

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22406007

研究課題名（和文） 三日熱マラリア肝内休眠原虫の検出系の確立

研究課題名（英文） Development of the detection method for *Plasmodium vivax* hypnozoites.

研究代表者

石野 智子 (Ishino Tomoko)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：40402680

研究成果の概要（和文）：マラリア原虫の肝臓ステージの培養系を、まずはネズミマラリア原虫をモデルとして最適化を行った。次に、三日熱マラリアの肝内型原虫を検出できるような種々の特異抗体を作成した。タイ王国において、三日熱マラリア患者の血液を人工的に吸血させた蚊の唾液腺から原虫を回収し、これを肝由来培養細胞に添加後培養し、作成した抗体を用いて、肝内型原虫が検出できた。さらに原虫の侵入効率の評価系が確立できた。

研究成果の概要（英文）：The liver stage culture condition has been improved by using rodent malaria parasites, *Plasmodium berghei*. Then, to detect the *P. vivax* liver stage parasite development, several antibodies against liver stage antigens were prepared. *P. vivax* sporozoites were collected from mosquitoes fed on patients blood in Thailand, then incubated with hepatocytes for 1 week. Liver stage parasites development could be detected by IFA using several antibodies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2011年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2012年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：医歯薬学 A

科研費の分科・細目：寄生虫学（含衛生動物学）

キーワード：三日熱マラリア原虫、肝臓ステージ、休眠体、顧みられない熱帯病、タイ王国

1. 研究開始当初の背景

三日熱マラリアは、世界では年間数億人が新規に感染する感染症である。致死的ではないものの症状は重く、特にアジア地域においては経済効率の観点からも早急な解決が望まれる問題である。

三日熱マラリア撲滅に向けての大きな障

害の一つに「再発」が挙げられる。蚊の吸血によって、ヒト体内に侵入したマラリア原虫は最初に肝細胞に寄生し、その中で赤血球感染型（メロゾイト）へと分化する。メロゾイトが赤血球への感染を繰り返すことで、発熱・貧血等のマラリア症状を引き起こす。一方で、原虫の一部は肝細胞内で「休眠体」を

形成し、長い時には数年間ヒト体内に留まった後に、再発を引き起こすことが知られている。赤血球ステージ原虫を標的とするほとんどの抗マラリア薬は休眠体に効果がなく、唯一の薬剤（プリマキン）も、副作用の問題で投与できないケースが多いのみならず耐性原虫の出現が報告されており、新たな薬剤の開発が望まれている。

ところが、三日熱マラリア原虫の *in vitro* 培養は成功しておらず、研究室での実験が全く行えないため、上記の問題はほとんど手つかずで残されてきた。無視された感染症と表現されるこの現状を打破すべく、三日熱マラリア原虫のゲノムプロジェクトが企画され、2008年に *Nature* 誌に報告された。これにより、三日熱マラリア撲滅に向けての遺伝子情報は揃いつつあるが、原虫の供給がネックとなり研究は進んでいない。

2. 研究の目的

三日熱マラリアは、アジア地域においては熱帯熱マラリアと同等の脅威を及ぼす感染症である。三日熱マラリア対策の大きな課題は、原虫が肝細胞内で時には数年にも及び「休眠」するために、一旦治癒した後に再発することである。再発防止法を開発を目指した三日熱マラリア研究の最大の困難は、原虫の培養さえ確立されていないために、実験室での研究が不可能なことである。本課題は、この状況を打破するために、まずタイの感染流行地において三日熱マラリア患者から感染血液を採取し、それを媒介蚊に人工的に吸血させることで感染蚊を作成する。次いで、蚊から肝細胞感染型原虫を回収、培養肝細胞に添加することで、肝細胞内で原虫を発育させる培養法の確立を目指す。さらにはマーカーを用いて、肝内型原虫と休眠体との識別法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

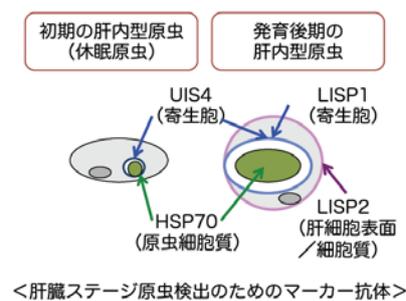
(1) ネズミマラリア原虫 (*Plasmodium berghei*) を用いた肝臓ステージ原虫培養系の最適化

