

201104004A

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**

(H23-国医-指定-004)

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 平 山 謙 二

平成24 (2012) 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**

(H23-国医-指定-004)

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 平 山 謙 二

平成24 (2012) 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. 日本住血吸虫性肝線維症とHLAとの相関

平山謙二 11

2. 原虫症治療標的分子の機能解析

北 潔 14

3. アジアの三日熱マラリア原虫の集団構造と伝播動態の解明

狩野繁之 19

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 21

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 30

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 34

8. 日本住血吸虫症の病態発現分子解析

太田伸生 36

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 40

10. リーシュマニア症対策疫学研究

我妻ゆき子 42

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 44

12. 寄生虫感染で誘導されるTh2/IgE/顆粒球応答の防御機能解明

中西憲司 47

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 51

14.	マラリアにおける宿主病原体相互関係の解析	久枝 一	52
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	54
16.	マラリア原虫感染赤血球膜タンパク質輸送の解析	金子 修	58
17.	マラリア原虫に有効な新規阻害剤の探索	金 惠淑	62
18.	住血原虫症の病態と創薬に関する研究	片倉 賢	65
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	67
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	68
21.	住血吸虫症の検査・診断・対策に関する研究	大前比呂思	74
22.	人獣共通寄生原虫・蠕虫症の寄生適応に関する分子生物学的解析	奈良武司	79
23.	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	81
III.	研究成果の刊行に関する一覧表		87
IV.	研究成果の刊行物・別刷り		107

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、社会経済学的な影響も大きい。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、エキノコックス症、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

平山謙二 長崎大学熱帯医学研究所・教授
北 潔 東京大学大学院・医学系研究科・教授
狩野繁之 国立国際医療研究センター研究所・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 恵淑 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
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

狩野は韓国で1993年に三日熱マラリアの再流行が報告されてから18年以上経過した現在でもなお制圧できずにいる原因は、北朝鮮からのPv株の継続的な流入によることを示した。さらに本解析方法はマラリアの対策が原虫集団に与える影響の評価や、患者数などの疫学情報からではわからないマラリアの流行状況を推定する有効な解析手法であることを明らかにした。

坪井はコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いることにより、熱帯熱マラリア原虫メロゾイト期に特異的な分子の組換えタンパク質を網羅的に合成した。これらに対する抗血清を作製し、培養熱帯熱マラリア原虫の増殖阻害活性を指標に赤血球期ワクチン候補分子のスクリーニングを試行した。その結果、それまで解析が全く行われていなかった未知の原虫分子GPI-anchored micronemal antigen (GAMA)の抗体が熱帯熱マラリア原虫の増殖を阻害することを見出し、GAMAがマラリア赤血球期ワクチン候補となる可能性が示唆された。鳥居はマラリア原虫の生活環において、スポロゾイトは肝細胞、メロゾイトは赤血球にそれぞれ寄生胞を形成して侵入し寄生するが、この2つの侵入ステージ原虫のみが有するロプトリーと呼ばれる先端部小器官の分子の蚊体内の原虫ステージにおける発現プロファイルをRT-PCR法で解析した。その結果、12個のロプトリー分子の転写がスポロゾイトでも認められることを新たに見出した。これら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。

久枝はマラリアの致死性合併症である脳マラリアの病態の理解を目的に、脳マラリア発症における、炎症性サイトカインであるIL-23、IL-17の関与をマウスモデルで検討した。

IL-23欠損マウス、IL-17欠損マウスのいずれもが、野生型マウスと同様に脳マラリアを発症したことから、これらのサイトカインは脳マラリアの発症には関わらないことが明らかとなった。由井は実験的脳マラリア (Experimental cerebral malaria; ECM) モデルを用い、脳マラリア発症におけるCD8⁺ T細胞の役割を解析した。CD8⁺ T細胞を活性化する樹状細胞の増殖因子Flt3 ligandをマウスに導入後PbA感染を行ったところ、脳マラリア発症が抑制された。脳内CD8⁺ T細胞の集積は脳マラリアを発症した対象群と同様であり、脳マラリア発症にはCD8⁺ T細胞が脳に集積するのみならずその活性化状態が重要であることが示された。今後その分子機構の詳細を明らかにすると共に、熱帯熱マラリア原虫感染に伴うヒトの脳マラリア発症においても同様な機構が存在するか否かについて解析を行う必要がある。また、樹状細胞やT細胞レベルに治療介入による脳マラリアの発症予防や治療法開発の可能性が期待される。金子修は、赤血球膜に局在し、接着現象に関係していると考えている Pf332 と呼ばれる分子について赤血球膜までの輸送機構を遺伝子組換えの手法を用いて観察し、Pf332 の輸送は何らかの分子輸送機構に認識され、原虫から感染赤血球膜に輸送されることが分かっている PEXEL に非依存的で、膜貫通領域が必須であることを明らかにした。抗マラリア薬の標的となることが期待できる。金は抗マラリア新薬候補である N-89 の体内動態の改善と作用機序の解析研究に重点を置いて研究を進めた。H22 年度までに懸濁化剤として Hydroxymethylcellulose (CMC) を用いた時の血漿中濃度推移を検討したが従来の CMC では化合物の懸濁化は出来なかったものの、体内動態値の改善は見られなかったため、H23 年度は複数の添加剤を混合してマイクロエマルジョンを形成する製剤処方を検討した。その結果、溶媒・界面活性剤・補助界面活性剤の組み合わせを変える事で N-89 と同程度の抗マラリア活性と同時間血漿中濃度が維持される結果を得た。また、N-89 にローダミンを置換させた誘導體を用いて N-89 の原虫内取り込みを検討した結果、N-89 はマラリア原虫内に特異的に取り込まれ、正常の赤血球への取り込みは見られなかった。この結果は N-89 の高い選択毒性とホストに対する毒性が低い結果を支持する結果であった。

(2) 住血吸虫症

平山は、フィリピンの若年性で発症する住血吸虫感染後肝線維症の感受性に特徴的な免疫応答性が存在することが示唆された。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、マウスの腸管寄生蠕虫である *Heligmosomoides polygyrus* (Hp) が誘発型 1 型糖尿病 (T1D) モデルを抑制するが IL-10KO マウスにおいても野生型と同様に本線虫の T1D 抑制作用が観察されたことから、寄生蠕虫類は自らが誘導するサイトカインである IL-4、IL-13 や IL-10 に依存しない、特有の T1D 抑制機構をもっている可能性があることが示唆された。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。

