

Fractogel の併用により、高純度の LtSQR 標品を mg オーダーで調製可能な大量精製系を確立する事ができた。

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。しかしこれまでの実験で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。実際に今回はヘム合成中間体の局在の解析に、これまでに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。実際に共結晶に用いた誘導体は本年度の研究において培養系でトリパノソーマの増殖を抑制し、実用化へ大きく前進したと考えられる。

複合体 II (コハク酸-ユビキノン還元酵素) 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ぶ重要な酵素であり、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、我々は *T. cruzi* の複合体 II が 12 サブユニットから構成される事を明らかにし、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。*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おり、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。同時に精製標品を用いた化合物ライブラリーのスクリーニングも可能となり、特異的阻害剤探索の基盤が整った。

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。実用化へ向けて、次のステップへ進みたい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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

- 6) 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

学会発表

- 1) 北 潔 「寄生虫ミトコンドリアの多様性：薬剤標的として」第84回日本生化学会大会 平成23年9月
- 2) 前田桂、畑昌幸、小松谷啓介、上田貴志、中野明彦、竹尾 暁、坪井敬文、室伏きみ子、北潔、佐々木成江「熱帯熱マラリア原虫におけるミトコンドリア DNA polymerase の解析」第84回日本生化学会大会 平成23年9月
- 3) Kita, Kiyoshi「The roles of mitochondrial complex II (succinate-ubiquinone reductase/quinol-fumarate reductase) of *Plasmodium* studied by gene targeting of the Fp subunit」5th Eijkman International Symposium, 2011, November (Jakarta)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

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))
分担研究報告書

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

研究分担者 狩野 繁之 国立国際医療研究センター研究所部長

研究協力者 石上 盛敏 国立国際医療研究センター研究所上級研究員

研究要旨 本研究では、1993年から再流行している韓国の三日熱マラリア (*Pv*) の集団構造と伝播動態を、同原虫のマイクロサテライト (MS) DNA 10 座位に基づく多型解析により明らかにすることを目的とした。近年、*Pv* 集団の遺伝的多様度や集団構造に関する研究が報告されはじめたが、本研究のように長期間 (1994 年～2008 年 : 15 年間) にわたって *Pv* 集団の伝播動態を解析した報告はこれが初めてである。*Pv* 87 株、10 座位の MS DNA データに基づき、遺伝的多様度を調べた結果、*Pv* 集団の多様度が増加していることが明らかとなった。次にアレルの組合せにより合計 40 ハプロタイプが同定された。さらにこれらの関係性を推定した結果、2 つの主要なグループ、すなわちグループ 1 と 2 が、それぞれ、11 年間 (1995 年～2005 年)、10 年間 (1996 年～2005 年) にわたって流行していることが明らかとなった。この結果から韓国の *Pv* 集団の組換え頻度は低いと推定された。一方で、上記の 2 グループに属さないハプロタイプも 1999 年から徐々に観察されはじめた。この結果より韓国には他の地域 (恐らく北朝鮮) から新たな *Pv* 株が継続的に流入していると推察され、このことが再流行から 18 年以上経過した現在でも、韓国が三日熱マラリアを制圧できずにいる原因だと推察された。

A. 研究目的

近年、三日熱マラリア原虫 (*Pv*) 集団の遺伝的多様度や集団構造に関する研究が、通年の流行が見られる熱帯・亜熱帯地域から報告されているが、季節性の流行を示す温帯地域からは少ない。そこで本研究では、日本の防疫にも重要な韓国 (温帯気候) の三日熱マラリアに着目した。韓国では、1970 年代後半に土着の三日熱マラリアの制圧に成功しているが、1993 年から北朝鮮との軍事境界線付近に従軍した韓国軍兵士を中心に再流行が確認され、今なお流行が続いている。本研究では多型性に富む *Pv* マイクロサテライト (MS) DNA を分子マーカーとして用いて、温帯地域に属する韓国の *Pv* 集団の集団構造と伝播動態を経時的に解析し、一度はその制圧に成功した韓国が、再流行の確認から 18 年以上経過した現在でもなお制圧出来ずにいる原因を解明することを目指した。

B. 研究方法

- 1) 材料は分担研究者の所属する国立国際医療研究センター研究所で保管している韓国の三日熱マラリア原虫 (*Pv*) 87 株 (1994 年～2008 年採取 : 韓国・仁済大学医学部の高元圭教授より分与) を用いた。
- 2) 患者血球から *Pv* DNA を抽出し、PCR 法で *Pv* MS DNA 10 座位を増幅後、ABI 3130xl Genetic Analyzer を用いてフラグメント解析を行った。得られた対立遺伝子 (アレル) データに基づき、*Pv* 集団の遺伝的多様度 (各 MS 座位に観察されるアレル数とヘテロ接合度) を算出した。次に MS 10 座位のアレルの組合せに基づき、各クローンのハプロタイプを同定し、さらに eBURST 法を用いて、それらのハプロタイプの関係性を推定した。
(倫理面への配慮)

本研究に用いた *Pv* 株の採取は、長期間で広範囲に渡っており、患者からの *Pv* 株の採取の際に、文書または口頭によるインフォームド・コンセントを取得していない。しかし、本研究分担者らは患者

からの *Pv* 株の採取に関わっておらず、なおかつ患者と *Pv* 株が連結不可能匿名可されているので、本研究によって得られる成果が、*Pv* 株の提供者に対していかなる不利益を与えることはない。また本研究は赤血球に感染したマラリア原虫の遺伝子解析を行うもので、宿主であるヒトの遺伝子解析は行っておらず、文部科学省・厚生労働省・経済産業省が共同作成した「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」には抵触しない。

