

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580445

研究課題名(和文) アピコンプレックス門原虫の新規治療・予防法の開発

研究課題名(英文) Development of the new treatment, prophylaxis of the phylum Apicomplexa

研究代表者

笹井 和美 (SASAI, Kazumi)

大阪府立大学・生命環境科学研究科(系)・教授

研究者番号：70211935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：アピコンプレックス門原虫である *Plasmodium berghei* (Pb) 及び *Cryptosporidium parvum* (Cp) の先端の細胞骨格抗原を認識するモノクローナル抗体 (mAB) が認識する抗原を免疫組織学的、及び分子生物学的手法により解析し、mAB の標的抗原が elongation factor-1 (EF-1) であることが判明した。これらの結果から、EF-1 が寄生虫による宿主細胞侵入に重要な役割を演じている可能性が示唆された。よって mAB が認識する抗原が、クリプトスポリジウム症に対するワクチン候補となりうる抗原である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The antigens in apical complex of *Cryptosporidium parvum* and *Plasmodium berghei* recognized were analyzed by monoclonal antibody (mAB). From these results, the possibility that EF-1a played the role that was important to the host cells invasion due to the parasitic worm was suggested. Thus, the possibility that the antigen which mAB recognized was the antigen which could become a vaccine candidate for the cryptosporidiosis and Malaria was suggested.

研究分野：獣医臨床学

科研費の分科・細目：臨床獣医学

キーワード：Apicomplexa Apical complex モノクローナル抗体 感染防御

1. 研究開始当初の背景

原虫の宿主細胞への迅速な侵入は、原虫細胞の形態の維持・変形、細胞内の物質移動を担う細胞骨格構成線維のひとつである microfilament の運動性と (Mol Biochem Parasitol. 2010 173(1):39-42.)、 apical complex (図 1) の microneme, rhoptry および dense granule といった細胞小器官から分泌される特定の蛋白質によって制御されると考えられている (J Biol Chem. 2009 284(39):26839-50.)。Apicomplexa の microneme に内蔵される蛋白質はすでにいくつか報告されており、それらは宿主細胞の認識、接着、侵入および原虫の運動性に関与することが示唆されている (PLoS Pathog. 2009 5(1):e1000273.)。また侵入型虫体の頭頂部に位置する conoid は、らせん状構造の微小管により形成される円錐形の構造物であり、*Toxoplasma gondii* において宿主細胞への侵入時にカルシウムイオン依存性に、この構造物が突出して侵入することが報告されている (PLoS One. 2009 4(10):e7406.)。conoid を構成する蛋白質やその詳細な役割に関して不明な点が多い。

当研究グループにおいて作製された conoid を認識するニワトリ型モノクローナル抗体 (以下、抗 conoid 抗体、図 3) は、*in vitro* で宿主細胞への原虫の侵入を阻害することが判明している (申請者 J Parasitol. 1998 84(3):654-6, 申請者, Vet Parasitol. 2005 128(1-2):47-57.)。また、原虫由来の Heat shock protein 90 (以下 HSP90) は、宿主環境への適応、増殖および宿主細胞の攻撃からの防御に係わるとされ、免疫原性が高いことが知られている (Malar J. 2010 Aug 19;9:236.)。これまでに、*Plasmodium falciparum* や *T. gondii* などのいくつかの Apicomplexa 門に属する原虫において、原虫の産生する HSP 90 が宿主細胞への侵入や宿主細胞内での成長に重要な役割を果たすという報告がなされている (Int J Parasitol. 36(10-11):1205-15.)。

そこで、申請者の研究室では、鶏型モノクローナル抗体作製系を利用することにより特異的抗体の作製を試みてきた。その結果、Apicomplexa 門に属するアイメリアの conoid を認識する鶏型モノクローナル抗体が (図 3)、クリプトスポリジウムだけでなく、分類学上で近縁なトキソプラズマ、ネオスポーラ、マラリアなどの多くの Apicomplexa 門に属する原虫と交差性を有することを証明した (J Parasitol. 1998 84(3):654-6., Vet Parasitol. 2005 128(1-2):47-57.)。具体的には、鶏にのみ感染するアイメリア原虫において、マウスのモノクローナル抗体では感知し得なかったタンパク質が同定された。そのタンパク質は、虫体の先端に存在する 21kDa の分子量で、そのタンパク質は、細胞への侵入に深く係わっていることを報告した (図 3、J

Parasitol. 1996 82(1):82-7.)。さらに、その後の解析で、このタンパク質は、トキソプラズマ、ネオスポーラ、クリプトスポリジウム、マラリアなどの Apicomplexa に属する原虫において広く発現している可能性が示唆された。更に、クリプトスポリジウム原虫においては、これまでに報告のない 48kDa のタンパク質として存在し、このタンパク質を認識する抗体をクリプトスポリジウムに処置した場合、原虫の培養細胞への侵入が有意に抑制されることが判明した (Vet Parasitol. 2005 128(1-2):47-57.)。更に、*E. tenella* の microneme 蛋白および HSP90 を認識するモノクローナル抗体を作製し、他の *Eimeria* 属原虫との交差性を検討したところ、*E. acervulina*、*E. maxima* と交差性を有することが判明した (文献 (8)、J. Parasitol. 2008 94(6):1432-4.)。

上記の抗体を用いて、Apicomplexa 門原虫に対する共通のワクチン候補となる抗原蛋白を解析し、ワクチン療法の一助とする。更に抗 conoid 抗体をコードする遺伝子を同定し、大腸菌にて一本鎖リコンビナント抗体を作製し、超可変領域の原虫との反応性を検討する。原虫に対する反応が優れた抗体を、感染実験のため、マウス化抗体に置換し、マウスを用いてマラリアの治療効果を検討する。マウスの感染実験にて良好な成績が得られた抗体について、ヒト、ウシ、ニワトリなどの動物に使用可能なリコンビナント抗体を作製し、治療・予防法が確立されていない Apicomplexa 門に属する原虫の制圧の一助とする。

