

マラリアにおける宿主病原体相互関係の解析

研究協力者 群馬大学・医学系研究科・国際寄生虫病学分野 久枝 一

研究要旨

我々はこれまでに赤血球型マラリア原虫の防御に CD8T 細胞が貢献していることを明らかにしてきたが、MHC class I 分子を持たない赤血球に感染するマラリア原虫に対してどのように防御能を発揮するのかは不明であった。本研究ではマウスマラリアモデルを用いて、マラリア原虫が MHC class I 分子を発現する赤芽球に感染すること、さらには CD8T 細胞が感染赤芽球を認識して活性化されることを明らかにした。

A. 研究目的

マラリアは今なお世界中で猛威をふるう感染症であり、ワクチンの開発が望まれて久しい。そのためには、防御免疫を理解することは必要不可欠であるが、マラリア原虫の巧みな免疫回避機構により十分ではない。我々はこれまでに赤血球型マラリア原虫の防御に CD8T 細胞が貢献していることを明らかにしてきたが、MHC class I 分子を持たない赤血球に感染するマラリア原虫に対してどのように防御能を発揮するのかは不明であった。本研究ではマウスマラリアモデルを用いて MHC class I を持つ赤芽球が CD8T 細胞の標的となるかを明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

ネズミマラリア原虫 *Plasmodium yoelii* 17XNL 株に GFP 遺伝子を組み込み、組換え GFP-Py を作製した。また、さらに卵白アルブミン OVA を加えた GFP-OVA-Py も作製した。

マウスに GFP-Py を感染させ、脾臓あるいは骨髓細胞中の赤芽球を、赤血球系のマーカーであるグリコフォリン A、核 DNA を染色し蛍光顕微鏡、フローサイトメーターで観察した。

CD8T 細胞の応答は、OVA を認識する CD8T 細胞のみをもつ OT-I マウスの CD8T 細胞を用いて解析した。

本研究には遺伝子組換え実験、動物実験が含まれるが、いずれも所属機関での承認を受けており、実験指針にそって行われた。

C. 結果

1. マラリア原虫の赤芽球への感染の検証

GFP-Py を感染させたマウスの細胞を蛍光顕微鏡での観察を行った。末梢血中の GFP 陽性の感染赤血球には DAPI に染まるのは小さな原虫の核のみであった（図 1 上段）。一方、溶血した脾臓細胞中には、原虫の核以外の核酸を持った細胞に GFP のシグナルが認められた（図 1 下段）。これはグリコフォリン A を認識する TER119 陽性であり、赤芽球であることが確認された。

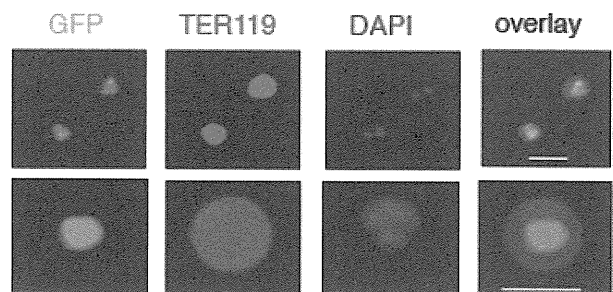


図1 マラリア原虫感染赤芽球
GFP-Py感染マウスより
上段 末梢血中の感染赤血球
下段 脾臓中の溶血抵抗性感染赤芽球

2. CD8T 細胞による感染赤芽球の認識

マラリア原虫の赤芽球感染は証明できたが、CD8T 細胞が認識するかどうかを検討した。まずは、赤芽球が MHC class I を発現するかどうかをフローサイトメーターで確認した。非感染マウスの脾臓での溶血抵抗性 TER119 陽性赤芽球は、通常の脾細胞に比べると発現量は低いものの、MHC class I 分子を発現していた。

次いで、赤芽球が CD8 に認識されるかどうかを OT-I CD8T 細胞を用いて検討した。非感染マウスの赤芽球を精製し OVA の CD8T 細胞エピトープをパルスし、OT-I CD8T 細胞と共培養し OT-I CD8T 細胞による IFN- γ 産生、赤芽球に対する細胞傷害活性で評価した。OVA エピトープ存在下で、OT-I CD8T 細胞は IFN- γ を産生したし、赤芽球に対して細胞死を誘導した。いずれも、エピトープをパルスした脾臓細胞を用いた時よりも応答は弱かった。これは、MHC class I の発現に相関していると思われる。いずれにしても、赤芽球が CD8T 細胞に認識されることは明らかとなつて。

さらに、感染赤芽球が認識されるかどうかを検討するために GFP-OVA-Py を感染させたマウスの感染赤芽球を OT-I CD8T 細胞と共培養した。GFP-Py 感染マウスの感染赤芽球は OT-I CD8T 細胞を活性化することはなかったが、GFP-OVA-Py 感染マウスの感染赤芽球は OT-I CD8T 細胞からの IFN- γ を誘導した。このことは、感染赤芽球が抗原特異的に CD8T 細胞に認識されることを明確にするものである。

D. 考察

マウスマラリアにおいて初めて赤芽球感染を示した。赤芽球感染の割合は低く、好適な宿主細胞ではなく、偶発的に侵入しそこでは発育できないと想定された。本研究では、感染赤芽球内でもマラリア原虫は分裂し、次の感染を起こすことも証明しており、原虫にとっても何らかの意味合いがあることが推察された。

感染赤芽球が CD8T 細胞に認識され、CD8T 細胞を活性化しうることも明らかとなった。赤芽球も通常の細胞と同様に、MHC class I に抗原を提示に関わるマシーナリーを持っていることが知られており、抗原提示できるのであろう。我々が見いだした、赤内マラリアに対する CD8T 細胞の防御メカニズムの一翼を担って

いると考えられる。しかしながら、感染赤芽球に対する細胞傷害活性が生体内でどれほどの防御効果を占めるのかについては今後の検討の課題である。

E. 結論

マウスマラリアモデルにおいて、マラリア原虫が赤芽球に感染すること、さらには CD8T 細胞が感染赤芽球を認識することを世界に先駆けて明らかにした。この結果は、CD8T 細胞を標的とした新たなワクチン戦略の可能性を示すものと期待できる。

F. 研究発表

1. 学会発表

今井孝, 石田英和, 鈴江一友, 平井誠, 谷口委代, 岡田紘子, 鈴木智久, 岩永史郎, 久枝 一 マラリア原虫は赤芽球に感染し CD8 T 細胞を活性化する. 第 81 回日本寄生虫学会大会、兵庫医科大学、兵庫、平成 24 年 3 月 23 日

平井誠, 本間一, 中村昇太, 後藤直久, 美田敏宏, 鈴江一友, 今井孝, 松岡裕之, 安永照雄, 古澤満, 堀井俊宏, 久枝 一, 田邊和祐 超加速変異型ネズミマラリア原虫の創出とその順遺伝学への応用第 81 回日本寄生虫学会大会、兵庫医科大学、兵庫、平成 24 年 3 月 23 日

鈴江一友, 叢 岳, 平井誠, 今井孝, 谷口委代, 岡田紘子, 小安重夫, 鈴木守, 久枝 一 マラリア感染時における他感染症に対する防御能への影響. 第 81 回日本寄生虫学会大会、兵庫医科大学、兵庫、平成 24 年 3 月 24 日

Kazutomo Suzue, Yue Cong, Makoto Hirai, Takashi Imai, Tomoyo Taniguchi, Hiroko Okada, Chikako Shimokawa, Shigeo Koyasu, Mamoru Suzuki, Hajime Hisaeda. Attenuation of protective immunity against bystander infectious agents upon malaria. 第 41 回日本免疫学会総会、神戸国際会議場、兵庫、平成 24 年 12 月 5 日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

マラリア感染における T 細胞免疫応答の研究

研究協力者 長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
感染免疫学講座・免疫機能制御学分野 由井 克之

研究要旨

マラリアは世界的に最も重要な感染症のひとつであるが、ワクチンは確立されていない。ワクチン開発の上では、長期間続く免疫記憶と有効な二次応答を誘導することが重要である。マラリア原虫感染では、免疫記憶が誘導されにくい或いは免疫抑制がかかるといわれており、これらの現象を正確に捉えメカニズムを解明することは重要である。本研究では、*Plasmodium berghei* ANKA 感染のマウス実験モデルを用い、CD8⁺ T 細胞の免疫記憶の誘導と記憶 T 細胞の応答に関して解析を行った。その結果、マラリア原虫感染治癒後記憶 CD8⁺ T 細胞が形成されること、記憶 CD8⁺ T 細胞の原虫感染に対する免疫応答はナイーブ T 細胞の応答に比べてより強く抑制されることが明らかになった。

