

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

新しい抗マラリア戦略を目指した糖鎖関連薬の開発

平成24年度 総括研究報告書

研究代表者 加藤 健太郎

平成25(2013)年 5月

## 目 次

I . 総括研究報告	
新しい抗マラリア戦略を目指した糖鎖関連薬の開発	----- 3
加藤 健太郎	
II . 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 7
III . 研究成果の刊行物・別刷	----- 8

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）  
総括研究報告書

新しい抗マラリア戦略を目指した糖鎖関連薬の開発

研究代表者 加藤 健太郎 帯広畜産大学原虫病研究センター 特任准教授

研究要旨

マラリア感染者は、熱帯、亜熱帯の途上国を中心として年間約3億人、死亡者は年間150～300万人にのぼると報告され、その対策が急務とされている。既存の抗マラリア剤耐性株の出現のため、多くの新しい抗マラリア剤が開発され、また、マラリアワクチン開発の研究が世界規模で試みられているが未開発であり、マラリア撲滅には至っていない。この大きな原因の1つに、先進国の製薬企業では市場性が見込めないことを理由に抗マラリア薬、ワクチンの開発を進めないことが挙げられる。

研究代表者らは独自に開発したマラリア原虫の赤血球感染レセプターの同定系を用いて糖鎖レセプターの同定に成功し、糖鎖がマラリア原虫の赤血球侵入（感染）を著しく阻害することを見出した。本研究では新しい抗マラリア戦略を目指した糖鎖製剤とマラリアワクチンの実用化に向けた開発研究を行うことを目的とする。

平成24年度は、熱帯熱マラリア原虫の赤血球培養系において、硫酸化多糖類としてヘパリン、λ、κ、ιカラギーナン、硫酸化κカラギーナン、ジェランガム、硫酸化ジェランガムを用いて、赤血球侵入阻害試験と増殖阻止試験を行った。この結果、ヘパリン、λカラギーナン、硫酸化ジェランが高い阻害効果を示した。また、ジェランガムをはじめ、硫酸化を付加した糖鎖の作製を進めた。

研究代表者 加藤 健太郎  
帯広畜産大学原虫病研究センター 特任准教授

A. 研究目的

マラリアは*Plasmodium*属原虫の感染によって引き起こされる感染症で、ハマダラカ属の蚊の吸血によってヒトに感染する。マラリアの感染者は、亜熱帯や熱帯地域、特にアフリカ、南アメリカ、東南アジア等の途上国を中心として年間約3億人、死亡者は年間150-300万人にのぼると報告され、その対策が急務とされている。昨今、既存の抗マラリア剤耐性株の出現のため、多くの新しい抗マラリア剤が開発され、また、マラリアワクチン開発の研究が世界規模で試みられているが未開発であり、マラリア撲滅には至っていない。この大きな原因の1つに、先

進国の製薬企業では市場性が見込めないことを理由に抗マラリア薬、ワクチンの開発を進めないことが挙げられる。

研究代表者らは抗マラリア薬開発を目的として、まずウイルスベクターを用いてマラリア原虫の赤血球感染レセプターの同定系の開発に独自に成功した。さらにこの感染レセプター同定系を用いてヘパリン硫酸等の糖鎖レセプターの同定に成功し、糖鎖がマラリア原虫の赤血球侵入（感染）を著しく阻害することを見出した。本研究の目的は、これまでの研究代表者らの研究において抗マラリア作用があることを見出した糖鎖について、新しい抗マラリア戦略を目指した糖鎖製剤とマラリアワクチンの実用化に向けた開発研究を行うことにある。以上の途上国の現状とマラリア薬開発の遅滞を鑑みると当該研究の必要性が極めて大きい。

## B．研究方法

研究代表者らは原虫の感染レセプターの同定系を確立し、これまでにヘパリン硫酸、シアル酸、コンドロイチン硫酸といった糖鎖レセプターを同定してきた。平成24年度は、様々な糖鎖とその派生体を用いてどの糖鎖構造体がマラリア原虫の感染に重要か解析を行った。以下に平成24年度に実施した研究の方法について記す。

- (i) ヘパリン、コンドロイチン硫酸、フコイダン、デキストラン硫酸等の各種硫酸化多糖類を用いて、熱帯熱マラリア原虫の赤血球侵入(感染)阻止能についての解析をマラリア原虫の培養系において行った。
- (ii) (i)で感染阻止に効果のあった糖類について硫酸基等の側鎖の位置が異なる派生体や様々な分子量の糖鎖群を用いて、感染阻止能の解析を行い、どの糖鎖構造体が原虫感染阻止に重要であるかを解析した。

### (倫理面への配慮)

平成24年度に実施した研究は、*in vitro*での実験系が主であったため、研究対象者の人権擁護に関わる実験等は行っていないため、倫理面の問題は無い。動物実験については、実施した東京大学大学院農学生命科学研究科から認可を受けている。