太田は日本住血吸虫 (Sj) 感染マウスで IL-4/IL-13 が肉芽腫性炎症の悪化や炎症性サイトカインの産生、好中球の過剰な浸潤を抑制している事を明らかにしてきた。今回 IL-4/IL-13 は IL-17A を抑制する事により肝臓の肉芽腫性炎症悪化を抑制していることを 4、13、17 トリプルノックアウトマウスにより証明することができた。感染後の肝硬変を予防あるいは治療するための有効な薬剤開発に資するものと考えられる。大前はラオス北部を旅行し住血吸虫症が疑われたイスラエル人の保存血清を用いて、メコン住血吸虫卵による SMP-ELISA を行ない、14 人中 6 人で陽性となり住血吸虫の感染が強く疑われた。ラオス北部に未知の有病地が存在する可能性が出てきたため、SMP-ELISA で陽性となった 6 人の旅行歴から最も可能性の高い Van Vieng 地域で、雨季に環境調査を行ったが、媒介貝: *Neotricula Aperta* は見つけることができなかった。

(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、目視判定できる尿診断法 (ビーズ法) が、充実した設備を持たない途上国において有用な診断法であることを明らかにした。LAMP 法による媒介蚊調査は、post-MDA 期のフィラリア伝搬調査に有用である。尿診断と媒介蚊調査により、住民に大きな負担を与えずフィラリア症制圧に必要なフォローアップが可能となると考えられた。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。本知見はマダニをはじめとした外部寄生性節足動物の生存に必須である、吸血および生体防御に関与する分子を標的とした新規寄生虫防圧法の開発に有効な知見であると考えられた。また、H1ChI およびロンギスタチンは寄生線虫や他の媒介性節足動物の寄生戦略にも関与することが考えられ、これら分子を標的とする新規の抗寄生線虫薬、抗マダニ薬及び外部寄生虫薬の開発が期待される。

(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。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。

片倉は抗エバンストリパノソーマ活性を有する薬用植物 *Brucea javanica* から抽出したクアシノイド類の化合物の構造と活性の相関をさらに検討するために、bruceine A と bruceine C のアセチル誘導体を合成し、抗原虫活性に及ぼす影響を検討した。その結果、C-3, -11, -12 の無保護の水酸基はより強い活性に必須であること、C-11, -12 の水酸基はC-3の水酸基より活性に重要であること、また、bruceine C の C-4' 水酸基のアセチル化は活性に影響を及ぼさないことが明らかとなった。嶋田は *Trypanosoma cruzi* 感染により発現上昇がおこる宿主アポトーシス抑制因子 c-FLIP および c-IAP の遺伝子を高発現させた培養細胞株を樹立した。また、c-FLIP は感染細胞でニトロソ化され、NO 阻害剤によりアポトーシス抑制が回復した。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。

奈良はこれまでトリパノソーマ類を含む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における解糖系酵素群の局在を解析した。その結果、トリパノソーマでは解糖系10酵素のうち前半7酵素がグリコソーム局在性であるのに対し、ディプロネマではアルドラーゼのみが小胞局在であり、グリコソーム成立の前段階としてアルドラーゼの孤立

化 (小胞移行) によって解糖カスケードの遮断が起きた可能性が示唆された。

我妻はバングラデシュのリーシュマニア症蔓延フィールドにおいて、ニーム介入群で吸血しているサシチョウバエの割合の低下を観察した。抗体陽性化率まで影響を与えるためには、さらに有効成分純度の高いものを使用し、介入試験を実施する必要がある。また、ニーム抽出物やアザルデイクチンを利用したリペラント、防虫シーツやカーテンなど予防ツールの多様化を図ってゆくことにより、人々の受け入れ効果やその有効性を検証する予定である。

(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)

中西は寄生虫はその構成成分であるキチンの作用で、肺内で IL-33 の産生を誘導するが、Th2 細胞が誘導されなくても、この IL-33 に反応してナチュラルヘルパー (natural helper; NH) 細胞が誘導され、最後に、この IL-33 刺激を受けた NH 細胞が IL-5 と IL-13 を産生して肺好球症を発症させることを初めて明らかにした。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。

野崎は赤痢アメーバ *Iron sulfur flavoprotein* を始めとした多くの遺伝子がシステイン飢餓により誘導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。

丸山はベネズエラ糞線虫のゲノム解析を進めている。ペアエンドライブラリーの作製とフォスミドライブラリーの構築が進行中で、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、アセンブルによって計 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。さらにベネズエラ糞線虫のゲノム配列を約 700 本の Scaffold に集約することができた (N50 Scaffold 長=167,301 塩基、最大 Scaffold 長=1,894,427 塩基)。フォスミドライ

ブラリ (冗長度 10.5 x) をもちいて最終的な検定を実施しベネズエラ糞線虫ゲノムの概要配列を公表する。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。

伊藤はアジア地域に蔓延するテニア症・囊虫症研究をさらに進め、以下のような成果を発表した。

- 特別な装置なしに、流行の現場で実施可能な LAMP 法の開発
- 遺伝子解析に基づくテニア条虫 (*Taenia saginata*, *Taenia asiatica*) の交雑個体の確認、感染地の特定、アジア型とアフリカ・アメリカ型の識別。
- インドネシアなどで囊虫症の流行地域住民検診に血清検査法を導入
- 中国ならびにタイでそれぞれ 20 隻、19 隻の有鉤条虫多数寄生例を発見
- テニア症駆虫薬として漢方 (かぼちゃの種とアロカナツ抽出液) の再評価。
- ヒトならびにブタに利用できる囊虫症に関する迅速イムノクロマトグラフィキットの基本形を開発

北海道の地方病であるエキノコックス症の検査法 (RecEm18-ELISA, -Immunoblot) を確立したが、この方法は欧米の専門機関との共同研究から世界最高水準との国際評価を得ている。さらに、アドテック (株) と共同で開発した簡便な迅速イムノクロマト診断キットの外部評価が得られている (Knapp et al. in prep.)。このキットは特別な経験や施設を必要とせず、受診時間内にリアルタイムで結果を出せる。国内症例で、陽性であればほぼ 100% 多包虫症と診断できる精度である。

