

厚生労働科学研究費補助金  
地球規模保健課題推進研究事業  
(国際医学協力研究事業)

**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**

(H22-国医-指定-004)

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 平 山 謙 二

平成23 (2011) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金  
地球規模保健課題推進研究事業  
(国際医学協力研究事業)

**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**

(H22-国医-指定-004)

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 平 山 謙 二

平成23 (2011) 年 3 月

## 目 次

### I. 総括研究報告

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

平山謙二 ..... 1

### II. 分担研究報告

1. 寄生虫症感受性の宿主因子の検討に関する研究  
平山謙二 ..... 10
2. 原虫症治療標的分子の機能解析  
北 潔 ..... 13
3. アジアの三日熱マラリア原虫の遺伝的集団構造の解明  
狩野繁之 ..... 18
4. ワクチン分子の無細胞系合成システムの確立  
坪井敬文 ..... 20
5. 赤痢アメーバの病原機構の解明  
野崎智義 ..... 27
6. フィラリア症の疫学研究（診断法の開発と野外応用）  
木村英作 ..... 31
7. フィラリア線虫と媒介節足動物の相互関係の解明  
辻 尚利 ..... 36
8. 日本住血吸虫症の病態発現分子解析  
太田伸生 ..... 38
9. 寄生蠕虫の寄生適応および免疫修飾機構の研究  
金澤 保 ..... 42
10. リーシュマニア症対策疫学研究  
我妻ゆき子 ..... 45
11. マラリア原虫の宿主細胞認識と侵入機序の解析  
鳥居本美 ..... 47
12. 寄生虫感染宿主内で誘導される好塩基球の感染制御能の証明  
中西憲司 ..... 50
13. 遺伝子導入ハマダラカを作成し空飛ぶ注射器としての実用性を探る  
松岡裕之 ..... 54
14. マラリアにおける宿主病原体相互関係の解析  
久枝 一 ..... 55

15.	マラリア感染における T 細胞免疫応答の研究	由井克之	57
16.	マラリア原虫のリガンドおよび赤血球侵入関連分子の解析	金子 修	60
17.	マラリア原虫に有効な新規阻害剤の探索	金 惠淑	63
18.	住血原虫症の病態と創薬に関する研究	片倉 賢	68
19.	トリパノソーマの防御応答回避メカニズムの解析	嶋田淳子	70
20.	人獣共通寄生虫病の血清診断システムの開発と幼虫移行症の病態解明	丸山治彦	71
21.	住血原虫症の診断学	五十嵐郁男	76
22.	住血吸虫症の検査・診断・対策に関する研究	大前比呂思	80
23.	人獣共通寄生原虫・孳虫症の寄生適応に関する分子生物学的解析	奈良武司	85
24.	人獣共通幼条虫症（脳囊虫症、エキノコックス症）の病態、診断、治療、 予防に向けた研究	伊藤 亮	87
III. 研究成果の刊行に関する一覧表			93
IV. 研究成果の刊行物・別刷り			109

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業（国際医学協力研究事業））  
総括研究報告書

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

研究代表者 平山謙二 長崎大学熱帯医学研究所教授

研究要旨 アジア地域は多様な地理的環境と多様な民族により構成されているが、東南アジアを中心に熱帯地域が広がっている。これらの地域ではいまだに寄生虫感染症の患者が多数存在し、住民の健康に重大な影響を与えているばかりでなく、社会経済的な影響も大きい。これら主要な寄生虫疾患の制圧を目指した新たな治療・予防法の開発を最終目標として、疾患別にグループを組み、各疾患の制圧を目指した基礎研究から応用研究を幅広く行い、真に地域の健康増進に資する研究を推進した。対象とした寄生虫疾患あるいは領域は以下のものである。（１）マラリア、（２）住血吸虫症、（３）フィラリア症、（４）住血原虫症（トリパノソーマ、リーシュマニア症など）、（５）新興・再興感染症（腸管寄生原虫症、腸管寄生ぜん虫症、エキノコッカス症、人獣共通感染症など）、（６）媒介昆虫領域である。上記の対象疾患の制圧に資する学術的な知見を得るために以下のようなアプローチで多様な研究を展開した。a) 保有宿主や媒介動物を含めた感染動態や伝播経路に関わる基礎研究、b) 病原体の寄生適応の分子メカニズム、c) ヒトの防御免疫および病態生理。

研究分担者名

北 潔 東京大学大学院・医学系研究科・教授  
狩野繁之 国立国際医療センター研究所・部長  
坪井敬文 愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター・教授  
野崎智義 国立感染症研究所・部長  
木村英作 愛知医科大学医学部・教授  
辻 尚利 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究所・主任研究員  
太田伸生 東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授  
金澤 保 産業医科大学・教授  
我妻ゆき子 筑波大学大学院人間総合科学研究科・教授  
鳥居本美 愛媛大学大学院医学系研究科・教授  
中西憲司 兵庫医科大学・教授  
松岡裕之 自治医科大学・教授  
久枝 一 群馬大学大学院医学研究科・教授  
由井克之 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授  
金子 修 長崎大学熱帯医学研究所・教授  
金 惠淑 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・准教授  
片倉 賢 北海道大学大学院獣医学研究科・教授  
嶋田淳子 群馬大学医学部・教授  
丸山治彦 宮崎大学医学部・教授  
五十嵐郁男 帯広畜産大学原虫病研究センター・教授  
大前比呂思 国立感染症研究所・室長  
奈良武司 順天堂大学大学院医学研究科・准教授  
伊藤 亮 旭川医科大学・教授

## A. 研究目的

アジアに広がる寄生虫疾患に関する基礎研究を推進し、その制圧、予防、治療に資する革新的な知見を集積することを目的とする。多くの寄生虫疾患は「見捨てられた病気」として分類され、途上国や研究環境の貧弱な地域で流行し、たくさんの命が奪われ、あるいは脅かされ続けている。この分野に光を当て、現地の研究者も含めて新しくより効率的な制圧法を開発することは日本や欧米先進国の役割である。本研究課題を推進することにより、アジア地域の研究者を巻き込んだ共同研究を活性化することが可能となる。また、寄生虫疾患という環境に密着した感染症に関する研究に日本やアジア地域の若手研究者が参加することで、新たな医科学領域の後継者を育成することが可能となる。

## B. 研究方法

マラリア、住血吸虫症、フィラリア症、住血原虫症、新興再興感染症、媒介昆虫の6つの疾患において、以下のような観点から分子レベルでの研究を行った。

A) 感染伝播メカニズム    B) 寄生虫の宿主適応    C) ヒト防御免疫および病態生理

(倫理面への配慮)

本研究計画においてはアジアの流行地域での疫学調査の実施も含まれるので、WHOの基準に従った倫理基準に基づいて実施された。血液などの試料提供者には研究主旨を説明した上で自由意思による同意を書面で得た。また、ヒト資料については匿名化を行った。今年度実施分については各分担研究者が所属機関とカウンターパートの機関において倫理審査を得た上で研究を開始するべく準備中である。動物実験についても各所属機関の動物実験審査の承認を得てから実施した。なお、計画にはヒトゲノム・遺伝子解析も含んでいる

● ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針

- 疫学研究に関する倫理指針
- 遺伝子治療臨床研究に関する指針
- 臨床研究に関する倫理指針
- 疫学・生物統計学の専門家の関与有
- 臨床研究登録予定無

## C. 研究結果

### (1) マラリア

狩野はアジアの三日熱マラリア原虫の遺伝的集団構造の研究を行い、Pv mtDNA 全塩基配列に基づく分子系統解析の結果、以下のことを明らかにした。1) 韓国のPv集団は、中国南部のPv集団と近縁の2つの集団からなること。2) フィリピンのPv検体(3検体)は、インドシナ半島のPv集団と遺伝的に近縁である。3) 輸入三日熱マラリア患者検体は、渡航先由来のPv集団に含まれた。マラリアの移動が地域的に限られていることを認識した輸入症例の治療方法の選択が必要であることを示唆するものである。

