

平成22年 5月28日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790322

研究課題名（和文）重症マラリア発症に伴う貧血に関わる宿主分子群の解析

研究課題名（英文） Research of host molecules associated with the pathogenesis of severe malarial anemia

研究代表者

畑生 俊光 (HATABU TOSHIMITSU)

群馬大学・医学部・助教

研究者番号：60344917

研究成果の概要（和文）：重症マラリアの合併症として重要な貧血に関わると推察される宿主因子であるスカベンジャーレセプターについて、class A に属する3種類を標的に強制発現細胞の作成を行った。本研究年度については Scavenger receptor-A および MARCO について強制発現細胞の作製ならびに分子内変異株の作製を行った。その結果、MARCO も SR-A 同様熱帯熱マラリア原虫感染赤血球との接着を認めた。また、分子内変異株の作製とそれに対するマラリア原虫感染赤血球との接着試験結果より、SR-A と MARCO では類似の分子構造にもかかわらず分子内の接着部位が異なることが明らかとなった。以上のことから、class A スカベンジャーレセプターは、マラリア原虫感染赤血球に対する宿主側の受容体として機能することが推察でき、重ねて重症マラリアにおける貧血との関連が強く推察できた。

研究成果の概要（英文）：Severe falciparum malaria such as cerebral malaria and severe anemia is leading cause of morbidity and mortality. *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells (pRBCs) adhere to the endothelial cells via receptors expressed on the surface of the endothelial cells, sequester in the microvasculature of several organs. Severe anemia which may be due to a number of factors including rupture of the pRBCs and phagocytosis of pRBCs is another cause of death. However, the molecular mechanism underlying both the cytoadherence and erythrophagocytosis related with severe malaria is not completely understood. Here, we report that the pRBCs bind to the class A scavenger receptors, SR-A and MARCO, which is expressed on the surface of the activated phagocytes.

To identify the cytoadherence of pRBCs to SR-A and MARCO, human SR-A or MARCO cDNA was transfected to CHO cells (CHO-SR-A or CHO-MARCO cells). Furthermore, several mutants of both molecules were made to identify the sites related with pRBC adherence. pRBCs adhered to the both CHO-SR-A and CHO-MARCO cells, but not to the CHO-mock cells. The pRBC did not observed adherence to the deletion mutants of SRCR domain in both scavenger receptors.

These results may suggest that both SR-A and MARCO acts as a host factor related with cytoadherence of the pRBCs, and contribute to our present understanding the pathology of severe falciparum malaria.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学（含衛生動物学）

キーワード：マラリア、貧血、スカベンジャーレセプター、パターン認識分子

1. 研究開始当初の背景

熱帯熱マラリアは、早期に適切な治療が行われない場合、合併症を併発し重症熱帯熱マラリアへと移行する。重篤な合併症として、脳マラリアや重症正球性貧血が知られている。前者は、マラリア原虫感染赤血球 (pRBC) が血管内皮細胞に宿主接着因子を介して接着し、深部臓器の血管閉塞から多臓器不全様症状が誘発される。一方後者は血管内容血と造血抑制、脾臓等における pRBC の排除により誘導されると説明されている。特に貪食細胞による pRBC の破壊処理がその後の免疫誘導等を鑑みて重要である。これらのことから重症化機構に関与する現象として、pRBC の宿主細胞への接着が最も重要な現象と考えることができ、過去の研究により原虫側・宿主側の接着関連分子が数多く同定されている。しかしながら、既知の宿主分子のみではこれら合併症の発症機構を説明できていないため、未知の宿主側因子の存在が推察されている。特に熱帯熱マラリアの病態において重要な貧血発症機構に関与する推察できる pRBC 貪食に関する報告はほとんど無い。現在の研究の主流は、未知の宿主因子の同定ではなく既知の宿主因子を利用した発症機構モデルの構築であるが、こちらも未だ確立されていない。

