

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：10105

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659208

研究課題名(和文) 幹細胞技術を応用したマラリア原虫の赤血球侵入機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of malaria erythrocyte invasion system using stem cell technology

研究代表者

加藤 健太郎 (KATO, Kentaro)

帯広畜産大学・原虫病研究センター・特任准教授

研究者番号：30401178

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト臍帯血造血幹細胞及びマウスES細胞から誘導分化させた赤血球様細胞について熱帯熱マラリア原虫の感染を確認した。in vitroにおいて幹細胞から成熟赤血球を効率よく作製する技術の構築を中心に行った。胚性幹細胞や人工多能性幹細胞を取り扱う前段階として、CD34陽性造血幹細胞を臍帯血から分離、培養する技術の習得を行った。その後、サイトカインの種類、濃度、培養期間など様々な因子を調整し、脱核まで至る赤血球を効率よく得られる条件の検討を行った。さらに特定分子が欠損した分化赤血球の作製を行うため、分化赤血球への遺伝子組換えの導入法としては、レンチウイルスベクターを用いたシステムの構築を試みた。

研究成果の概要(英文)：We confirmed the invasion of Plasmodium falciparum using erythrocyte like cells from human umbilical cord blood hematopoietic stem cell and mouse ES cells. The establishment of effective production system of mature erythrocyte from stem cell has been mainly proceeded. Before the treatment of ES cell and iPS cell, the technique that CD34 positive hematopoietic stem cell are isolated from umbilical cord blood and cultured have been mastered. Afterwards, we investigated the effective condition to lead enucleation with arrangement of class, concentration of cytokine, and culture period. Moreover, to produce the differentiated erythrocyte mutant with specific protein deficient, we tried to establish the transfection system of differentiated erythrocyte using lentivirus vector.

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：マラリア原虫 幹細胞 赤血球

1. 研究開始当初の背景

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、マラリアワクチン開発の研究が世界規模で行われているが、マラリア撲滅には至っていない。マラリア研究はワクチン・抗マラリア薬開発を目的として、赤血球侵入についての研究が国内外で盛んに行われてきた。ワクチン等のターゲットになる原虫膜抗原とそのレセプターの同定には、主に患者由来の特定の赤血球膜蛋白質が欠損したミュータント赤血球が用いられてきたが、赤血球には増殖能力がなく、ミュータント赤血球は希少であり、新鮮な状態で入手することは困難である。また、特定の表面蛋白質がうまく欠損した赤血球の存在は稀であり、入手できても溶血のため正確な解析ができないため、凍結保存も難しい。このような状況で我々はマラリア原虫の赤血球侵入レセプターの解析を行ってきたが、レセプター遺伝子が欠損した患者赤血球が手に入らない場合はトリプシンなどの消化酵素を用いて間接的に赤血球の膜表面蛋白質や糖鎖を修飾することでレセプターを消失させる以外に方法がない。このため、実際の感染状態における最終的なレセプター同定の証明を行うことは難しい。

我々の研究室ではウイルスの表面蛋白質や原虫の膜蛋白質に対する宿主細胞レセプター同定系の確立に成功した(Anal Biochem. 389:80-2)。この過程で、熱帯熱マラリア原虫の主要な複数の膜抗原の赤血球膜レセプターがヘパラン硫酸であることも同定している(J Biol Chem. 284:13648-59.)。しかし、上記の通りマラリア原虫の最終的なレセプター同定の証明が困難であるため、本研究計画では原虫宿主細胞である赤血球への人為的な操作を可能とする系の確立を目指す。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、幹細胞から誘導分化

させた赤血球様細胞を用いたマラリア原虫の培養系とマウス感染動物モデル系の確立を行うことで、現在まで不可能であった宿主細胞である赤血球に対する遺伝子操作を可能とし、感染レセプター等の感染に重要な因子の直接的な解析を行うことにある。

3. 研究の方法

(1) 幹細胞や株化細胞から分化誘導された赤血球様細胞を用いた熱帯熱マラリア原虫の感染実験

ヒト臍帯血造血幹細胞、ヒト ES 細胞、マウス ES 細胞(MEDEP)から分化させた赤血球様細胞を用いて、すでに *in vitro*での培養系が確立している熱帯熱マラリア原虫の赤血球侵入(感染)の解析を行う。解析は invasion assay あるいはリング型虫体に対する特異抗体を用いた IFA 等により、感染率を出すことで行う。なお、熱帯熱マラリア原虫はマウス赤血球にも侵入するが、増殖はできない。