坪井は無細胞系合成システムによるワクチン分子探索を継続し、114種類のプロテインアレイと、熱帯熱マラリアに対する防御抗体を含有するヒト血清を用いてスクリーニングを行った。その結果、PfMSPDBL1という分子が選択された。PfMSPDBL1はメロゾイト表面に局在し、さらに抗PfMSPDBL1抗体は、培養熱帯熱マラリア原虫の赤血球への侵入を阻害した。新たなワクチン候補分子を発見することができ、今後の臨床開発への道をひらいた。

鳥居はマラリア原虫の宿主細胞認識と侵入機序に重要な分子である赤血球結合リガンドEBLの構造変換による機能の変化を観察した。Py17XNL株原虫EBLの領域6の8個のシステインを、それぞれアラニンに置換した遺伝子組換え原虫を作成して、EBLの局在を間接蛍光抗体法で観察したところ、1、4、5、7番目のCys組換え原虫においてはEBLの局在がPy17XNLのマイクロネームから強毒株のPy17XLに見られる局在パターンへと変化した。第6領域がPyEBL分子の細胞内輸送に重要であること、さらにその立体構造と、分子表面の特定の領域が細胞内輸送に関わっていることが示唆され、この分子が治療薬開発の標的として重要であることが示唆された。

久枝はマウスマラリアにおけるCD8T細胞の赤血球ステージマラリアに対する防御機能を明らかにした。これまで肝細胞期に有効であろうとされていたCD8T細胞の機能が拡大され今後のワクチン開発に重要な基礎研究情報となる。

由井はマウスマラリアにおいてCD4<sup>+</sup>T細胞は感染により非特異的に産生されるIL-2によりIFN-gを産生することが明らかになった。他の感染症との重複感染の際の影響を示唆するものである。

金子修は、三日熱マラリア原虫のPvSTP2という細胞内タンパクの細胞内での局在を間接蛍

光抗体法により観察し、原虫感染赤血球膜上シュフナー斑点によく似ることが判明した。マラリアの赤血球内での膜タンパク輸送に重要なタンパク質であることが示唆されたことから抗マラリア薬の標的となることが期待できる。

## (2) 住血吸虫症

平山は、フィリピンの若年性の日本住血吸虫性肝線維症を憎悪させる要因として50の免疫応答関連遺伝子近傍に設置したマイクロサテライトマーカーのうち、IL12B MS\*241 (OR=2.48)、MS\*245 (OR=0.45)と IL2 MS\*383 (OR=10.3)の3つの感受性あるいは抵抗性アレルを同定した。これらはいずれもTh1型のT細胞応答性と関連しているため、今後の肝線維症予防薬開発のための基礎的な情報として重要であると考えられる。

金澤は、マウスに慢性感染する腸管寄生蠕虫 *Heligmosomoides polygyrus* (Hp) を感染させた1型糖尿病モデルマウスの発症を抑制することを発見したが、この機序にTh2偏倚が関与しないことをSTAT6KOマウスで明らかにした。ぜん虫感染による他の疾患感受性への影響は寄生虫撲滅後の保健衛生対策にも重要であり、フィールド研究へと発展するテーマである。

太田はアジアに蔓延する日本住血吸虫症がアフリカのマンソン住血吸虫症に比べ肝病変が強いことに着目し、マウスモデルにおいても肝臓の好中球と好酸球浸潤パターンの顕著な違いがあることや、Th2反応を阻害した条件下で炎症性のTh17応答性が日本住血吸虫で上昇することを突き止めた。免疫制御剤による治療モデルの開発に資する重要な研究である。

大前はフィリピンで新たに確認された2つの日本住血吸虫症浸淫地の疫学調査により、両地域が、従来から日本住血吸虫症浸淫地であることを明らかにした。腹部超音波検査と免疫血清検査の結果を組み合わせることで流行の期間や流行密度を推測することが可能であることを示したことから、今後対策の地方分権が進むフィリピンにおけるサーベイランス政策立案に貢献することが期待される。

## (3) フィラリア症

木村は尿サンプルを用いた簡便で乳幼児に適用可能なフィラリア症の診断法の開発と野外

応用研究を推進し、スリランカの調査で尿ELISA陽性率は、血清のICT testの約5倍高く1,505人中、21人(1.4%)が陽性となった。陽性者の29%が10歳未満であったことは最近の流行を示唆しており、この方法が集団治療による対策後のサーベイランスに非常に有用な方法であることを証明した。さらにこれを改良したビーズ法の確認や環境調査に重要なLAMP法の開発も進展した。

辻はフィラリア線虫由来の抗血液凝固物質であるロンギスタチンは媒介者であるマダニの寄生維持に深く関与することを発見した。新規抗寄生虫薬の標的分子として有効であると考えられる。

## (4) 住血原虫症(トリパノソーマ、リーシュマニア)

北はマラリア原虫細胞をParr homogenizerで破碎し、パーコールを用いてミトコンドリアとアピコプラストを分離できる最終的な条件を確立した。トリパノソーマのシアン耐性酸化酵素は膜結合性2核鉄タンパク質であるがその立体構造を明らかにした。アメリカリーシュマニアの新奇なミトコンドリア呼吸鎖の複合体II(コハク酸-ユビキノ還元酵素複合体)の精製法を確立した。これら抗原虫薬の標的分子候補の立体構造の解明によりインシリコあるいは化合物ライブラリーからの医薬品開発が促進されることが期待される。

片倉はネパールやインドで蔓延するカラアザールの病原原虫であるリーシュマニア原虫がNF- $\kappa$ B inducing kinaseを遺伝的に欠いている *aly/aly* マウスでは長期間(7か月)にわたって肝臓に存続し慢性期に原虫数が増加することを見出し、原虫のマウス体内における存続機構としてCD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T細胞の関与が強く示唆された。Treg細胞の抑制活性を調節する薬剤の開発により慢性感染を制御できる可能性を示唆した。またResveratrolというミャンマーの薬用植物由来の物質に強い抗リーシュマニア活性があることを見出した。

嶋田はトリパノソーマ感染細胞のアポトーシスを抑制する宿主由来の遺伝子であるc-FLIPおよびc-IAPを培養細胞に導入し、高発現させた株を樹立することに成功した。アポトーシス抑制因子と相互作用する原虫側因子の探索が可能となったので、この因子を単離することで細胞内感染を阻止するための標的分子を決定することができる。

五十嵐はウシバベシアのスフェリカルボデ

ィ4 (BbSBP4) 組換え抗原を用いた ELISA および膜抗原遺伝子 BV5650 および BV8970 を用いた nPCR を開発した。人獣共通寄生原虫症の診断法の開発に資するものと考えられる。

奈良は解糖系酵素であるアルドラーゼ ALD 等を用いたキネトプラスチダ類とディプロネマ類の分子進化に着目し、ALD では分子系統解析でトリパノソーマ類および *D. papillatum* の ALD の単系統性を示し、免疫蛍光染色 (IFA) によって、ALD は両者において同様のドット状の蛍光パターンを示すことを証明した。このことから、*D. papillatum* の ALD は PTS を持ち、細胞内小胞に局在することが明らかとなった。これは、解糖系酵素のペルオキシソームへの移行がキネトプラスチダ類とディプロネマ類との分岐以前に既に成立していたことを示唆する最初の報告である。

キネトプラスチダ類に特異的と考えられてきたグリコソームの成立背景について、近縁群のディプロネマ類との共通祖先段階ですでに解糖系酵素の一部がペルオキシソームに移行しており、グリコソームのプロトタイプがすでに成立していた可能性が示唆された。

#### (5) 新興・再興感染症 (腸管寄生原虫症、腸管寄生ぜん虫症、エキノコックス症、人獣共通感染症など)

中西は好塩基球を欠損したマウスにぜん虫を感染させた場合、排虫時期が野生型マウスに比べて著しく遅延するが、腸間膜リンパ節 T細胞からのサイトカイン産生、血清中 IgE 産生誘導、粘膜型肥満細胞の誘導に好塩基球の有無で変化は認められなかったことから新たな好塩基球依存性の排虫メカニズムの存在を明らかにした。アジア地域に広く蔓延する腸管寄生虫症の制御薬の開発に資する研究である。