C. 研究結果

15年間(1994年～2008年)にわたって採取された *Pv* 集団(87株)を、5年ごとに分け(1994年～1998年、1999年～2004年、2005年～2008年)、*Pv* MS DNA 10座位の多型データに基づき、それらの遺伝的多様度を解析した。その結果、1座位に観察される平均アレル数が順に、2.5、3.0、3.8で、ヘテロ接合度が順に、0.31、0.42、0.56であった。次にアレルの組合せにより、各原虫クローンのハプロタイプを調べた結果、40ハプロタイプが同定された。さらにこれらのハプロタイプの関係性を eBURST 法を用いて調べた結果、2つの主要なグループ、すなわちグループ1と2が、それぞれ、11年間(1995年～2005年)、10年間(1996年～2005年)にわたって流行していることが明らかとなった(図1)。しかし一方で、上記のグループに属さないハプロタイプも1999年以降観察された。

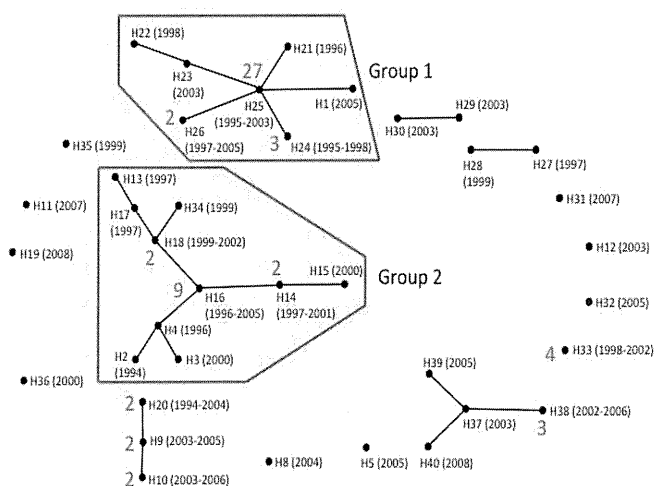


図1 eBURST 解析によるハプロタイプの関係性

D. 考察

韓国 *Pv* 集団の遺伝的多様度を経時的に解析した結果、時間の経過と共に多様度が増加傾向に

あることが観察された。韓国の三日熱マラリア報告数は、1993年から急増し2000年にピークを向かえ、2001年以降は増減を繰り返しながらも減少傾向にある。通常、患者数が減少すればマラリア原虫集団の多様度も減少すると考えられるが、本研究では患者数が減少しても *Pv* 集団の多様度は増加していた。一方、ハプロタイプ解析の結果、韓国の *Pv* 集団は2つのグループが、長期間(10年～11年)にわたって流行していたことから、*Pv* ゲノムの組換え頻度が低いと推察された。しかし、このグループに属さない *Pv* 株も1999年以降、徐々に観察された。この新しい *Pv* 株の出現と、*Pv* 集団の多様度が経時的に増加していること、並びに流行地域が北朝鮮との軍事境界線付近であることから総合的に判断して、恐らく北朝鮮から新たな *Pv* 株が韓国に継続的に流入していると推察された。

E. 結論

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と推察された。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も明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

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, 2012 (accepted for publication)

2. 学会発表

石上盛敏, 福本恵, Weon-Gyu Kho, 狩野繁之. 韓国の三日熱マラリア原虫のマイクロサテライトDNA多型に基づく分子遺伝疫学. 第52回日本熱帯医学会大会, 東京大学(2011年11月4-6日)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金(国際医学協力研究事業)

分担研究報告書

ワクチン分子の無細胞系合成システムの確立

分担研究者 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

研究要旨： 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。以上の結果から、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系のマラリアワクチン研究への有用性が確認された。

A. 研究目的

マラリア撲滅が 2007 年に再度宣言されて依頼、マラリアワクチン開発は緊急の課題として再認識された。そのためには、既知のワクチン候補のみの研究では限界に達しており、新たなワクチン候補分子の探索が、緊急の課題となっている。申請者らは、マラリア原虫組換えタンパク質の合成に優れているコムギ胚芽無細胞タンパク質合成法を用いて熱帯熱マラリア原虫のゲノムワイドに組換えタンパク質を発現し、その中から新規抗原を同定することを目的に本研究を実施した。

B. 研究方法

1) 熱帯熱マラリア原虫メロゾイト期組換えタンパク質の合成および抗体の作製

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて、熱帯熱マラリア原虫タンパク質の内、マラリアゲノム情報データベース (PlasmoDB) より、メロゾ

イト期にのみ発現が示唆されている遺伝子 41 種類を選択し、熱帯熱マラリア原虫 3D7 株のメロゾイト期 cDNA からコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて組換えタンパク質を合成した。これらを実験動物に免疫して特異抗体を作製した。

2) 間接蛍光抗体法による局在解析

熱帯熱マラリア原虫 3D7 株のメロゾイト抗原と上記で作製した抗体を用いて、標的抗原のメロゾイトにおける局在を解析した。

3) ハイスループット熱帯熱マラリア原虫増殖阻害アッセイ

培養熱帯熱マラリア原虫 3D7 株に上記で作製した抗体を加え、原虫増殖阻害活性を測定するために、96 穴マルチウエルプレートの自動測定が可能な FACS を応用して、ハイスループット増殖阻害活性アッセイ系を確立した。

(倫理面への配慮)

実験動物における抗体の作製は、愛

媛大学動物実験委員会において許可を得ている。

C. 研究結果および考察

1) 熱帯熱マラリア原虫メロゾイト期組換えタンパク質の合成および抗体の作製

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて、熱帯熱マラリア原虫タンパク質の内、マラリアゲノム情報データベース (PlasmoDB) より、メロゾイト期にのみ発現が示唆されている遺伝子 41 種類を選択し、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて組換えタンパク質を合成した。これらの内、免疫実験に十分な量のタンパク質が合成できた 28 種類について実験動物に免疫して特異抗体を作製した。

2) 間接蛍光抗体法による局在解析による赤血球期ワクチン候補分子の選択

熱帯熱マラリア原虫 3D7 株のメロゾイト抗原と上記で作製した抗体を用いて、標的抗原のメロゾイトにおける局在を解析した。メロゾイト表面もしくは、メロゾイトの赤血球への侵入に必須の役割を果たしている先端部小器官への局在を示した 18 種類の分子を選択した。