同様に、赤血球への分化誘導が可能であると報告されている株化細胞について赤血球様細胞を誘導し、熱帯熱マラリア原虫が侵入するかを解析する。現在解析予定の株化細胞は、ヒト血小板由来の UT-7/Epo、ヒト赤白血病細胞由来の K562、マウス白血病細胞株である Friend 細胞、その他の赤血球への誘導の可能性があると考えられる株化細胞について感染性の解析を行う。

(ii) 特定分子が欠損した分化赤血球の作製

分化赤血球への遺伝子組換えの導入法としては、ES 細胞で実績のあるレンチウイルスベクターを用いる方法を予定しており、Short hairpin RNA 導入による RNA 干渉法(RNAi)と外来遺伝子導入(GFP等のマーカー遺伝子)を一度に行えるシステムを構築する。

4. 研究成果

ヒト臍帯血造血幹細胞、及びMEDEPから誘導分化させた赤血球様細胞について熱帯熱マラリア原虫の感染を確認した。*in vitro*において幹細胞から成熟赤血球を効率よく作製する技術の構築を中心に行った。胚性幹細胞(ESC)や人工多能性幹細胞(iPSC)を取り扱う前段

階として、CD34陽性造血幹細胞を臍帯血から分離、培養する技術の習得を行った。その後、分化誘導法の検討を行った。先行研究を参考に、サイトカインの種類、濃度、培養期間など様々な因子を調整し、脱核まで至る赤血球を最も効率よく得られる条件の検討を行った。しかし、まだ十分な効率とはいえず、マラリア原虫の感染を確認するに至っていない。したがって、今後さらに効率の良い条件を見いだす必要性がある。

さらに特定分子が欠損した分化赤血球の作製を行うため、分化赤血球への遺伝子組換えの導入法としては、ES細胞で実績のあるレンチウイルスベクターを用いて、Short hairpin RNA導入によるRNA干渉法 (RNAi) と外来遺伝子導入 (GFP等のマーカー遺伝子) を一度に行えるシステムの構築を試みた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計5件) 全て査読有り。

Recueno FC, Kobayashi K, Ishiwa A, Enomoto-Rogers Y, Fundador NGV, Sugi T, Takemae H, Iwanaga T, Murakoshi F, Gong H, Inomata A, Horimoto T, Iwata T, **Kato K (corresponding author)**. Gellan sulfate inhibits *Plasmodium falciparum* growth and invasion of red blood cells *in vitro*. *Scientific Reports*. (Nature Publishing Group) 4:4723. (2014) 帯広畜産大学プレスリリース、東京大学大学院農学生命科学研究科研究成果 (2014年4月23日) 十勝毎日新聞記事掲載 (2014年5月2日1面) UTokyo Research 記事掲載 (2014年5月14日) 北海道新聞記事掲載 (2014年5月22日朝刊29面) Kobayashi K, Takano R, Takemae H, Sugi T, Gong H, Recueno FC, Iwanaga T, Horimoto T, Akashi H, **Kato K (corresponding author)**. Analyses of interactions between heparin and the apical surface proteins of *Plasmodium falciparum*. *Sci Rep*. (Nature Publishing Group) 3:3178. (2013) 帯広畜産大学プレスリリース、東京大学大学院農学生命科学研究科プレスリリース (2013年11月13日) Todai Research 記事掲載 (2013年11月21日) 日経産業

新聞記事掲載 (2013年11月21日11面) 十勝毎日新聞記事掲載 (2013年11月25日24面) 北海道新聞記事掲載 (2013年11月26日朝刊25面)

Iwanaga T, Sugi T, Kobayashi K, Takemae H, Gong H, Recueno FC, Ishiwa A, Horimoto T, Akashi H, **Kato K (corresponding author)**.

Characterization of *Plasmodium falciparum* cdc2-related kinase and the effects of a CDK inhibitor on the parasites in erythrocytic schizogony. *Parasitol Int*. 62: 423-430. (2013) *Malaria Nexus* 記事掲載 (2013年6月6日)

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)

Kobayashi K, Takemae H, Sugi T, Gong H, Recueno F, Iwanaga T, Horimoto T, Akashi H, **Kato K (corresponding author)**. *Jpn J Vet Parasitol*. 11: 23. (2012)

[学会発表] (計13件)

Recueno Frances Cagayat、Herbas Maria Shirley、杉達紀、竹前等、高野量、村越ふみ、石和玲子、**加藤健太郎** " Lambda carrageenan treatment induces cerebral malaria in BALB/c mice infected with *Plasmodium berghei* ANKA" 第83回日本寄生虫学会、愛媛大学 (愛媛県松山市), 2014. 3