2. 研究の目的

原虫はヒトおよび動物に重篤な疾病を引き起こし、罹患したヒトおよび動物の生命を脅かす。なかでも、Apicomplexa 門に属する原虫には、マラリア、トキソプラズマ、クリプトスポリジウムなどの人と動物に共通感染性を有するものや、産業動物に多大な被害を及ぼす、ネオスポーラ、鶏コクシジウム、バベシア、タイレリアなどが含まれる。Apicomplexa 門に属する原虫は、多大な研究費を使用し多くの研究者がその治療・予防法を開発しようと試みているが、薬剤耐性株の出現、抗原虫薬の環境汚染等の問題が出現し、未だその成果が認められない。本研究では、Apicomplexa 門に属する全ての原虫の宿主細胞侵入型虫体とその前端に保有する apical complex と呼ばれる特徴的な複合構造体に着目し、全ての Apicomplexa 門に属する原虫に共通する抗原に対する特異的な抗体を利用して、新しい原虫の治療法・予防法を開発を試みる。

3. 研究の方法

Apicomplexa 門に属する原虫の治療・予防法は、有効なワクチンが現存せず、薬剤耐性株の出現など多くの問題を含む。本研究により作製した組換えリコンビナント抗体による治療法や抗体の認識する抗原による

新たな新規ワクチン療法などの基礎的データを得ることにより、現在、予防・治療が困難な Apicomplexa 門に属する原虫の感染防御の一助とする。平成 23 年度には一本鎖抗体の反応性を免疫組織化学、及び分子生物学的手法を用いて確定する。平成 24 年度には感染実験用のマウス化リコンビナント抗体を作製し、その反応性を同様に検討する。最終年度の平成 25 年度にはマウスを用いたマラリア感染実験を実施し、リコンビナント抗体の有用性を検討する。更に抗 Mic2 抗体、及び抗 HSP 90 抗体についても同様の実験を実施し、それぞれの有用性を検討する。

4. 研究成果

アピコンプレックス門に属する原虫は、脊椎動物に感染する偏性細胞内寄生虫である。すべてのアピコンプレックス門に属する原虫は宿主細胞侵入型虫体にアピカルコンプレックスを所有し、アピカルコンプレックスは原虫の前端に位置し、宿主細胞侵入に関与している。以前、我々は、*E. acervulina* スポロゾイトの先端の細胞骨格に位置する抗原を特異的に認識する鶏型モノクローナル抗体(mAB)を作製した。このmABが認識する抗原は、他のアイメリア属 spp.、トキソプラズマ、*Neospora* とクリプトスポリジウムを含む Apicomplexan 寄生虫の間で保存されていた。本研究において、*Plasmodium* 属原虫であるげっ歯類に感染するネズミマラリア原虫 *Plasmodium berghei* (Pb)との交差性の有無、および PB 侵入型虫体であるメロゾイト(Pmero)宿主細胞への侵入に及ぼす影響、及び *Cryptosporidium parvum* の先端の細胞骨格抗原を特定して、クリプトスポリジウム症に対する標的分子としてその可能性を評価した。間接免疫蛍光法において mAB の *C. parvum* スポロゾイトに対する反応性と抗 - と抗 - -チューブリン抗体のそれらと類似していた。免疫電子顕微鏡法による観察において、mAB によりアピカル領域の表面と内膜の下に抗原を検出した。mAB は、*C. parvum* の宿主細胞への侵入を有意に阻害した。PB の Pmero と Pmero を含むシゾンに対して mAB が反応したことから、mAB が PB の Apical complex を認識している可能性が考えられた。また、mAB が濃度依存的に感染赤血球のリングステージへの発育を抑制する結果を示したことから、mAB が Pmero の正常赤血球への侵入に影響を与えると考えられたトリプシンペプチドの MALDI-TOF/MS と LC-MS/MS 分析で、mAB の標的抗原が elongation factor-1 (EF-1)であることが判明した。これらの結果から、*C. parvum* EF-1 が寄生虫による宿主細胞侵入に重要な役割を演じている可能性が示唆された。よって mAB が認識する抗原が、クリプトスポリジウム症に対するワクチン候補となりうる抗原である可能性が示唆された。

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2件)

1. Matsubayashi M, Kimata I, Uni S, Lillehoj HS, Matsuda H, Furuya M, Tani H, and Sasai K. Elongation Factor-1 α is a Novel Protein Associated with Host Cell Invasion and a Potential Protective Antigen of *Cryptosporidium parvum*. *The Journal of Biological Chemistry*. 査読有、288(47)、2013、34111-34120、DOI: 10.1074/jbc.M113.515544
2. Koyashiki-Nagano S., Matsubayashi M., Kimata I., Furuya M., Tani H., Sasai K. Infectivity of *Cryptosporidium andersoni* Kawatabi type relative to the small number of oocysts in immunodeficient and immunocompetent neonatal and adult mice. *Parasitol. Int.*、査読有、62(2)、2013、109-111、DOI: 10.1016/j.parint.2012.11.001

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

笹井 和美 (SASAI. Kazumi)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授
研究者番号：70211935

(2)研究分担者

谷 浩行 (TANI Hiroyuki)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：00305658
古家 優 (FURUYA Masaru)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教
研究者番号：30500706
松林 誠 (MATSUBAYASHI Makoto)
独立行政法人 農業・食品産業総合研究機構
動物衛生研究所・主任研究員
研究者番号：00321076

(3)連携研究者
()

研究者番号：