野崎は酸化ストレス負荷環境下での赤痢アメーバの遺伝子発現を網羅的に計測し、システム飢餓が原虫の遺伝子発現、特に代謝に関与する酵素遺伝子 L-cysteine-regulated NADPH-dependent oxidoreductases に影響することを明らかにした。これらの酵素活性の病原性との関連が今後の南アジアに広く蔓延するアメーバ赤痢対策のための抗原虫剤や治療薬の開発のシーズとなる可能性が高い。

丸山はブタ回虫組換え抗原 As16 が幼虫分泌排泄抗原 (ES 抗原) と相関が強く、診断用抗

原として優れていること、As16 とイヌ回虫の組換え抗原 TES32 との組み合わせによる幼虫移行症の病原体診断が可能であることを示した。ベネズエラ糞線虫のゲノム解析ではペアエンドライブラリの作製とフォスミドライブラリの構築が進行中で、またトランスクリプトーム解析では、虫卵、感染幼虫、肺移行期幼虫、および寄生世代成虫の cDNA を作製し、454 GS-FLX で塩基配列を決定した。総計 2,483,165 のリードが得られ、アSEMBL によって計 14,016 のアイソティグ (トランスクリプトに相当) を得、7,560 に何らかのアノテーションを付けることができ、約 3,000 個はベネズエラ糞線虫特異的と考えられた。寄生性線虫ゲノム情報としては世界的に貴重なものとなることが期待される。

伊藤は有鉤条虫 (*Taenia solium*) をアジア型とアメリカ・アフリカ型を区別できる新しい核遺伝子を見出した。エキノコックス属条虫も含めてアジアではさらに国や地域ごとに特徴的なハプロタイプの存在し感染した地域を特定することが可能であることを明らかにした。人体寄生テニア属条虫 3 種の遺伝子鑑別法としてミトコンドリアならびに核遺伝子を用いる Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法による糞便内遺伝子検査法を確立し、流行の現場で実施可能であることをほぼ確認した。*Taenia asiatica* と *Taenia saginata* の交雑個体がタイのみならず中国でも確認された。インドで有鉤条虫に感染し、年余にわたる虫卵排出と、自家感染による糞虫症を引き起こした日本人症例を発見した。流行地住民から血清検査により糞虫症患者を確認。遺伝子組み換え Em18 (RecEm18), Antigen B (Rec AgB) を用いるエキノコックス症に関する血清診断法に関する外部評価研究を展開した。この検査法 (RecEm18-ELISA, RecEm18-Immunoblot) は、世界最高水準との国際評価を得、米国疾病情報対策センター (CDC) が採用を決めている。さらに、昨年度にアドテック (株) と共同で簡便な迅速イムノクロマト診断キットを開発した。国内外での活用が期待される。

#### (6) 媒介昆虫

松岡は、唾液腺にマラリア抗原ペプチドを発現・分泌し、口吻から放出できる遺伝子導入蚊を作製し、その蚊を繰り返してマウスに吸血させた。その結果マウスは注入されたマラリア抗原ペプチドに対して抗体を産生したので、



これを今後より実用性の高いものへと発展させてゆくことにしている。

#### D. 考察

本年度の事業活動はほぼ計画通りに遂行された。研究計画全体の4年目にあたり、特にアジア地域に流行する寄生虫疾患とりわけ、以下にあげた、住血吸虫症、フィラリア症、マラリア、新興再興寄生虫病、ベクターの各研究領域で研究を遂行した。昨年度米国サンディエゴで免疫部会と合同で会議を開催したが、今年度は国立感染研で野崎部会員の主催で合同会議を開催し、日米のパネルおよび研究員に加えて、多数の研究協力者さらには若手のポストドク研究員や大学院学生が成果を発表し(口頭発表演題数 56)、最終日の赤痢アメーバの研究会を含め、133名が参加し、そのうち18名がアジアアメリカからの招待研究者であった。これまでに確立された日本とアジアの連携にさらに日米、あるいは米アジアを加えた3角協力による優れた共同研究の新たな発展がなされつつあり、その結果としての論文の産出が顕著にみられた。米国NIHの進めるアジア地域での米国機関とアジアとの拠点間研究が今年度から大きく前進しており、日本とアジアの枠組みを並行して発展させることにより、次期の日米5年計画ではアジアにおける3角協力推進のための新たな日米医学協力事業の存在意義を明らかにできると考えられる。

#### E. 結論

アジアに蔓延する広範囲な寄生虫疾患を対象にした分子レベルから公衆衛生レベルまでの活発な研究が行われ、本プログラムが日米における各研究グループの間の情報交換や新しいプロジェクトの提案、若手研究者の育成に重要な役割を果たした。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. マラリア

1. Moritoshi Iwagami, Seung-Young Hwang, Megumi Fukumoto, Toshiyuki Hayakawa, Kazuyuki Tanabe, So-Hee Kim, Weon-Gyu

- Kho, Shigeyuki Kano. Geographical origin of *Plasmodium vivax* in the Republic of Korea: haplotype network analysis based on the parasite's mitochondrial genome. *Malaria Journal* 9:184-188, 2010.
2. Tsuboi T, Takeo S, Arumugam TU, Otsuki H, Torii M. The wheat germ cell-free protein synthesis system: a key tool for novel malaria vaccine candidate discovery. *Acta Trop.* 2010, 114: 171-176.
3. Imai T, et al: Involvement of CD8+ T cells in protective immunity against murine blood-stage infection with *Plasmodium yoelii* 17XL strain. *Eur. J. Immunol.* 40: 1053-1061, 2010.
4. Ishida H, et al: Development of experimental cerebral malaria is independent of IL-23 and IL-17. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 402: 790-795, 2010.
5. Ozeki Y, et al: Transient role of CD4+CD25+ regulatory T cells in mycobacterial infection in mice. *Int. Immunol.* 22: 179-189, 2010.
6. Chou B, et al: Genetic immunization based on the ubiquitin-fusion degradation pathway against *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 392: 277-282, 2010.
7. Kimura D., Miyakoda M., Honma K., Yuda M., Chinzei Y., and Yui K., Production of IFN- $\gamma$  by CD4<sup>+</sup> T cells in response to malaria antigens is IL-2-dependent. *Int. Immunol.*, 22 (12); 941-952, 2010.
8. Complete abrogation of sporozoite-induced sterile immunity by blood stage parasites of homologous and heterologous malaria parasites, M. Inoue, J. Tang, O. Kaneko, K. Yui, R. Culleton, *Malaria J.*, 9 (suppl)O19, 2010
9. Wang Y, Kaneko O, Sattabongkot J, Chen J-H, Lu F, Chai J-Y, Takeo S, Tsuboi T, Ayala FJ, Chen Y, Lim CS, Han ET Genetic Polymorphism of *Plasmodium vivax* msp1p, a Paralog of Merozoite Surface Protein 1, from Worldwide Isolates. *Am J Trop Med Hyg* 84(2), 292-297 (2011/Feb).
10. Pandey BD, Pun SB, Kaneko O, Pandey K, Hirayama K. Expansion of Visceral Leishmaniasis to Western Hilly Part of Nepal. *Am J Trop Med Hyg* 84(1):107-8. (2011/Jan)
11. Pandey K, Pandey BD, Mallik AK, Kaneko O, Uemura H, Kanbara H, Yanagi T, Hirayama K. Diagnosis of visceral leishmaniasis by polymerase chain reaction of DNA extracted from Giemsa's solution-stained slides. *Parasitol Res* 107(3):727-30 (2010/Aug)

## 2. 住血吸虫症

1. Kohama H, Harakuni T, Kikuchi M, Nara T, Takemura Y, Miyata T, Sato Y, Hirayama K, Arakawa T. Intranasal Administration of *Schistosoma japonicum* Paramyosin Induced Robust Long-Lasting Systemic and Local Antibody as well as Delayed-Type Hypersensitivity Responses, but Failed to Confer Protection in a Mouse Infection Model. *Jpn J Infect Dis.* 63(3):166-72. 2010.
2. Shimizu S, Osada Y, Kanazawa T, Tanaka Y, Arai M. Suppressive effect of azithromycin on *Plasmodium berghei* mosquito stage development and apicoplast replication. *Malar J.* 9:73.2010
3. Kumagai T, Furushima-Shimogawara R, Ohmae H, Wang TP, Lu S, Chen R, Wen L, Ohta N. Detection of early and single infections of *Schistosoma japonicum* in the intermediate host snail, *Oncomelania hupensis*, by PCR and Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) assay *Am J Trop. Med Hyg* 2010, 83:542-548.