(6) 媒介昆虫

松岡は、人類に有用なワクチン蛋白を唾液腺で発現し、吸血とともにワクチン蛋白を注入する蚊をつくるため、蚊の唾液腺特有蛋白遺伝子のプロモーターに、マラリア抗原 (部分スポロゾイト表面蛋白 pCSP) 遺伝子をつないでハマダラカ受精卵に注射、遺伝子導入蚊を作成した。唾液腺には pCSP が発現し、唾液腺細胞から唾液腺腔に分泌され、蚊の口吻から放出された。その蚊をマウスに頻回に吸血させると、マウスは pCSP に対する抗体を産生した。この抗体はスポロゾイトの培養 HepG2 細胞への侵入を阻害した。

D. 考察

本年度の事業活動は日米合同会議の米国での開催がキャンセルになった以外は、ほぼ計画通りに遂行された。研究計画全体の 5 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。今年度はアメリカ側の主催で予定されていたが、NIH の予算が配慮されず、残念ながら合同会議は開催されなかった。今後は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を継続し、新たな日米の協力体制を作り上げてゆきたい。

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

マラリア

1. Moritoshi Iwagami, Megumi Fukumoto, Seung-Young Hwang, So-Hee Kim, Weon-Gyu Kho, Shigeyuki Kano. Population structure and transmission dynamics of *Plasmodium vivax* in the Republic of Korea based on microsatellite DNA analysis. PLoS Neglected Tropical Diseases.
2. Rui E, Fernandez-Becerra C, Takeo S, Sanz S, Lacerda MV, Tsuboi T, Del Portillo HA. *Plasmodium vivax*: comparison of immunogenicity among

- proteins expressed in the cell-free systems of *Escherichia coli* and wheat germ by suspension array assays. *Malar J.* 2011, 10:192.
3. Miyata T, Harakuni T, Tsuboi T, Sattabongkot J, Ikehara A, Tachibana M, Torii M, Matsuzaki G, Arakawa T. Tricomponent immunopotentiating system (TIPS) as a novel molecular design strategy for malaria vaccine development. *Infect Immun.* 2011, 79:4260-4275.
 4. Arumugam TU, Takeo S, Yamasaki T, Thonkukiatkul A, Miura K, Otsuki H, Zhou H, Long CA, Sattabongkot J, Thompson J, Wilson DW, Beeson JG, Healer J, Crabb BS, Cowman AF, Torii M, Tsuboi T. Discovery of GAMA, a *Plasmodium falciparum* merozoite micronemal protein, as a novel blood-stage vaccine candidate antigen. *Infect Immun.* 2011, 79:4523-4532.
 5. Moriya-Matsuzaki C, Tu L, Ishida H, Imai T, Suzue K, Hirai M, Tetsutani K, Hamano S, Shimokawa C, and Hisaeda H: A critical role for phagocytosis in resistance to malaria in iron-deficient mice. *Eur. J. Immunol.* 41: 1365-1375, 2011.
 6. Kim HJ, Jung BK, Lee JJ, Pyo KH, Choi BI, Kim TW, Hisaeda H, Himeno K, Shin EH, Chai JY: CD8 T-cell activation in mice injected with a plasmid DNA vaccine encoding AMA-1 of the reemerging Korean *Plasmodium vivax*. *Korean J. Parasitol.* 49: 85-90, 2011
 7. Ishida H, Matsuzaki-Moriya C, Imai T, Yanagisawa K, Nojima Y, Suzue K, Hirai M, Iwakura Y, Yoshimura A, Hamano S, Shimokawa C, and Hisaeda H: Development of experimental cerebral malaria is independent of IL-23 and IL-17. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 402: 790-795, 2010.
 8. Tamura, T., Kimura, K., Yuda, M., Yui, K., Flt3 ligand prevents the development of cerebral malaria during infection with *Plasmodium berghei* ANKA. *Infection and Immunity*, 79 (10), 3947-3956.2011.
 9. Sungkapong T, Culleton R, Yahata K, Tachibana M, Ruengveerayuth R, Udomsangpetch R, Torii M, Tsuboi T, Sattabongkot J, Kaneko O, Chotivanich K. Humoral immune responses to *Plasmodium vivax* subtelomeric transmembrane proteins in Thailand. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 42(6), 1313 (2011/11).
 10. Tsumori Y, Ndounga M, Sunahara T, Hayashida N, Inoue M, Nakazawa S, Casimiro P, Isozumi R, Uemura H, Tanabe K, Kaneko O, Culleton R. *Plasmodium falciparum*: Differential selection of drug resistance alleles in contiguous urban and peri-urban areas of Brazzaville, Republic of Congo. *PLoS ONE* 6(8), e23430 (2011/08).
 11. Li J, Pattaradilokrat S, Zhu F, Jiang H, Liu S, Hong L, Fu Y, Koo L, Xu W, Pan W, Carlton JM, Kaneko O, Carter R, Wootton JC, Su XZ. Linkage maps from multiple genetic crosses and loci linked to growth-related virulent phenotype in *Plasmodium yoelii*. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(31): E374-82 (2011/08).
 12. Alexandre JSF, Kaewthamasorn, Yahata K, Nakazawa S, Kaneko O. Positive selection on the *Plasmodium falciparum* *clag2* gene encoding a component of the erythrocyte-binding rhoptry protein complex. *Trop Med Health* 39(3):77-82 (2011/09).
 13. Alexandre JSF, Yahata K, Kawai S, Torii M, Kaneko O. PEXEL-independent trafficking of *Plasmodium falciparum* SURFIN4.2 to the parasite-infected red blood cell and Maurer's clefts. *Parasitol Int* 60(3):313-20 (2011/09).
 14. Kamata, M., Hagiwara, J., Hokari, T., Suzuki, C., Fujino, R., Kobayashi, S., Kim, H.-S. and Wataya, Y. Applications of triphenylpyrylium salt-sensitized electron transfer photo-oxygenation reactions to the synthesis of benzo-fused 1,4-diaryl-2,3-dioxabicyclo[2.2.2]octanes as new antimalarial cyclic peroxides. *Research on Chemical Intermediate* (in press).
 15. Sato, A., Kawai, S., Hiramoto, A., Morita, M., Tanigawa, N., Nakase, Y., Komichi, Y., Matsumoto M., Hiraoka, O., Hiramoto, K., Tokuhara, H., Masuyama, A., Nojima, M., Higaki, K., Hayatsu, H., Wataya, Y., and Kim, H.-S. Antimalarial activity of endoperoxide compound 6-(1,2,6,7-tetraoxaspiro[7.11]nonadec-4-yl)hexan-1-ol. *Parasitology International*, 60(4), 488-192, 2011.
 16. Sato, A., Hiramoto, A., Morita, M., Matsumoto, M., Komichi, Y., Nakase, Y., Tanigawa, N., Hiraoka, O., Hiramoto, K., Hayatsu, H., Higaki, K., Kawai, A., Masuyama, A., Nojima, M., Wataya, Y., and Kim, H.-S. Antimalarial activity of endoperoxide compound 6-(1,2,6,7-

tetraoxaspiro[7.11]nonadec-4-yl)hexan-1-ol. *Parasitology International*, 60(3), 270-273, 2011.