## C．研究結果

- (i) ヘパリン、λ、κ、ιカラギーナン、硫酸化κカラギーナン、ジェランガム、硫酸化ジェランガムの各種硫酸化多糖類を用いて、熱帯熱マラリア原虫の赤血球侵入(感染)阻止能についての解析をマラリア原虫の培養系において行った。
- (ii) (i)で感染阻止に効果のあった糖類について硫酸基等の側鎖の位置が異なる派生体や様々な分子量の糖鎖群を用いて、感染阻止能の解析を行い、ヘパリン、λカラギーナン、硫酸化ジェランが高い阻害効果を示した。

## D．考察

熱帯熱マラリア原虫の赤血球侵入(感染)阻止能について、ヘパリン、λカラギーナン、硫酸化ジェランが高い阻害効果を示した。また、硫酸化度の高い硫酸化多糖類では、その阻害効果が高い傾向があることが明らかとなった。今後は、マウスマラリア原虫を用いた動物感染実験によって阻害効果のあった糖鎖派生体について実際の生体内での効果を解析する必要がある。

## E．結論

熱帯熱マラリア原虫の赤血球培養系において、硫酸化多糖類としてヘパリン、λ、κ、ιカラギーナン、硫酸化κカラギーナン、ジェランガム、硫酸化ジェランガムを用いて、赤血球侵入阻害試験と増殖阻止試験を行った。この結果、ヘパリン、λカラギーナン、硫酸化ジェランが高い阻害効果を示した。また、ジェランガムをはじめ、硫酸化を付加した糖鎖の作製を進めた。λカラギーナンについては、他のカラギーナンと比べて元々硫酸化度が高い。

## F．健康危険情報

無し。

## G．研究発表

### 1. 論文発表

Iwanaga T, Sugi T, Kobayashi K, Takemae H, Gong H, Recuenco FC, Ishiwa A, Horimoto T, Akashi H, **Kato K (corresponding author)**. Function of *Plasmodium falciparum* cyclin-dependent kinases in erythrocytic schizogony. **Parasitol Int.** In press. (2013)

Gen F, Yamada S, **Kato K**, Akashi H, Kawaoka Y, Horimoto T. Attenuation of an influenza A virus due to alteration of its hemagglutinin-neuraminidase functional balance in mice. **Arch Virol.** 158:1003-1011. (2013)

Kobayashi K, Takemae H, Sugi T, Gong H, Recuenco F, Iwanaga T, Horimoto T, Akashi H, **Kato K (corresponding author)**. Approach for the

development of antiprotozoal agents and vaccines on the basis of invasion inhibitory effect of heparin. **Jpn J Vet Parasitol.** 11:23. (2012)

Gong H, Kobayashi K, Sugi T, Takemae H, Kurokawa H, Horimoto T, Akashi H, **Kato K (corresponding author)**. A novel PAN/apple domain-containing protein from *Toxoplasma gondii*: characterization and receptor identification. **PLoS One.** 7:e30169. (2012)

**Kato K (corresponding author)**, Sugi T, Iwanaga T. Roles of Apicomplexan protein kinases at each life cycle stage. **Parasitol Int.** 61: 224-234. (2012) **Malaria Nexus 記事掲載 (2012年3月9日)**

## 2. 学会発表

Frances Recuenco, 石和玲子, 小林郷介, ロジャース有希子, Noreen Grace Fundador, 竹前 等, ゴン海燕, 杉 達紀, 村越ふみ, 岩永達也, 堀本泰介, 岩田忠久, **加藤健太郎** 「*In vitro* growth inhibition activities of modified carrageenans and gellan gum against *Plasmodium falciparum* 3D7」 第 82 回寄生虫学会、東京、2013 年 3 月

石和玲子, 杉達紀, レクエンコ・フランセス, ロジャース有希子, フンダドール・ノリーン, 竹前等, 堀本泰介, 岩田忠久, **加藤健太郎** 「海藻由来及び合成硫酸化多糖類によるトキソプラズマ原虫の感染および増殖阻害」 第 82 回寄生虫学会、東京、2013 年 3 月

岩永達也, 杉達紀, 小林郷介, 堀本泰介, 明石博臣, **加藤健太郎** 「熱帯熱マラリア原虫のサイクリン依存性キナーゼ相同遺伝子の機能解析」 第 82 回寄生虫学会、東京、2013 年 3 月

Haiyan Gong, Kyousuke Kobayashi, Tatsuki Sugi, Hitoshi Takemae, Akiko Ishiwa, Taisuke Horimoto, Hiroomi Akashi, **Kentaro Kato**. “Two adhesive domain-containing proteins are involved in the interaction of *Toxoplasma gondii* with host cell.”