A. 研究目的

マラリア赤外型感染では、不活化スポロゾイトの免疫により完全な防御免疫が成立することがマウスとヒトの実験系で示されている。しかしながら赤内型感染では防御免疫応答が抑制される。さらに一度防御免疫を獲得しても、流行地を離れて原虫フリーになると防御免疫を失う例も指摘されている。即ちマラリアの記憶は、獲得しがたく失いやすいとされる。本研究では、マラリア原虫 *Plasmodium berghei* ANKA のマウス感染実験モデルを用い、マラリアに対する防御免疫の成立と記憶 T 細胞の活性化について、リステリア菌感染の場合と比較検討した。

B. 研究方法

1. マラリア原虫感染後の免疫記憶
実験モデルでは、モデル抗原 OVA (卵白アルブミン) を発現する組換えマラリア原虫 *Plasmodium berghei* ANKA (PbA-OVA) を用いた。対象群は、OVA を発現するリステリア菌 *Listeria monocytogenes* (LM-OVA) を用いた。マウスに OVA 特異的 T 細胞受容体トランスジェニックマウス OT-I の CD8⁺ T 細胞を受け身移

入し、PbA-OVA 或いは LM-OVA を感染させた。PbA-OVA 感染群では、感染 6 日後から 2 週間にわたり抗マラリア剤で治療し、原虫を排除した。2 ヶ月にわたり末梢血中の OT-I 細胞の比率をモニターした。

2. 記憶 T 細胞のマラリア原虫感染に対する応答

記憶 T 細胞は、*in vitro* で OT-I 細胞に抗原刺激を行い調整するか、*in vivo* で作製した OT-I 記憶細胞をソーティングにより分離して用いた。ナイーブ OT-I 細胞は、Rag ノックアウト OT-I マウス CD8⁺ T 細胞を用いた。記憶 OT-I 細胞とナイーブ OT-I 細胞とを 1:1 で混和し、マウスに受け身移入した。なお、記憶 T 細胞、ナイーブ T 細胞、宿主 CD8⁺ T 細胞を区別するため、CD45.1 と CD45.2 のマーカーを用いた。このマウスに PbA-OVA 或いはコントロールの LM-OVA を感染させ、末梢血や各臓器内の記憶細胞由来 OT-I とナイーブ細胞由来 OT-I 細胞の数をマウス毎に調べた。

記憶 CD8⁺ T 細胞の増殖がマラリア原虫感染において低下する機構を解明するため、PbA-OVA 感染と LM-OVA 感染マウスにおける記

憶とナイーブ OT-I 由来細胞の細胞表面分子の発現を調べた。

C. 結果

1. マラリア原虫感染後の免疫記憶の獲得

感染 2 ヶ月後、PbA-OVA 感染群では 38%、LM-OVA 感染群では 62%のマウスで OT-I 細胞が末梢血中に維持されていた。これらの細胞は、細胞表面分子発現及び機能において記憶細胞であった。さらに OVA を発現する腫瘍細胞の拒絶反応においても PbA-OVA 誘導の記憶細胞は LM-OVA 誘導の記憶細胞と同等の能力を示した。

2. 記憶 T 細胞のマラリア感染に対する応答

記憶とナイーブ OT-I 細胞を移入したマウスの感染実験に結果、マラリア原虫感染では脾臓、リンパ節、骨髄、脳、肝臓、末梢血においてナイーブ細胞由来の OT-I 細胞が記憶細胞由来 OT-I 細胞よりも著名に増加していた。一方 LM-OVA を感染させた場合には、脾臓、骨髄、脳、肝臓、末梢血において記憶細胞由来 OT-I 細胞が著名に増加していた。リンパ節では逆にナイーブ細胞由来 OT-I 細胞の方が多かった。応答を抑制する補助シグナル分子である PD-1 と LAG-3 の発現は、PbA-OVA 感染マウスでは記憶細胞由来 OT-I で亢進していた。一方 LM-OVA 感染マウスでは亢進していなかった。

D. 考察

少なくとも *P. berghei* 感染の動物モデルにおいては、マラリア原虫感染により CD8⁺T 細胞の免疫記憶が成立することが明らかになった。さらにマラリア原虫感染においては、記憶 CD8⁺T 細胞のクローン増殖がナイーブ CD8⁺T 細胞に比べて選択的に抑制される可能性が示唆された。記憶細胞に抑制性補助シグナル分子が高発現されることが、マラリア原虫感染における記憶 CD8⁺T 細胞の増殖抑制に関与している可能性が示唆された。

E. 結論

マラリア原虫感染では、記憶 T 細胞の活性化がナイーブ T 細胞に比べより強く阻害される可能性が示唆された。このメカニズムについては今後さらに詳細な研究が必要であるが、ヒトマラリア感染でも同様な抑制がかかる可能性が考えられる。マラリア原虫感染にお

ける免疫制御機構に関する研究は、ワクチンの有効性を確実にするためにも推進する必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

英文論文

Chapman, L.M., Aggrey, A.A., Field, D.J., Srivastava, K., Ture S., Yui, K., Topham, D.J., Baldwin III, W.M., Morell, C.N., Platelets presents antigen in the context of MHC class I, *J. Immunol.*, 189 (2): 916-923. 2012.

Inoue M., Jianxia T., Miyakoda M., Kaneko O., Yui, K., Culleton R., The species specificity of immunity generated by live whole organism immunization with erythrocytic and pre-erythrocytic stages of rodent malaria parasites and implications for vaccine development, *Int. J. Parasitol.*, 42; 859-870. 2012.

Miyakoda, M., Kimura, D., Honma, K., Kimura, K., Yuda, M., Yui, K. Development of memory CD8⁺ T cells and their recall responses during blood-stage infection with *Plasmodium berghei* ANKA. *J. Immunol.*, 189(9) : 4396-4404. 2012.

2. 学会発表

モデル抗原組換えマラリア原虫を用いた肝細胞期防御免疫機構の解析、木村一美、木村大輔、都田真奈、本間季里、田村隆彦、油田正夫、由井克之、第 65 回日本寄生虫学会南日本支部大会第 62 回日本衛生動物学会南日本支部大会合同大会、11 月 10-11 日、2012 年

IRF4 controls cytokine signals and plays critical roles for proliferation and differentiation of CD8⁺ T cells. M. Miyakoda, Honma, D. Kimura, K. Kimura, T. Matsuyama, K. Yui 第 4 1 回日本免疫学会学術集会、12 月 5-7 日、2012 年

CD4⁺ T cells produce EBI-3⁺ cytokine inhibiting their own protective immune responses during infection with malaria parasites. D. Kimura, M. Miyakoda, Honma, K. Kimura, H. Hara, H. Yoshida, K. Yui 第 4 1 回日本免疫学会学術集会、12 月 5-7 日、2012 年

Negative regulation of Th2-type cytokine

production by IRF4 in natural helper cells. K. Honma, D. Kimura, K. Kimura, M. Miyakoda, M. Kazuyo, S. Koyasu, T. Matsuyama, K. Yui 第41回日本免疫学会学術集会、12月5-7日、2012年

Regulation of T cell responses during infection with *P. berghei* ANKA leading to the protective immunity and pathogenesis of cerebral malaria. D. Kimura, M. Miyakoda, K. Kimura, K. Yui, The 6th Nagasaki symposium on tropical and emerging infectious diseases, The 11th Nagasaki-Singapore medical symposium. Dec. 10-12, 2012

Development of memory CD8⁺ T cells and their recall responses during blood-stage infection with *Plasmodium berghei* ANKA., M. Miyakoda, D. Kimura, K. Honma, K. Kimura, M. Yuda, K. Yui. Immunological mechanisms of vaccination, Part of the Keystone symposia global health series, Dec. 13-18, 2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

マラリア原虫感染赤血球膜タンパク質輸送の解析

研究協力者 長崎大学・熱帯医学研究所・原虫学分野 金子 修

研究要旨

マラリアの中でも最も危険な悪性マラリアを引き起こす熱帯熱マラリア原虫は、病原性に関わる接着分子等を感染赤血球内に形成するマウレル裂と呼ばれる膜構造物を経て赤血球表面に輸送する。原虫分子の輸送を阻害することで病原性を軽減できるため、この分子輸送機構の解明は重要な研究課題である。マウレル裂と感染赤血球表面に局在する接着分子候補で surf 多重遺伝子族がコードする SURFIN は、熱帯熱マラリア原虫以外のマラリア原虫種にも相同体が存在し、かつ感染赤血球に局在する唯一の分子であるため、本研究では、その中でも転写量が最も多いにもかかわらず、感染赤血球へは輸送されないと報告されていた SURFIN_{4.1} について再評価を行った。その結果、組換えタンパク質 SURFIN_{4.1} は感染赤血球へ輸送されており、その輸送にはアミノ末端側配列が必須で、かつ膜貫通領域周辺配列が輸送効率に大きく影響することがわかった。