17. Taniguchi, T., Kumagai, T., Shimogawara, R., Ichinose, S., Hiramoto, A., Sato, A., Morita, M., Nojima, M., Kim, H.-S., Wataya, Y., Ohta, N. Schistosomicidal and antifecundity effects of oral treatment of synthetic endoperoxide N-89. *Parasitology International*, 60(3), 231-236, 2011.

住血吸虫症

18. Kajihara N, Hirayama K. The War against a Regional Disease in Japan A History of the Eradication of Schistosomiasis japonica. *Trop Med Health*. (Suppl 1):3-44. 2011
19. Huy NT, Hamada M, Kikuchi M, Lan N T, Yasunami M, Zamora J, Hirayama K. Association of HLA and post-schistosomal hepatic disorder: a systematic review and meta-analysis. *Parasitol Int.* 60(4):347-56. 2011
20. T. Seki, Kumagai T, Kwansa-Bentum B, Furushima-Shimogawara R, Anyan WK, Miyazawa Y, Iwakura Y, Ohta N. IL-4 and IL-13 suppress excessive neutrophil infiltration and hepatocyte damage during acute murine schistosomiasis japonica. *Infection and Immunity*. 2012, 80(1):159
21. Osada Y, Kanazawa T. Schistosome: its benefit and harm in patients suffering from concomitant diseases. *J Biomed Biotechnol.* 2011. vol.2011, 264173.
22. Kirinoki M, Chigusa Y., Ohmae H. Matsumoto J, Kitikoon V, Sinuon M, Saem C, Socheat D, Matsuda H. Efficacy of sodium metaperiodate (SMP)-ELISA for the serodiagnosis of schistosomiasis mekongi. *Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth* 2011, 42:25-33.
23. 大前比呂思, 千種雄一, 桐木雅史, Muth Sinuon, Duong Socheat. 住血吸虫症に対するブラジカンテル投与法に関する考察 - 1回投与か分割複数投与か - 臨床寄生虫学会誌 2011, 22 : 54-58.

フィラリア症

24. 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. *Trop Med Health*, 39: 17-30, 2011.

25. Itoh M, Weerasooriya MV, Yahathugoda TC, Takagi H, Samarawickrema WA, Nagaoka F, Kimura E. Effects of 5 rounds of mass drug administration with diethylcarbamazine and albendazole on filaria-specific IgG4 titers in urine: 6-year follow-up study in Sri Lanka. *Parasitol Int*, 60: 393-397, 2011.
26. (3) Takagi H, Itoh M, Kasai S, Yahathugoda TC, Weerasooriya WA, Kimura E. Development of loop-mediated isothermal amplification method for detecting *Wuchereria bancrofti* DNA in human blood and vector mosquitoes. *Parasitol Int*, 60: 493-497, 2011.
27. Anisuzzaman, Islam MK, Alim MA, Miyoshi T, Hatta T, Yamaji K, Matsumoto Y, Fujisaki K, Tsuji N. (2011). Longistatin, a novel plasminogen activator from vector ticks, is resistant to plasminogen activator inhibitor-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 413, 599-604.

住血原虫症 (トリパノソーマ、リーシュマニア)

28. Concatenated mitochondrial DNA of the coccidian parasite *Eimeria tenella*. Hikosaka, K., Nakai, Y., Watanabe, Y., Tachibana, S., Arisue, N., Palacpac, N. M., Toyama, T., Honma, H., Horii, T., Kita, K. and Tanabe, K. *Mitochondrion*, (2011) 11, 273-278
29. Highly conserved gene arrangement of the mitochondrial genomes of 23 *Plasmodium* species. Hikosaka, K., Watanabe, Y., Kobayashi, F., Waki S., Kita, K. and Tanabe, K. *Parasitol. Int.* (2011) 60, 175-180
30. Ukulactones A and B, new NADH-fumarate reductase inhibitors produced by *Penicillium* sp. FKI-3389. Mori, M., Morimoto, H., Kim, Y-P., Ui, H., Nonaka, K., Masuma, R., Sakamoto, S., Kita, K., Tomoda, H., Shiomi, K. and Ōmura, S. *Tetrahedron*, (2011) 67, 6582-6586
31. Molecular interaction of the first 3 enzymes of the *de novo* pyrimidine biosynthetic pathway of *Trypanosoma cruzi*. Nara, T., Hashimoto, M. Hirawake, H., Liao, C-W., Fukai, Y., Suzuki, S., Tsubouchi, A., Morales, J., Takamiya, S., Fujimura, T., Taka, H., Mineki, R., Fan, C-K., Inaoka, D. K., Inoue, M., Tanaka, A., Harada, S., Kita, K. and Aoki, T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* in press