## 3. フィラリア症

1. Kimura E. The Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis: History and achievements with special reference to annual single-dose treatment with diethylcarbamazine in Samoa and Fiji. *Tropical Medicine and Health* (in press).
2. Anisuzzaman, Islam MK, Miyoshi T, Alim MA, Hatta T, Yamaji K, Matsumoto Y, Fujisaki K, Tsuji N. (2010). Longistatin, a novel EF-hand protein from the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*, is required for acquisition of host blood-meals. *Int J Parasitol.* 40, 721-729.

## 4. 住血原虫症 (トリパノソーマ、リーシュマニア)

1. Kido, Y., Shiba, T., Inaoka, D. K. Sakamoto, K., Nara, K., Aoki, T., Honma, T., Tanaka, A., Inoue, M., Matsuoka, S., Moore, A., Harada, S. and Kita, K. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of cyanide-insensitive alternative oxidase from *Trypanosoma brucei brucei*. *Acta Crystallographica* (2010) F66, 275-278
2. Hikosaka, K., Watanabe, Y., Tsuji, N., Kita, K., Kishine, H., Arisue, N., Palacpac, N. M. Q., Kawazu, S., Sawai, H., Horii, T., Igarashi, I. and Tanabe, K. Divergence of

mitochondrial genome structure in the apicomplexan parasites, *Babesia* and *Theileria*. *Mol. Biol. Evolution* (2010) 27, 1107-1116

3. Balogun, O. E., Inaoka, D. K., Kido, Y., Shiba, T., Nara, T., Aoki, T., Honma, T., Tanaka, A., Inoue, M., Matsuoka, S., Michels, P. AM., Harada, S. and Kita, K. Overproduction, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of *Trypanosoma brucei gambiense* glycerol kinase. *Acta Crystallographica* (2010) F66, 304-308
4. Kido, Y., Sakamoto, K., Nakamura, K., Harada, M., Suzuki, T., Yabu, Y., Saimoto, H., Yamakura, F., Ohmori, D., Moore, A., Harada, S. and Kita, K. Purification and kinetic characterization of recombinant alternative oxidase from *Trypanosoma brucei brucei*. *Biochim Biophys. Acta (Bioenergetics)* (2010) 1797, 443-450
5. Masuda, I., Matsuzaki, M. and Kita, K. Extensive frameshift at all AGG and CCC codons in the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 gene of *Perkinsus marinus* (Alveolata; Dinoflagellata). *Nucleic Acids Research.* (2010) 38, 6186-6194
6. Nakamura, K., Fujioka, S., Fukumoto, S., Inoue, N., Sakamoto, Hirata, H., Kido, Y., Yabu, Y., Suzuki, T., Watanabe, Y., Saimoto, H., Akiyama, H. and Kita, K. Trypanosome alternative oxidase, a potential therapeutic target for sleeping sickness, is conserved among *Trypanosoma brucei* subspecies. *Parasitol. Int.* (2010) 59, 560-564
7. Hikosaka, K., Nakai, Y., Watanabe, Y., Tachibana, S., Arisue, N., Palacpac, N. M., Toyama, T., Honma, H., Horii, T., Kita, K. and Tanabe, K. Concatenated mitochondrial DNA of the coccidian parasite *Eimeria tenella*. *Mitochondrion*, (2010) 11, 273-278
8. Kawamura Y, Yoshikawa I, Katakura K: Imported leishmaniasis in dogs, US military bases, Japan. *Emerg Infect Dis* 16, 2017-2019, 2010
9. Bawm S, Tiwananthagorn S, Lin KS, Hirota J, Irie T, Htun LL, Maw NN, Myaing TT, Phay N, Miyazaki S, Sakurai T, Oku Y, Matsuura H, Katakura K: Evaluation of Myanmar medicinal plant extracts for antitrypanosomal and cytotoxic activities. *J Vet Med Sci* 72, 525 – 528, 2010
10. Mizukami C, Spiliotis M, Gottstein B, Yagi K, Katakura K, Oku Y: Gene silencing in *Echinococcus multilocularis* protoscoleces using RNA interference. *Parasitol Int* 59, 647-652, 2010

11. Armua-Fernandez MT, Nonaka N, Sakurai T, Nakamura S, Gottstein B, Deplazes P, Phiri IGK, Katakura K, Oku Y: Development of PCR/dot blot assay for specific detection and differentiation of taeniid cestode eggs in canids. *Parasitol Int* in press
12. Nakajima-Shimada J., Hatabu T. *Trypanosoma cruzi* infection induces nitric oxide production and S-nitrosylation of cellular FLIP in host cell. Medimond S.r.l, Italy, 2011, in press.
13. Hikosaka K, Watanabe YI, Tsuji N, et al., K. Divergence of the mitochondrial genome structure in the apicomplexan parasites, *Babesia* and *Theileria*. *Mol Biol Evol.* 27(5):1107-1116, 2010.
14. Aboulaila M, Sivakumar T, Yokoyama N, Igarashi I. Inhibitory effect of terpene nerolidol on the growth of *Babesia* parasites. *Parasitol Int.* 59(2):278-282, 2010.
15. Iseki H, Zhou L, Kim C, Inpankaew T, Sununta C, Yokoyama N, Xuan X, Jittapalpong S, Igarashi I. Seroprevalence of *Babesia* infections of dairy cows in northern Thailand. *Vet. Parasitol.* 170(3-4):193-196, 2010.
16. Aboulaila M, Yokoyama N, Igarashi I. Development and evaluation of two nested PCR assays for the detection of *Babesia bovis* from cattle blood. *Vet. Parasitol.* 172(1-2):65-70 2010.
17. Iseki H, Kawai S, Takahashi N, Hirai M, Tanabe K, Yokoyama N, Igarashi I. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method as a tool for diagnosis of infection by the zoonotic simian malaria parasite *Plasmodium knowlesi*. *J Clin Microbiol.* 48(7):2509-2514, 2010.
18. Goo YK, Terkawi MA, Jia H, Aboge GO, Ooka H, Nelson B, Kim S, Sunaga F, Namikawa K, Igarashi I, Nishikawa Y, Xuan X. Artesunate, a potential drug for treatment of *Babesia* infection. *Parasitol Int.* 59(3):481-486, 2010.
19. Ooka H, Terkawi MA, Goo YK, Luo Y, Li Y, Yamagishi J, Nishikawa Y, Igarashi I, Xuan X. *Babesia microti*: Molecular and antigenic characterizations of a novel 94-kDa protein (BmP94). *Exp Parasitol.* 127(1):287-293 2011.
20. Terkawi MA, Huyen NX, Wibowo PE, Seuseu FJ, Aboulaila M, Ueno A, Goo YK, Yokoyama N, Xuan X, Igarashi I. Spherical body protein 4 is a new serological antigen for the global detection of *Babesia bovis* infection in cattle. *Clin Vaccine Immunol.* 18(2):337-342, 2011.
21. Tajima K, Miura K, Ishiwata T, Takahashi F, Yoshioka M, Minakata K, Murakami A, Sasaki S, Iwakami S, Annoura T, Hashimoto M, Nara T, Takahashi K. Sex hormones alter Th1 responses and enhance granuloma formation in the lung. *Respiration, in press*
22. Makiuchi T, Annoura T, Hashimoto M, Hashimoto T, Aoki T, Nara T. Compartmentalization of a glycolytic enzyme in *Diplonema*, a non-kinetoplastid Euglenozoan. *Protist, in press*
23. Kido Y, Shiba T, Inaoka DK, Sakamoto K, Nara T, Aoki T, Honma T, Tanaka A, Inoue M, Matsuoka S, Moore A, Harada S, Kita K. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of cyanide-insensitive alternative oxidase from *Trypanosoma brucei brucei*. *Acta Cryst Section F*, 66: 275-278, 2010
24. Balogun EO, Inaoka DK, Kido Y, Shiba T, Nara T, Aoki T, Honma T, Tanaka A, Inoue M, Matsuoka S, Michels PAM, Harada S, Kita K. Overproduction, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of *Trypanosoma brucei gambiense* glycerol kinase. *Acta Cryst Section F*, 66: 304-308, 2010
25. Tajima K, Ohashi R, Sekido Y, Hida T, Nara T, Hashimoto M, Iwakami S, Minakata K, Yae T, Takahashi F, Saya H, Takahashi K. Osteopontin-mediated enhanced hyaluronan binding induces multidrug resistance in mesothelioma cells. *Oncogene* 29(13): 1941-1951, 2010
26. Kohama H, Harakuni T, Kikuchi M, Nara T, Takemura Y, Miyata T, Sato Y, Hirayama K, Arakawa T. Intranasal administration of *Schistosoma japonicum* paramyosin induced robust long-lasting systemic and local antibody as well as delayed-type hypersensitivity responses, but failed to confer protection in a mouse infection model. *Jap J Inf Dis*, 63(3): 166-172, 2010
5. 新興・再興感染症（腸管寄生原虫症、腸管寄生ぜん虫症、エキノコックス症、人獣共通感染症など）
  1. Nakanishi K. Basophils are potent antigen-presenting cells that selectively induce Th2 cells. *Eur J Immunol.* 2010 ;40(7):1836-42.
  2. Satoh T, Takeuchi O, Vandenbon A, Yasuda K, Tanaka Y, Kumagai Y, Miyake T, Matsushita K, Okazaki T, Saitoh T, Honma K, Matsuyama T, Yui K, Tsujimura T, Standley DM, Nakanishi K, Nakai K, Akira