2. 研究の目的

重症マラリアの合併症として重要な貧血に関わると推察される宿主因子であるスカベンジャーレセプターについて、本研究年度については前倒して行っていたスカベンジャーレセプター2種類 (MARCO, SR-A) について強制発現細胞の作成を行い、pRBC に対する宿主接着因子であることおよび接着様式・接着部位の確認を目的として研究を行った。

また、貪食細胞による pRBC の貪食および pRBC 貪食後の貪食細胞機能解析を行うことを目的として、卵白アルブミン (OVA) あるいは緑色蛍光蛋白質 (GFP) 強制発現 pRBC の作製のための発現用コンストラクトの作製も行った。

3. 研究の方法

ヒト単核球細胞株およびヒト臍帯血管内皮細胞より Total RNA を回収後、cDNA を合成し、そこから MARCO, SR-A それぞれの cDNA を合成した。これらを哺乳類動物細胞発現用ベクター pcDNA3.1 に組み込み、CHO-K1 細胞に遺伝子導入することにより強制発現細胞株を樹立した。それぞれの強制発現細胞株をクローン化した後、pRBC と試験管内で共培養し、強制発現細胞株に対する pRBC の付着を、細胞をギムザ染色することで可視化し観察した。また、pRBC との接着に関与するそれぞれの分子内領域を決定するために、各分子の分子内領域変異株を作製し、上記と同様に pRBC 細胞接着試験を行った。

また、同定したスカベンジャーレセプターを介した pRBC 貪食とその結果生ずると推測できる貪食細胞機能変化・抗原提示能の解析を行う目的で、マラリア原虫用遺伝子強制発現ベクター (pHC1) に OVA および GFP 遺伝子の組み込みを行った。

4. 研究成果

本研究では、マラリア重症化の際に認められる貧血発症機構の解明を目的とした。貧血の一つの機構として、マラリア原虫感染赤血球 (pRBC) の貪食細胞による処理が考えられる。申請者は、貪食細胞表面に発現し pRBC との接着に関与すると推察される因子の同定を最初に行った。研究の結果、スカベンジャーレセプター4種類を同定することに成功した。

4種類のスカベンジャーレセプターのうち、本研究年度は、SR-A および MARCO に関して詳細に検討した。細胞接着試験の結果、MARCO は若い発育時期の pRBC が成熟 pRBC よりも接着することが判明した (図 1)。

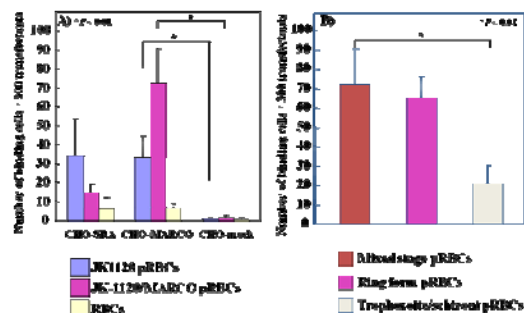


図 1) MARCO に対する pRBC の接着

SR-A については若い pRBC よりも成熟 pRBC の接着が優位であった(図 2)。

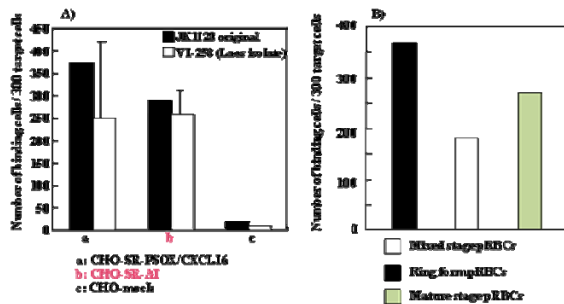


図 2) SR-A に対する pRBC 接着

また、それぞれの分子を使用して pRBC の選抜を行うとそれぞれの分子に対して優位に接着する pRBC の作出ができたことから、それぞれの分子に対するマラリア原虫由来のリガンドの存在が推察できた。