三日熱マラリア原虫は、実験室内での培養が不可能なため、実験材料としては感染流行地の患者血液に頼らざるを得ない。そのため、

肝臓ステージ培養系を最適化するために、ヒト由来培養細胞 (HepG2) に寄生できることが報告されているネズミマラリア原虫 (*P. berghei*) をモデルとして用いることにした。なお、遺伝子組換え技術により、細胞質に GFP を発現する組換え原虫を用いることで、原虫の検出を容易にしている。原虫の発育の指標としては、大きさ（直径）と、肝内型発育の後期に宿主細胞の細胞質へと輸送されるタンパク質 LISP2 (Liver stage specific protein 2) の局在解析により行った。最初に、様々な培地 (DMEM high glucose, DMEM low glucose, RPMI1640, EMEM) を用いて、原虫の発育を比較した。次いで、培地中のグルコース量が、原虫の発育に影響を与えるか否か検討した。

(2) 三日熱マラリア原虫 (*P. vivax*) の肝臓ステージ原虫を特異的に検出する為のマーカーとなる抗体の作成

三日熱マラリア原虫は、肝細胞に侵入し、寄生胞膜の中で約1週間から10日かけて発育し、メロゾイトへと分化する。三日熱マラリア原虫の特徴として、一部は極めて初期の段階で休眠体となり、長期間に渡り活動を休止させるものがある。現在までに休眠体の特異的に認識する方法は見いだされていない。本研究では、肝内型原虫を効率的に検出でき、また休眠体を識別できるようなマーカーとなる抗体の作出を目指す。まずは、三日熱マラリア原虫の遺伝子情報から、a) 肝内型原虫全般にわたり原虫細胞質に発現するタンパク質 (PvHSP70)、b) 初期の寄生胞膜に局在するタンパク質 (PvUIS4)、c) 後期の寄生胞膜に局在するタンパク質 (PvLISP1)、d) 後期に肝細胞細胞質へと輸送されるタンパク質 (PvLISP2) の組換えタンパク質を、コムギ胚芽由来無細胞タンパク質合成系を用いて作



出する。方法は、PlasoDBを参考にプライマーを作製し、三日熱マラリ

ア原虫の標準株のゲノムを鋳型にPCRを行い、コンストラクトを作製する。GSTとの融合タンパク質として発現・精製を行い、SDS-PAGEで確認する。これらをウサギに免疫することで特異抗体を得る。

(3) マラリア流行地の患者血液の人工吸血により得られた肝細胞侵入型原虫（スポロゾイト）の培養と肝内型原虫の検出系の確立

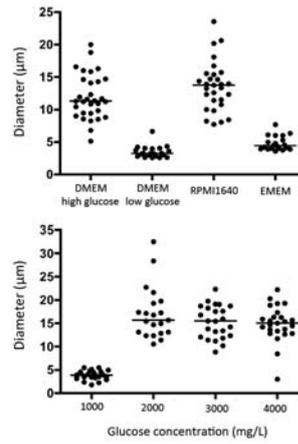
三日熱マラリア原虫は培養できないため、タイ・ミャンマーの国境付近の感染流行地をフィールドとして活動する共同研究者(Dr. Jetsumon Sattabongkot、マヒドン大学)と共に研究を遂行する。マラリアクリニックを訪れる患者から同意を得た上で感染血液を提供してもらい、人工吸血法により媒介蚊(*Anopheles dirus*)に吸血させた後、3週間飼育する。実体顕微鏡下で唾液腺を解剖により摘出し、肝細胞感染型原虫(スポロゾイト)を回収し、これを肝由来培養細胞 HC-04 に添加し、37度で培養する。6時間後、4日後にそれぞれ培養細胞をホルマリンで固定し、(2)で作製した特異抗体を用いて蛍光抗体法を行い、肝内型原虫が検出できるか否か検討する。

4. 研究成果

(1) ネズミマラリア原虫(*Plasmodium berghei*)を用いた肝臓ステージ原虫培養系の最適化

①肝内型原虫の発育の指標の確立。LISP2が肝臓ステージ後期に発現し、成熟すると肝細胞へと移行することが知られていたが、このパターンが肝内型原虫の発育と相関があるかどうか最初に検討した。その結果、肝内型原虫の大きさとLISP2の肝細胞への輸送には正の相関が認められたことから、肝内型原虫の質的な成熟の指標としてLISP2の局在パターンを用いることにした。

②DMEM high glucose, DMEM low glucose, RPMI1640, EMEMの4種類の培地を用いて培養したところ、DMEM high glucoseとRPMI1640を用いた時に、原虫の大きさおよびLISP2の局在の2つの指標で評価したところ、他の2種類に比べて有意に原虫の発育が亢進していることを見いだした。