32. Critical importance of the *de novo* pyrimidine biosynthesis pathway for *Trypanosoma cruzi* growth in the mammalian host cell cytoplasm. Hashimoto, M., Morales, J., Fukai, Y., Suzuki, S., Takamiya, S., Tsubouchi, A., Inoue, S., Inoue, M., Kita, K., Harada, S., Tanaka, A., Aoki, T. and Nara, T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* in press
33. Mitochondrial fumarate reductase as a target of chemotherapy: from parasites to cancer cells. Sakai, C., Tomitsuk, E., Esumi, H., Harada, S. and Kita, K. *Biochim. Biophys. Acta* in press
34. Nonaka N, Nakamura S, Inoue T, Oku Y, Katakura K., Matsumoto J, Mathis A, Chembesofu M, Phiri IGK: Coprological survey of alimentary tract parasites in dogs from Zambia and evaluation of a coproantigen assay for canine echinococcosis. *Ann Trop Med Parasitol* 105, 521-530, 2011
35. 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* 60, 84-89, 2011
36. Ichikawa M, Bawn S, Maw NN, Htun LL, Thein M, Gyi A, Sunn K, Katakura K., Itagaki T: Characterization of *Fasciola* spp. in Myanmar on the basis of spermatogenesis status and nuclear and mitochondrial DNA markers. *Parasitol Int* 60, 474-479, 2011
37. Kobayashi T, Kanai Y, Oku Y, Matoba Y, Katakura K., Asakawa M: Morphological and molecular characterization of sylvatic isolates of *Trichinella* T9 obtained from feral raccoons (*Procyon lotor*). *Nematol Res* 41, 27-29, 2011
38. 片倉 賢: リーシュマニア症. 木村哲, 喜田宏編集, 改訂版 人獣共通感染症, 東京: 医薬ジャーナル社, pp.431-436, 2011
39. Elkhateeb A, Tosa Y, Matsuura H, Nabeta K, Katakura K.: Antitrypanosomal activities of acetylated bruceines A and C; a structure-activity relationship study. *J Nat Med* 66, 233-240, 2012
40. The role of VAMP7/TI-VAMP in cell polarity and lysosomal exocytosis in vivo. Sato M, Yoshimura S, Hirai R, Goto A, Kunii M, Atik N, Sato T, Sato K, Harada R, Shimada J., Hatabu T, Yorifuji H, Harada A. *Traffic* 2011 12:1383-93
41. Makiuchi T, Annoura T, Hashimoto M, Hashimoto T, Aoki T, Nara T. Compartmentalization of a glycolytic enzyme in *Diplonema*, a non-kinetoplastid Euglenozoan. *Protist* 162:482-489, 2011
42. 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* 81:491-498, 2011
43. Liao CW, Sukati H, Nara T., Tsubouchi A, Chou CM, Jian JY, Huang YC, Chang WS, Chiu WT, Huang YH Fan CK. Prevalence of *Schistosoma haematobium* infection among schoolchildren in remote areas devoid of sanitation in Northwestern Swaziland, Southern Africa. *Jap J Inf Dis* 64(4):322-326, 2011
44. Chu TB, Liao CW, Nara T., Huang YC, Chou CM, Liu YH, Fan CK. *Enterobius vermicularis* infection is well controlled among preschool children in nurseries of Taipei City, Taiwan. *Rev Soc Bras Med Trop* in press, 2012
45. Hashimoto M, Morales J, Fukai Y, Suzuki S, Takamiya S, Tsubouchi A, Inoue S, Inoue M, Kita K, Harada S, Tanaka A, Aoki T, Nara T. Critical importance of the *de novo* pyrimidine biosynthesis pathway for *Trypanosoma cruzi* growth in the mammalian host cell cytoplasm. *Biochem Biophys Res Commun* in press, 2012
46. Nara T., Hashimoto M, Hirawake H, Liao CW, Fukai Y, Suzuki S, Tsubouchi A, Morales J, Takamiya S, Fujimura T, Taka H, Mineki R, Fan CK, Inaoka K, Inoue M, Tanaka A, Harada S, Kita K, Aoki T. Molecular interaction of the first 3 enzymes of the *de novo* pyrimidine biosynthetic pathway of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun* in press, 2012
- 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）
47. Nishizaki C, Nishikawa M, Yata T, Yamada T, Takahashi Y, Oku M, Yurimoto H, Sakai Y, Nakanishi K., Takakura Y. Inhibition of surgical trauma-enhanced peritoneal dissemination of tumor cells by human catalase derivatives in mice. *Free Radic Biol Med* 2011. 51(3):773-9.
48. Nakahira M, Nakanishi K. Requirement of GATA-binding protein 3 for IL13 gene expression in IL-18-stimulated Th1 cells. *Int Immunol.* 2011;23:761-72

49. Yasuda K, Muto T, Kawagoe, T, Makoto M, Sasaki Y, Matsushita K, Taki Y, I, Futatsugi-Yumikura S, Tsutsui H, Ishii KJ, Yoshimoto T, Akira S, Kenji N akanishi. Contribution of IL-33-activated natural helper cells to pulmonary eosinophilia in intestinal nematode-infected mice. *PNAS*, in press.
50. Husain, A., Jeelani, G., Sato, D., and Nozaki, T. Global Analysis of gene expression in response to L-cysteine deprivation in the anaerobic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *BMC Genomics* 12, 275, 2011.
51. Yamane K Itoh et al. Recent hybridization between *Taenia asiatica* and *Taenia saginata*. *Parasitol Int* 2012; in press.
52. Jongwutiwes U Itoh et al. Isolated intradural- extra- medullary spinal cysticercosis: a case report. *J Travel Med* 2011; 18: 284-287.
53. Sato MO Itoh et al. A possible nuclear DNA marker to differentiate the two geographic genotypes of *Taenia solium* tapeworms. *Parasitol Int* 2011; 60: 108-110.
54. Swastika K Itoh et al. An ocular cysticercosis in Bali, Indonesia caused by *Taenia solium* Asian genotype. *Parasitol Int* 2012; in press.
55. Hailemariam Z Itoh et al. Molecular identification of unilocular hydatid cysts from domestic ungulates in Ethiopia: implications for human infections. *Parasitol Int* 2012; in press.
56. Konyaev SV Itoh et al. The first report on cystic echinococcosis in a cat caused by *Echinococcus granulosus* s.str. with molecular confirmation. *J Helminthol* 2011; 20: 1-4.
57. Bresson-Hadni S Itoh et al. Should possible recurrence of disease contraindicate liver transplantation in patients with end-stage alveolar echinococcosis? A 20-year follow-up study. *Liver Transplant* 2011; 17: 855-865.
58. Sako Y Itoh et al. Immunochromatographic test with recombinant Em18 antigen for the follow-up study of alveolar Echinococcosis. *Clin Vaccine Immunol* 2011; 18: 1302-1305.
59. Li T Itoh et al. Post-treatment follow-up study of abdominal cystic echinococcosis in Tibetan communities of northwest Sichuan Province, China. *PLoS NTD* 2011; 5(10): e1364.
60. Mohammadzadeh T Itoh et al. Comparison of the usefulness of hydatid cyst fluid, native antigen B and recombinant antigen B8/1 for serological detection of cystic echinococcosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2012; in press.
61. Nakamura K Itoh et al. A case of pulmonary and hepatic cystic Echinococcosis of CE1 stage in a healthy Japanese female that was suspected to have been acquired during her stay in the United Kingdom. *Am J Trop Med Hyg* 2011; 85: 456- 459.
62. Nomura Y Itoh et al. Capsule endoscopy is a feasible procedure for identifying a *Diphyllobothrium nihonkaiense* infection and determining the indications for vermifuge treatment. *BMJ Case Reports* 2011; doi:10.1136/bcr.05.2010.3023.
63. Maeda T Itoh et al. Neurocysticercosis case with tuberculoma-like epithelioid granuloma strongly suspected by serology and confirmed by mitochondrial DNA. *BMJ Case Reports* 2011; doi:10.1136/bcr.04.2011.4125.
64. Ito A et al. The first workshop on towards the control of cestode zoonoses in Asia/Africa. *Parasit Vectors* 4:114, 2011.
65. Yanagida T, Sako Y, Nakao M, Nakaya K, Ito A. Mini Review: Taeniasis and cysticercosis due to *Taenia solium* in Japan. *Parasit Vectors* 2012; 5, 18.
66. Knapp J Itoh et al. Phylogenetic relationships within Echinococcus and Taenia tape worms (Cestoda: Teaniidae): an inference from nuclear protein-coding genes. *Mol Phylogenet Evolution* 2011; 61: 628-738.
67. Sako Y Itoh et al. *Echinococcus multilocularis*: identification and functional characterization of cathepsin B-like peptidases from metacestode. *Exp Parasitol* 2011; 127: 693-701.
68. Brunetti E Itoh et al. Cystic Echinococcosis: chronic, complex, and still neglected. *PLoS NTD* 2011; 5: e1146.
69. Wandra T Itoh et al. Taeniasis/cysticercosis in Bali, Indonesia. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 2011; 42: 793-802.
70. Nkouawa A Itoh et al. Serological and molecular tools to detect neurologic parasitic zoonoses in rural Cameroon. *Southeast Asina J Trop Med Public Health* 2011; 42: 1365-1374.