3) ハイスループット熱帯熱マラリア原虫増殖阻害アッセイによる赤血球期ワクチン候補分子の同定

上記 18 種類の抗体を用いて熱帯熱マラリア原虫増殖阻害アッセイを行った結果、2 種類の機能未知分子に対する抗体が、熱帯熱マラリア原虫 3D7

株に対する増殖阻害活性を有していることが明らかとなった。

そこで今年度は、これらの機能未知分子の一つ、GPI-anchored micronemal antigen (GAMA) と呼ばれている分子に着目し、これがマラリア赤血球期ワクチン候補となりうるかを検討した。PfMSPDBL1 は一次構造上、既知の赤血球結合タンパク質 Erythrocyte Binding Antigen (EBA) 175 等の分子が有する DBL (Duffy Binding Like) ドメインに類似したドメインは有していない。全長 GAMA 組換えタンパク質をコムギ胚芽無細胞系により合成し動物抗血清を作製した。この抗血清を用いた間接蛍光抗体法により、GAMA は赤血球への侵入型であるメロゾイトの先端部小器官への局在が確認された。更にこれを免疫電子顕微鏡法により観察したところ、メロゾイト先端部小器官の一つであるマイクロネームに局在していた。さらに、メロゾイトが赤血球への侵入直前には、GAMA はメロゾイト表面に移行することが判明した。また、GAMA はヒト赤血球表面に結合し、この結合は既知の赤血球結合能を有するワクチン候補抗原 EBA175 とは異なり、赤血球表面のシアル酸には依存していないことを明らかにした。したがって、GAMA (シアル酸非依存的) に対する抗体と、EBA175 (シアル酸依存的) に対する抗体を同時に作用させれば、それぞれの原虫増殖阻害活性を増強できるカクテルワクチン候補となる可能性が考えられた。そこで GAMA 抗体と

EBA175 抗体を混合し、GAMA 抗体もしくはEBA175 抗体単独の原虫増殖阻害活性と比較検討したところ、両者の混合により培養熱帯熱マラリア原虫の赤血球への増殖阻害活性が増強することが明らかとなった。以上の結果から、GAMA は熱帯熱マラリア原虫メロゾイトの赤血球侵入に重要な役割を果たすこと、さらに新規赤血球期ワクチン候補となる可能性が示唆された。以上の結果から、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成法のマラリアワクチン研究への有用性が確認された。

3) 今後の課題

同定されたその他の新規の抗原に関しては、GAMA 同様個別の研究を進めてゆき、新規ワクチン候補分子の同定をすすめてゆく予定である。

D. 結論

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系が、新規マラリアワクチン候補抗原の網羅的な同定が可能と考えられた。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.

- 2) 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.

- 3) 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.

2. 学会発表

- 1) Tsuboi T, Takeo S, Arumugam TU, Sakamoto H, Yamasaki T, Miura K, Long CA, Sattabongkot J, Torii M. Post-genome novel blood-stage malaria vaccine candidate discovery by wheat germ cell-free system. Forty-fifth annual U.S.- Japan Parasitic Diseases Panel Meeting, Tokyo, Japan, January 10-11, 2011.
- 2) Ito D, Han ET, Takeo S, Thongkukiatkul A, Otsuki H, Torii M, Tsuboi T.

- Plasmodial ortholog of *Toxoplasma gondii* rhoptry neck protein 3 is localized to the rhoptry body.
Forty-fifth annual U.S.- Japan Parasitic Diseases Panel Meeting, Tokyo, Japan, January 10-11, 2011.
- 3) Tsuboi T, Takeo S, Arumugam TU, Sakamoto H, Yamasaki T, Miura K, Long CA, Sattabongkot J, Torii M. Post-genome discovery of novel malaria vaccine candidates using wheat germ cell-free system. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, September 6-10, 2011.
 - 4) Sakamoto H, Takeo S, Tsuboi T Antibody against a novel *Plasmodium falciparum* antigen MSPDBL1 inhibits erythrocyte invasion of merozoites. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, September 6-10, 2011.
 - 5) Arumugam TU, Takeo S, Yamasaki T, Thonkukiatkul A, Miura K, Sattabongkot J, Healer J, Crabb B, Cowman A, Torii M, Tsuboi T. Post genomic identification of a novel malaria vaccine candidate by functional approach. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, September 6-10, 2011.
 - 6) Richards JS, Arumugam TU, Reiling L, Fowkes FJ, Healer J, Hodder AN, Anders RF, Takeo S, Gilson PR, Thompson JK, Narum DL, Chitnis CE, Cross N, Langer C, Siba PM, King CL, Mueller I, Torii M, Crabb BS, Cowman AF, Tsuboi T, Beeson JG. Associations between protection from malaria and antibodies to known and predicted merozoite antigens. ASTMH 60th annual meeting, Philadelphia, USA, December 4-8, 2011.
 - 7) Ord RL, Rodriguez M, Yamasaki T, Takeo S, Tsuboi T, Lobo C. Targeting sialic acid-dependent and -independent pathways of invasion in *Plasmodium falciparum*. ASTMH 60th annual meeting, Philadelphia, USA, December 4-8, 2011.
 - 8) 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. Identification of a novel *Plasmodium falciparum* merozoite micronemal protein as a blood-stage vaccine candidate. ASTMH 60th annual meeting, Philadelphia, USA, December 4-8, 2011.