本研究で確認した 2 種類のスカベンジャーレセプターは、pRBC 接着因子として同様の機能を持つ 2 分子であると考えられ、類似の分子内構造を有する。MARCO も SR-A も分子内の SRCR 領域が既知のリガンドとの接着部位であることが知られている。そこで、pRBC に対する接着領域を確認する目的で、それぞれの分子内 SRCR 領域の変異株を作出し、pRBC との細胞接着試験を行った。その結果、両分子ともに SRCR 領域が pRBC の接着に関与していることが明らかになった。詳細に検討した結果、MARCO については SRCR 領域内の 447 番目と 508 番目のシステイン間で形成される SS 結合の結果生じるループ構造が pRBC と MARCO の接着に関与していることが明らかとなった(図 3)。

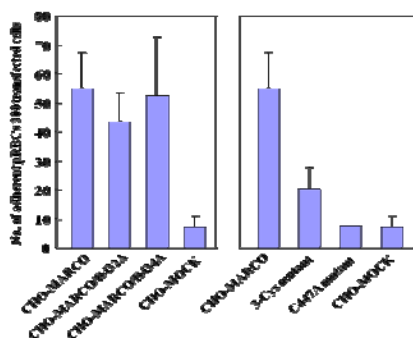


図 3) pRBC と MARCO の接着は SRCR 領域内 447 番目と 508 番目のシステインで形成される構造が重要である。

一方、SR-A に関しては、SRCR 領域内 351 番目のアルギニンをアラニンに置換すると pRBC の接着が抑制されることが明らかとなった(図 4)。

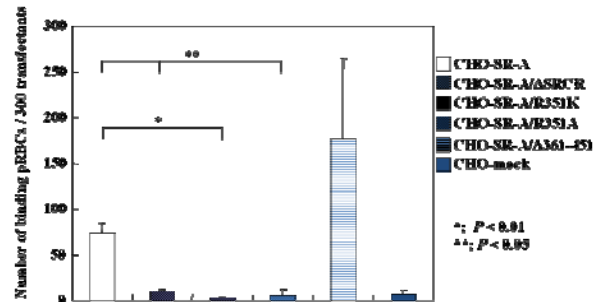


図 4) pRBC と SR-A の接着は SRCR 領域内 351 番目のアルギニンが重要である

これらの結果から、SR-A と MARCO は、分子内 SRCR 領域を pRBC との接着に利用していることは共通であるが、pRBC との接着に利用している部位が異なることが明らかとなった。

また、将来的に同定したスカベンジャー受容体を介した pRBC 貪食機構の解析および抗原提示能等の貪食細胞機能解析を行うために、外部抗原発現熱帯熱マラリア原虫の作出を試みる必要がある。そこで、OVA 発現 pRBC 作製のために熱帯熱マラリア原虫発現ベクターに OVA を組み込んだ pHCl/OVA および GFP 遺伝子を組み込んだ pHCl/GFP の作製を試みた。その結果、pHCl/OVA の作製に成功した

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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

① 雨宮健司、畑生俊光、嶋田淳子 スカベンジャーレセプター MARCO は分子内 SRCR domain でマラリア感染赤血球と接着する。第 8 回 沖縄フォーラム、2010. 02. 11-13, 宜野湾市, 沖縄

② 畑生俊光、嶋田淳子 Scavenger receptor-A は分子内 cysteine-rich 領域で熱帯熱マラリア原虫感染赤血球を認識する。第 8 回 沖縄フォーラム、2010. 2. 11, 宜野湾市, 沖縄

③ 畑生俊光、嶋田淳子 Scavenger receptor-A は分子内 cysteine-rich 領域で熱帯熱マラリア原虫感染赤血球を認識する。分子寄生虫マラリアフォーラム、2009. 10. 11, 千里ライフサイエンスセンター、大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

畑生 俊光 (HATABU TOSHIMITSU)

群馬大学・医学部・助教

研究者番号：60344917