A. 研究目的

マラリアはいまだに熱帯・亜熱帯地域を中心に世界に蔓延し、早急に対策を進めるべき問題である。マラリアの中でも最も危険な悪性マラリアを引き起こす熱帯熱マラリア原虫は、病原性に関わる接着分子等を感染赤血球内に形成するマウレル裂と呼ばれる膜構造物を経て赤血球表面に輸送する。原虫分子の輸送を阻害することで病原性を軽減できるため、この分子輸送機構の解明は重要な研究課題である。マウレル裂と感染赤血球表面に局在する接着分子候補で surface-associated interspersed gene (surf) 多重遺伝子族がコードする一回膜貫通型タンパク質 SURFIN は、熱帯熱マラリア原虫以外のマラリア原虫種にも相同体が存在し、かつ感染赤血球に局在する唯一の分子であるため、本研究では、マラリア原虫種を通じて保存された輸送機序を明らかにする事を念頭に、SURFIN_{4.1} と呼ばれるメンバーについて、その局在を再評価し、マウレル裂への輸送に必要な領域を明らかにすることとした。

B. 研究方法

SURFIN_{4.1} の相補的 DNA の塩基配列を複数の原虫株において決定した。SURFIN_{4.1} の全長を Ty タグ配列と緑色蛍光タンパク質(GFP)と融合した組換え全長 SURFIN_{4.1} を発現する組換え熱帯熱マラリア原虫、組換え全長 SURFIN_{4.1} から種々の領域を除去した組換え部分 SURFIN_{4.1} を発現する原虫、さらに、細胞膜領域周辺の配列を SURFIN とは関係のないタンパク質の相当領域と入れ替えた組換え SURFIN_{4.1} を発現する原虫を作製した。間接蛍光抗体法により、組換え SURFIN_{4.1} と種々の局在マーカーの共局在を検討した。精製した原虫虫体からトリトン X-100 により抽出した膜タンパク質を免疫沈降することによりタンパク質複合体形成を検討した。

C. 結果

①相補的 DNA の塩基配列の再評価を行った結果、以前の報告とは異なり、SURFIN_{4.1} は株により、細胞内領域に他の SURFIN 相同体との間で保存しているトリプトファンに富んだ領域を2つ含むものと全く含まないものと

の2種類があった。②3D7株の全長SURFIN_{4.1}をタグタンパク質との融合タンパク質として発現させたところ、SURFIN_{4.1}は感染赤血球へは輸送されていないとした以前の報告とは異なり、感染赤血球内のマウレル裂に局在した。③ブレフェルディンA処理により、粗面小胞体マーカールと共局在を示したため、SURFIN_{4.1}は粗面小胞体を経て細胞外へ輸送されることが示唆された。④膜貫通領域は粗面小胞体への移行に必須であった。⑤SURFIN_{4.1}の細胞外領域のシステインに富んだ領域とそれに続く相同体間で多様性に富んだ領域があると、内在性のSURFIN_{4.1}と複合体を形成して、マウレル裂へ輸送されてしまうことが分かった。⑥アミノ末端側にマウレル裂へ輸送されるシグナルが2つ存在する事が分かった。⑦細胞膜貫通領域と直後の細胞内領域を関係のないタンパク質に置換すると、マウレル裂への輸送効率が落ちた。

D. 考察

熱帯熱マラリア原虫が感染赤血球内へ原虫分子を輸送するシグナルとして、輸送される分子のアミノ末端側疎水性領域と5つのアミノ酸からなる *Plasmodium* export element (PEXEL) と呼ばれるモチーフを用いる PEXEL 依存性輸送と、PEXEL モチーフを持たないアミノ末端領域と膜貫通領域を用いる PEXEL 非依存性輸送が知られている。本研究によりSURFIN_{4.1} は原虫内では粗面小胞体を経由する古典的分泌経路を用い、マウレル裂への輸送は PEXEL モチーフに依存しないものの、アミノ末端領域を必要とし、膜貫通領域が輸送効率に大きく影響することが明らかとなり、SURFIN_{4.1} の輸送は既知の PEXEL 非依存性輸送と同じ特徴を持つ事が明らかとなった。

E. 結論

熱帯熱マラリア原虫以外のマラリア原虫種にも相同体が存在し、かつ感染赤血球に局在する唯一の分子である SURFIN の輸送が PEXEL 非依存性輸送と同じ特徴を持つことは、マラリア原虫の赤血球へのタンパク質輸送において PEXEL 非依存性輸送がより古典的である事を意味するのかもしれない。

G. 研究発表

1. 論文発表

和文論文

金子修 ノーベル賞の医学の進歩・発展 (3) マラリア原虫発見の歴史と今日的課題 最新医学 pp 2828-2830 (2012年 67巻 12号)

英文論文

Asada M, Goto Y, Yahata K, Yokoyama N, Kawai S, Inoue N, **Kaneko O**, Kawazu S-I. Gliding motility of *Babesia bovis* merozoites visualized by time-lapse video microscopy. *PLoS ONE* 7(4):e352272012 (2012/04).

Tang J, Dai Y, Zhang H, Culleton RI, Liu Y, Zhao S, Wang X, Guan X, **Kaneko O**, Zhu Y. Positive diversifying selection on *Plasmodium vivax* RON2 protein. *Parasitology* 139(6):709-15 (2012/05)

Kaewthamasorn M, Yahata K, Alexandre JSF, Xangsayarath P, Nakazawa S, Torii M, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, **Kaneko O**. Stable allele frequency distribution of the polymorphic region of SURFIN_{4.2} in *Plasmodium falciparum* isolates from Thailand. *Parasitol International* 61(2):317-23 (2012/06)

Inoue M, Tang J, Miyakoda M, **Kaneko O**, Yui K, Culleton R. The species specificity of immunity generated by live whole organism immunization with erythrocytic and pre-erythrocytic stages of rodent malaria parasites and implications for vaccine development *Int J Parasitol* 42(9):859-70 (2012/08).

Alexandre JSF, Xangsayarath P, Kaewthamasorn, Yahata K, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, **Kaneko O**. Stable allele frequency distribution of the *Plasmodium falciparum* clag genes encoding components of the high molecular weight rhoptry protein complex. *Trop Med Health* 40(3):71-7 (2012/09).

Xangsayarath P, Kaewthamasorn K, Yahata K, Nakazawa S, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, **Kaneko O**. Positive diversifying selection on the *Plasmodium falciparum* *surf*_{4.1} gene in Thailand. *Trop Med Health* 40(3):79-89 (2012/09).

Tachibana S, Sullivan SA, Kawai S, Nakamura S, Kim HR, Goto N, Arisue N, Palacpac NMQ, Honma H, Yagi M, Tougan T, Katakai Y, **Kaneko**

Q, Mita T, Kita K, Yasutomi Y, Sutton PL, Shakhbatyan R, Horii T, Yasunaga T, Barnwell JW, Escalante AA, Carlton JM, Tanabe K. *Plasmodium cynomolgi* genome sequences provide insight into *Plasmodium vivax* and the monkey malaria clade. *Nat Genet* 44(9):1051-5 (2012/09).

Zhao H, Konishi A, Fujita Y, Yagi M, Ohata K, Aoshi T, Itagaki S, Sato S, Narita H, Abdelgelil NH, Inoue M, Culleton R, **Kaneko O**, Nakagawa A, Horii T, Akira S, Ishii KJ, Coban C. Lipocalin 2 bolsters innate and adaptive immune responses to blood-stage malaria infection by reinforcing host iron metabolism. *Cell Host & Microbe* 12(5), 705-16 (2012/11)

Morita M, Sanai H, Hiramoto A, Sato A, Hiraoka O, Sakura T, **Kaneko O**, Masuyama A, Nojima M, Wataya Y, Kim H-S. *Plasmodium falciparum* endoplasmic reticulum-resident calcium binding protein is a possible target of synthetic antimalarial endoperoxides, N-89 and N-251. *J Proteome Res* 11(12):5704-11 (2012/12)

Yahata K, Treeck M, Culleton R, Gilberger TW, **Kaneko O**. Time-lapse imaging of red blood cell invasion by the rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii*. *PLoS ONE* 7(12):e50780 (2012/12)

Sakura T, Yahata K, **Kaneko O**. The upstream sequence segment of the C-terminal cysteine-rich domain is required for microneme trafficking of *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding antigen 175. *Parasitol Int* 62(2):157-64 (2012/12)

Zhu XT, Yahata K, Alexandre JSF, Tsuboi T, **Kaneko O**. The N-terminal segment of *Plasmodium falciparum* SURFIN_{4.1} is required for its trafficking to the red blood cell cytosol through the endoplasmic reticulum. *Parasitol Int* 62(2):215-29 (2012/12)

2. 学会発表

Mutungi JK, Kaewthamasorn M, Culleton R, Sakaguchi M, Yahata K, **Kaneko O**. Expression of PyRON5, a *Plasmodium yoelii* rhoptry neck protein in merozoite and sporozoite. (oral) The 15th Japan-Korea Parasitologists' Seminar, Miyazaki Aoshima Palmbeach Hotel, Miyazaki, Japan (2012. May. 23-25)