- 9) Fowkes FJ, McGready R, Hommel M, Cross N, Simpson J, Lackovic K, Richards JS, Viladpai-nguen SJ, Avril M, Smith J, Narum DL, Anders RF, Tsuboi T, Nosten F, Beeson JG. Acquisition and maintenance of IgG responses to *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* during pregnancy. ASTMH 60th annual meeting, Philadelphia, USA, December 4-8, 2011.
- 10) Lu F, Chen JH, Li J, Cheng Y, Wang B, Ha KS, Tsuboi T, Han ET. Evaluation of naturally acquired humoral immune responses against immunoreactive proteins of *Plasmodium vivax* by protein arrays. ASTMH 60th annual meeting, Philadelphia, USA, December 4-8, 2011.
- 11) 加藤 晶、今西 祥子、竹尾 暁、Sattabongkot Jetsumon、Li Fengwu、Vinetz Joseph、鳥居 本美、坪井 敬文。熱帯熱マラリア原虫の3つの宿主侵入期における新規内膜複合体関連分子の同定。第 80 回日本寄生虫学会大会、東京都、7/17-18、2011。
- 12) 宮田 健、原國 哲也、坪井 敬文、Jetsumon Sattabongkot、橘 真由美、鳥居 本美、松崎 吾朗、新川 武。三部構成免疫賦活システム(TIPs) 第 80 回日本寄生虫学会大会、東京都、7/17-18、2011。
- 13) 原國 哲也、宮田 健、坪井 敬文、Jetsumon Sattabongkot、橘 真由美、鳥居 本美、松崎 吾朗、新川 武。酵母 *Pichia pastoris* 発現コレラトキシン B 鎖(CTB)を用いたワクチンプラットフォームの開発。第 80 回日本寄生虫学会大会、東京都、7/17-18、2011。
- 14) ジャン ニン、アレキサンダー ジーン、矢幡 一英、坪井 敬文、チェン キジュン、金子 修。Identification of a region responsible for *Plasmodium falciparum* Pf332 export to the infected erythrocyte。第 80 回日本寄生虫学会大会、東京都、7/17-18、2011。
- 15) 坂本寛和、竹尾 暁、坪井 敬文。熱帯熱マラリア原虫の新規抗原 MSPDBL1 に対する抗体は原虫の赤血球侵入を阻害する。第 80 回日本寄生虫学会大会、東京都、7/17-18、2011。
- 16) Arumugam Thangavelu U.、竹尾 暁、Thonkukiatkul Amporn、三浦 憲豊、山崎 勤、大槻 均、Long Carole A.、Sattabongkot Jetsumon、鳥居 本美、坪井 敬文。機能予測に基づくポストゲノム新規熱帯熱マラリア赤血球期ワクチン候補抗

- 原の同定
第 80 回日本寄生虫学会大会、東京都、7/17-18、2011。
- 17) 橘 真由美、須藤 もえ、横内 ゆき、石野 智子、坪井 敬文、鳥居 本美
雄性生殖体に発現する新規伝搬阻止ワクチン候補抗原の同定
第 80 回日本寄生虫学会大会、東京都、7/17-18、2011。
- 18) Niwat Kangwanrangsarn、橘 真由美、坪井 敬文、石野 智子、鳥居 本美
マラリア原虫オオキネート表面に発現する新規タンパク質の同定と性状解析
第 80 回日本寄生虫学会大会、東京都、7/17-18、2011。
- 19) 大槻 均、入子 英幸、石野 智子、金子 修、福本 宗嗣、坪井 敬文、鳥居 本美
ネズミマラリア原虫赤血球結合リガンド(EBL)の細胞内輸送ドメインの解析
第 80 回日本寄生虫学会大会、東京都、7/17-18、2011。
- 20) 入子 英幸、大槻 均、橘 真由美、石野 智子、鳥居 本美、坪井 敬文、福本 宗嗣
感染赤血球内における熱帯熱マラリア原虫-宿主間の物質輸送経路の解析
第 80 回日本寄生虫学会大会、東京都、7/17-18、2011。
- 21) 伊藤 大輔、韓 銀澤、竹尾 暁、Thongkukiatkul Amporn、大槻 均、鳥居 本美、坪井 敬文
熱帯熱マラリア原虫 rhoptry neck protein 3 は AMA1 非存在下で RON2 および RON4 と複合体を形成する
第 80 回日本寄生虫学会大会、東京都、7/17-18、2011。

厚生科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）
分担研究報告書

赤痢アメーバの病原機構の解明

分担研究者 野崎 智義 国立感染症研究所 部長

研究要旨 赤痢アメーバ症はアジア・アフリカにおける重要な腸管寄生原虫症である。本研究は赤痢アメーバの特殊な代謝とその調節を明らかにするため、トランスクリプトーム・メタボローム解析等の網羅的解析を行った。本年度は、赤痢アメーバの酸化ストレス応答を更に詳細に検討するため、栄養型の低システイン条件への暴露に伴うトランスクリプトーム解析を行った。

A. 研究目的

アメーバ赤痢（赤痢アメーバ症）は開発途上国を中心として世界の人口の約1%が感染する腸管感染症である。我が国では、男性同性愛者および知的障害者において濃厚感染を引き起こし問題となっている。その遺伝子情報は、全ゲノムの読了により明らかにされ(Lofus Nature 2005)、本原虫の研究に不可欠な核酸情報の基盤的は明らかにされた。一方、原虫が感染過程で暴露される様々な宿主由来の酸化ストレス応答等に関しては、未解明な点が多く、トランスクリプトーム解析に代表される網羅的研究手法が有効である。

本年度は我々は赤痢アメーバのエネルギー産生の解明に主眼をおいて研究を継続している。しかしながら、酸化ストレスが赤痢アメーバの中心代謝に与える影響に関してはほとんど未解明である。そこで本研究では、酸化ストレスが赤痢アメーバの中心代謝に与える影響をトランスクリプトーム解析による網羅的遺伝子発現プロファイリングにより解析した。

B. 研究方法

1. 培養

赤痢アメーバ株 HM-1: IMSS cl6 (Louis Buddy Diamond の分離による) の培養は常法の無菌培養法に従っ

た。

2. トランスクリプトーム解析

Affymetrix 社製のカスタム合成された *E. histolytica*/*E. invadens* マイクロアレイを用いた。プローブのデザイン、cRNA の作成、ハイブリダイゼーション、スキャンなどは常法に従った。トリプリケートで得られたデータの優位性は ANOVA にて検定した。