- S. The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection. *Nat Immunol* 2010;11: 936-944.
3. Nakanishi K. Basophils as APC in Th2 response in allergic inflammation and parasite infection. *Curr Opin Immunol* 2010.22(6):814-20.
  4. Jeelani, G., Husain, A., Sato, D., Ali, V., Suematsue, M., Soga, T., and Nozaki, T. (2010) Two Atypical L-cysteine-regulated NADPH-dependent oxidoreductases involved in redox maintenance, L-cystine reduction, and metronidazole activation in the enteric protozoon *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.*, 285, 26889-26899.
  5. Yousuf, M. A., Mi-ichi, F., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. (2010) Localization and targeting of unusual pyridine nucleotide transhydrogenase in *Entamoeba histolytica*. *Eukaryot. Cell* 9, 926-933.
  6. Yoshida A, Nagayasu E, Nishimaki A, Sawaguchi A, Yanagawa S, Maruyama H (2011): Transcript analysis of infective larvae of an intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis* *Parasitol Int.* 60: 75-83.
  7. Gurbadam A et al. Mongolian and Japanese Joint Congress on "Echinococcoses: diagnosis, treatment and prevention in Mongolia" June 4, 2009. *Parasites and Vectors* 2010; 3: 1/8-3/8.
  8. Li T et al. Specific IgG Responses to Recombinant Antigen B and Em18 in Cystic and Alveolar Echinococcosis in China. *Clinical and Vaccine Immunology* 2010; 17: 40-475.
  9. Ito A et al. Histopathological, Serological and Molecular Confirmation of Indigenous Alveolar echinococcosis cases in Mongolia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2010; 82: 266-269.
  10. Li T et al. Widespread co-endemicity of human cystic and alveolar echinococcosis on the eastern Tibetan plateau, northwest Sichuan/southeast Qinghai, China. *Acta Tropica* 2010; 113: 248- 256.
  11. Brunetti E et al. Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. *Acta Tropica* 2010;114: 1-16.
  12. Yanagida T et al. Neurocysticercosis: Assessing where the infection was acquired from. *Journal of Travel Medicine* 2010; 17:206-208.
  13. Nakao M et al. Genetic polymorphisms of *Echinococcus* tapeworms in China as determined by mitochondrial and nuclear DNA sequences. *International Journal for Parasitology* 2010; 40: 379-385.
  14. Okamoto M et al. Evidence of hybridization between *Taenia saginata* and *Taenia asiatica*. *Parasitology International* 2010; 59: 70-74.
  15. Anantaphruti MT et al. Molecular and serological survey on taeniasis and cysticercosis in Kanchanaburi Province, Thailand. *Parasitology International* 2010; 59: 326-330.
  16. Nkouawa A et al. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method using fecal specimens for differential detection of *Taenia* species from humans. *Journal of Clinical Microbiology* 2010a; 48: 3350-3352.
  17. Nkouawa A et al. Serological studies of neurologic helminthic infections in rural areas of Southwest Cameroon: toxocariasis, cysticercosis and paragonimiasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2010b; 4: e732.
  18. Nakao M et al. State-of-the-art *Echinococcus* and *Taenia*: Phylogenetic taxonomy of human- pathogenic tapeworms and its application to molecular diagnosis. *Infection, Genetics and Evolution* 2010; 10:444-452.(総説)
  19. Tappe D et al. Immunoglobulin G subclass responses to recombinant Em18 in the follow-up of patients with alveolar echinococcosis in different clinical stages. *Clinical Vaccine Immunology* 2010; 17: 944-948.
  20. Sato MO et al. A possible nuclear DNA marker to differentiate the two geographic genotypes of *Taenia solium* tapeworms. *Parasitology International* 2011; 60: 108-110.
  21. Sako Y et al. *Echinococcus multilocularis*: identification and functional characterization of cathepsin B-like peptidases from metacestode. *Experimental Parasitology* 2011; in press.

## 6. 媒介昆虫

Matsuoka H, Ikezawa T, Hirai M: Production of a transgenic mosquito expressing circumsporozoite protein, a malarial protein, in the salivary gland of *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). *Acta Med Okayama* 64(4): 233-241, 2010

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得  
なし

2. 実用新案登録  
なし

3. その他  
なし

分担研究概要報告書

寄生虫感受性の宿主因子の検討に関する研究

長崎大学・熱帯医学研究所・免疫遺伝学 平山 謙二

研究要旨

フィリピン国ルソン島南端ソルソゴン州は 10 歳代においてネットワークパターン(NW)を示す肝線維化症患者が 12.3%、20 歳以上では 55.3%が存在する浸淫地である。この対象集団で肝線維化症を憎悪させる要因に関わる免疫関連遺伝子を探索する目的で、免疫応答に関わる遺伝子等の近傍に設定したマイクロサテライトマーカー多型を用いて相関解析を行った。対象群は 15~35 才の肝線維化症群 54 名と 36 才以上の非肝線維化症群 40 名で、50 の免疫応答関連遺伝子近傍に設置したマイクロサテライトマーカーのうち、7 マーカーに、有意差を認めるアレルを検出した。このうち、特に有意差及び発現頻度が高く、住血吸虫性肝線維化症の感受性と強い相関を示したマーカーは D3S3561 MS\*214 (OR=3.21)、IL12B MS\*241 (OR=2.48)と I L 2 MS\*383 (OR=10.3)であった。IL12B マーカーには抵抗性に相関する MS\*245 (OR=0.45)が観察された。これらの感受性・抵抗性アレルのホモ接合体を持つ患者が、線維化症群では MS\*241 (31.5%)、MS\*245 (23.1%)、正常群では MS\*241 (61.5%)、MS\*245 (27.8%)で MS\*241 ホモ接合体は正常群で有意に増加していたことから、抵抗性に相関したと考えられた ( $p < 0.002$ , OR=0.24)。これらのマイクロサテライトマーカーと HLA-DRB1\*1501 との相互作用は認められず、独立に肝線維化症の感受性に関与したと考えられた。抵抗性アレルを 2 個以上持つ場合あるいは、感受性アレルを 2 個以上持つ場合でそれぞれ、線維化症群と正常群で比較したところ、感受性アレルを持つ場合に有意差が認められたことから、感受性アレルの存在が肝線維化症に対して優性に働いた事が示唆された。