金子修. 共生非依存的に進化したオルガネラによるマトリョーシカ化機構. (oral) 第1回マトリョーシカ型生物学研究会、国立感染症研究所、東京 (2012. July. 20-22)

Xangsayarath P, Kaewthamasorn M, Yahata K, Nakazawa S, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, **Kaneko O**. Positive diversifying selection on the *Plasmodium falciparum* surf_{4.1} gene in Thailand. (poster) 第53回日本熱帯医学会大会、とちぎプラザ、北海道 (2012. Sep. 5-6)

Jiang N, Sakaguchi M, Alexandre J, Yahata K, Tsuboi T, Chen Q, **Kaneko O**. Role of the C-terminal region of *Plasmodium falciparum* antigen 332 on the location in the parasite-infected red blood cell. (poster) 2012 (23rd) Annual Molecular Parasitology Meeting, Marine Biological Laboratory, Woods Hole, USA (2012. Sep. 22-26)

Sakura T, Yahata K, **Kaneko O**. Involvement of the upstream of C-terminal cysteine-rich domain in the microneme trafficking of erythrocyte binding antigen-175 in *Plasmodium falciparum*. (poster) 2012 (23rd) Annual Molecular Parasitology Meeting, Marine Biological Laboratory, Woods Hole, USA (2012. Sep. 22-26)

Zhu X, Yahata K, Alexandre JSF, **Kaneko O**. Recombinant *Plasmodium falciparum* SURFIN_{4.1} protein is exported to the parasite-infected red blood cell. (poster) 2012 (23rd) Annual Molecular Parasitology Meeting, Marine Biological Laboratory, Woods Hole, USA (2012. Sep. 22-26)

佐倉孝哉、矢幡一英、**金子修**. 熱帯熱マラリア原虫 EBA-175 のマイクロネーム輸送に必要な領域の同定. (oral) 第72回日本寄生虫学会東日本支部会、第10回分子寄生虫・マラリアフォーラム合同大会、群馬大学医学部、群馬 (2012. Oct. 12-13)

宮崎真也、Zhu X、矢幡一英、**金子修**. マラリア原虫の赤血球へのタンパク質輸送機構に関する研究. (oral) 第1回日本細胞共生学会若手の会、下田臨海実験センター、静岡 (2012. Nov. 7-9)

Zhu X, Yahata K, Alexandre JSF, **Kaneko O**.

Deciphering the export signal of *Plasmodium falciparum* protein exported to the parasite-infected red blood cell. (oral) The 6th Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases and The 11th Nagasaki-Singapore Medical Symposium, Ryojun Auditorium, Nagasaki University, Nagasaki, Japan (2012. Dec. 10-12)

Lucky A, Yahata K, Iwata N, Kaneko O. Trafficking and assembly of malarial exported proteins in the *Plasmodium falciparum*-infected red blood cell. (poster) The 6th Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases and The 11th Nagasaki-Singapore Medical Symposium, Ryojun Auditorium, Nagasaki University, Nagasaki, Japan (2012. Dec. 10-12)

Zhu X, Yahata K, Alexandre JSF, Tsuboi T, Kaneko O. The N-terminal segment of *Plasmodium falciparum* SURFIN_{4.1} is required for its trafficking to the red blood cell cytosol through the endoplasmic reticulum. (poster) The 6th Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases and The 11th Nagasaki-Singapore Medical Symposium, Ryojun Auditorium, Nagasaki University, Nagasaki, Japan (2012. Dec. 10-12)

Jiang N, Sakaguchi M, Alexandre J, Yahata K, Tsuboi T, Chen Q, Kaneko O. Role of the C-terminal region of *Plasmodium falciparum* antigen 332 on the location in the parasite-infected red blood cell. (poster) The 6th Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases and The 11th Nagasaki-Singapore Medical Symposium, Ryojun Auditorium, Nagasaki University, Nagasaki, Japan (2012. Dec. 10-12)

Yahata K, Kaneko O. Time-lapse imaging of red blood cell invasion by rodent malaria parasites. (poster) The 6th Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases and The 11th Nagasaki-Singapore Medical Symposium, Ryojun Auditorium, Nagasaki University, Nagasaki, Japan (2012. Dec. 10-12)

Asada M, Goto Y, Yamagishi J, Yahata K, Yokoyama N, Inoue N, Kaneko O, Kawazu S. *In vitro* imaging of gliding motility on *Babesia bovis* merozoites. (poster) The 6th Nagasaki

Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases and The 11th Nagasaki-Singapore Medical Symposium, Ryojun Auditorium, Nagasaki University, Nagasaki, Japan (2012. Dec. 10-12)

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

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」

研究協力者 報告書

マラリア原虫に有効な新規阻害剤の探索

研究協力者 金 恵淑

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・国際感染症制御学分野・准教授

研究要旨

熱帯熱マラリア原虫に有効な新規抗マラリア薬の候補化合物を探索するために、分子内にペルオキシドを有する化合物の中から環状過酸化化合物・N-89を見出した。この化合物は *in vitro*, *in vivo* の両実験系で優れた抗マラリア活性と完治効果を併せ持つことが判った。今までの体内動態解析研究より、マラリア流行地の状況に合わせた軟膏製剤も他の懸濁剤と同様に抗マラリア薬効を発揮することを確認した。今年度は過酸化構造を有する有機合成品、及び天然生薬資源由来の化合物、計 31 種について *in vitro* での薬効評価を行った。また、*P. chabaudi* 感染マウスを用いた薬効評価系を新たに構築し、リング期の原虫、及び栄養体の原虫に阻害活性を示す化合物を特異的に選抜できることを確認した。

A. 研究目的

近年 Artemisinin をベースに他の抗マラリア薬を併用した ACT (Artemisinin-Combination Therapy) 療法が WHO を中心に展開されているが、カンボジア国境を中心にこれら ACT 耐性の熱帯熱マラリア原虫が報告され、新しい抗マラリア薬の開発の重要性が急務になっている。

私は抗マラリア新薬開発研究で得られた分子内ペルオキシド構造を含む有機合成化合物に優れた抗マラリア活性を見出し、将来抗マラリア薬として臨床の現場で使用することを念頭において研究を進めた。そこで、マラリア流行地の状況を考慮し、安価で大量に有機合成しやすい化合物を選抜する。また、*in vivo* 抗マラリア薬効解析を容易に行うことが出来る評価系を構築し、*in vitro* 評価系で見出された候補化合物の作用機序の解析研究（マラリア原虫の生育ステージを中心に）を同時に行った。

B. 研究方法

1. N-89 軟膏製剤の体内動態解析と抗マラリア薬効評価

LC/MS/MS を用いた N-89 の検出条件をもとに、新しい処方で作成した N-89 の配合率を 0~150mg/Kg まで含む種々の軟膏製剤を作成した。基剤はオイルと白色ワセリンで均一になるように混ぜた。N-89 軟膏製剤をマウスの背の毛の刈った部分に塗布し、乾燥してからケージに戻した。単回塗布、あるいは複数回塗布し、0~12 時間までの血液サンプルを用いて N-89 含有量を測定した。マウスに従来のオイル溶解した N-89 を投与する群をコントロールとした。抗マラリア薬効解析は *in vivo* 4-day suppressive test 法で行った (*P. berghei* NK65 株感染マウスを用い、1 回/日×4 日間連続薬剤投与後、次の日に感染率で阻害能を見る方法)。

2. *P. chabaudi* 感染マウスを用いた *in vivo* 薬効評価系の構築

抗マラリア薬効評価系で用いる *in vivo* 実験系は *P. berghei* NK65 株感染マウスを用いて行うが、この評価系では様々なステージの原虫が混在し、薬剤評価時に原虫の総阻害能として算出する。私たちはメラトニン添加によりマラリア

原虫の周期性が見られる論文報告から、*P. berghei* NK65 株感染マウスにメラトニン（最大 150mg/kg）を投与したが、マラリア原虫の周期性に影響する結果が得られなかった。そこで、ネズミマラリア原虫株によって周期性の相違有無を調べた。*P. chabaudi chabaudi* 感染マウスを用い、感染率の増殖カーブの作成、メラトニン添加有無による周期性の変化、及び、マラリア原虫のステージ変動を経時的に検討した。Positive control として N-89 作用時のマラリア原虫ステージの変動についても比較解析した。

2. 過酸化構造を有する化合物、及び天然生薬資源を用いた *in vitro* 薬効解析

培養熱帯熱マラリア原虫 *P. falciparum* (FCR-3 株) を用い、初期感染率 0.3%、ヘマトクリット値 3% の条件で 24 well plate に感染赤血球浮遊液を入れ、DMSO 等で溶解した化合物を添加して 72 時間培養後、感染率の変動より阻害能を算出する。