（倫理面への配慮）本研究に関わる病原体の取扱に関する許可は当該研究機関にて得られている。

C. 研究結果

1. 酸化ストレスによるフラビン含有タンパク質遺伝子の発現への影響

赤痢アメーバの栄養型をシステイン枯渇の環境で 3, 6, 12, 24, 或は 48 時間培養を行ったところ、4 種の flavoprotein のうち 1 種 (EHI_129890) のみが選択的に遺伝子発現制御を受けた。発現誘導のピークは 24 時間後であった (図 1)。Peroxiredoxin, iron 含有 superoxide dismutase, rubrerythrin などの遺伝子発現は影響を受けなかった。

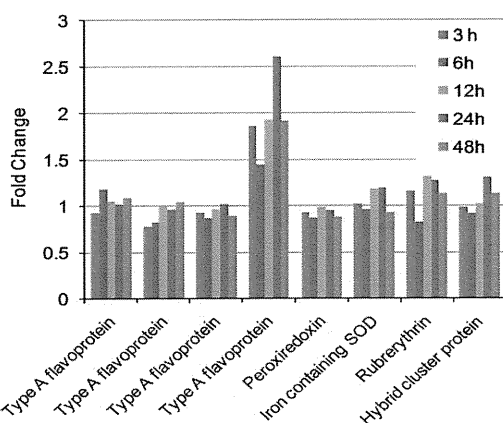
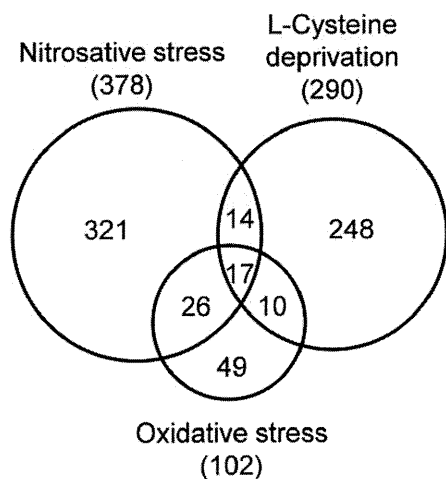


図1 システイン飢餓による flavoprotein 等抗酸化タンパク質遺伝子発現誘導

2. システイン飢餓とそれ以外の酸化・窒素化ストレスとの遺伝子誘導の相関

これまで解析され報告された nitrosative stress や oxidative stress による遺伝子発現の変化のプロファイルを本研究で示されたシステイン飢餓によるそれと比較した(図2)。

システイン飢餓により>3 倍の発現制御を受けた遺伝子の内、約 10% (27 遺伝子) が過酸化水素により誘導を受けた 102 の遺伝子とオーバーラップしていた。また約 15% (31 遺伝子) が nitrosative stress により発現誘導を受けた遺伝子とオーバーラップしていた。



3. システイン飢餓により大きく発現調節を受けた Iron sulfur flavoproteins

7 種類の Iron sulfur cluster と flavin を cofactor にもつタンパク質遺伝子が、同様の発現誘導プロファイルを示した。(図3)

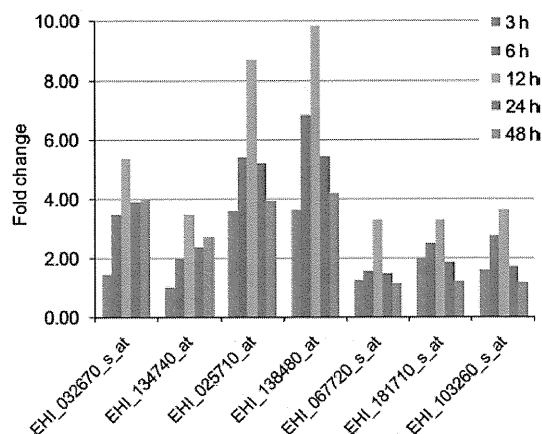


図3 システイン飢餓で誘導を受ける鉄イオウフラビタンパク質遺伝子

4. システイン飢餓による regulator of nonsense transcript の発現誘導とそのプロファイル

図4にシステイン飢餓によって発現誘導が起きる RNA の制御に関する regulator of nonsense transcript 遺伝子の発現制御プロファイルを示す。

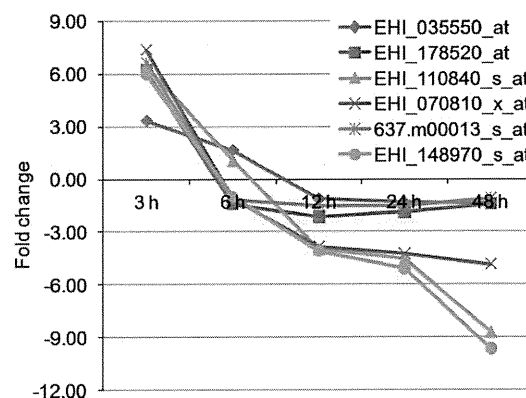


図4 システイン飢餓で誘導を受ける regulator of nonsense transcript

遺伝子

deprivation in the anaerobic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. BMC Genomics 12, 275, 2011.