71. Yoshida A, Nagayasu E, Horii Y, Maruyama H: A novel C-type lectin identified by EST analysis in tissue migratory larvae of *Ascaris suum*. Parasitol Res DOI 10.1007/s00436-011-2677-9, 2011

媒介昆虫

72. Yamamoto DS, Sumitani M, Nagumo H, Yoshida S, Matsuoka H. Induction of antiparasite antibodies by biting of transgenic *Anopheles stephensi* delivering malarial antigen via blood feeding. Insect Mol Biol 21(2): in press, 2012

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定をふくむ）

なし

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

日本住血吸虫性肝線維症とHLAとの相関

長崎大学・熱帯医学研究所・免疫遺伝学分野 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日本住血吸虫高度流行地で超音波診断で明らかな肺線維症を呈する患者が10才台で12.3%、20才以上では55.3%存在する。これら肝線維症患者集団でのHLA-DRB1*1501頻度は、35才未満の群で、有意に増加していたことから、早期肝線維化症発症にはHLA-DRB1*1501が感受性因子として働いていると考えられた。感受性を示したDRB1*1501陽性者の免疫応答性の特徴を明らかにするために、RNAアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。住血吸虫症患者群では非患者群と比較して、ケモカイン、サイトカイン、NKT細胞などの特に炎症に関わる遺伝子の発現量の上昇が認められた。肝線維症群と非肝線維症群間の比較では、肝線維症群で、MHC class II, IL-18R と immunoglobulin 関連遺伝子の高発現が認められた。

A. 研究目的

フィリピン国ソルソゴン州で観察された若年性肝線維症発症に関わる免疫応答性の特徴を解明することにより、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。

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。

B. 研究方法

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っている独協大・千種教授、フィリピン大学・レオナルド教授、ソルソゴン県保健チームらの協力して、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、40歳以上 非肝線維化症対象者10名の10ml EDTA採血を施行し、mRNA用の試料を得た。これらのサンプルのうち、30歳以下（DRB1*1501陽性）、肝線維症患者、40歳以上 非肝線維化症対象者（DRB1*1501陰性）を各2名、DRB1*1501陽性日本住血吸虫非感染者1名を選択し GeneChip gene 1.0ST Array (AFFYMETRIX)を用いて、網羅的遺伝子発現プロファイルにより比較解析を行った。現地調査及び採血、遺伝子解析等について

C. 結果

DRB1*1501陽性、30才以下の若年で肝線維化が見られる患者2名（A群）、DRB1*1501陰性、35歳以上で肝線維化が見られなかった患者2名（B群）、DRB1*1501陽性、健常人1名（C群）とし群間での発現量の増減の比較を行った。C群とA、B群で比較した結果、A、B群で423遺伝子の高発現を認め、A群とB、C群の比較では、A群で16遺伝子の高発現が認められた（表1, 2）。またA群で9遺伝子の発現量の低下が認められた（表3）。5サンプルの遺伝子発現量に殆ど差がなかったものが3426遺伝子、住血吸虫感染者で高発現のものは1124遺伝子であった。

表1. 住血吸虫症患者で高発現が認められた遺伝子（423遺伝子）抜粋

8155849	annexin A1
7983360	beta-2-microglobulin
8006602	chemokine (C-C motif) ligand 4
8055465	chemokine (C-X-C motif) receptor 4
8099471	fibroblast growth factor binding protein 2
7936734	fibroblast growth factor receptor 2
8105340	granzyme A (granzyme 1, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase
7978366	granzyme B (granzyme 2, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase
7976443	interferon, alpha-inducible protein 27
8044021	interleukin 1 receptor-like 1
8026292	interleukin 27 receptor, alpha
8095680	interleukin 8
8031328	killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, long cytoplasmic tail, 2
7961187	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 1
8038809	natural killer cell group 7 sequence

住血吸虫症患者群では炎症に関わる遺伝子群の高発現が認められた。Granzyme A, B, CCL, CXCL1, IL-8 など、T 細胞、DC、Mφ、NK 細胞、好中球を動員させるサイトカイン遺伝子の発現量上昇が認められた。