C. 研究結果

難溶性薬物の体内動態の改善とマラリア流行地の現状を考慮した剤形として N-89 軟膏製剤の可能性について検討した。軟膏の基剤としてオイル：白色ワセリン(2:8 (v/w)) で N-89 を均一となるように混ぜ、マウスの毛を刈った背の部分に塗り、乾燥後にケージに戻した。健康なマウスを用いた単回、及び複数回塗布時の体内動態解析の結果、基剤として用いた溶剤が検出法に影響したか、あるいは、体内動態の検出感度以下であったために定量することが出来ない。一方、*P. berghei* NK65 感染マウスを用いた 4-day suppressive test の結果、ED₅₀ 及び ED₉₀ 値は 30mg/kg と 45mg/kg で従来の他の投与ルートと比較して同程度か劣る値であった。延命率は 150mg/kg 投与群で実験群の 80% が生存し、60 日以上生存した。この結果より N-89 軟膏製剤は抗マラリア薬効を示し、延命効果を合わせて持つが、体内動態の解析が不十分であるため、再現性の実験が必要がある。

今まで *in vitro* の熱帯熱マラリア原虫に強い阻害活性を示す化合物は、次にネズミマラリア原虫感染マウス (*P.*

berghei NK65 株) 系で薬効解析を行っていたが、この評価系ではマラリア原虫の阻害能（メロゾイト期の原虫～分裂期のスカイゾント原虫を全て含む）のみ評価出来る。そのため、私たちは特定のマラリア原虫、即ち、マラリア原虫の代謝・成長が盛んな原虫（栄養体）に作用する抗マラリア薬の開発評価系が構築できれば、マラリア原虫の阻害能とマラリア原虫の作用ステージの両方が解析できるのではと考え、研究を行った。その結果、ネズミマラリア原虫 (*P. chabaudi chabaudi*) を感染させたマウスの特定時期にトロポゾイト期の原虫が全原虫の 7 割以上含まれていることが分かった。この現象は *P. berghei* NK65 株を感染させたマウス系では見られない。また、メラトニンを処理しても特定ステージの割合が増えるなどの変化は見られず、これら現象は *P. chabaudi chabaudi* 原虫由来であると考えられる。コントロールとして用いた N-89 では従来の報告通りにトロポゾイト期の原虫を特異的に阻害する予備的な結果を得た。現在、最適の評価系を構築するための条件検討（原虫の感染数、原虫ステージの変動、薬剤の処理時期など）を行っている。

In vitro 薬効評価に用いた計 31 種の化合物は、いずれも 1 μ M 程度で熱帯熱抗マラリア活性を示すか、あるいは、それ以下の濃度で阻害活性を示した。哺乳動物細胞への細胞毒性も解析したが、阻害活性は抗マラリア活性と同等、あるいは若干弱く、結果として 10 倍以下の選択毒性を示すことが分かった。そのうち、天然生薬資源由来の 2 化合物については抗マラリア活性は 1 μ M と弱いものの、化合物の基本構造が抗マラリア活性を示す論文報告があることから、活性改善のために誘導体を合成してさらに評価する。

D. 考察

分子内のペルオキシド構造を有する化合物は抗マラリア活性と安全性を同時に有しており、アルテミシニンと比較して単剤で完治能力を示した。現在 WHO はアルテミシニンを主とした併用法 (Artemisinin-Combination Therapy (ACT)) を推奨しているが、既にカンボジアを中心とした東南アジアで ACT に耐性

を示す熱帯熱マラリア原虫の出現が報告されている。従って、ACT 耐性の克服にも N-89 は力を発揮すると考えられる。マラリア流行地でこれら環状過酸化化合物が新規抗マラリア薬として使用されるためには、現地の劣悪な環境での化合物の投与ルートと安定性維持など解決する問題点がいくつかある。そのため、安定性を含めた安全性試験の詳細も平行していく。

薬効評価系の試みとして *P. chabaudi chabaudi* 感染マウスを用いた特異的ステージの原虫を阻害する阻害剤の開発研究も構築することができたが、日周性を引き起こす機序についての解析がさらに必要になる。加えて、*in vitro* で抗マラリア薬効を示す新規阻害剤の探索研究は論文報告をもとに効率よく阻害剤の選抜を行って行く必要がある。

E. 結論

安全で簡単な構造を有する環状過酸化化合物 (N-89) は水に難容性であるため、体内利用率を改善させた新しい製剤として軟膏製剤としても有用であることが判った。新しいマウスの薬効評価系でも N-89 はトロポゾイト基の原虫を特異的に阻害し、抗マラリア作用を示すことが確認できた。これら結果を基にマラリア流行地で使用可能で且つ作用機序の明らかな新規抗マラリア薬を開発するための解析をさらに進める。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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*, 39, 127-137, 2013

2. Morita, M., Sanai, H., Hiramoto, A., Sato, A., Hiraoka, O., Sakura, T., Kaneko, O., Masuyama, A., Nojima, M., Wataya, Y. and Kim, H.-S. *Plasmodium falciparum* endoplasmic reticulum-resident calcium binding protein is a possible target of synthetic antimalarial endoperoxides, N-89 and N-251. *J Proteome Res.*, 11, 5704-5711, 2012
3. Tanaka Y, Sakamoto A, Inoue T, Yamada T, Kikuchi T, Kajimoto T, Muraoka O, Sato A, Wataya Y, Kim H.-S., and Tanaka R. Andiroloides HeP from the flower of *andiroba (Carapa guianensis, Meliaceae)*. *Tetrahedron*, 68, 3669-3677, 2012

2. 学会発表

1. 薬剤耐性マラリアの最新の知見—新規治療薬開発研究の現況—。金 惠淑、綿矢 有佑。第60回日本化学療法学会学術集会、2012年4月26-27、長崎
2. New Antimalarial Endoperoxides - Bench to Bed for Malaria Control-
Hye-Sook Kim, Masayuki Morita, Bun Kou, Akira Sato, Yusuke Wataya. New drug development research of antimalarial endoperoxide N-251. 5th Asean Congress of Tropical Medicine and Parasitology, 15-17, May, 2012, Manila
3. Morita M., Hiramoto A., Okada K., Wakimoto T., Katamoto A., Watanabe H., Takahashi T., Imada C., Sato A., Higaki K., Wataya Y., Kim H. S. Forum Cheju 15 The 15th Japan-Korea Parasitologists' Seminar、2012年5月、Miyazaki

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」

研究協力者 報告書

住血原虫症の伝播、病態、創薬に関する研究

研究協力者 北海道大学大学院・獣医学研究科 片倉 賢

研究要旨

中国の *Leishmania infantum*29 株についてマイクロサテライト遺伝子解析を行ったところ、Pop-1 (13 株) と Pop-2 (16 株) の 2 つの集団に分かれた。系統樹解析では、Pop-1、Pop-2 ともに既知の他国の *L. infantum* や *L. donovani* の集団とは独立した集団であったことから、中国の *L. infantum* 株は、近年、他地域から輸入されたものものではなく、独自に進化した可能性が示唆された。吸血性サンガメの唾液腺由来蛋白 dimiconin の組換えタンパクについて、血液凝固に及ぼす影響を検討したところ、dimiconin は内因系凝固カスケードの初期段階である fXII から fXIIa への活性化段階を阻害する新規の血液凝固阻害物質であることが判明した。ミャンマー産薬用植物 *Vites repens* のエタノール抽出物から抗トリパノソーマ活性をもつ化合物として resveratrol、11-*O*-acetyl bergenin および stigmast-4-en-3-one を分離した。

A. 研究目的

(1) 中国の *Leishmania infantum* 株についてマイクロサテライト遺伝子をマーカーとするタイピング解析を行い、集団構造と株間の系統関係を明らかにする。(2) ベクターの唾液腺由来生理活性物質の性状と吸血における役割を明らかにする。(3) 天然薬用植物に由来する抗トリパノソーマ活性物質を探索する。

B. 研究方法

(1) 中国の *Leishmania infantum* 株のマイクロサテライト遺伝子解析
リーシュマニア症はアジア各地への拡大が懸念されている。マイクロサテライト DNA をマーカーとする解析方法 (MLMT, Multilocus microsatellite typing) は、同一原虫種の株間の区別や系統解析に有用である。近年、世界各地のリーシュマニア種について解析が行われているが、中国のリーシュマニア株については、解析があまり進められていない。本研究では、1950 年から 2001 年の間に分離された *Leishmania infantum*29 株について、14 のマイクロサテライトマーカー DNA を PCR 増幅し、それらの塩基配列を決定した。得られたデータについて、集団構造は STRUCTURE software を用い、遺伝的距離は MICROSAT と POPULATIONS software を用いて解析した。系統樹は POPULATIONS and MEGA 3.1 を用いて作成し、遺伝子座の多様性は GDA software