D. 考察及び結論

赤痢アメーバは一般の原核・真核生物と異なり、主要な抗酸化物質であるグルタチオン並びに、グルタチオン合成並びに代謝の能力を持たず、NADPH 依存性酸化還元酵素などに代表される特殊な酸化ストレス防御機構を有している。

酸化ストレスへの応答は原虫の宿主内での生存に必須である。赤痢アメーバ原虫は低濃度の酸素に耐性であるだけでなく、これを消費している。更に、組織侵入の際に高い酸化ストレスに暴露される。しかしながらその詳細な機構は不明なままであった。本研究では、酸化ストレスの一つの例として、システイン飢餓に伴う原虫の遺伝子発現調節をトランスクリプトーム解析によって解明した。本年度の研究成果によって、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が明らかにされた。本研究は、更に展開し、発現誘導を受けた遺伝子のうち、ISF1, ISF2 と呼ばれる2種の遺伝子を発現抑制した形質転換体を作成し、その増殖能力を計測したところ、ISF1, ISF2 遺伝子を抑制した株をシステイン飢餓条件下で培養すると増殖抑制が起こることを示した。本研究成果は、直ちに、ISF1, ISF2 がシステイン飢餓に伴うストレス応答において必須の機能を果たすことを示している。

E. 健康危険情報

該当せず

F. 研究発表

1. 論文発表

- (i) Husain, A., Jeelani, G., Sato, D., and Nozaki, T. Global Analysis of gene expression in response to L-cysteine

2. 学会発表 なし

G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当せず。
2. 実用新案登録
該当せず

厚生労働科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）
分担研究報告書

フィラリア症の疫学研究（診断法の開発と野外応用）

研究分担者 木村 英作 愛知医科大学医学部 教授

研究要旨：

フィラリア SXP-1 抗原をコートした赤色のラテックスビーズを用い、尿中のフィラリア特異抗体を検出する新しい診断法（ビーズ法）は、感度、特異度共に高く、スリランカの調査では国際標準である ICT test（血液を用い抗原を検出する）より感度が高かった。ビーズ法は結果を目視判定できるので、途上国での野外調査を簡略化すると期待される。

媒介蚊のフィラリア感染状況を知るため、LAMP法を開発した。蚊60匹中に1匹のマイクロフィラリアが存在すれば確実に検出できる。集団治療（MDA）が終了した村で採集された媒介蚊よりLAMP陽性サンプルが得られたことにより、治療後のフィラリア伝搬が示唆された。今後の調査が必要である。

MDA後は感染者が激減し、住民の多くは‘健康人’である。集団的な採血は次第に嫌われるであろう。尿サンプルと、媒介蚊調査によるフォローアップが受け入れられるようになると考えている。

A. 研究目的

アジアの多くの国々では 2020 年までにリンパ系フィラリア症を eliminate（制圧）するための努力が続いている。既に多くの国で予定されていた年 1 回、5 年間の集団治療（MDA）が終了し、感染者数は著しく減少した。このステージ（post-MDA 期）では、制圧の確認作業と再燃の監視（早期発見）が重要な課題となるが、マイクロフィラリア陽性者が 1%未満という状態なので、感度の高い検査法が必要となる。この際、住民のほぼ全てが“健康者”なので侵襲的な採血による集団検査は次第に困難になるだろうと考えられる。

我々は、尿を検体とする抗体検査（小児を対象とする）と媒介蚊の感染状況調査により、住民の負担を最小限に抑えつつ撲滅を達成することを目指している。

前回我々は目視判定ができる尿診断法（ビーズ法）を報告したが、今回はスリランカにおいてその有用性がさらに詳しく検討された。また、媒介蚊（ネッタイエカ）に関連して、フィラリア感染蚊を効率よく発見するための LAMP 法を前回報告したが、さらなる改良を目指して研究を行った。

B. 研究方法

1. スリランカにおけるビーズ法の検討（尿 ELISA、ICT test との比較）

マータラ県、ゴール県で得られた尿検体を用い、ビーズ法の感度、特異度を検討した。前者は、尿 ELISA 陽性尿あるいは ICT test（血液を用い抗原を検出するキット）陽性者の尿を positive standard として計算した。後者は尿 ELISA

及び ICT test 共に陰性者の尿を negative standard とした。

さらに、同地域に住む 2～15 歳の小児を対象に 3 種の免疫診断法を比較した。

2. LAMP 法の改良と応用（予備調査）

スリランカの野外で採集された蚊を用いてフィラリア DNA の検出を試みた。

3. 集団治療後の‘隠れた’流行地を発見するための手順に関する研究

フィラリア特有の症状を持つ患者の存在に基づいて流行地を推定する方法がある。この際、医師らによる診察ではなくアンケート等による「住民情報」を利用できるならば作業は格段に容易となる。

Post-MDA 期のスリランカで、住民情報の信頼性を検討するために「感染率が低い」ことが判明しているハンバントタ県において調査を実施した。

4. その他

ビーズ法の改良（特に診断キットとしての長期保存の可能性を検討）、尿サンプルの保存法（尿の pH が診断に及ぼす影響などを検討）について実験を行った。

（倫理面への配慮）

本研究は、愛知医科大学倫理委員会の審査を経て実施された。スリランカにおける共同研究者は、その所属機関（ルフナ大学医学部）において同様の審査・承認を得ている。被検者には十分な説明を行い同意を得ている。

C. 研究結果

ビーズ法の感度と特異度

ICT test 陽性者の尿を用いた場合の感度は 94.1% (48/51) であった。また、尿 ELISA 陽性尿では 84.5% (164/194) であった。尿 ELISA/ICT 共に陰性者の尿を用いた特異度は 97.5% (1,039/1,066) であった。

ビーズ法、尿 ELISA、ICT test による小児感染率の比較

小児（2-15 歳, N=345）を 3 種の方法で検査した結果、その陽性率は、ビーズ法 3.2%、尿 ELISA 3.8%、ICT test 0.3% で、ビーズ法と尿 ELISA に差はなく、ICT test は前二者より有意に低かった。

LAMP 法の応用

改良が進み、現在は、1 ミクロフィラリア/蚊 60 匹で確実に診断ができる。MDA が理想的に実施（住民の 80% 以上を治療）された地域において採集された媒介蚊に LAMP 法を応用したところ、陽性蚊が発見された。

隠れた流行地の発見手順

ハンバントタ県の全村長 576 人にアンケートを配り、その情報により患者の分布、患者数を推定してマッピングした。さらに、サンプル地点において医師による診察及び尿 ELISA を実施した。その結果、住民情報は、医師の診察結果とよく一致することが示された。また、尿 ELISA とともに統計的に有意な関係が認められた。