高野量、竹前等、杉達紀、田坂修也、**加藤健太郎** "マラリア原虫感染赤血球における分泌タンパク質のインタラクトーム解析" 第83回日本寄生虫学会、愛媛大学 (愛媛県松山市), 2014. 3

Frances Recueno、小林郷介、石和玲子、ロジャース有希子、Noreen Fundador、杉達紀、竹前等、岩永達也、村越ふみ、猪又敦子、堀本泰介、岩田忠久、**加藤健太郎** " Assessing the microbial polysaccharide gellan gum and its sulfated derivative on their inhibition of growth of *Plasmodium yoelii* 17XL in

BALB/c mice" 第 156 回日本獣医学会, 岐阜大学 (岐阜県岐阜市), 2013. 9

高野 量、田坂修也、**加藤健太郎** "マラリア原虫分泌蛋白質のインタラクトーム解析" 第 21 回分子寄生虫学ワークショップ, 神戸セミナーハウス (兵庫県神戸市), 2013. 8

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 回日本寄生虫学会, 東京医科歯科大学(東京都文京区), 2013. 3

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 回日本寄生虫学会, 東京医科歯科大学(東京都文京区), 2013. 3

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, 神戸セミナーハウス (兵庫県神戸市), 2012. 8

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 -carrageenan on the course of infection of *Plasmodium yoelii* in BALB/c mice" 第 20 回分子寄生虫学ワークショップ, 神戸セミナーハウス (兵庫県神戸市), 2012. 8

小林郷介、竹前等、杉達紀、Gong Haiyan、Recuenco Frances、岩永達也、堀本泰介、明石博臣、**加藤健太郎** "ヘパリンによる侵入阻害作用に基づく抗原虫薬およびワクチン開発へのアプローチ" 第 153 回日本獣医学会, 大宮ソニックシティ(埼玉県さいたま市), 2012. 3

小林郷介、岩永達也、Recuenco Frances、竹前等、杉達紀、Gong Haiyan、石和玲子、堀本泰介、明石博臣、**加藤健太郎** "熱帯熱

マラリア原虫由来ヘパリン結合性タンパク質を用いた増殖阻害抗体の誘導" 第 81 回日本寄生虫学会, 兵庫医科大学 (兵庫県西宮市), 2012. 3

岩永達也、**加藤健太郎**、杉達紀、小林郷介、堀本泰介、明石博臣 "熱帯熱マラリア原虫のサイクリン依存性キナーゼ(CDK)相同遺伝子及び CDK 阻害剤の原虫増殖への影響の解析" 第 81 回日本寄生虫学会, 兵庫医科大学 (兵庫県西宮市), 2012. 3

小林郷介、**加藤健太郎** "熱帯熱マラリア原虫のヘパリン結合性タンパク質による防御抗体の誘導" 第 19 回分子寄生虫ワークショップ, 神戸セミナーハウス(兵庫県神戸市), 2011. 10

小林郷介、竹前等、杉達紀、Gong Haiyan、Recuenco Frances、岩永達也、堀本泰介、明石博臣、**加藤健太郎** "ヘパリンによる熱帯熱マラリア原虫メロゾイトの赤血球侵入阻害メカニズムの解明" 第 80 回日本寄生虫学会, 東京慈恵会医科大学(東京都港区), 2011. 7

〔図書〕(計 6 件)

加藤健太郎 「寄生虫研究 材料と方法」熱帯熱マラリア原虫の赤血球侵入試験, p.91-92, 三恵社, 2013 年

レクエンコ フランセス、**加藤健太郎** 「寄生虫研究 材料と方法」熱帯熱マラリア原虫の増殖阻害試験, p.89-90, 三恵社, 2013 年

田坂修也、**加藤健太郎** 「寄生虫研究 材料と方法」赤内期における熱帯熱マラリア原虫の培養法, p.47-50, 三恵社, 2013 年

加藤健太郎 「寄生虫研究 材料と方法」原虫プロテインキナーゼの酵素活性測定系, p.111-112, 三恵社, 2012 年

小林郷介、**加藤健太郎** 「寄生虫研究 材料と方法」ヘパリンを用いた熱帯熱マラリア原虫の同調培養法, p.37-40, 三恵社, 2012 年

岩永達也、**加藤健太郎** 「寄生虫研究 材料と方法」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, p.109-110, 三恵社, 2012 年

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.obihiro.ac.jp/~globalinfection/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 健太郎 (KATO, Kentaro)

帯広畜産大学・原虫病研究センター・特任
准教授

研究者番号：30401178

(2) 研究分担者

辻 浩一郎 (TSUJI, Koichiro)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：50179991