を用いて解析した。

(2) サンガメの唾液腺由来血液凝固阻害物質の機能解析

吸血性サンガメはシャーガス病を媒介するベクターであるが、唾液腺成分は止血阻害、血管拡張、抗炎症などの作用をもち、これを宿主に注入して効率よく吸血を行う。本研究では、*Triatoma pallidipennis* 唾液腺由来のトロンビン活性阻害物質 triabin と相同性をもつ分子、*T. dimidiata* の triabin 様タンパク (dimiconin と命名) の組換えタンパクを作製し、dimiconin が血液凝固に及ぼす影響を検討した。

(3) ミャンマー産薬用植物から分離・精製した抗トリパノソーマ活性物質

ミャンマーは薬用植物資源が豊富にあり、民間薬として様々な病気に用いられているが、科学的薬効に関する研究は少ない。これまでの研究で、ミャンマー産薬用植物のブドウ科の薬用植物である *Vites repens* のエタノール抽出物にも抗トリパノソーマ活性があることを報告してきたが、今回、有効成分を精製し、各磁気共鳴、赤外スペクトル、質量スペクトルなどの各種スペクトルデータを解析し、その構造を決定した。

C. 結果

(1) 中国の *Leishmania infantum* 株のマイクロサテライト遺伝子解析

中国の *L. infantum*29 株の MLMT において、14 のマーカーのうち 13 のマーカーから変異が

認められ、全体としては2つの集団 (Pop-1 と Pop-2) に分離された。Pop-1 は13株、Pop-2 は16株であったが、中国国内に混在して分布していた。系統樹解析から、Pop-1 は、リーシュマニアの種分類の基本となっている15種類の酵素の電気泳動パターンによる zymodeme 分類では MON-1 タイプに属することが示唆された。一方、Pop-2 は MON-1 以外のタイプの総称である non-MON-1 タイプであり、株間変異が Pol-1 よりも大きかった。系統樹解析では、Pop-1、Pop-2 とともに既知の他国の *L. infantum* や *L. donovani* の集団とは独立した集団であることが示された。つまり、解析した中国の *L. infantum* 株は、近年、他地域から輸入されたものものではなく、独自に進化した可能性が示唆された。

(2) サシガメの唾液腺由来血液凝固阻害物質の機能解析

大腸菌発現系を用いて作製した dimiconin の組換えタンパクは、内因系凝固活性の指標である活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) を延長させたが外因系凝固活性の指標であるプロトロンビン時間 (PT) は延長させなかった。このことから dimiconin は、トロンビン活性ではなく内因系凝固の阻害物質であることが示唆された。次に、dimiconin が凝固カスケードのどの段階に作用するか検討したところ、XIIa 因子 (fXIIa) の活性を濃度依存的に阻害し、その下流にある fIXa および fXa の活性を高濃度で阻害したことから、dimiconin は内因系凝固カスケードの初期段階である fXII の作用を阻害する物質であることが明らかになった。また、組換え fXII を用いた実験から、dimiconin は fXIIa の酵素活性ではなく、fXII から fXIIa への活性化段階を阻害することが分かった。以上の結果から、dimiconin はサシガメが吸血する際に血液凝固の接触相を阻害する役割を果たしていると考えられた。

(3) ミャンマー産薬用植物から分離・精製した抗トリパノソーマ活性物質

Vites repens のエタノール抽出物から抗トリパノソーマ活性をもつ化合物として resveratrol、11-O-acetyl bergenin および stigmast-4-en-3-one を分離・精製することに成功した。*Trypanosoma evansi* の trypomastigote 型虫体の *in vitro* における50%増殖阻害濃度(IC₅₀)は、それぞれ、31.4、61.2、62.8 μg/ml であった。

D. 考察

中国ではかつて都市部でも内臓リーシュマニア症が流行し、anthroponotic な *L. donovani* と zoonotic な *L. infantum* が混在するとされてきたが、国家的対策が実施され、1951年以降は患者数が激減した。しかし、2005年から2010年の間に2,000名を超える内臓リーシュマニア症患者が報告され、その約98%はXinjiang、

Gansu、Sichuan の3つの行政区に集中している。anthroponotic タイプはXinjiang に分布し、砂漠(desert)の zoonotic タイプはXinjiang と Gansu に、そして山岳(mountainous)の zoonotic タイプはSichuan、Shaanxi、Shaxi に分布するとされる。今回解析した *Leishmania infantum* 29株は1950年から2001年の間に分離された古い株であり、また、検査数も少ないため、今後は最近の分離株についても解析し、より詳細に全体像明らかにする必要がある。

サシガメの唾液腺成分はリポカリン分子を多く含んでいる。リポカリンは疎水性物質の運搬体として名付けられた分子量1.5~2.5万の細胞外分泌タンパク質で、緑色硫黄細菌、プロテオバクテリア、脊椎動物、一部の無脊椎動物と植物に存在することが知られている。リポカリンは、フェロモンなどのリガンド輸送、感覚伝達、無脊椎動物の背地適応、膜の修復、プロスタグランジンD合成、脂質Aへのアシル基転移反応、細胞分化、細菌の感染阻止など、様々な生物機能に関わっている。*T. pallidipennis* 唾液腺由来の triabin はリポカリンの一種でトロンビン活性阻害活性を有するが、*T. dimidiata* から発見した triabin 様タンパクの dimiconin はトロンビン活性を阻害するのではなく、内因系凝固カスケードの初期段階である fXII から fXIIa への活性化段階を阻害すること判明した。このように、サシガメの唾液腺成分には独特な生理活性をもつ分泌タンパクが存在するため、今後、吸血における役割についてさらに検討する必要がある。

ブドウ科の薬用植物である *Vites repens* はミャンマー産薬用植物60種類をスクリーニングした中で最も強い抗エバンズ・トリパノソーマ活性を示した植物であった。この根皮はミャンマーでは薬用医薬品として、潰瘍、肝炎、黄疸、腫瘍などの疾患に対して使用されている。今回、分離された resveratrol はポリフェノールの一種でブドウの果皮などに含まれる抗酸化物質として知られている。bergenin はイソクマリン誘導体であり、抗潰瘍作用が報告されている。根皮のアルコール抽出液は細胞毒性も少なかったことから、臨床応用も期待できる。

E. 結論

中国で分離された *Leishmania infantum* 株は2つの集団に分かれるが、それぞれ、独自に進化した可能性が示唆された。吸血性サシガメの唾液腺由来蛋白 dimiconin は内因系凝固カスケードの初期段階である fXII から fXIIa への活性化段階を阻害する新規の血液凝固阻害物質であることが明らかになった。ミャンマー産薬用植物 *Vites repens* のエタノール抽出物から抗トリパノソーマ活性をもつ化合物として resveratrol など3種類の化合物を分離、精製した。

F. 健康危険情報 該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

英文論文

Alam MZ, Yasin MG, Kato H, Sakurai T, Katakura K: PCR-based detection of *Leishmania donovani* DNA in a stray dog from a visceral leishmaniasis endemic focus in Bangladesh. *J Vet Med Sci* 75, 75-78, 2013

Doi J, Hirota J, Morita A, Fukushima K, Kamijyo H, Ohta H, Yamasaki M, Takahashi T, Katakura K, Oku Y: Intestinal *Tritrichomonas suis* (= *T. foetus*) infection in Japanese cats. *J Vet Med Sci* 74, 413-417, 2012

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

Fujita M, Kato H, Cáceresc AG, Gomeze EA, Mimori T, Zhang F, Iwata H, Korenaga M, Sakurai T, Katakura K, Hashiguchi Y: Genotyping of sand fly species in Peruvian Andes where leishmaniasis is endemic. *Acta Tropica* 121, 93-98, 2012

Ichikawa M, Kondoh D, Bawn S, Maw NN, Htun LL, Thein M, Gyi A, Sunn K, Katakura K, Itagaki T: Morphological and molecular characterization of *Explanatum explanatum* from cattle and buffaloes in Myanmar. *J Vet Med Sci* in press

Ishimaru Y, Gomez EA, Zhang F, Martini-Robles L, Iwata H, Sakurai T, Katakura K, Hashiguchi Y, Kato H: Dimiconin, a novel coagulation inhibitor from the kissing bug, *Triatoma dimidiata*, a vector of Chagas disease. *J Exp Biol* 215, 3597-3602, 2012

Kato H, Jochim, RC, Gomez EA, Uezato H, Mimori T, Korenaga M, Sakurai T, Katakura K, Valenzuela JG, Hashiguchi H: Analysis of salivary gland transcripts of the sand fly *Lutzomyia ayacuchensis*, a vector of Andean type cutaneous leishmaniasis. *Infect Genet Evol* 13, 56-66, 2013

Nyunt KS, Elkhateeb A, Tosa Y, Nabeta K, Katakura K, Matsuura H: Isolation of antitrypanosomal compounds from *Vitis repens*, a medicinal plant of Myanmar. *Nat Prod Commun* 7, 609-610, 2012