ビーズ法と尿サンプル保存

抗体処理したマイクロプレートが少なく

とも3ヶ月間保存できることを確認した。また、高いpHを示す尿サンプルの一部において抗体価の低下が認められた。

D. 考察 ビーズ法

尿ELISAは感度が高くpost-MDA期の流行調査に有用であるが、機器を要するという欠点があり、途上国での普及が遅れている。目視判定できるビーズ法は感度、特異度共に高く、今回のスリランカの調査により、実用に耐える尿診断法であることが示された。特に、世界標準とされるICT testより高い感度を示したことの意義は大きい。熱帯地域での応用を可能にするためキット化に向けた基礎研究が必要である。

LAMP法

1 ミクロフィラリア/蚊60匹の検出が可能となり、LAMPの実用化が可能となった。Post-MDA地域で得られた媒介蚊よりLAMP陽性が出たことは、伝搬の可能性を示しており、今後、注意深いフォローが必要である。

隠れた流行地の発見

アンケートによる住民情報収集は大変シンプルで、県の協力が得られれば、数か月で百万人規模の住民をカバーできる。さらに報告患者数の多い地域に尿ELISA（或いはビーズ法）を応用すれば、流行地の確認が可能である。

スリランカの（かつての）紛争地帯は調査が行われておらず、また、post-MDA期の再燃発見も今後ますます重要となる。

アンケート+尿免疫診断の応用はフィラリア対策の促進に大きな貢献ができると期待している。

加えて、LAMP法による媒介蚊調査が行われれば、「住民に迷惑をかけない」疫学調査が可能となるであろう。

E. 結論

目視判定できる尿診断法（ビーズ法）は、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。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。

G. 研究発表 1. 論文発表

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

(2) 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.

(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.

2. 学会発表

(1) Kimura E, Itoh M, Weerasooriya MV, Yahathugoda TC, Samad MS, Takagi H, Nagaoka F, Moji K, Hossain M. Evaluation of urine-based IgG4 ELISA for detecting lymphatic filarial infection and the development of a visual diagnostic method with urine samples. The 45th Annual Japan-US Joint Conference on Parasitic Diseases. 2011 (東京)

(2) 長岡史晃、伊藤誠、高木秀和、木村英作. 抗フィラリア IgG4 抗体検出ラテックスビーズ法の簡便化の試み. 第67回日本寄生虫学会西日本支部大会プログラム・講演要旨 p.11, 2011 (金沢)

(3) 高木秀和、伊藤誠、葛西真治、Yahathugoda TC、Weerasooriya MV、木村英作. LAMP を用いた *Wuchereria bancrofti* DNA 検出法の開発. 第67回日本寄生虫学会西日本支部大会プログラム・講演要旨 p.15, 2011 (金沢)

(4) 木村英作. フィラリア症対策の過去・未来 ---日本の根絶成功と世界プログラム--- 第52回日本熱帯医学会大会, 2011 (東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

病原体媒介性節足動物（ベクター）由来生物活性分子の機能探索の結果、フタトゲチマダニの血球細胞より、キモトリプシンインヒビター様分子 H1ChI を分離した。H1ChI 遺伝子は全ての発育期で発現し、宿主への付着時に発現増強されることから、マダニ吸血行動に関与すると考えられた。組換え H1ChI は、 α キモトリプシンの加水分解活性を顕著に阻害することが示された。H1ChI 遺伝子の発現を抑制したマダニでは、正常な吸血が阻害され、飽血時体重の低下が見られた。これらの知見より、H1ChI はマダニ吸血行動に深く関与することが示唆された。また、以前にマダニ唾液腺より分離されたロンギスタチンに関して、血液凝固阻害機能以外にセリンプロテアーゼとしての活性が確認された。

A. 研究目的

本研究では、宿主体内への寄生（内部寄生虫）及び体表への寄生（外部寄生虫）に適応した巧妙な生残戦略を備えていると想定される線虫類と媒介節足動物が産生する遺伝子産物の機能解明を実施する。これによって、線虫及び媒介者の生存・侵入・存続に不可欠な分子機構を阻害することのできる新しい寄生虫感染及び伝搬防除技術を確立する。

B. 研究方法

病原体媒介者であるマダニを用いて、マダニが産生する生物活性分子（TBM）の機能を生化学・細胞生物学的及び *in vivo* での内在機能を明らかにするため組換え TBM とマダニ-哺乳類宿主系を用いた解析を行った。

- 1) 国内最優占種であるフタトゲチマダニの TBM をコードする EST データベースより H1ChI 遺伝子を分離した。
- 2) 宿主ウサギに付着・吸血させたマダニを経時的に回収し、定量 PCR 法を用いて内在性 H1ChI の発現動態を検討した。
- 3) 分離した cDNA 配列のうち、成熟蛋白質をコードする領域をプラスミドベクター（pTrcHisB）に挿入し、大腸菌発現系にて組換え H1ChI を作製した。
- 4) 上記の組換え体を精製し、マウスに免疫して抗血清を作製した。
- 5) 吸血したマダニより体液を採取し、免疫組織化学及び免疫蛍光抗体法を用いて、内在性 H1ChI のヘモサイトにおける局在を、細胞生

物学的に検討した。

- 6) H1ChI のキモトリプシン阻害活性はウシ膵臓由来 α キモトリプシン標品を用いて実施した。
- 7) H1ChI をコードする cDNA より逆転写反応を用いて 2 本鎖 RNA を合成し、マダニ個体へ注入することによって、H1ChI 遺伝子の発現が抑制されたロックダウンマダニを作製した。
- 8) H1ChI ロックダウンマダニを宿主ウサギに付着させることにより、H1ChI の吸血時の機能について検討した。
- 9) 以前にフタトゲチマダニ唾液腺より分離した抗凝固因子ロンギスタチンについて、プロテアーゼ活性があることが示唆されたため、各種蛍光基質を用いて加水分解活性を検討するとともに、各種阻害剤を用いて感受性を調べた。