A. 研究目的

フィリピン国ルソン島南端ソルソゴン州は高度信淫地で、これまで住血吸虫症に対する十分な治療や防圧対策が取られていない。千種らが 2005~6 年に渡って行われた 1500 名(3~84 歳)に及ぶ住血吸虫症の現地調査の結果、虫卵陽性率(Kato-Katz)は全体の 6.3%程度であったが、虫卵に対する抗体陽性率は 61.4%、10 歳代においてネットワークパターン(NW)を示す肝線維化症患者が 12.3%、20 歳以上では 55.3%が存在する浸淫地であることが報告されている。

本研究においては、フィリピン国ソルソゴン州で観察された若年性肝線維化症発症に関わる免疫応答分子を網羅的に解析するこ

とにより、発症機序の本態を明らかにし発症の予防・治療法の開発、あるいは高リスク患者の早期発見に寄与することを目的とする。

B. 研究方法

肝線維化症を憎悪させる要因には HLA だけではなく他の免疫関連分子も関係することが報告されていることから、発症に関わる免疫関連遺伝子を探索する目的で、フィリピン国ルソン島南端ソルソゴン州の住血吸虫浸淫地で収集した 288 名のうち、15~35 才の肝線維化症群 54 名と 36 才以上の非肝線維化症群 40 名で、免疫応答に関わる遺伝子である、各種サイトカイン、サイトカインレセプター、シグナル伝達に関わる遺伝子、文献等から選択した遺伝子 100 について遺伝

子座内あるいは近傍（200K 以内）にマイクロサテライトマーカーを設置した。このマイクロサテライトマーカーを用いて相関解析を行った。また、感受性を示した DRB1\*1501 との関連や相関を示した免疫応答遺伝子発現レベルの解析の為に、フィリピン国ルソン島南端ソルソゴン州で住血吸虫症患者を対象とし、共同研究を行う独協大・千種教授ら、フィリピン大学・寄生虫学レオナルド教授、及びソルソゴン州保険チームらと超音波診断、血清抗体価、Kato-Katz を施行し 30 歳以下での肝線維化症患者 10 名と、40 歳以上非肝線維化症対象者 10 名の 10ml 程度の EDTA 採血を行い、mRNA 発現解析用の試料を採取した。

現地調査及び採血、遺伝子解析等については、長崎大学・熱帯医学研究所・研究倫理委員会及びフィリピン大学での承認を得て行った。「フィリピンにおける住血吸虫性肝線維化症の遺伝的調節機構の解析」承認番号 04031002 長崎大学・熱帯医学研究所・研究倫理委員会。

### C. 結果

設置した 160 のマイクロサテライトマーカーのうち IL6R, IL10, IL20, IL20.2, CR1L, CR1L.2, IL19, IRF6, IRF6.2, IL1F6, IL1F8, IL1F9, IL1B, STAT1, STAT4, D3S3561, IL5RA, CD86, CD86.2, SOD3, SOD3.2, IL8, JNK3, JNK3.2, IL2, IRF2, IL4, IL4.2, IL5, IL12B, NFKB1, NFKB1.2, SOD2, SOD2.2, IL6, IL6.2, IL7, IL18, STAT6, IFNG, IL26, IL4R, STAT3, FCER2, IL10RB, IL2RB, IL17RA, IL2RG 50 マーカーについて解析が終了し、7 マーカーに、有意差を認める 7 アレルを検出した。

表 1. 対象住血吸虫症患者

Subjects	Mean age + SD	M	F
Liver net work pattern (NW)	26.0 ± 6.1	47	7
Normal liver	51.9 ± 12.4	20	19

特に有意差及び発現頻度が高く、住血吸虫性肝線維化症の感受性と強い相関を示したマーカーは D3S3561 MS\*214 (OR=3.21)、IL12B MS\*241 (OR=2.48) と IL2 MS\*383 (OR=10.3) であった。IL12B マーカーには抵抗性に相関する MS\*245 (OR=0.45) が観察

された。これらの感受性・抵抗性アレルのホモ接合体を持つ患者が、線維化症群では MS\*241 (31.5%)、MS\*245 (23.1%)、正常群では MS\*245 (61.5%)、MS\*241 (27.8%) で MS\*245 ホモ接合体は正常群で有意に増加していた ( $p < 0.002$ , OR=0.24)。

表 2 相関を示したマイクロサテライトマーカーの頻度

IL10	Nor.	(%)	NW	(%)	Pv	OR
MS*172	5	(6.4)	14	(13.0)		
MS*174	45	(57.7)	45	(41.7)	<0.04	0.52
MS*176	16	(20.5)	25	(23.1)		
MS*182	1	(1.3)	13	(12.0)	<0.01	10.5
<b>D3S3561</b>						
MS*214	8	(10.3)	29	(26.9)	<0.01	3.21
MS*220	52	(66.7)	62	(57.4)		
<b>IL12B</b>						
MS*241	23	(29.5)	54	(50.9)	<0.01	2.48
MS*245	52	(66.7)	50	(47.2)	<0.01	0.45
<b>IL2</b>						
MS*383	2	(2.6)	23	(21.7)	<0.01	10.3
MS*385	15	(19.2)	14	(13.2)		
MS*387	30	(38.5)	28	(26.4)		
MS*389	11	(14.1)	12	(11.3)		
MS*391	10	(12.8)	14	(13.2)		

これらのマイクロサテライトマーカーと HLA-DRB1\*1501 との相互作用は認められず、独立に肝線維化症の感受性に関与したと考えられた。抵抗性アレルを 2 個以上持つ場合あるいは、感受性アレルを 2 個以上持つ場合でそれぞれ、線維化症群と正常群で比較した。肝線維化症群では感受性アレルを 2 個以上持った対象者は 69.1% で正常群では 27.5% で有意差が認められた ( $P < 0.0001$ ) 反対に肝線維化症群で抵抗性アレルを 2 個以上持つ対象者は 85.0% で、正常群では 85.0% で有意差は認められなかった。このことは、感受性アレルの存在が肝線維化症に対して優性に働いた事が示唆された。

### D. 考察

有意差が検出されたマイクロサテライトマーカーのうち、IL12 は IFN- $\gamma$  産生を誘導するとともに、NK 細胞の細胞傷害活性を亢進させる活性を示し、いわゆる Th1/Th2 バランスの上で重要なサイトカインである。

IL12B-MS\*241 の連鎖する多型が IL12 発現量に関連するとすれば、このことが、直接的に線維化症発症に影響するかもしれない。相関を示すようなマーカーの多くはサイトカインや T 細胞応答に関わる遺伝子であった。今後、さらに近傍のマイクロサテライト解析を進めるとともに、遺伝子近傍の SNP について検討を進める。

## E. 結論

肝線維化症を憎悪させる要因に関わる免疫関連遺伝子を探索する目的で、免疫応答に関わる遺伝子等の近傍に設定したマイクロサテライトマーカー多型を用いて相関解析を行った結果、相関を示すいくつかのサイトカイン遺伝子が検出された。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

和文論文

平山謙二. 今日の診断指針 第 6 版 医学書院 金澤一郎、永井良三 総編集 住血吸虫症・消化器吸虫症 pp 1373-7, 2010 (2010 年 1 月発刊)

平山謙二. 今日の治療指針 医学書院 山口徹、北原光夫、福井次矢 総編集 リーシュマニア症 pp 254-5, 2011 (2010 年発刊)

英文論文

Kohama H, Harakuni T, Kikuchi M, Nara T, Takemura Y, Miyata T, Sato Y, Hirayama K, Arakawa T. Intranasal Administration of *Schistosoma japonicum* Paramyosin Induced Robust Long-Lasting Systemic and Local Antibody as well as Delayed-Type Hypersensitivity Responses, but Failed to Confer Protection in a Mouse Infection Model. *Jpn J Infect Dis.* 63(3):166-72. 2010.