Tiwananthagorn S, Bhutto AM, Baloch JH, Soomro FR, Kawamura Y, Nakao R, Aoshima K, Nonaka N,

Oku Y, Katakura K: Zoophilic feeding behaviour of phlebotomine sand flies in the endemic areas of cutaneous leishmaniasis of Sindh Province, Pakistan. *Parasitol Res* 111, 125-133, 2012

Tiwananthagorn S, Iwabuchi K, Ato M, Sakurai T, Kato H, Katakura K: Involvement of CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells in persistence of *Leishmania donovani* in the liver of alymphoplastic *aly/aly* mice. *PLoS Negl Trop Dis* 6, e1798, 2012

2. 学会発表

Alam Mohammad, 中尾亮, 櫻井達也, 加藤大智, Chang K.-P., Schönián Gabriele, 片倉 賢. Genetic polymorphism of Chinese *Leishmania infantum* strains revealed by multilocus microsatellite analysis. 第 154 回日本獣医学学会学術集会、岩手大学、盛岡、平成 24 年 9 月 14-16 日

加藤大智, 石丸由佳, 櫻井達也, 片倉 賢, 橋口義久. 吸血性サシガメ *Triatoma dimidiata* 唾液腺由来の新規血液凝固阻害物質 dimiconin. 第 154 回日本獣医学学会学術集会、岩手大学、盛岡、平成 24 年 9 月 14-16 日

櫻井達也, 土佐祐輔, 清水耕平, 廣田淳一, 近朋之, 加藤大智, 片倉 賢. ミャンマー連邦におけるピロプラズマ病の疫学調査. 第 154 回日本獣医学学会学術集会、岩手大学、盛岡、平成 24 年 9 月 14-16 日

サルダー・ティワナンタゴン, 加藤大智, 櫻井達也, 岩渕和也, 阿戸 学, 片倉 賢. 免疫不全 *aly/aly* マウスの内臓リーシュマニア症における肝臓内原虫存続と制御性 T 細胞. 第 154 回日本獣医学学会学術集会、岩手大学、盛岡、平成 24 年 9 月 14-16 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

トリパノソーマの防御応答回避メカニズムの解析

研究協力者 群馬大学大学院・保健学研究科・生体情報検査科学分野 嶋田 淳子

研究要旨

南米型トリパノソーマ (*Trypanosoma cruzi*) は中南米に流行する寄生原虫で、感染すると宿主細胞のアポトーシスを抑制することがわかっている。宿主アポトーシス抑制因子 c-FLIP と相互作用する原虫側因子を探索するため、photo-cross-linking の実験系を確立した。

A. 研究目的

Trypanosoma cruzi 感染により宿主アポトーシス抑制因子 c-FLIP と相互作用する原虫側因子の探索を行うため、培養細胞を用い、c-FLIP の高発細胞を樹立する。また、c-FLIP と相互作用する原虫側因子を探索することを目的とする。

B. 研究方法

ヒト由来培養細胞 HT1080 に c-FLIP 遺伝子発現細胞を樹立する。予備実験で、全長の c-FLIP 全長を発現することが困難であったため、c-FLIP を DED 領域と pseudo caspase 領域に分け、各々の遺伝子を tag 付ベクターに連結した。リポフェクションにより HT1080 細胞にトランスフェクションし、クローン化後、高発細胞を樹立した。発現細胞に *T. cruzi* を感染させ、photo アミノ酸を含む培地で 24 時間培養し、UV 照射により photo-cross linking を行った。この方法により、高発現させたタンパク質と相互作用するタンパク質を共有結合させることができる。Photo-cross-linking の実験条件を決めるため、UV 照射条件等を検討した。最適条件で細胞ライセートを調整し、抗 tag 抗体で免疫沈降後ウエスタンブロットを行い、相互作用するタンパク質を探索した。

C. 結果

c-FLIP の pseudo caspase 領域発現細胞クローンを 5 個得ることができ、そのうちの 2 クローンで本タンパク質の発現が確認された。この細胞を用いて photo-cross-linking の実験

条件を検討したところ、波長 365 nm、照射エネルギー 2800 mW/cm²、照射距離 5 cm、16 分間が最適であることがわかった。そこで pseudo caspase 発現細胞に *T. cruzi* を感染させ、この条件下で photo-cross-linking を行ったところ、pseudo caspase より分子量が大きいバンドが複数認められた。

D. 考察

アポトーシス抑制因子 c-FLIP の pseudo caspase 領域を発現する細胞を樹立することができた。DED 領域を発現する細胞のクローンは未だ得られておらず、この領域はアポトーシス誘導と関連しているため、高発現細胞が得られない可能性が考えられた。また、UV 照射により pseudo caspase より分子量が大きいサイズのバンドが検出されたことから、photo-cross-linking 法の実験条件を確立することができ、相互作用するタンパク質の存在が明らかとなった。現在、MS/MS を用いて、pseudo caspase と結合したタンパク質の解析を試みている。

E. 結論

アポトーシス抑制因子 c-FLIP の pseudo caspase 領域を発現する細胞を樹立することができた。c-FLIP と相互作用するタンパク質を探するためのツールとして photo-cross-linking の実験系を確立した。

G. 研究発表

1. 論文発表

和文論文

なし

英文論文

なし

2. 学会発表

本村玲奈、嶋田淳子 南米型トリパノソーマ
感染宿主細胞の細胞分裂とアクチンの解析
第 72 回日本寄生虫学会東日本大会・第 10 回
分子寄生虫・マラリアフォーラム合同大会
群馬大学昭和キャンパス、前橋、平成 24 年 10
月 12 - 13 日

高橋千由紀、嶋田淳子 *Trypanosoma cruzi*
感染細胞におけるオートファジーと原虫由来の
タンパク質との関連性の解析 第 82 回日本寄
生虫学会大会、東京医科歯科大学、東京、平
成 25 年 3 月 29 - 31 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

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

協力研究者 丸山治彦 宮崎大学医学部 教授

研究要旨 宮崎大学医学部寄生虫学で施行した血清診断では、2012年においても、動物由来回虫類感染症が多数あった。これらの原因虫種はイヌ回虫かブタ回虫と考えられ、これまでに組換えブタ回虫抗原 As16 と組換えイヌ回虫抗原 rTcAg を組み合わせた抗体検査により、イヌ回虫症が 90% 程度であることを示した。しかしながらこれは「トキソカラ感染症」であって、イヌ回虫かネコ回虫かは不明である。したがって、今年度は、イヌ回虫感染とネコ回虫感染に病態の違いがあるのかどうか、ブタを用いた感染実験で検討した。その結果、幼虫包蔵卵投与後は両者ともに肝臓から肺へと移行したが、ネコ回虫はイヌ回虫と比べて極めて移行速度が速く、短時間で虫体は肺より先へ到達することがわかった。このことは、臨床的に肝臓や肺に病変が強く出るのがイヌ回虫感染症、好酸球増多のみみとめて画像所見に乏しいのはネコ回虫感染症である可能性を示唆している。

A. 研究目的

われわれは、multiple-dot ELISA 法による抗体スクリーニングと 96-well microtiterplate ELISA 法による精査を基本とした寄生虫症診断システムを構築し、多くの寄生虫病の診断に関わってきた。総検体数は年間 500 前後で推移し、毎年 100-200 例を寄生虫症と診断している。

抗寄生虫抗体陽性で、臨床的に感染ありと判断される症例は年間 100 例近くにのぼり、その中では肺吸虫症と動物由来の回虫類感染症が多数を占める。動物由来の回虫とは具体的にはトキソカラとブタ回虫であり、トキソカラ症とブタ回虫症の鑑別については、これまでの研究によって組換え抗原を用いた抗体検査法である程度鑑別できる見通しが立った。

しかしながら、未だにトキソカラがイヌ回虫なのかネコ回虫なのかという問題が残されている。イヌ回虫とネコ回虫は同属に分類されている通りきわめて近縁であり、抗体での鑑別は少なくとも現時点では不可能である。また、ネコ回虫の遺伝子やタンパク質についての情報は限定的にしか得られていないため、イヌ回虫とネコ回虫で、それぞれに特異的な抗原を探すのは

困難である。

そこで、イヌ回虫症とネコ回虫症の違いを病態の面から明らかにするために、ヒトと生理学的に近いとされるブタを用いて感染実験を実施した。ブタで幼虫の体内移行などにおける病態の違いを明らかにできれば、ヒトで発生している幼虫移行症の病態解明に大きく貢献できることになる。

B. 研究方法

1. ブタと寄生虫

ブタの感染実験は、コペンハーゲン大学獣医学部 Stig Milan Thamsborg 教授（Danish Centre for Experimental Parasitology, Department of Veterinary Disease Biology, Faculty of Life Sciences, University of Copenhagen）で実施した。虫卵はイヌ回虫とネコ回虫ともに、Claudia Bohm, Institute of Parasitology, University of Veterinary Medicine, Hannover より供与いただいた。