表 2. 若年性肝線維症患者で高発現を認めた遺伝子 (16 遺伝子)

8071642	immunoglobulin lambda variable 6-57
8071658	immunoglobulin lambda variable 7-46
8044049	interleukin 18 receptor accessory protein
8125436	major histocompatibility complex, class II, DR beta 5
7958860	rabphilin 3A homolog (mouse)
8043431	similar to Ig kappa chain V-I region HK102 precursor
8043476	similar to Ig kappa chain V-I region HK102 precursor
8043433	similar to Ig kappa chain V-II region RPMI 6410 precursor
8043474	similar to hCG26659 similar to Ig kappa chain V-I region HK102 precursor
7961295	taste receptor, type 2, member 43

MHC class II, IL-18 receptor accessory protein などの発現が高かった。IL-18 は T 細胞による IFN- γ の誘導、NKT 細胞の活性化や、および Th1 細胞への分化誘導の補助などに関わる重要なサイトカインである。このサイトカインに対するレセプターの発現上昇が認められたということは、肝線維化症発症に

関して、MHC class II 依存性の T 細胞応答が関わっていることが強く示唆された。

表 1. 住血吸虫症患者で発現量の低下が認められた 9 遺伝子 (遺伝子) 抜粋

8007607	RUN domain containing 3A
8016285	ADP-ribosylation factor-like 17 pseudogene 1 neighbor of BRCA1 gene 2
8016300	ADP-ribosylation factor-like 17 pseudogene 1 neighbor of BRCA1 gene 2
8021081	solute carrier family 14 (urea transporter), member 1 (Kidd blood group)
8105908	occludin
8116980	ring finger protein 182
8149116	defensin, alpha 1 defensin, alpha 3, neutrophil-specific
8149126	defensin, alpha 1 defensin, alpha 3, neutrophil-specific
8149137	defensin, alpha 3, neutrophil-specific defensin, alpha 1 defensin, theta 1 pseudogene

発現低下の認められたデフェンシンは自然免疫における重要なエフェクター分子で、宿主を感染微生物から守り、粘膜表面の微生物叢の構成を決定付ける抗菌ペプチドである。このデフェンシンの発現量の低下が肝線維化発症機序に、関わるか否かは明らかではない。

D. 考察

住血吸虫症患者群で、ケモカイン、サイトカイン、NKT 細胞などの特に炎症に関わる免疫応答細胞関連遺伝子の発現量の上昇が認められた。住血吸虫感染後に発症する肝線維化が T 細胞依存性の免疫応答により形成されることが確認された結果であるとともに、さらに DRB1*1501 陽性住血吸虫性肝線維化症患者で、MHC class II 遺伝子の発現量の上昇が認められたことから、DRB1*1501 遺伝子そのものの発現量によって、直接的に免疫応答が増進している可能性が考えられた。今後、個々の対象者で、得られた結果を元に、mRNA の発現量の増減を解析するとともに、患者 PBMC を用いた FACS 解析などを行い HLA-DRB1*1501 が誘導する免疫応答がどのように、肝線維化症発症機序に関わるか詳細な検討を行う必要がある。

E. 結論

若年性で発症する住血吸虫感染後肝線維症の感受性に特徴的な免疫応答性が存在することが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

著書

平山謙二. Today's Therapy 2012, 今日の治療指針 2012 版 (vol.54). 私はこう治療している。医学書院 山口徹、北原光夫、福井次矢編、住血吸虫症 pp:250-251, 2011 (2011 年 1 月発刊)

平山謙二 感染症辞典 感染症辞典編集委員会編 オーム社、1 章 感染症とは : pp 1-34, 2 章 熱帯医学と感染症 ; pp35-49, (2012 年 1 月発刊)

論文

Kajihara N, Hirayama K. The War against a Regional Disease in Japan A History of the Eradication of Schistosomiasis japonica. Trop Med Health. (Suppl 1):3-44. 2011

Cherif MS, Shuaibu MN, Kurosaki T, Helegbe GK, Kikuchi M, Yanagi T, Tsuboi T, Sasaki H, Hirayama K. Immunogenicity of novel nanoparticle-coated MSP-1 C-terminus malaria DNA vaccine using different routes of administration. Vaccine, 29(48):9038-50. 2011.

Yamazaki A, Yasunami M, Ofori M, Horie H, Kikuchi M, Helegbe G, Takaki A, Ishii K, Omar AH, Akanmori BD, Hirayama K. Human leukocyte antigen class I polymorphisms influence the mild clinical manifestation of Plasmodium falciparum infection in Ghanaian children. Hum Immunol. 72(10):881-8. 2011.

Huy NT, Hamada M, Kikuchi M, Lan NT, Yasunami M, Zamora J, Hirayama K. Association of HLA and post-schistosomal hepatic disorder: a systematic review and meta-analysis. Parasitol Int. 60(4):347-56. 2011

2. 学会発表

Florencia del Puerto, Juan Eiki Nishizawa, Mihoko Kikuchi, Naomi Iihoshi, Yelin Roca, Cinthia Avilas, Alberto Gianella, Javier Lora, Freddy Udalrico Gutierrez Velarde, Luis Alberto Renjel, Sachio Miura, Hiroo Higo, Norihiro

Komiya, Koji Maemura, Michio Yasunami, Kenji Hirayama. Peripheral blood of Chronic Chagasic patients in Bolivia using real time PCR 第 80 回日本寄生虫学会大会、東京大学本郷キャンパス、東京、平成 22 年 7 月 17-18 日

Mihoko Kikuchi, Lydia R. Leonardo, Yuichi Chigusa, Edelwisa M. Segubre-Mercado, Noriko Kobayashi, Naoko Hayashi, Tetsu Inoue, Napoleon L. Arevalo, Ronald R. Lim, Lea M. Agsolid, Ken Agatsuma, Kenji Hirayama. Immunogenetic analysis of patients with early onset schistosomal fibrosis in Sorsogon Province, the Philippines. 第 80 回日本寄生虫学会大会、東京大学本郷キャンパス、東京、平成 22 年 7 月 17-18 日

Gissel García, Florencia del Puerto, Ana B. Pérez, Beatriz Sierra, Eglys Aguirre, 菊池三穂子, Lizet Sánchez, 平山謙二, and María G. Guzmán Association of MICA and MICB alleles to symptomatic dengue infection. 第 20 日本組織適合学会大会、三島市民文化会館、静岡、平成 22 年 8 月 28-31 日