<肝臓ステージ原虫培養の条件検討>

2000mg/Lのglucose濃度が肝内型原虫の発育には十分量であることが見いだされた。

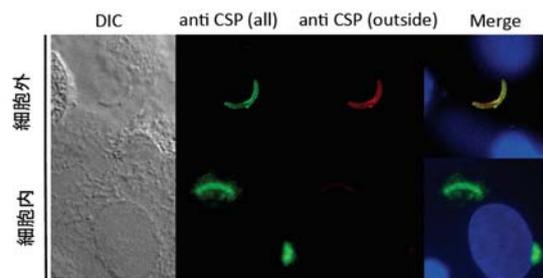
(2) 三日熱マラリア原虫(*P. vivax*)の肝臓ステージ原虫を特異的に検出する為のマーカとなる抗体の作成

PvHSP70 (2種類), PvUIS4, PvLISP1 (3種類), PvLISP2 (3種類)の部分組換えタンパク質の合成に成功した。これらの組換えタンパク質をウサギに免疫し、それぞれ抗血清を得た。

(3) マラリア流行地の患者血液の人工吸血により得られた肝細胞侵入型原虫（スポロゾイト）の培養と肝内型原虫の検出系の確立

患者血液を人工吸血法により吸血させた媒介蚊の唾液腺からスポロゾイトを回収し、肝由来培養細胞 HC-04 に添加した後、37度で培養し、6時間、4日後にホルマリン固定した。6時間後に固定したサンプルは、2種類の坑CSP (circumsporozoite protein)抗体で染めることで、スポロゾイトが細胞外にいるのか、細胞内に侵入しているのかを区別する

P. vivax in vitro culture with HC-04 cells for 6 hours

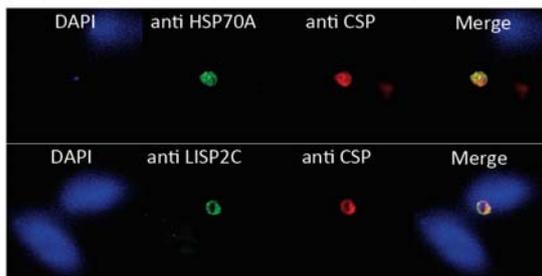


<スポロゾイトの細胞侵入評価系の確立>

方法を試みた。図に示すように、細胞外のスポロゾイトは2色で検出され、細胞内に侵入しているものは緑でのみ検出されるという結果が得られ、細胞侵入アッセイ法を確立することができた。今後、培養細胞や培養条件、あるいはスポロゾイト解剖の日にち等を含めた培養系の改良の為の評価方法が確立できた。

さらに、4日目に固定したサンプルをPvHSP70, PvLISP1, PvLISP2の抗体を用いて染色を行った。その結果、抗HSP70抗体2種類は、原虫の細胞質を認識し、抗LISP1抗体1種類、抗LISP2抗体2種類が、寄生胞膜を検出することができた。従って、発育初期-中期の肝内型原虫を検出できるマーカーとなる抗体が得られた。今後は、LISP2が三日熱マラリア原虫においても宿主肝細胞の細胞質へ輸送されて行くのか、また、これらの抗体を用いることで、休眠体と正常に発育している原虫を識別できるのか検討していく。

P. vivax in vitro culture with HC-04 cells for 4 days



<培養4日目の肝内型原虫の抗体による検出>

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

1. Niwat Kangwanrangsarn, Mayumi Tachibana, Rachaneeporn Jenwithisuk, Takafumi Tsuboi, Suda Riengrojpitak, Motomi Torii and Tomoko Ishino A member of the CPW-WPC protein family is expressed in and localized to the surface of developing ookinetes *Malaria Journal* 2013, 12:129 査読有り

[学会発表] (計17件)

1. 石野智子、杉野友香、野崎守、徳永順士、橘真由美、坪井敬文、鳥居本美 スポロ

ゾイトの細胞侵入におけるロプトリタンパク質の機能分担 第82回日本寄生虫学会大会 (ワークショップ「寄生現象の分子メカニズム」) 2013年3月30,31日 東京都

2. 野崎守、徳永順士、坪井敬文、石野智子、鳥居本美 ネズミマラリア原虫 Rhoptry neck protein 4は蚊の唾液腺への侵入に必要である 第82回日本寄生虫学会大会 2013年3月30,31日 東京都