2. 感染

虫卵は、イヌ回虫またはネコ回虫に感染したイヌまたはネコの糞便から分離し、定法により

培養して幼虫包蔵卵とした。

1) 感染 31-32 日後の評価

ブタには幼虫包蔵卵を 10,000 個経口的に投与し、31-32 日後の各臓器（肺、肝臓、腸間膜リンパ節、心、脳、眼、横隔膜、舌、筋肉）から虫体を回収した。肝臓と腎臓は、破碎前に表面の白点 white spot のカウントもおこなった。感染 22、28 日後には採血して末梢好酸球を測定した。

2) 感染 4 日および 14 日後の評価

幼虫包蔵卵 100,000 個を経口投与して 4 日後は肺と肝臓から、14 日後には肺、肝臓、腸間膜リンパ節、脾臓、腎臓、横隔膜、脳、筋肉から虫体を回収した。

3. 虫体の回収法

臓器からの虫体回収は消化法と寒天法のどちらか、あるいは両方を実施した。消化法は人工消化法を用いた。1% ペプシン - HCl 人工消化液で破碎した臓器を消化し、臓器中に含まれる虫体を回収した。寒天法は、破碎した臓器を 1% 寒天液に懸濁して布に塗り広げ、寒天の凝固後に布ごと緩衝液中でインキュベートして、遊出してきた虫体を回収した。

虫体回収は、感染 4 日後、14 日後、31-32 日後に実施した。31-32 日後では、

C. 研究結果

1. 感染 31-32 日後（虫卵 10,000 個投与）

1) 末梢血好酸球

感染後の末梢血好酸球はイヌ回虫感染群の方がネコ回虫感染群よりも有意に高かった。しかしながら、感染 28 日後には非感染群と同程度までに下がっていた（推移は図 1 の通り）。

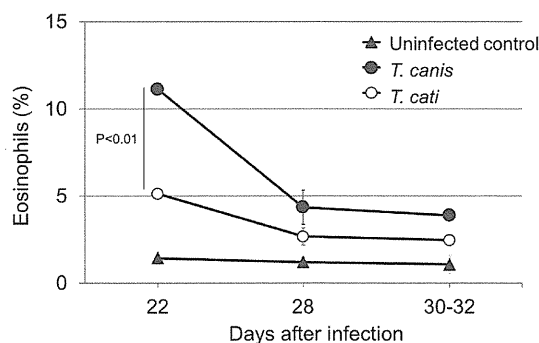


図 1 末梢好酸球数

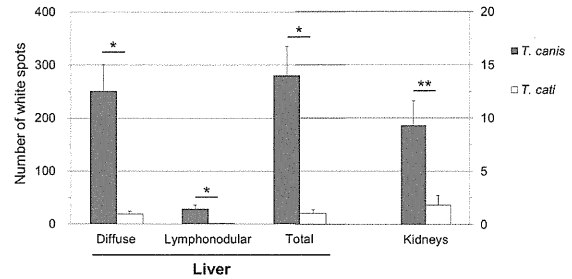


図 2 肝および腎表面の白点 white spot

2) 白点

臓器表面の白点は炎症巣を示し、感染の有無を肉眼的にとらえることができる。肝臓および腎臓表面の白点は、イヌ回虫感染群の方が明らかに高い値を示し、ネコ回虫感染群は有意に少ない数の白点しか認めることができなかった。

3) 回収虫体数

感染約 1 か月後における回収虫体数は下表の通りで、リンパ節はネコ回虫の方が多かったが、最も幼虫が集積していると思われた肺からは、イヌ回虫の方が多く回収された。肝臓からの回収虫体数が少ないのは、イヌ回虫・ネコ回虫ともに、すでに肝臓を通り抜けた後だったためと考えられた。

Organ	<i>T. canis</i>	<i>T. cati</i>
Liver	0.1	0
Lungs	3.0	0.6
LN	1.7	4.2
Diaphragm	0.1	0
Brain	0	0
Muscle	0	0.1

表 1 感染 31-32 日後の回収虫体数（臓器 100 g 当たり）

2. 感染 14 日後（虫卵 100,000 個投与）

感染 14 日後は、対象のすべての臓器で回収虫体数はイヌ回虫がネコ回虫を上回り、とくに肺ではイヌ回虫はネコ回虫の倍近い値であった。またネコ回虫感染ブタの肝臓からは虫体を回収することができなかった（表 2、図 3、図 4）。

Organ	<i>T. canis</i>	<i>T. cati</i>
Liver	31	0
Lungs	122	67
LN	57	54
Spleen	0	0
Kidneys	0	0
Diaphragm	2	0
Brain	1	0
Muscles	0	0

表 2 感染 14 日後の回収虫体数（臓器 100g 当たり）

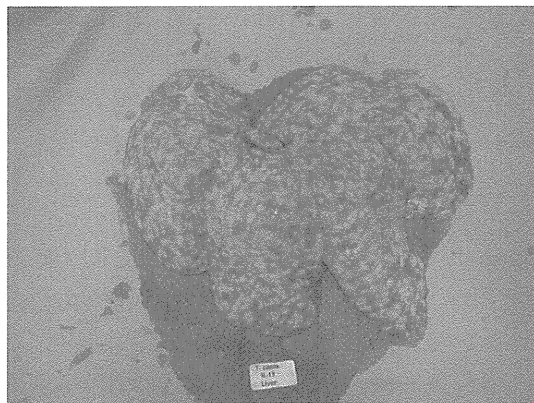


図 3 イヌ回虫感染 14 日後のブタの肝臓

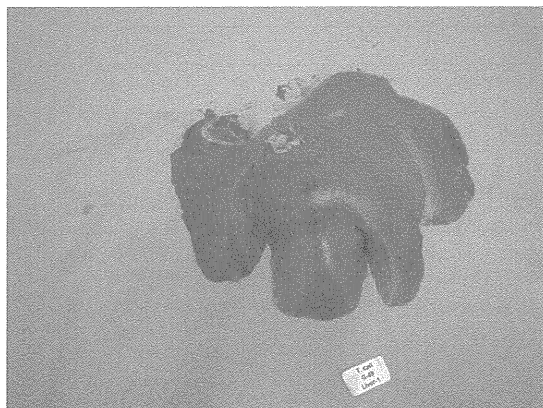


図 4 ネコ回虫感染 14 日後のブタの肝臓

3. 感染 4 日後（虫卵 100,000 個投与）

感染 31-32 日後および感染 14 日後にはネコ回虫を肝臓から回収することができなかった。その理由として、ネコ回虫が肝臓をバイパスしていることが考えられたため、もっと早期の感染 4 日後に肝臓、肺、腸間膜リンパ節から体内移行幼虫を回収した。

その結果、ネコ回虫感染でも肝臓から虫体が

回収され、さらに、肺ではイヌ回虫よりも多数の虫体を回収することができた（表 3）。

Organ	<i>T. canis</i>	<i>T. cati</i>
Liver	700	60
Lungs	42	128*
LN	3540	2240

表 3 感染 4 日後の全回収虫体数

D. 考察

当教室で実施している寄生虫病血清診断の結果陽性と判定される症例の大多数は、食品媒介性の人獣共通寄生虫症である。具体的には肺吸虫症とトキソカラやブタ回虫による内臓幼虫移行症で、両者で全体の 80%を超えている。

昨年度までの研究で、トキソカラ症とブタ回虫症を血清学的に鑑別する手法はある程度確立でき、症例数を増やして検討を続ける予定である。しかしながら、新たな問題として、トキソカラ症の実態がイヌ回虫症なのかネコ回虫症なのかという点が残されている。どちらも非好適宿主内では幼虫のまま止まるため、トリなどの食肉を介したヒトへの感染が起きる可能性は等しく存在する。近年、子犬のイヌ回虫症は減少しているので、トキソカラ症の原因としてイヌ回虫に加えてネコ回虫についても考慮する必要があるであろう。

ブタ回虫とトキソカラは交差反応が強いとはいえ一定以上抗原性に違いがあり、抗体による鑑別が可能であった。実際 As16 抗原はホモログがイヌ回虫には存在しない。イヌ回虫とネコ回虫の場合は、抗原性はもっと近いと考えられるので、抗体による鑑別はきわめて難しいと予想される。しかもネコ回虫は EST やゲノム情報に乏しく、特異的な診断抗原の探索もできない。

そこで本研究では、ヒトと生理学的に近いとされるブタを用いて、イヌ回虫とネコ回虫の病態の違いを検討した。その結果、同じトキソカラとはいえ、イヌ回虫とネコ回虫では大きな違いがあることが明らかになった。

もっとも大きな違いは肝臓から回収される虫体数であり、検討した範囲（4 日後、14 日後 31-32 日後）では常にイヌ回虫感染の方が多くの虫体が回収された。とくに感染 14 日後と 31-32 日後では、ネコ回虫感染では肝臓からは全く幼虫を回収することはできなかった。