Shuaibu M.N. Kikuchi M, Cherif M.S., Helegbe G.K., Yanagi T, Hirayama K., Selection and identification of malaria vaccine target molecule using bioinformatics and DNA vaccination. *Vaccine*, 28(42): 6868-75, 2010.

Del Puerto F., Nishizawa JE., Kikuchi M, Iihoshi N, Roca Y, Avilas C, Gianella A, Lora

J, Velarde FUG., Renjel LA, Miura S, Higo H, Komiya N, Maemura K, Hirayama K. Lineage Analysis of Circulating *Trypanosoma cruzi* Parasites and their Association with Clinical Forms of Chagas Disease in Bolivia. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4(5);e687, 2010.

### 2. 学会発表

Mihoko Kikuchi and Kenji Hirayama. Microsatellite markers of immune responses gene as a tool for immunogenetic analysis of parasitological disease. 1st Conference on Cadmium in Food and Human Health. Phitsanulok, Thailand, January 15-17, 2010

Florencia Del Puerto Rodas, Eiki J. Nishizawa, Mihoko Kikuchi, Keiko Iihoshi, Freddy U. G. Velarde, Luis A. Renjel, Jelin Roca, Norihiro Komita. Kouji Maemura, Sachio Miura, Michio Yasunami, Kenji Hirayama Immunogenetic analysis of chronic Chagas disease in Bolivia. 第 79 回日本寄生虫学会大会、旭川市、2010 年 5 月 20-21 日

菊池三穂子, EDELWISA M. S.-MERCADO, LYDIA R LEONARDO, 千種雄一, 林尚子, 亀井香里, 井上哲, NAPOLEON L AREVALO, RONALD R LIM, LEA M AGSOLID, 吾妻健、平山謙二 フィリピンでの若年性住血吸虫症性肝線維化症についての考察 第 4 回蠕虫研究会 宮崎 11 月 26~27 日

菊池三穂子, Edelwisa M. Segubre-Mercado, Lydia R. Leonardo, 千種雄一, 林尚子, 亀井香里, 井上哲, Napoleon L. Arevalo, Ronald R. Lim, Lea M. Agsolid, 吾妻健, 平山謙二 フィリピンにおける若年性住血吸虫性肝線維化症の発症に関わる免疫関連遺伝子の探索 第 51 回熱帯医学会大会 仙台市 2010 年 12 月 3~4 日

## 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



# 厚生科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業）

## 分担研究報告書

### 原虫症治療標的分子の機能解析

分担研究者 北 潔 東京大学大学院医学系研究科

研究要旨 寄生原虫のミトコンドリア呼吸鎖は宿主哺乳類のミトコンドリアと大きく異なった性質を持ち、しかもその増殖に必要な不可欠であることから特異的阻害剤による抗寄生虫薬の重要な標的となる事が明らかになりつつある。我々はマラリア原虫およびトリパノソーマのミトコンドリアを薬剤標的として捉え、特に呼吸鎖電子伝達系に関して、その特異的な性質を明らかにした。

#### A. 研究目的

われわれは寄生適応に必要な基本的要素である各種代謝系のなかでも特にエネルギー代謝系に焦点を絞り、寄生原虫ミトコンドリアが宿主と極めて異なったエネルギー代謝系を作動させることによって宿主内の環境に適応していることを明らかにしてきた。この成果をふまえマラリア原虫やトリパノソーマのミトコンドリア電子伝達系の特異性を解析することにより、最終的に化学療法標的として捉えたいと考えている。そこで、熱帯熱マラリア原虫におけるエネルギー代謝系を先端的なエネルギー転換系研究の視点から追求し、さらにトリパノソーマなど他の寄生原虫も含め寄生現象全般に共通する適応戦略の分子基盤とその多様性を明らかにする事を目的として研究を進めている。

#### B. 研究方法

赤血球内型マラリア原虫ミトコンドリアの呼吸鎖電子伝達系は化学療法剤の標的として期待されている。しかしマラリア原虫ミトコンドリアに関する情報は非常に限られたものであり、これが研究の進展を妨げている。そこで活性を保持したミトコンドリアの単離法

検討し、その結果ネズミマラリア原虫の系を用いて生化学的な解析が可能な量のミトコンドリアの調製法を確立した。またマラリア原虫にはアピコプラストと呼ばれる 35 kb の環状 DNA を持つオルガネラが存在し、マラリア原虫の増殖に必要な機能を有している。電子顕微鏡による観察から両者が細胞の中で常に近傍に局在している事が報告されている。そこでこの2つのオルガネラの相互作用を調べ、さらにそれぞれの機能を独立に解析する目的で細胞分画における挙動を調べて来た。昨年度は熱帯マラリア原虫の培養系から単離した粗ミトコンドリア画分を用い、ミトコンドリアとアピコプラストの相互作用を調べる目的で Percoll による分離に対する細胞破碎条件などを含む、種々の処理、薬剤の効果の検討を進めた結果、ミトコンドリアとアピコプラストのそれぞれを異なった画分に分離する事ができた。そこで本年度はこの分離法の最終的なプロトコルを確立すべく、種々の条件を比較し最適化を試みた。

また、アフリカトリパノソーマに関しては、極めて低濃度で効果を示す抗トリパノソーマ薬アスコフラノンの標的であるシアン耐性酸化酵素のタンパク質としての性質を調べる目的で、これまでに組換え酵素を用い高純

度で高活性の酵素の精製法を確立した。昨年度はこの精製標品を用いて、その結晶を得る事ができた。そこで今年度はその解像度を上げ、またアスコフラノンやその誘導体との共結晶を得てその結合様式を明らかにする事を試みた。

(倫理面への配慮)

本研究はほとんどが *in vitro* の実験系であり、またネズミマラリア原虫の実験は東京大学医学部の動物実験指針に従って行ったもので、倫理面の問題はない。

### C. 研究結果

#### 【マラリア原虫】

昨年までの結果を踏まえ、ヒト赤血球を用いて培養した熱帯熱マラリア原虫のオルガネラ分離法の最適化を試みた。すなわち N2 cavitation 法と Percoll 密度勾配遠心分離法の改良を行ない、核 DNA 由来と思われる凝集の除去や、細胞骨格の阻害剤による処理により、ヘモゾインを含む食胞を取り除くことによって、ミトコンドリアとアピコプラストを部分的に精製することが可能となった。ミトコンドリアの純度の指標としてのジヒドロオロト酸還元酵素の比活性は約 60 nmol/min/mg と、他の報告に比べて約 4-5 倍高い値を示した。最終的なプロトコールを以下に示す。

1. トロホゾイト期の熱帯熱マラリア原虫 (3D7 株など) を 360 mL の培養から回収する。
2. 0.075% サポニン処理により赤血球膜を可溶化する。
3. 10  $\mu$ M Nocodazole を添加した MSE バッファーに懸濁し、Parr homogenizer により 300 psi にて細胞を破碎する。
4. 800 x g、5 分の遠心で核画分を除く。
5. 上清を 5,000 x g、20 分で遠心し、粗ミトコンドリア画分を沈殿として得る。

6. 粗ミトコンドリア画分を 28% Percoll PLUS にて 100,000 x g、1 時間遠心を行なう。
7. 上層部付近の凝集塊をピペットで除き、混和後さらに 100,000 x g、1 時間遠心を行なう。
8. ペリスタポンプにて 350  $\mu$ L ずつ回収する。

以上の方法により、同一容量の培地から高島、見市らの以前の方法で調製した熱帯熱マラリア原虫ミトコンドリア (約 1 mg) に比べ 3 倍以上の粗ミトコンドリアを得る事が可能となり、複合体 II のコハク酸-ユビキノ還元酵素の比活性も 3 倍以上に上昇した。これは河原らによるネズミマラリア原虫 (*P. yoelii*) の場合のマウス 5 匹分に相当し、熱帯熱マラリア原虫ミトコンドリアの生化学的な解析に十分な高活性の粗ミトコンドリア調製法が確立できた。また、Percoll による分離の後の Western ブロットおよび各種酵素活性の解析からミトコンドリアとアピコプラストを再現性良く分離している事が明らかとなった。実際にこのミトコンドリア画分を用いる事によって初めて複合体 II の Clear native electrophoresis が可能となり、コハク酸脱水素酵素活性による染色でウシ心筋複合体 II と同様なサイズを示す事が判った。