菊池三穂子, Lydia R. Leonardo, 千種雄一, Edelwisa M. Segubre-Mercado, 小林典子, 林尚子, 井上哲, Napoleon L. Arevalo, Ronald R. Lim, Lea M. Agsolid, 吾妻健, 平山謙二. Immunogenetic analysis of patients with early onset schistosomal fibrosis in Sorsogon Province, the Philippines. 第 52 回日本熱帯医学会大会、東京、平成 22 年 11 月 4-6 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（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事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

我々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事によって宿主内の環境に適応している事を明らかにしてきた。この成果をふまえて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事により、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。昨年度までに確立した方法により、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。そこで本年度はこの分離法を用いてヘム合成に関わる中間体のオルガネラへの局在を調べた。

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、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できた。そこで本年度はアスコフラノンの実用化をめざし、実際にこれらの誘導体の培養型のトリパノソーマの増殖阻害について調べた。

また 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ベニン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。昨年度は *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を得る条件を確立し、複合体 II (LtSQR) の精製を検討したところ *T. cruzi* 同様に 10~12 のサブユニットの部分精製標品を得る事ができた。そこで、本年度はさらにその精製法を改良し、純度の高い標品の精製法を試みた。

(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】

2004 年、Smith らにより δ -アミノレブリン酸 (ALA) がマラリア原虫の増殖を阻害する事が報告された。ALA 自身は光増感性を持たないが、生体内で代謝されて光増感物質であるプロトポルフィリン IX (PPiX) に変換される。主に癌の光動学的治療に利用されている。しかしマラリア原虫の増殖阻害には培地に 2 mM の ALA の添加が必要であり、体重 60 kg の人間の場合、少なくとも 20 g の ALA の投与に相当し、副作用の観点から治療は不可能である。また 0.2 mM ALA を投与した場合、殺原虫効果には、410 W、30 分の強力な光照射が必要である。これは透明な培地を用いた試験であり、光の透過性も高いが、実際にはマラリア原虫は人体内の血液中の赤血球に寄生する事から光照射は非現実的であり、その後の研究は進んでいなかった。そこで我々は、光照射を用いず、ALA を利用したマラリアの予防及び治療に有効な抗マラリア薬の開発をめざして、研究を開始した。

種々の条件を検討した結果、ALA と塩化鉄 (II) を組み合わせる事で、ALA 濃度を低濃度に抑える事が可能で、また光照射を必要とせ

ずに熱帯熱マラリア原虫の増殖を阻害する事を見出した。ALA と塩化鉄(II)を投与した熱帯熱マラリア原虫では、蛍光顕微鏡による観察からリングステージではアピコプラストに、トロホゾイト・シズントステージでは食胞に、それぞれヘム中間代謝産物が蓄積していた。そこでこれまでに確立した細胞分画法を用いてミトコンドリア、アピコプラストおよび食胞を分離しヘム中間代謝産物の同定とその局在を調べた。HPLC 解析によりコプロポルフィリノーゲン III、プロトポルフィリン IX と同定され、前者はアピコプラストや食胞に、また後者はミトコンドリアの局在していた。これらのポルフィリンの異常な蓄積がマラリア原虫の増殖を阻害したと考えられる。

この様に ALA と鉄化合物を組み合わせる事でマラリア原虫の増殖を阻害する事から、ALA と鉄化合物はマラリア治療に有効な新規抗マラリア薬として期待される。

【アフリカトリパノソーマ】

培養系でアスコフラノンおよびその誘導体の効果を調べるために、*Trypanosoma brucei brucei* (IL 221) を HMI-9 (10%FBS) 培地中で、37°C、5%CO₂ 下の条件で定期的に継代し、培養した。マイクロタイタープレートに薬剤希釈系列を作成し、ここに原虫培養液を加え、37°C、18 時間培養後、各ウェルにアラマーブルーを加え、さらに 6 時間同条件下で培養した。培養後、顕微鏡を用いて各ウェルを観察、およびプレートリーダーにより吸光度を測定し、原虫増殖率を算出した。生存原虫の確認されない最低濃度を MIC とし、50% 増殖率を示す濃度をその化合物の IC₅₀ 値とした。グリセロールを含む HMI-9 培地を用いた実験も同様の方法で行った。

さらに 50mM Tris-HCl (pH7.3)、組換え TAO タンパク質、薬剤候補化合物希釈液、ユビキ

ノール-1 を混合し、278nm におけるユビキノール-1 の吸光度の変化を測定する事により、薬剤候補化合物の組換え TAO に対する阻害効果の評価を行った。本年度は、84 種類の AF 誘導体の培養原虫に対する増殖阻害効果を検討した結果、組換え TAO の活性阻害には重要とされていなかった側鎖末端の構造が、培養原虫の増殖阻害に大きな影響を与えるという新たな知見が得られた。さらに培養原虫に対する増殖阻害効果が増強されるだけでなく、グリセロール併用効果も増強する可能性を持つ末端構造も明らかとなった。これは、将来アフリカトリパノソーマ症に対する薬を化学合成する際にも重要な知見になると考えられる。

【アメリカトリパノソーマ】

部分精製標品のサイズおよびサブユニット構造を調べる目的で、ミトコンドリア膜からの可溶化 LtSQR 標品を用いてクリアネイティブ電気泳動(hrCNE)を行なった結果、LtSQR と TcSQR の分子量が共に 520 kDa 程度である事が判明した。また SOURCE15Q 精製標品の二次元電気泳動の結果、LtSQR のサブユニットが少なくとも 10 個存在し、哺乳類 SQR と大きく異なる構成を有する事も明確にする事ができた。阻害剤感受性においてもさらに検討を加えた結果、LtSQR と TcSQR は類似した性質を示し、特に *T. cruzi* の増殖を抑える TcSQR 特異的阻害剤シッカニンへの IC₅₀ はほぼ同一の値であった。

さらに、結晶解析に必要な精製標品を再現性良く大量に得られる条件を確立する目的で、原虫の培養条件を検討した結果、YE 培地で *L. tarentolae* の 10 L 培養を行うと、*T. cruzi* 10L 培養時の 10. 倍量の SQR 活性をミトコンドリア画分に分離できる事が判った。またポリエチレングリコール沈殿とイオン交換カラム