

令和元年6月19日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(A) (海外学術調査)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02656

研究課題名(和文) 三日熱マラリア原虫の休眠現象とその多様性

研究課題名(英文) Deciphering hypnozoite formation of Plasmodium vivax

研究代表者

金子 修 (KANEKO, Osamu)

長崎大学・熱帯医学研究所・教授

研究者番号：50325370

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,400,000円

研究成果の概要(和文)：三日熱マラリア原虫肝細胞期における植物ホルモンの有無を、タイのマラリア患者由来の原虫を接種したヒト肝細胞キメラマウスの肝臓切片を用いて、質量分析イメージング法により解析した。まず、キメラマウスの肝臓切片標本中で肝細胞期分裂体および休眠体が観察できることを確認した後、各ステージの原虫の場所と植物ホルモンと合致するシグナルの場所を解析したが、明確な関連は認めなかった。また、トキシソプラズマで潜伏感染を制御する事が報告された植物ホルモンとその合成阻害剤を肝細胞期三日熱マラリア原虫に投与したが、休眠体と考えられる原虫の数と大きさに有意な影響は見られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

三日熱マラリア原虫はヒトへ感染後、一部が数週から数年にわたり潜伏する性質を備える休眠体となる。休眠体に効く薬剤は一部のヒトに重篤な副作用を示し、また抵抗性マラリアも出現したため、休眠体の存在はマラリア根絶計画の大きな障壁となっている。本研究により、ヒト肝細胞を移植したuPAマウスにて、肝細胞期三日熱マラリア原虫の解析ができることが明らかとなった。また、トキシソプラズマで潜伏感染を制御する植物ホルモンは、三日熱マラリア原虫休眠体の活性化には関与していない可能性を示唆する結果を得た。以上より、マラリア原虫休眠体に対する今後のより詳細な研究を展開する基盤を構築した。

研究成果の概要(英文)：To evaluate the existence of plant hormones in the liver stage Plasmodium vivax, vivax parasites obtained from infected patients in Thailand were passed through mosquitoes and inoculated to chimeric mice with human liver cells. Liver specimens were then analyzed by imaging mass spectrometry. After confirming the existence of liver stage schizonts and hypnozoites in the chimeric mice, location of parasites and location of plant hormone signals were compared, however, no clear association was seen. In addition, we evaluated liver stage P. vivax parasites for their responses against a plant hormone and an inhibitor of its biosynthesis, which have been reported to control the quiescence of Toxoplasma gondii. However, no effect was observed for the number and the size of P. vivax hypnozoites with these compounds.

研究分野：基礎医学・寄生虫学(含衛生動物学)

キーワード：マラリア 原虫 休眠 植物ホルモン

1. 研究開始当初の背景

三日熱マラリア原虫はヒトの肝細胞内に侵入した後に一部が休眠体を形成する。休眠体は肝臓の細胞に数週から数年にわたり潜伏する性質を備えている。潜伏した休眠体はなんらかのきっかけで再発し、ヒトに病害を引き起こす。休眠体には血液中のマラリア原虫に対して有効な薬も効かない。休眠体に効く市販薬はプリマキンだけであるが、抵抗性原虫の出現やその副作用が問題となっている。そのため、三日熱マラリア原虫の根絶のためには、休眠体の特徴を理解し、それらを標的とする薬を開発することが重要である。

マラリア原虫が属するアピコンプレックス門原虫は二次共生により獲得した色素体を有し、植物ホルモンを利用していることが知られている。これまでに、マラリア原虫の近縁原虫であるトキソプラズマ原虫が植物ホルモンの一種を生合成し、トキソプラズマの潜伏感染を制御する事が報告されている。そのため、三日熱マラリア原虫においても、肝臓での潜伏を担う休眠とその活性化機序について植物ホルモンが関与している可能性があると考えた。

これまでは三日熱マラリア原虫の肝細胞への感染を再現する比較的簡便なモデル動物がなかったため、休眠体の生物としての基礎的理解は著しく遅れていたが、最近、ヒトの肝臓を移植したマウスを使って休眠体が観察出来ることが報告された。そこで、このモデルを利用することにより、休眠体における植物ホルモンの役割を明らかにできるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

三日熱マラリア原虫の休眠体における植物ホルモンの役割を明らかにする。

3. 研究の方法

ヒト肝細胞を70%以上保有するuPAマウス(ヒト肝細胞キメラマウス)をタイへ輸送し、タイの三日熱マラリア患者の血液から媒介蚊への吸血により調整したスポロゾイトをヒト肝細胞キメラマウスに接種することで肝内休眠型三日熱マラリア原虫を取得し、原虫接種前後のマウス肝臓切片について質量分析イメージング法にて植物ホルモン解析を行った。トキソプラズマの潜伏感染を制御する植物ホルモンとその阻害剤の投与により、休眠体の活性化への影響を検討した。