C. 研究結果

- 1) フタトゲチマダニより 82 アミノ酸残基・分子量 9.1kDa からなる H1ChI をコードする cDNA を分離した。
- 2) RT および定量 PCR による解析の結果、H1ChI 遺伝子は、吸血時に発現が増強されており、幼ダニ、若ダニでは吸血開始 96 時間後に、成ダニでは吸血開始 120 時間後において最も高い発現レベルを示した。
- 3) 免疫蛍光抗体法を用いて検討したところ、H1ChI の陽性反応はヘモサイトの細胞質内に確認された。
- 4) 組換え H1ChI は、ウシ膵臓由来 α キモトリプシンの蛍光基質およびカゼインに対する加

水分解活性を顕著に阻害したが、ウシ腓臓トリプシンに対する阻害活性は低く、ブタ由来エラスターゼに対しては殆ど阻害活性を示さなかった。

- 5) H1ChI ノックダウンマダニでは吸血の進行が顕著に阻害されており、それに伴って飽血時体重の著しい減少や、産卵数、孵化率の低下が見られた。
- 6) ロングスタチンはセリンプロテアーゼ特異的基質に対して加水分解活性を示したが、アスパラギン酸プロテアーゼやシステインプロテアーゼ特異的基質に対しては活性を示さなかった。
- 7) ロングスタチンの加水分解活性はセリンプロテアーゼ特異的阻害剤により阻害されたが、他のプロテアーゼ阻害剤に対しては感受性を示さなかった。

D. 考察

H1ChI はマダニのヘモサイトで生産され、マダニの正常な吸血行動に不可欠な機能を持つことが示唆された。また、H1ChI はキモトリプシンに対しては顕著な活性阻害作用を示したが、他のトリプシンやエラスターゼに対しては殆ど阻害作用を示さなかったことから、セリンプロテアーゼの中でも特にキモトリプシンの加水分解活性を特異的に阻害するインヒビターであると考えられた。また、ロングスタチンは、保存された典型的なセリンプロテアーゼのモチーフを持たないにも関わらず、セリンプロテアーゼ活性および阻害プロファイルを呈したことから、非典型的なセリンプロテアーゼであることが示唆された。このような特異的性状を持つインヒビターやプロテアーゼは、ベクター由来の新規抗寄生虫薬の標的としても有効であると考えられた。

E. 結論

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 およびロング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。

G. 研究発表

1. 論文発表

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.

2. 学会発表

Abdul Alim, Khyrul Islam, M Anisuzzaman, 三好猛晴、八田岳士、山地佳代子、松林誠、藤崎幸蔵、辻尚利. A novel chymotrypsin inhibitor from the hard tick *Haemaphysalis longicornis* is involved in blood-feeding process. 第80回日本寄生虫学会大会 P. 85

アニスザマン M, Khyrul Islam, Abdul Alim, 三好猛晴、八田岳士、山地佳代子、松林誠、松本安喜、藤崎幸蔵、辻尚利 Longistatin, a novel plasminogen activator from the salivary gland of the ixodid tick with two EF-hand domains, function like serine protease. 第80回日本寄生虫学会大会 P. 84

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
 2. 実用新案登録
 3. その他
- 以上なし

厚生労働科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）

分担課題：日本住血吸虫症の病態発現分子解析

分担研究者 太田伸生

（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科国際環境寄生虫病学分野）

研究協力者 熊谷 貴、関 丈典（同上）

研究要旨

我々は日本住血吸虫(Sj)感染マウスでは IL-4/IL-13 は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。しかしながら、IL-4/IL-13 がどのような機構で肉芽腫性炎症を抑制しているかは不明であった。Sj 感染 IL-4^{-/-}IL-13^{-/-}(DKO)マウスでは好中球浸潤や炎症性サイトカインの産生を誘導する Th17 関連サイトカインの一つである IL-17A の産生が増加しており、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のではないかと考え本研究を実施した。Sj を DKO 群と IL-4^{-/-}IL-13^{-/-}IL-17A^{-/-} (TKO)群及び対照(WT)群に感染させ、肝臓の病態を解析した。結果、WT 群と比べ DKO 群では肉芽腫性炎症の悪化、炎症性サイトカインの発現量の増加や過剰な好中球浸潤が見られたが、DKO 群と TKO 群の間で有意な差は見られなかった。しかしながら TKO 群の肝臓では WT 群と比較して Th17 関連サイトカインで好中球浸潤や炎症性サイトカインの産生に関わる IL-17F や IL-22 の mRNA 発現量が増加していた。したがって IL-4/IL-13 はいくつかの Th17 関連サイトカインの産生を抑制する事により、肝臓での虫卵性肉芽腫性炎症や過剰な好中球浸潤を抑制している事が示唆された。

A. 研究目的

日本住血吸虫(Sj) は宿主の門脈や腸間膜静脈に寄生し、そこで産卵された虫卵は肝臓に蓄積し虫卵性の肉芽腫性炎症を誘導する。この Sj 虫卵抗原は Th2 サイトカインである IL-4 や IL-13 の産生を誘導する事が知られている。我々は IL-4^{-/-}IL-13^{-/-}(DKO) マウスを用いた Sj 感染実験により、感染 6 週間において IL-4/IL-13 が過剰な炎症性サイトカインの誘導や過剰な好中球浸潤を伴う肉芽腫性炎症の悪化を抑制している事を明らかに

してきた。

Th17 は炎症性疾患などに関与しており、炎症性サイトカインの産生や好中球性炎症を誘導する IL-17A を産生する事が知られている。この IL-17A の mRNA 発現は肉芽腫性炎症が悪化した Sj 感染 DKO マウスの肝臓では対象群と比較して有意に上昇していた。さらに IL-17A により産生が誘導される IL-6 や TNF- α の mRNA 発現も Sj 感染 DKO マウスの肝臓では増強されており、Sj 感染 DKO マウスにおける肝臓の病態の悪化には IL-17A が主要な役割を