#### 【アフリカトリパノソーマ】

アフリカ睡眠病の病原体アフリカトリパノソーマのシアン耐性酸化酵素に関しては、昨年度までに大腸菌の発現系を用い、高純度、高活性の酵素の精製法を確立し、1 分子の酵素が 2 分子の鉄を含む事を示し、酵素学的な解析から還元型ユビキノ-1 に対する  $K_m$  が 338  $\mu$ M であり、特異的阻害剤であるアスコフラノンによる阻害形式は非競合混合型であることが明らかにして来た。さらにこの標品を用いて結晶化を試み、膜結合性の 2 核鉄タンパク質として初めての結晶を得る事ができ

た。本年度は結晶化の条件をさらに検討し、またアスコフラノンとの結合様式を明らかにする目的でアスコフラノンやその誘導体との共結晶を試みた。TAO の結晶化は最終的に界面活性剤存在下で PEG400 を結晶化剤に用いて行った。位相決定は、TAO 中の二核鉄原子の異常分散効果を利用した単波長異常分散法 (SAD 法) で行ない (3.2 Å 分解能、波長=1.739 Å)、2.85 Å 分解能で精密化した立体構造を得ることができた。TAO は 6 本の長いヘリックスと 4 本の短いヘリックスから構成され、長い 6 本のヘリックスが逆平行なバンドル構造を形成した。N 末端には、非常に長いループがあり、隣の分子と相互作用しており結晶中では、ダイマーを形成していた。バンドルを形成している 4 本の長いヘリックス中に存在するグルタミン酸残基が二核鉄に配位していた。また、TAO の分子表面には疎水性アミノ酸残基が集中しているところがあり、そこが膜結合領域と考えられる。さらに、アスコフラノンの阻害機構を明らかにするために、その誘導体との複合体結晶を soaking 法で調製し、2.6 Å 分解能で複合体構造を明らかにした。複合体結晶では、二核鉄に近傍に存在する 1 つのヒスチジン残基が新たに配位結合を形成していた。アスコフラノン誘導体は、二核鉄の近くに結合し、近傍のアミノ酸残基と水素結合及び疎水性相互作用を形成することによって認識されていた

#### 【アメリカトリパノソーマ】

中南米のトリパノソーマ症 Chagas 病の病原体である *Trypanosoma cruzi* のレドックス調節に関わる酵素群の立体構造に基づく薬剤の分子設計を進めているが、ミトコンドリアの複合体 II (SQR) に関して精製を試みたところ *T. cruzi* 酵素は 12 種類のサブユニット (7.3~62 kDa) で構成される二量体酵素

(286.5 kDa x 2) で、哺乳類や出芽酵母の 4 サブユニット型酵素 (約 130 kDa) とは大きく異なっていた。また本酵素は複合体 II の特異的阻害剤に対する感受性が哺乳類の酵素と大きく異なっており、実際に酵素活性を最も強く阻害するアトペニン<sup>1</sup>は原虫の増殖を抑制する事から、薬剤標的として極めて有望と考えられた。そこでその立体構造を解析する目的で大量培養が可能でヒトへの感染の危険性がないトリパノソーマ科鞭毛虫類の一種で爬虫類に寄生する *Leishmania. Tarentolae* を用いる事とした。*L. tarentolae* の培養において液体培地 10 L 当たりから 3 g 以上の大量のミトコンドリアが得られた。これは *T. cruzi* の 10 倍ほどの収量である。次に、このミトコンドリアからの複合体 II の可溶化を試みた。種々の界面活性剤や可溶化条件を検討した結果、スクロースモノラウレート (SML) が高い効果を示す事が判った。この可溶化画分から各種クロマトグラフにより複合体 II を精製を試みたところ *T. cruzi* 同様に 12 のサブユニットの精製標品を得る事ができた。

#### D. 考察

マラリア原虫ミトコンドリアは大量調製法が確立されていなかった事から生化学的解析が遅れていた。特に熱帯熱マラリア原虫は培養系のスケールアップが困難な事からこの点が大きな問題となっていた。しかし今回、一回の実験で 3 mg 以上の粗ミトコンドリアを再現性良く調製する方法を確立できた事は、今後マラリア原虫の研究の新しい展開に大いに貢献すると考えられる。さらにマラリア原虫のミトコンドリアとアピコプラストの分離条件を見出した事は、これらのオルガネラ間の相互作用の解析、またそれぞれの機能を独立に調べる事が可能になったと言う点で大きな前進である。実際に熱帯熱マラリア原虫ミト

コンドリアの DNA ポリメラーゼの局在や酵素学的な性質の解析に今回確立した方法が大いに貢献している。

我々が見出し、開発中のアスコフラノン、現在最も強力な抗トリパノソーマ薬とされ、その標的はトリパノソーマのミトコンドリアに局在するシアン耐性酸化酵素である。しかしそのタンパク質としての性質は酵素が極めて不安定であるため、ほとんど判っていなかった。酵素学的な解析に加え、結晶を得る事ができた事は鉄を 2 分子含む膜結合性の 2 核鉄 (di-iron) タンパク質としては初めての報告である。さらに今回アスコフラノン誘導体との共結晶からその相互作用が明らかになった事は、今後のより低コストの誘導体あるいは阻害剤の分子設計に大いに役立つと考えられる。

複合体 II (コハク酸-ユビキノ還元酵素) は TCA 回路の酵素中唯一の膜結合性の酵素であり、ミトコンドリアのマーカー酵素として知られている。本酵素は呼吸鎖の脱水素酵素としてコハク酸からの還元力を呼吸鎖のユビキノンに伝達し、TCA 回路と呼吸鎖を直接結合重要な酵素であり、宿主哺乳類ばかりでなく、寄生虫においてもそのエネルギー代謝に大きな役割を果たしている。これまで、そのサブユニット構造はヒトから細菌まで基本的には 4 つとされていたが、今回 *T. cruzi* の複合体 II が 12 サブユニットから構成される事が明らかになり、寄生虫の持つ多様性がさらに明確になった。この構造はアフリカトリパノソーマやリーシュマニアにも共通しており、12 サブユニットの複合体 II に対する特異的阻害剤を探索する事によって、極めて作用スペクトルの広い抗原虫薬の開発が期待される。ミトコンドリアの大量調製法を確立し、精製

法を検討中の *L. tarentolae* に関してはすでに次世代シーケンサーを用いて全ゲノムの塩基配列の情報を得ている。この解析結果からも *L. tarentolae* の複合体 II は *T. cruzi* の複合体 II 同様に 12 のサブユニットを持ち、さらに極めて類似したアミノ酸配列を持つ事を確認している。*L. tarentolae* の複合体 II の新規な立体構造を解析する事によって、これまで我々が *T. cruzi* のジヒドロオロト酸脱水素酵素で行なって来たのと同様に薬剤の分子設計が可能になると考えられる。

#### E. 結論

マラリア原虫やトリパノソーマなど寄生原虫のミトコンドリア呼吸鎖は宿主哺乳類のミトコンドリアと大きく異なった性質を持ち、特異的阻害剤による抗寄生虫薬の重要な標的となる事が明らかになった。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

論文発表

- 1) Crystallization and preliminary crystallographic analysis of cyanide-insensitive alternative oxidase from *Trypanosoma brucei brucei*. Kido, Y., Shiba, T., Inaoka, D. K. Sakamoto, K., Nara, K., Aoki, T., Honma, T., Tanaka, A., Inoue, M., Matsuoka, S., Moore, A., Harada, S. and Kita, K. *Acta Crystallographica* (2010) F66, 275-278
- 2) Divergence of mitochondrial genome structure in the apicomplexan parasites, *Babesia* and *Theileria*. Hikosaka, K., Watanabe, Y., Tsuji, N., Kita, K., Kishine,