4. 研究成果

三日熱マラリアに感染したタイの患者から得たマラリア原虫を蚊に感染させ、感染蚊から調整したヒト肝細胞侵入型原虫スポロゾイトを、日本からタイへ輸送したヒト肝細胞キメラマウスに感染させ、数日後に肝臓切片を調整し、休眠型原虫の形成を検討した。ところが、予備実験として行った赤血球期熱帯熱マラリア原虫を標的とした網羅的植物ホルモン分析では、複数の植物ホルモンを検出することができたものの、休眠型原虫については、数が予想よりもずっと少なく、レーザーダイセクションでは網羅的植物ホルモン分析を行うために十分量の原虫試料が取れない可能性が高いことが分かった。また、コラゲナーゼ灌流法により肝細胞を採集した後に、セルソーターで原虫感染肝細胞を集める方法も考慮したが、本法でも十分量の原虫試料の採取が見込めないこと、同様に、スポロゾイト期原虫の網羅的植物ホルモン分析も十分な原虫数を収集することが困難であることも分かった。再検討の結果、質量分析イメージング法によるマラリア原虫からの植物ホルモンの検出を試みることにした。三日熱マラリア原虫スポロゾイトを接種したヒト肝細胞キメラマウスから調整した肝臓切片について予備的に質量分析イメージング解析を行った結果、サリチル酸やアブシシン酸から予想されるシグナルを得ることができた。一方、原虫のステージ(分裂体と休眠体)と検出された分子の有無の関係を調べるため、質量分析イメージング解析後にギムザ染色や間接蛍光抗体法で原虫局在を検討したが、質量分析イメージングによる組織ダメージが大きく困難であった。そのため、質量分析イメージング解析前に原虫の場所を特定しておく必要があると考えた。予備実験としてmCherryもしくはGFPを発現するネズミマラリア原虫*Plasmodium yoelii*を用いて蛍光ラベル肝臓ステージ原虫の局在と検出される植物ホルモンの局在が一致することを確認する実験を行ったが、本原虫種の肝細胞期原虫数が少ない、質量分析イメージング用に乾燥させた試料での蛍光シグナルの検出が困難等の問題に直面し、結論が得られなかった。そこで、*P. yoelii*より多く調整できる三日熱マラリア原虫のスポロゾイトをCFSEもしくはCMRA orangeにて前染色した。しかし、肝細胞でみられる蛍光は鮮明でなく、原虫検出は依然として困難であった。一方、当初使用していた質量分析イメージング法のモードでは組織ダメージが大きすぎ、本研究の目的に沿わないことが早くに分かったが、シグナル特異性を上げるために、当初とは異なるモードで質量分析イメージングを行い、データ解析をするうちに、このモードでは組織のダメージが少なく、質量分析イメージング解析後のサンプルでも間接蛍光抗体法により原虫局在がわかるのではないかとこの着想を得た。その結果、スポロゾイト投与数日後の肝臓切片標本から、ダメージはあるものの明らかな分裂体を検出することができ、休眠体と思われるものも少数ながら

見出すことができた。しかし、いずれのステージの原虫においても植物ホルモンと考えられるシグナルと原虫の局在との間に明確な関連は見いだせなかった。一方、他のアピコンプレックス門原虫であるトキソプラズマにおける報告により、マラリア原虫の休眠現象に関係する可能性があると考えていた植物ホルモンについて、当該ホルモンとその合成阻害剤を三日熱マラリア原虫の休眠体に作用させたが、対照群と比べて休眠体の数と大きさに有意差は見られなかった。

以上、本研究により、ヒト肝細胞を移植した uPA マウスにて、肝細胞期三日熱マラリア原虫の解析ができることが明らかとなった。また、トキソプラズマで潜伏感染を制御する植物ホルモンは、三日熱マラリア原虫休眠体の活性化には関与していない可能性を示唆する結果を得た。以上より、マラリア原虫休眠体に対する今後のより詳細な研究を展開する基盤を構築した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計3件)

Jivapetthai A, Pewkliang Y, Limudompon P, Kokkonda S, Sattabongkot J, Hongeng S, Rathod PK, Kaneko O, Patrapuvich R. A novel in vitro model of *Plasmodium vivax* hypnozoites. *US-Japan Cooperative Medical Sciences Program 21st International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim*. (2019) (口頭、招待)

Kangwanransan N, Praikongkatham C, Roobsoong W, Jenwithisuk R, Pankao V, Kaneko O, Sattabongkot J. *P. vivax* liver stage maturation and hypnozoite formation in humanized uPA/SCID mice. *The 17th Awaji International Forum on Infection and Immunity*. (2018) (ポスター/ショート口頭)

Patrapuvich R, Jivapetthai A, Pewkliang Y, Limudompon P, Chaiyawong N, Hongeng S, Rathod PK, Kaneko O. A novel in vitro model of *Plasmodium vivax* hypnozoites. *US-Japan Parasitic Disease joint meeting*. (2018) (口頭)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

<http://www.tm.nagasaki-u.ac.jp/protozoology/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

永宗 喜三郎 (NAGAMUNE, Kisaburo)
国立感染症研究所・寄生動物部・室長
研究者番号：9 0 3 1 4 4 1 8

久保 亜紀子 (KUBO, Akiko)
慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・特任講師
研究者番号：5 0 4 5 5 5 7 3

(2)研究協力者

宮崎 真也 (MIYAZAKI, Shinya)

ナタワット チャイヤウォン (CHAIYAWONG, Nattawat)

ジェットサモン サタボンコット (SATTABONGKOT, Jetsumon)

ワンラパ ローブスーン (ROOBSOONG, Wanlapa)

ラチャニポーン ジェンウィティスク (JENWITHISUK, Rachaneeporn)

ニワット カンワンランサン (KANGWANRANGSAN, Niwat)

ラパブーン パトラブビッチ (PATRAPUVICH, Rapatbhorn)

プラディップシン ラソッド (RATHOD, Pradipsinh)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。