Molecular Parasitology Meeting XXIII, Woods Hole, MA, USA. (2012.9) **日本獣医寄生虫学会より招待派遣**

Frances Recuenco, 石和玲子, 小林郷介, ロジャース有希子, Noreen Grace Fundador, 竹前 等, ゴン海燕, 杉 達紀, 村越ふみ, 岩永達也, 堀本泰介, 岩田忠久, 加藤健太郎 「Effect of  $\lambda$ -carrageenan on the course of infection of *Plasmodium yoelii* in BALB/c mice」 第 154 回日本獣医学会、岩手、2012 年 9 月

ゴン海燕, 小林郷介, 杉達紀, 竹前等, 堀本泰介, 明石博臣, **加藤健太郎** 「To explore the interaction factors in *Toxoplasma gondii* infection」 第 154 回日本獣医学会、岩手、2012 年 9 月 **第 3 回日本獣医寄生虫学奨励賞受賞**

岩永達也, 杉達紀, 小林郷介, 堀本泰介, 明石博臣, **加藤健太郎** 「熱帯熱マラリア原虫に対するサイクリン依存性キナーゼ(CDK)阻害剤の影響」 第 154 回日本獣医学会、岩手、2012 年 9 月

石和玲子, 小林郷介, 杉達紀, 竹前等, ゴン海燕, レクエンコ・フランセス, 村越ふみ, 堀本泰介, 明石博臣, **加藤健太郎** 「硫酸化多糖類によるトキソプラズマ原虫増殖阻害に関する解析」 第 154 回日本獣医学会、岩手、2012 年 9 月

岩永達也, 杉達紀, 小林郷介, 堀本泰介, 明石博臣, **加藤健太郎** 「熱帯熱マラリア原虫の赤血球内発育におけるサイクリン依存性キナーゼの役割」 第 20 回分子寄生虫学ワークショップ、神戸、2012 年 8 月

Frances Recuenco, 小林郷介, 石和玲子, 竹前 等, ゴン海燕, 杉達紀, 村越ふみ, 岩永達也, 堀本泰介, **加藤健太郎** 「The effect of carrageenans on the course of infection of *Plasmodium yoelii* and *Plasmodium berghei* in BALB/c mice」 第 20 回分子寄生虫学ワークショップ、神戸、2012 年 8 月

H . 知的財産権の出願・登録状況

無し。

1. 特許取得

3.その他

無し。

無し。

2. 実用新案登録

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
<b>加藤健太郎</b>	原虫プロテインキナーゼの酵素活性測定系	宇賀昭二、丸山治彦	寄生虫研究 材料と方法 2012年版	三恵社	名古屋市	2012年	111-112
小林郷介、 <b>加藤健太郎</b>	ヘパリンを用いた熱帯熱マラリア原虫の同調培養法	宇賀昭二、丸山治彦	寄生虫研究 材料と方法 2012年版	三恵社	名古屋市	2012年	37-40
ゴン海燕、玄学南、 <b>加藤健太郎</b>	ブルダウン法を用いたトキソプラズマ原虫の宿主細胞レセプターの同定	宇賀昭二、丸山治彦	寄生虫研究 材料と方法 2012年版	三恵社	名古屋市	2012年	103-104
石和玲子、 <b>加藤健太郎</b>	培養細胞を用いたトキソプラズマ原虫培養系における感染・増殖阻害アッセイ	宇賀昭二、丸山治彦	寄生虫研究 材料と方法 2012年版	三恵社	名古屋市	2012年	105-108
岩永達也、 <b>加藤健太郎</b>	熱帯熱マラリア原虫の培養系における増殖阻害アッセイ	宇賀昭二、丸山治彦	寄生虫研究 材料と方法 2012年版	三恵社	名古屋市	2012年	109-110
杉達紀、 <b>加藤健太郎</b>	トキソプラズマ原虫の培養と精製	宇賀昭二、丸山治彦	寄生虫研究 材料と方法 2012年版	三恵社	名古屋市	2012年	41-44

### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Iwanaga T, Sugi T, Kobayashi K, Takemae H, Gong H, Recuenco FC, Ishiwa A, Horimoto T, Akashi H, <b>Kato K (corresponding author)</b>	Function of <i>Plasmodium falciparum</i> cyclin-dependent kinases in erythrocytic schizogony	<b>Parasitol Int.</b>	印刷中		2013年
Gen F, Yamada S, <b>Kato K</b> , Akashi H, Kawaoka Y, Horimoto T	Attenuation of an influenza A virus due to alteration of its hemagglutinin-neuraminidase functional balance in mice	<b>Arch Virol.</b>	158	1003-1011	2012年
Kobayashi K, Takemae H, Sugi T, Gong H, Recuenco F, Iwanaga T, Horimoto T, Akashi H, <b>Kato K (corresponding author)</b>	Approach for the development of antiprotozoal agents and vaccines on the basis of invasion inhibitory effect of heparin	<b>Jpn J Vet Parasitol.</b>	11	23	2012年
<b>Kato K (corresponding author)</b> , Sugi T, Iwanaga T	Roles of Apicomplexan protein kinases at each life cycle stage	<b>Parasitol Int.</b>	61	224-234	2012年

Gong H, Kobayashi K, Sugi T, Takemae H, Kurokawa H, Horimoto T, Akashi H, <b><u>Kato K</u></b> ( <b><u>corresponding author</u></b> ).	A novel PAN/apple domain-containing protein from <i>Toxoplasma gondii</i> : characterization and receptor identification	<b>PLoS One.</b> 7	e30169	2012年
--	--	--------------------	--------	-------