3. 石野智子、杉野友香、徳永順士、野崎守、坪井敬文、鳥居本美 Functional analyses of sporozoite rhoptry proteins by stage-specific gene silencing system in *Plasmodium berghei*. Keystone シンポジウム 2013年1月20-25日 アメリカ合衆国、ニューオーリンズ (ルイジアナ州)

4. 徳永順士、野崎守、村田英理、坪井敬文、石野智子、鳥居本美 Screening for sporozoite rhoptry proteins in *Plasmodium*. Keystone シンポジウム 2013年1月20-25日 アメリカ合衆国、ニューオーリンズ (ルイジアナ州)

5. 新澤直明、石野智子、橘真由美、坪井敬文、鳥居本美 Phenotypic dissection of a *Plasmodium*-refractory strain of Malaria vector *Anopheles stephensi*. Keystone シンポジウム 2013年1月20-25日 アメリカ合衆国、ニューオーリンズ (ルイジアナ州)

6. 橘真由美、須藤萌、横内ゆき、石野智子、坪井敬文、鳥居本美 Identification of novel molecule that is specifically expressed on the osmiophilic bodies of male gametocyte and microgamete surface. Keystone シンポジウム 2013年1月20-25日 アメリカ合衆国、ニューオーリンズ (ルイジアナ州)

7. 石野智子、村田英理、徳永順士、橘真由美、坪井敬文、鳥居本美 Rhoptry neck protein 2 is produced in oocyst-derived sporozoites and required for salivary gland invasion. ASTMH meeting, 2012年11月11-15日、アメリカ合衆国、アトランタ

8. 石野智子、徳永順士、杉野友香、野崎守、橘真由美、坪井敬文、鳥居本

- 美 スポロゾイトロプトリー分子の機能分担 第20回分子寄生虫学ワークショップ、神戸、2012年8月26-29日 兵庫県
9. 徳永順士、村田英理、坪井敬文、石野智子、鳥居本美 マラリア原虫スポロゾイトのロプトリータンパク質の同定と発現解析 第81回 日本寄生虫学会大会 2012年3月24日 兵庫県
 10. 石野智子、村田英理、徳永順士、橘真由美、坪井敬文、鳥居本美 マラリア原虫先端部小器官(ロプトリー)に局在する分子のスポロゾイトにおける機能解析 第81回 日本寄生虫学会大会 (シンポジウム「寄生虫におけるオルガネラ進化と寄生適応」) 2012年3月23日 兵庫県
 11. 石野智子、村田英理、徳永順士、橘真由美、坪井敬文、鳥居本美 Investigation of the mechanisms how malaria sporozoites invade salivary glands Molecular Approach to Malaria 2012 2012年2月20日 オーストラリア、ローン(ビクトリア州)
 12. 新澤直明、石野智子、橘真由美、坪井敬文、鳥居本美 Functional dissection of vectorial capacity in Plasmodium-refractory Anopheles stephensi. Molecular Approach to Malaria 2012 2012年2月20日 オーストラリア、ローン(ビクトリア州)
 13. 橘真由美、須藤萌、横内ゆき、石野智子、坪井敬文、鳥居本美 Identification of novel molecule that is specifically expressed on the surface of microgamete. Molecular Approach to Malaria 2012 2012年2月20日 オーストラリア、ローン(ビクトリア州)
 14. 石野智子 Investigation of liver stage parasite development using rodent malaria parasite. Joint International Tropical Medicine Meeting 2011 (招待講演)タイ王国、バンコク 12月1-2日 2011年
 15. 徳永順士、村田英理、石野智子、鳥居本美 マラリア原虫スポロゾイトにおけるロプトリータンパク群の性状解析 第19回分子寄生虫学ワークショップ、2011年10月21日~23日、兵庫県
 16. 徳永順士、村田英理、石野智子、鳥居本美 マラリア原虫スポロゾイトのロプ

トリー分子の探索及び発現プロファイル解析 第80回 日本寄生虫学会大会 2011年3月27日 東京都

17. 石野智子、Hegge Stephan、徳永順士、村田英理、杉野友香、鳥居本美 マラリア原虫スポロゾイトの肝細胞への侵入過程の real time imaging 解析 第80回日本寄生虫学会、東京都、2011年3月27-30日

〔その他〕

ホームページ等
愛媛大学プロテオサイエンスセンター 寄生病原体学部門
<http://www.m.ehime-u.ac.jp/school/parasitology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石野 智子 (Ishino Tomoko)
愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：40402680

(2) 研究分担者

新澤 直明 (Shinzawa Naoaki)
愛媛大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：10583015

橘 真由美 (Tachibana Mayumi)
愛媛大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：00301325